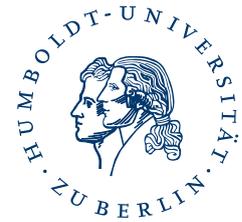


HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I
INSTITUT FÜR BIOLOGIE

Diplomarbeit
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES
DIPLOM-BIOLOGE

Immunisierungsstudien mit vom transmembranen Hüllprotein gp41
von HIV-1 abgeleiteten Hybridproteinen

vorgelegt von
Michael Rothe
Matrikelnummer: 162281

Angefertigt am Robert Koch-Institut
in der Arbeitsgruppe P13 -
Retrovirus-Induzierte Immunsuppression

Berlin, den 28.02.2007

1. Gutachter: Prof. Dr. Richard Lucius
Humboldt Universität zu Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Kurth
Robert Koch-Institut, Berlin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung von HIV und AIDS	1
1.2. Aktuelle Zahlen und Fakten zur HIV - Epidemie	1
1.3. Retroviren.....	3
1.4. Eigenschaften des HI-Virus	5
1.4.1. Aufbau des HI-Virus	5
1.4.2. HIV-1 Genomstruktur	6
1.4.3. Aufbau und Funktion der LTR - Region.....	7
1.4.4. Die Hüllproteine gp120 und gp41	7
1.4.5. Aufbau und Funktion der <i>spikes</i>	8
1.4.5.1. Morphologie der <i>spikes</i>	8
1.4.5.2. Clusterung der <i>spikes</i>	9
1.4.5.3. Strukturelle Details der <i>spikes</i>	10
1.4.5.4. Gp41 bildet die Verankerung der <i>spikes</i>	10
1.4.5.5. Zielzellerkennung durch die <i>spikes</i>	11
1.4.6. Die gp41-induzierte Membranfusion	13
1.5. HIV-1-spezifische monoklonale Antikörper 2F5 und 4E10	13
1.6. Die Epitope E1 und E2.....	14
1.7. HIV-1 Infektionszyklus.....	16
1.8. Klinik und Pathologie einer HIV-Infektion	18
1.9. Therapie und Impfstoffentwicklung.....	20
1.9.1. Allgemeine Impfstoffe	20
1.9.2. Impfstoffentwicklung bei Retroviren	21
2. Zielsetzung	25
3. Material und Methoden	26
3.1. Materialien	26
3.1.1. Chemikalien	26
3.1.2. Puffer.....	26
3.1.3. Medien.....	27
3.1.4. Primer, Sonden und Peptide	28
3.2. Mikrobiologische Methoden	29
3.2.1. Bakterienkulturbedingungen	29
3.2.2. Herstellung eines Glycerinstocks	29
3.2.3. Herstellung kompetenter Bakterien.....	29
3.2.4. Transformation	30
3.2.5. Proteinherstellung mit E.coli.....	30
3.3. Zellkultur	31
3.3.1. Zellkulturbedingungen für eukaryotische Zellen	31
3.3.2. Kryokonservierung.....	31
3.3.3. Auftauen kryokonservierter Zellen	31
3.3.4. C8166-Zellen.....	32
3.3.5. GHOST R4/R5-Zellen.....	32
3.3.6. 293-Zellen	32
3.3.7. HIV-Neutralisationsassay.....	32
3.4. Biochemische Methoden	33
3.4.1. SDS-PAGE / Gelelektrophorese	33
3.4.2. Proteinaufreinigung durch Auswaschen löslicher Proteine	34
3.4.3. Proteinaufreinigung durch Acetonfällung.....	34
3.4.4. Proteinaufreinigung durch SDS-Page und Elutrap.....	34

3.4.5. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration.....	35
3.5. Molekularbiologische Methoden.....	36
3.5.1. DNA - Isolierung.....	36
3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese.....	37
3.5.3. DNA - Konzentrationsbestimmung.....	37
3.5.4. Restriktionsverdau.....	38
3.5.5. Dephosphorylierung der 5'-Enden.....	38
3.5.6. Ligation.....	39
3.5.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	39
3.5.8. Real Time - PCR.....	40
3.6. Immunologische Methoden.....	41
3.6.1. Enzym Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA).....	41
3.6.2. Western Blot.....	42
3.6.3. Epitopkartierung.....	43
3.6.4. ECL-Detektion.....	44
3.7. Immunisierungsstudien.....	44
3.7.1. Versuchstiere.....	44
3.7.2. Immunisierungsstrategie.....	44
4. Ergebnisse.....	46
4.1. Versuchsstrategie.....	46
4.2. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	48
4.3. Herstellung der Antigene für die Immunisierung.....	48
4.3.1. Herstellung des Hybrid II-Antigens.....	48
4.3.2. Produktion und Aufreinigung von Hybrid II.....	48
4.3.3. Klonierung der modifizierten Hybrid II-Konstrukte.....	49
4.3.4. Produktion und Aufreinigung der modifizierten Hybrid II - Konstrukte.....	51
4.3.5. Herstellung der HIV-1-gp41 Antigene.....	52
4.4. Analyse der bindenden Antikörper.....	53
4.4.1. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II.....	53
4.4.2. Analyse der Induzierung von Hybrid II - spezifischen Antikörpern.....	55
4.4.3. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II C1-C4 ...	56
4.4.4. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit 293/293gp41- Zelllysat.....	57
4.5. Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der Seren.....	58
4.5.1. Seren von Tieren, die mit Hybrid II immunisiert wurden.....	58
4.5.2. Seren von Ratten, die mit modifiziertem Hybrid II - C1-C4 immunisiert wurden	59
4.5.3. Seren von Ratten, die mit gp41 transfizierten 293 - Zellen immunisiert wurden.	60
4.6. Nachweis einer KoRV-Infektion in den immunisierten Tieren.....	60
4.7. Neue Immunisierung mit den modifizierten Hybrid II-C1-C4 Konstrukten.....	63
5. Diskussion.....	65
5.1. Herstellung der Antigene für die Immunisierung.....	65
5.2. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II.....	66
5.3. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II C1-C4.....	70
5.4. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit 293 oder 293gp41- Zelllysat.....	71
5.5. Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der Seren.....	72
5.6. Analyse des Einflusses einer Infektion mit Koala-Retrovirus auf die Immunisierung mit Hybrid II und abgeleiteten Konstrukten.....	73
5.7. Wiederholung der Immunisierung mit Hybrid II C1-C4.....	75
6. Zusammenfassung.....	76
Anhang.....	77

Anhang A: Literatur- und Bildverzeichnis.....	77
Anhang B: Häufig verwendete Abkürzungen	82
Anhang C: Weitere Arbeitsmittel.....	84
Anhang D: Danksagung	86
Anhang E: Eigenständigkeitserklärung.....	87

1. Einleitung

1.1. Bedeutung von HIV und AIDS

Seit der ersten Beschreibung des Erworbenen Immundefizienz Syndroms (engl. Acquired Immunodeficiency Syndrome – AIDS) im Jahr 1981 starben über 25 Millionen Menschen an den Auswirkungen der Infektion. Ursache für AIDS ist eine Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV). Die weltweit weiter steigende Zahl von Infizierten, der bei Unbehandelten zumeist tödliche Krankheitsverlauf sowie bislang fehlende Schutzmöglichkeiten durch Impfung machen AIDS zu einer Pandemie mit katastrophalen Auswirkungen.

1.2. Aktuelle Zahlen und Fakten zur HIV - Epidemie

Neuere Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass HIV mindestens zwei Mal die Artgrenze übersprungen haben muss und sich als HIV-1 und HIV-2 dauerhaft im Menschen etablierte. Das ursprüngliche HIV-1 hat sehr große Ähnlichkeit mit den heutigen Hauptgruppen M (major, Subtypen A-K), N (new) und O (outlier) und hat nach heutiger Erkenntnis seinen Ursprung in einem SIV-Subtyp, der bei einer Schimpansen-Unterart vorkommt (*Pan troglodytes troglodytes*). Der Übertragungszeitraum für HIV-I wird in den Jahren 1920-1940 vermutet. Die älteste bekannte Blutprobe, bei der sich HIV-Fragmente nachweisen ließen stammt aus Kinshasa/Kongo aus dem Jahr 1959. HIV-1 ist dem SIV der Schimpansen genetisch ähnlicher als es HIV-1 und -2 untereinander sind. Schimpansen lassen sich auch mit HIV infizieren, zeigen jedoch keine AIDS-Symptome. HIV-2 leitet sich von einem SIV-Stamm ab, welcher bei der Rauchgrauen Mangabe (*Cercocebus atys*) zu finden ist.

Von dem anfangs unbekanntem Erreger und dem Auftreten AIDS-typischer opportunistischer Erkrankungen nahm man erstmals 1981 bei einer Gruppe infizierter Homosexueller in San Francisco Notiz. Die Betroffenen litten an einer Reihe teilweise häufig wiederkehrender oder persistierender Infektionskrankheiten: Durchfall, Fieber, verschiedene Hauterkrankungen, Atemwegsinfektionen und Lungenentzündung. Als Indikator für das Syndrom stellten sich schnell Markerinfektionen heraus die sonst fast nur im Zusammenhang mit einer Immunsuppression auftraten (Gottlieb et al., 1981): Infektionen mit *Candida albicans*, einer Hefepilzart die Candidose verursacht, dem Schlauchpilz *Pneumocystis jiroveci* welcher die interstitielle Pneumonie auslöst, persistierende Lymphadenopathie oder das Karposi-Sarkom (Siegal et al., 1981). Dieser für HIV-Infektionen typische Symptomkomplex wurde 1982, noch vor der eigentlichen Charakterisierung des HIV, vom amerikanischen NIH als AIDS

bezeichnet. Der Krankheitsverlauf war in nahezu 100% der Fälle aufgrund der opportunistischen Infektionen tödlich. 1983 gelang den Arbeitsgruppen um Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris und Robert C. Gallo am NIH die Isolierung eines bis dahin unbekanntes Retrovirus aus Blutproben symptomatischer AIDS-Patienten. Erste Bezeichnungen waren Lymphadenopathie assoziiertes Virus (Barre-Sinoussi et al., 1983) oder HTLV-III (Broder und Gallo, 1984), seine endgültige Bezeichnung erhielt das Virus 1986: HIV - Humanes Immundefizienz Virus.

Die derzeit verfügbaren Zahlen zur HIV-Pandemie werden in Tabelle 1.1. zusammengefasst.

Anzahl der HIV-Positiven 2006	Gesamt	39,5 Millionen (34,1–47,1 Mio.)
	Erwachsene	37,2 Millionen (32,1–44,5 Mio.)
	Frauen	17,7 Millionen (15,1–20,9 Mio.)
	Kinder \leq 15 Jahre	2,3 Millionen (1,7–3,5 Mio.)
HIV-Neuinfektionen 2006	Gesamt	4,3 Millionen (3,6–6,6 Mio.)
	Erwachsene	3,8 Millionen (3,2–5,7 Mio.)
	Kinder \leq 15 Jahre	530.000 (410.000–660.000)
AIDS-Tote 2006	Gesamt	2,9 Millionen (2,5–3,5 Mio.)
	Erwachsene	2,6 Millionen (2,2–3,0 Mio.)
	Kinder \leq 15 Jahre	380.000 (290.000–500.000)

Tab. 1.1. Aktuelle Zahlen zur HIV-Epidemie. Werte in Klammern geben die angenommene Unter- und Obergrenze der Schätzungen an (UNAIDS, 2006)

Besonders dramatisch ist die Situation in Afrika südlich der Sahara. Hier ist die Prävalenz wesentlich höher (5,9%) als im Rest der Welt (0,3-0,9%). Fast 25 Millionen Menschen in den betroffenen Ländern leben mit HIV, das sind 63% aller Personen mit HIV weltweit. Etwa 2,1 Millionen (1,8-2,4 Millionen) Afrikaner starben im Jahr 2006 an AIDS, dies entspricht fast drei Viertel der AIDS-Toten weltweit (UNAIDS/WHO, 2006).

Diese Zahlen machen deutlich, wie wichtig die Weiterentwicklung bereits bestehender Behandlungsmöglichkeiten und die Entwicklung eines Impfstoffes sind.

1.3. Retroviren

Begriffsdefinition: Viren sind autonome genetische Elemente, welche als Fremdbestandteile in Wirtszellen vermutlich aller Lebewesen existieren können. Viren benötigen zur eigenen Vermehrung Bestandteile des zellulären Systems, sei es zur Komplementierung nicht (mehr) vorhandener Funktionen wie z.B. bestimmter Proteasen oder zur parasitären Nutzung des zellulären Syntheseapparates für den Aufbau viraler Proteine.

Die taxonomische Einordnung von Viren aufgrund ihrer äußeren morphologischen Merkmale ist anders als z.B. bei Eucaryoten nicht möglich. Die Unterteilung in Familien erfolgt daher größtenteils aufgrund der Eigenschaften des Genoms, welche wesentlich den Vermehrungszyklus eines Virus bestimmen. Die Unterscheidungskriterien sind:

- Genom aus DNA oder RNA
- Form des Genoms im Virion (einzel- oder doppelsträngig, Positiv- oder Negativstrang, segmentiert oder kontinuierlich)
- Vorhandensein einer Membranhülle
- Symmetriefform der Kapside

Die weitere Unterteilung in Genera und Arten erfolgt nach Ähnlichkeiten im Genom wie z.B. Genanordnung und nach serologischen Kriterien.

Retroviren besitzen ein diploides Genom aus positiv orientierten, einzelsträngigen RNA-Molekülen mit 5'-Cap-Struktur und 3'-Polyadenylierung, welches unsegmentiert ist. Das Kapsid hat je nach Genus verschiedene Formen und wird von einer Hüllmembran umgeben, welche von der Wirtszellmembran stammt und daher auch einige zelluläre Oberflächenproteine trägt.

Die Familie der *Retroviridae* hat als charakterisierende Besonderheit eine Reverse Transkriptase, mit der das RNA-Genom in DNA umgeschrieben werden kann. Dies ist die zentrale Voraussetzung für diese Viren, um ihr Genom in das der jeweiligen Wirtszelle zu integrieren. Einzig bei den Hepadna-Viren gibt es eine vergleichbare DNA-Polymerase mit der Eigenschaft zur reversen Transkription (hier eine DNA- und RNA-abhängige DNA-Polymerase). Im Menschen findet man eine Reverse Transkriptase-Aktivität bei der Telomerase, der mitochondrialen γ -DNA-Polymerase sowie bei autonomen LINE-Elementen und LTR-Retrotransposons. Auf die Bedeutung der mitochondrialen γ -DNA-Polymerase wird im Zusammenhang mit der antiretroviralen Medikamententherapie eingegangen (1.9.1.).

Die Familie der *Retroviridae* wird in sieben Genera unterteilt, die sich hinsichtlich Gemeinsamkeiten bei der Infektion (Erkrankungsformen, Wirtsspezifität) sowie morphologischer und genetischer Details voneinander abgrenzen lassen (siehe Tab. 1.2.).

Je nachdem, ob ein Retrovirus sich in das Genom somatischer Zellen oder Keimbahnzellen integriert hat, wird zwischen exogenen und endogenen Retroviren unterschieden. Eine Integration in Keimbahnzellen ermöglicht die horizontale Weitergabe des viralen Genoms auf die jeweilige Tochtergeneration. Eine Infektion somatischer Zellen kann nur exogene Retroviren hervorbringen, die Weitergabe erfolgt vertikal zwischen den Zellen. Bei den humanen endogenen Retroviren hat die Endogenisierung schon vor entwicklungsgeschichtlich längerer Zeit stattgefunden. Die viralen Genome sind degeneriert, von ihnen können keine infektiös- und replikationskompetenten Virionen translatiert werden. Hinzu kommen die voran genannten LINEs und LTR-Retrotransposons, diese machen zusammen mit anderen Retroelementen über 42% des humanen Genoms aus (Bannert und Kurth, 2004).

Genus	humane Vertreter	Beispiele bei Tieren	Typ
α -Retrovirus		Rous-Sarkomvirus (RSV)	exogen
		aviäre Leukoseviren (ALV)	exogen
β -Retrovirus	HERV-K-Familie		endogen
		Maus-Mammatumortumor-Virus (MMTV)	endogen/ exogen
γ -Retrovirus		Katzen-Leukämievirus (FeLV)	exogen
		Affenleukämieviren (SLV)	exogen
	ERV3 S71-Familie		endogen endogen
δ -Retrovirus	humane T-Zell- Leukämieviren (HTLV-1/-2) HRES	bovines Leukosevirus (BLV)	exogen
		Simianes-Lymphotropes-Virus (STLV)	exogen
			endogen
ϵ -Retrovirus		diverse Fischretroviren	exogen
Lentivirus	HIV-1, HIV-2	Affen-Immundefizienzvirus (SIV)	exogen
		felines Immundefizienzvirus (FIV)	exogen
		bovines Immundefizienzvirus (BIV)	exogen
Spumavirus		feline, bovine, equine Spumaviren	exogen

Tab. 1.2. Einteilung der Retroviren

Eine weitere, früher verwendete Art der Klassifizierung von Retroviren richtet sich nach der Kapsidform und berücksichtigt daher keine Gemeinsamkeiten in genetischer Struktur und Infektionszyklus. Unterschieden werden A-Typ Viren (unreife Viruspartikel), B-Typ Viren (exzentrisches Kapsid), C-Typ Viren (zentrales Kapsid) und D-Typ Viren (konisches Kapsid).

Bei einer Retrovirusinfektion ergeben sich für die infizierte Zelle unterschiedliche Folgen:

- sie wird zerstört und stirbt ab (durch Virusproduktion und Dysregulation zellulärer Vorgänge)
- die Zelle bleibt am Leben, produziert kontinuierlich geringe Mengen viraler Partikel (persistierend)
- die Zelle bleibt am Leben, Virusgenom ist im latenten Zustand, keine Virusproduktion
- die Zelle wird durch Transformation immortalisiert, Virus liegt in latenter oder persistierender Form vor
- die infizierte Zelle wird von Immunsystem erkannt und zerstört.

1.4. Eigenschaften des HI-Virus

1.4.1. Aufbau des HI-Virus

HIV gehört zur Familie der Retroviridae, Genus Lentivirus. Die morphologischen Eigenschaften entsprechen größtenteils denen anderer Retroviren. Die Membranhülle hat einen Gesamtdurchmesser von ~100 nm und umgibt das konische Kapsid, das darin befindliche diploide Genom liegt als Nukleokapsid vor trägt alle wichtigen Merkmale einer zellulären mRNA. Das virale Genom kann daher ohne Zwischenschritte translatiert werden und ist deshalb an sich schon infektiös. In Abbildung 1.1. ist der schematische Aufbau von HIV-1 dargestellt. HIV besitzt 2 identische Kopien seines Genoms, die RNA sind an Nukleokapsidproteine (p7) angelagert. Mit jedem RNA-Strang sind je ein Molekül Integrase und Reverse Transkriptase assoziiert. Das Kapsid besteht aus mehreren hundert Kapsidproteinen (p24), in ihm befinden sich außer dem Nukleokapsid auch virale Faktoren wie Vif, Vpr, Nef (p25) sowie weitere bei der Virusassemblierung eingeschlossene Proteine. Der gesamte Komplex wird als *Virus-core* bezeichnet. Das Kapsid wird von einer Schicht aus Matrixproteinen (p17) umhüllt, die von innen der Hüllmembran aufgelagert ist. Das Matrixprotein ist durch aminoternale Myristinsäurereste mit der Virusmembran assoziiert und für die Form und die Stabilität des Viruspartikels verantwortlich. Im Zwischenraum von Kapsid und Matrix befinden sich Link-Proteine (p6), welche das Kapsid am schmalen Ende des Konus mit der Matrix verbinden. Seitlich des Kapsides befinden sich sogenannte Lateralkörperchen, Proteinkomplexe mit bislang unbekannter Funktion. Des Weiteren finden sich hier die Proteasen, welche für die Prozessierung der Vorläuferproteine bei der Virusassemblierung zuständig sind. Die Hüllmembran stammt von der Wirtszelle, in ihr ist

das transmembrane Hüllprotein gp41 eingelagert. An dieses ist das Oberflächen-Hüllprotein gp120 in nicht kovalenter Form gebunden.

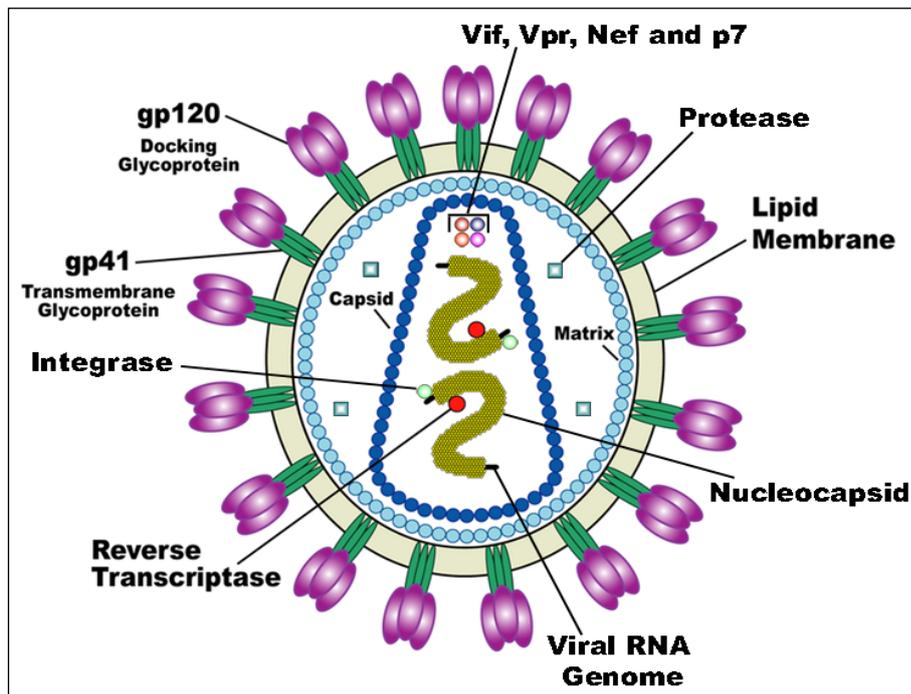


Abb. 1.1. HIV-Virion, Darstellung der Bestandteile eines Viruspartikels und deren Lokalisation.

1.4.2. HIV-1 Genomstruktur

Die genomische RNA des in dieser Arbeit verwendeten HIV Referenzstammes HIV_{III B} NL4-3 (NCBI-Locus: NC 001802) ist 9181 bp lang. Das Schema des Genomaufbaus ist bei allen Retroviren gleich. Der CAP-Struktur an 5' folgt die in sich wiederholte R-Region (redundant), daran anschließend die U5-Region (unique) mit wichtigen Sequenzen für die Provirusintegration. An der Primerbindungsstelle (PB, 18 bp) ist eine tRNA^{Lys} über das 3'-Ende mit der RNA verknüpft und bietet damit den Startpunkt für die Reverse Transkriptase zur Herstellung eines kurzen DNA-Primers. Vor dem offenen Leserahmen für *gag/pol* liegt die Leader-Region (Ψ), sie enthält die universelle Spleißdonorstelle für die posttranskriptionelle Prozessierung aller späteren prä-mRNAs sowie eine Anlagerungsstelle für die p-24 - Kapsid-Proteine.

Im Anschluss liegen die codierenden Regionen für die *gag-pol*- und *env*-Gene sowie weitere durch alternatives Spleißen hervorgehende Sequenzen. Im direkten Anschluss befindet sich ein Polypurin-Abschnitt mit einer für jeden Retrovirustyp spezifischen Abfolge von mindestens neun Adenosin- oder Guanosinresten, er ist für die Initiation der reversen Transkription wichtig. Analog dem 5'-Ende befindet sich auch am 3'-Ende eine unikale (U3) sowie eine redundante Region. Den Abschluss an 3' bildet ein Poly-A-Schwanz. Beim

Umschreiben in DNA bildet sich eine ringförmige Zwischenstruktur, um die Zweitstrangsynthese zu ermöglichen. Dabei werden aus den U3-, R-, U5- Regionen die Long Terminal Repeats (LTR) gebildet, sie sind auf beiden Seiten identisch und flankieren das Provirusgenom. Die LTRs enthalten wichtige regulatorische Sequenzen und sind entscheidend an der Provirusintegration beteiligt.

1.4.3. Aufbau und Funktion der LTR - Region

Die LTRs enthalten identische Sequenzfolgen und haben auch die gleiche Orientierung. Das LTR enthält alle cis-aktiven Sequenzen, alle Promotor- und Enhancer - Elemente. Für die Induzierung der Transkription viraler Gene sind überwiegend Sequenzen in der U3-Region verantwortlich, an diese binden einige transaktive zelluläre Proteine. Besonders wichtig ist die cis-aktive Sequenz, an welche zellulärer NF κ B bindet. NF κ B wird von den T-Lymphozyten als Reaktion auf die Stimulierung mit IL-1 oder TNF α gebildet. Dieser Mechanismus hat wichtige Folgen bei der Pathogenese der HIV-Infektion und der Entstehung von AIDS. Tritt beispielsweise eine Bakterieninfektion mit der entsprechenden Aktivierung des Immunsystems bzw. der infizierten T-Lymphozyten auf, wird die Expression der viralen Gene verstärkt. Die verstärkte Aktivität der Zellen führt unter anderem zu verstärkter Synzytienbildung, zusätzlich wird das geschwächte Immunsystem mit einer erhöhten Anzahl an Viruspartikeln konfrontiert. Dadurch wird die Schädigung der T-Zell-Population mit jeder Infektion weiter vorangetrieben. Weitere Bindungsstellen finden sich für SP1, AP1 und das *Leader Binding Protein* LBP-1.

1.4.4. Die Hüllproteine gp120 und gp41

Die Translation beider Proteine erfolgt als ein Vorläuferprotein (gp160) am rauen Endoplasmatischen Retikulum, die Bestandteile der späteren viralen *spikes* - gp41 und gp120 - sind kovalent miteinander verbunden. Die Spaltung in gp120 und gp41 erfolgt erst im Trans-Golgi-Netzwerk durch eine Furin- oder äquivalente Endoprotease (Wyatt und Sodroski, 1998). Das Hüllprotein gp120 ist für die Adsorption des Virions an die zellulären Rezeptorproteine, CD4 und den entsprechenden Chemokinrezeptor (CXCR4 oder CCR5), verantwortlich. Gp120 setzt sich in der Aminosäuresequenz aus abwechselnden konstanten (C1-C4) und variablen Regionen (V1-V5) zusammen, im gefalteten (globulären) Protein sind die variablen Domänen exponiert. N-Terminal befindet sich ein Signalpeptid für den Transport durch das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Gp41 besteht im Bereich der Ektodomäne überwiegend aus den konstanten Regionen C5 und C6 sowie einer Endodomäne.

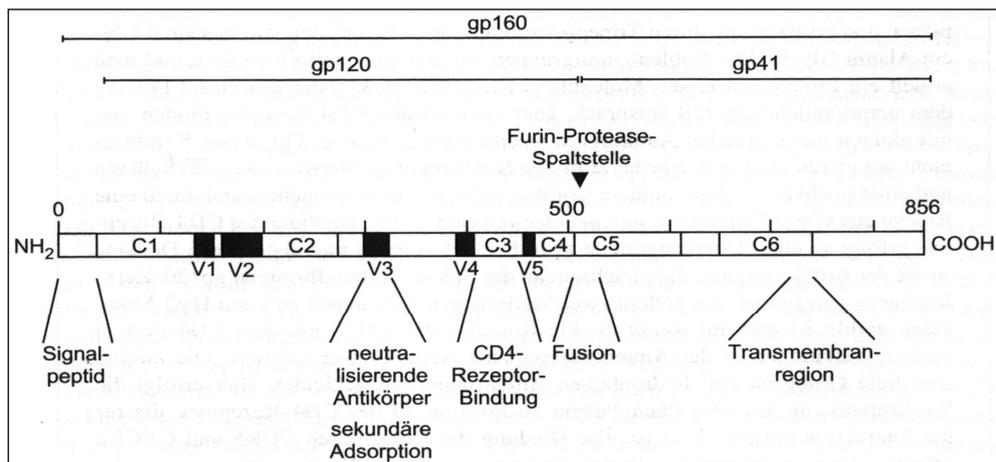


Abb. 1.2. Schematischer Aufbau des HIV-1 gp160. V1-V5: variable Domänen, C1-C6: konstante Domänen. Proteasespaltstelle an Position 512. „Fusion“ : Fusionspeptid

Im Golgi-Apparat oligomerisieren die Vorläuferproteine und werden in großem Umfang glycosyliert, wobei der Hauptanteil auf die variablen gp120-Domänen entfällt. Es werden N-glycosidisch mannoseähnliche Moleküle an das Protein-Rückgrat gebunden. Anschließend erfolgt die Modifizierung der Zuckergruppen mit verschiedenen zellulären Enzymen (Wyatt und Sodroski, 1998), wodurch Zuckerreste entstehen, die kaum von zelleigenen glycosylierten Proteinen zu unterscheiden sind. Im gp120 machen die Modifizierungen an den Aminosäuren etwa die Hälfte des Molekulargewichtes aus (Poignard et al., 2001). Die Glycosylierung ist entscheidend für die korrekte Faltung und damit für die Stabilität des Proteins (Fenouillet et al., 1994), daher laufen Glycosylierung und Faltung parallel ab.

Die Funktion des transmembranen Hüllproteins gp41 besteht in der Annäherung und Fusion der Zytoplasmamembran mit der Hüllmembran des Virions. Die Konformationsänderung des gp120 nach der Kontaktaufnahme mit dem CD4-Rezeptor und dem entsprechenden Chemokinrezeptor exponiert die fusionsaktive Domäne des gp41. Diese besteht aus einer 25 Aminosäuren langen N-terminalen Sequenz, dem Fusionsprotein, welche struktureller Ähnlichkeit mit den fusionsaktiven Regionen bei Paramyxoviren (F-Protein) und Orthomyxoviren (Hämagglutinin) aufweist.

1.4.5. Aufbau und Funktion der *spikes*

1.4.5.1. Morphologie der *spikes*

Die *spikes* sind Trimere aus den Hüllproteinen gp41 und gp120. Der gp41-Anteil ist fest in der Membran verankert, das gp120 bedeckt gp41 fast vollständig (Zwick et al., 2004) und ist mit diesem nicht kovalent verbunden. Entscheidend für die Induzierung von Antikörpern ist die Zugänglichkeit immunogener Bereiche der *spikes*. In Abb. 1.3. (a) wird die Form eines solchen Trimers, berechnet mittels cryoEM-Tomographie, für SIV gezeigt (Zhu et al., 2006).

Für jedes Monomer lassen sich morphologische Strukturen definieren und verschiedenen Domänen und Funktionen zuordnen (Abb. 1.2.). Für diese Arbeit besonders interessant ist die Position der Membran-proximalen externen Region (MPER) von gp41. Die MPER ist lokalisiert in einer als Fuß bezeichneten morphologischen Struktur und wird als einziger Teil von gp41 nicht direkt vom gp120-Trimer bedeckt (Zhu et al., 2006). Die MPER ist die am stärksten konservierte Region in gp41 (Zwick et al., 2005), sie enthält die Epitope der breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 4E10 und 2F5. Nach den vorliegenden Daten scheint es, dass die jeweiligen MPER eines Trimers nicht in enger Nachbarschaft einen gemeinsamen Stiel bilden sondern vielmehr in einer Dreifuß-ähnlichen Konfiguration (Abb. 1.3.) angeordnet sind (Zhu et al., 2006). Wichtig ist es herauszufinden, wie die Membrannähe, die sterische Behinderung durch gp120 und die Konformation von gp41 selbst die Erkennung der MPER durch Antikörper ermöglichen oder behindern. Danach richten sich die Anforderungen an das Design eines möglichen Impfantigens.

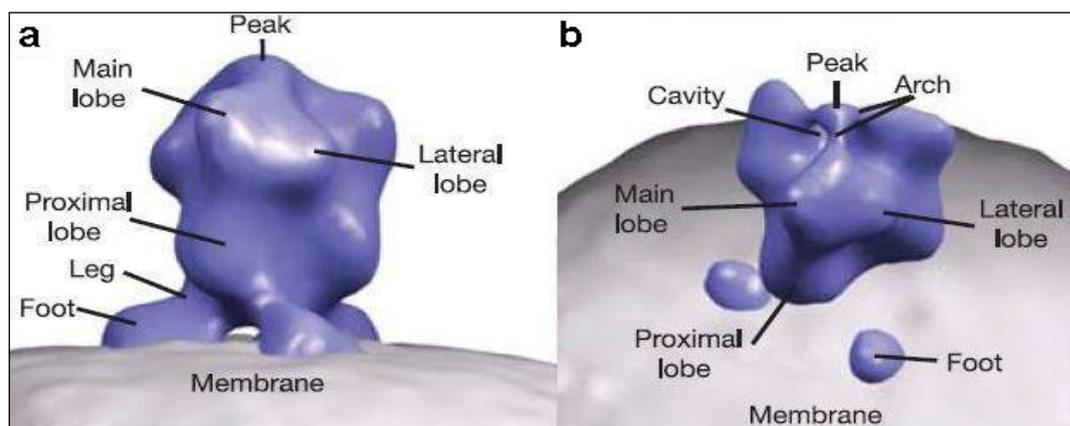


Abb. 1.3. Mittels cryo-EM-Tomographie berechnetes Oberflächenmodell für SIV-*spikes* (Zhu et al., 2006). Jedes gp120 besteht aus 3 abgrenzbaren Ausbuchtungen (*lobe*), von gp41 ist nur die membranproximale Basis (*Foot*, *Leg*) zu sehen. Die Spitze wird durch Ausläufer aller 3 gp120 gebildet. (a) seitliche Ansicht, (b) Ansicht schräg von oben mit höherem Grenzwert für die Elektronendichte bei der EM-Tomographie, dabei wird eine Einbuchtung bzw. Hohlraum sichtbar.

1.4.5.2. Clusterung der *spikes*

Mithilfe der cryoEM-Tomographie konnte eine Clusterung der *spikes* bei HIV eindeutig bewiesen werden (Zhu et al., 2006). Die Analyse der Menge und der Verteilung der *spikes* erbrachte einige neue Erkenntnisse, welche für die Vakzineentwicklung von Nutzen sein könnten. Die Menge an kompletten *spikes* liegt mit durchschnittlich 14 (\pm 7) niedriger als angenommen, die *spikes* können sich anscheinend nicht frei (diffus) in der Membran bewegen und der häufigste gemessene Abstand zum am nächsten benachbarten *spike* liegt mit \sim 15 nm niedriger als erwartet. Der typische Paratopabstand bei Antikörpern liegt zwischen 10-20 nm,

demzufolge ist ein *cross-linking* bei der Antigenerkennung sterisch möglich (Zhu et al., 2006). Ein experimenteller Nachweis, wie genau die Antigenerkennung durch 2F5 und 4E10 erfolgt und ob ein *cross-linking* stattfindet, liegt bisher nicht vor.

1.4.5.3. Strukturelle Details der *spikes*

Für die Pathogenese einer Infektion ist entscheidend, welche Zellen infiziert werden können. Die Funktion der Zielzellerkennung übernimmt bei HIV das Oberflächen-Hüllprotein gp120. Besonders wichtig für die Funktion von gp120 ist die Organisation der *spikes* als Trimer, dadurch ist es möglich, durch Konformationsänderungen das verdeckte gp41 zugänglich zu machen. Durch die Oligomerisierung sind bestimmte Bereiche (V1-V5) immer nach außen gerichtet (*outer domain*), während der andere Teil ist nach innen gerichtet ist (*inner domain*). Beide Bereiche sind durch 4 β -Faltblätter (*bridging sheet*) miteinander verbunden (Wyatt et al., 1998, Kwong et al., 1998). Der innere Bereich des Trimers besteht hauptsächlich aus den konstanten Regionen der Monomere, die nur sehr wenig glycosyliert sind. Der jeweilige Kontakt mit der trimeren Achse aus den N-terminalen Helixregionen (NHR) der drei gp41 erfolgt über die Domänen C1 und C5. Der äußere Bereich des Trimers wird überwiegend durch die variablen Regionen gebildet, diese sind weitestgehend mit Zuckergruppen bedeckt. Der dem Virion abgewandte obere Bereich der *spikes* wird häufig als „*silent face*“ beschrieben, da die Glycosylierung und Modifizierung durch zelluläre Enzyme die Immunreaktion gegen diesen Bereich unterbindet (Burton et al., 2005). Eine besondere Stellung im gp120 nimmt die V3-Domäne ein, sie bildet eine exponierte Schleife von bis zu 35 Aminosäuren. Die Basis bilden Cysteinreste, welche durch eine Disulfidbrücke beide Schenkel der Schleife zusammenhalten. Die V3-Domäne ist als einzige variable Region nicht glycosyliert, sie ist daher immunogen und induziert neutralisierende Antikörper, die jedoch nur spezifisch gegen einzelne Isolate wirken. In einem Patienten findet man Virusisolate, die sich hinsichtlich ihrer V3-Domäne signifikant unterscheiden, dementsprechend können eine Reihe V3-spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Die V3-Domäne ist auch an der Kontaktaufnahme mit dem Chemokinrezeptor beteiligt. Die konstanten Regionen wiederum sind strukturell so gelagert, dass sie dem Selektionsdruck der Antikörperantwort nicht ausgesetzt sind.

1.4.5.4. Gp41 bildet die Verankerung der *spikes*

Das transmembrane Hüllprotein gp41 bildet die Basis und die Verankerung für die *spikes*. Den N-Terminus bildet ein Fusionspeptid, welches bei der Infektion in der Membran der

Zielzelle verankert wird. Durch Umlagerungen im gp41 werden virale und zelluläre Membran soweit angenähert, dass eine Membranfusion möglich wird. Der Fusionsprozess ist noch nicht bis ins Detail bekannt, für einige wichtige Schritte fehlt bislang der experimentelle Beweis. Daher kann hier nur das aktuelle Modell wiedergegeben werden. Nach dem derzeitigen Modell bilden im freien Virion die gp41-NHR der *spikes* eine trimere *coiled-coil*-Struktur. Ob die C-terminale Helixregion zu diesem Zeitpunkt in helikaler Konformation vorliegt und ebenfalls eine Trimerstruktur bildet, ist bisher nicht bekannt. Die zytoplasmatische Domäne ragt in das Innere des Virions und ist mit den Matrixproteinen assoziiert. Ein stark hydrophober Bereich bildet die Transmembrandomäne. Die Ektodomäne wird gebildet durch die C-terminale MPER, durch die mit einem Cystein-Cystein-Loop verbundene C- und N-terminale Helixregion sowie dem N-terminalen Fusionspeptid. Die MPER umfasst die Region zwischen dem Transmembrandurchgang und der C-terminalen Helixregion. Das gp120 bedeckt das gp41 fast vollständig, lediglich die MPER ist von außen zugänglich, diese These wird durch die Existenz der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 unterstützt. Ein Schema des Aufbaus von gp41 wird in Abbildung 1.4. gezeigt.

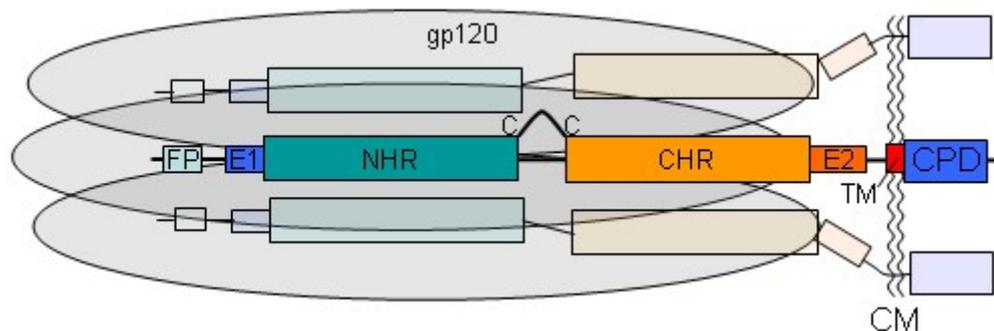


Abb. 1.4. Schema des gp41 im Kontext eines *spike*. FP: Fusionspeptid, E1: E1-Region mit vermutetem Interaktionsbereich von mAK 2F5, NHR/CHR: N-/C-terminale Helixregion, C-C: Cystein-Cystein-Loop, E2: E2-Region mit Epitopen für die mAK 2F5 und 4E10, CM: Zytoplasmamembran, TM: Transmembran-Domäne, CPD: Zytoplasmatische Domäne

1.4.5.5. Zielzellerkennung durch die *spikes*

Während der Infektion durchlaufen sowohl gp120 als auch gp41 sequentiell mehrere Konformationsänderungen, welche letztlich das Ziel haben, die Membranfusion von Virion und Zielzelle zu induzieren.

Der erste Schritt ist die Erkennung der Zielzelle. Neben den *spikes* sind eine Reihe zellulärer Proteine in die Virionenmembran inkorporiert, unter anderem auch Adhäsionsproteine. Dies kann die Anlagerung an potentielle Zielzellen unterstützen. Die Erkennung geeigneter Zielzellen erfolgt über eine Wechselwirkung des gp120 mit dem CD4-Rezeptor. CD4 wird

auf der Oberfläche von CD4-positiven T-Lymphozyten, Monocyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen im Gehirn exprimiert. Die Kontaktaufnahme mit CD4 erfolgt in einer weiten Tasche von gp120 auf einer Fläche von $\sim 800\text{\AA}^2$, welche über 2 evidente Gruben verfügt. Eine Grube ist breit, flach und mit Wassermolekülen gefüllt. Die zweite Grube ist eine Vertiefung, welche bis zur C3-Domäne im inneren Bereich von gp120 reicht. Den Großteil der Kontaktfläche mit CD4 bilden die Schleifen der V1-V4-Domänen als Bestandteil der äußeren Domäne sowie die verbindenden β -Faltblattstrukturen. Die zweite, tiefere Grube ist mit hydrophoben Aminosäuren ausgekleidet, über welche die spezifische Bindung an CD4 erfolgt. Die zentrale Wechselwirkung mit gp120 geschieht über ein Phenylalanin an Position 43 des CD4-Rezeptors, welches ca. 10\AA in die Grube hineinragt. Die Wechselwirkung mit CD4 führt zu einer massiven Konformationsänderung im gp120. Der Hauptanteil der Konformationsänderung betrifft die mit gp41 interagierenden Regionen der inneren Domäne von gp120. Dies könnte nötig sein, um die Korezeptor-Bindungsstelle in eine stabile Konformation zu bringen und gp41 die ersten Schritte für den Fusionsprozess zu ermöglichen (Pantophlet und Burton, 2006). Die Korezeptor-Bindungsstelle ist bei Primärisolaten erst nach der CD4-Bindung zugänglich. Bei laboradaptierten Stämmen hat man Varianten beobachtet, welche direkt an den Chemokinrezeptor binden und dennoch infektiös sind. Bei FIV ist die direkte Bindung an den Chemokinrezeptor der normale Weg des Zelleintrittes. Dies bedeutet, dass bei Lentiviren der Chemokinrezeptor der ursprüngliche und obligate Rezeptor für den Zelleintritt ist (Pantophlet und Burton, 2006). Demzufolge könnte die spezifische Bindung an CD4 eine Folge des Evolutionsdruckes gegen die Chemokinrezeptor-Bindungsstelle sein (Pantophlet und Burton, 2006). Die Chemokin-Bindungsstelle liegt in Nachbarschaft zur CD4-Bindungsstelle, sie wird aber erst nach den Umlagerungen zugänglich. An der Bindung des Chemokinrezeptors sind Aminosäuren der V1/V2 und der V3 Domäne beteiligt, sie bestimmen den Tropismus des Virions für Monocyten / Makrophagen (CCR5, β -Chemokinrezeptor) oder T-Zellen (CXCR4, α -Chemokinrezeptor). Deletionen in V3 oder bindende Antikörper gegen diese Domäne verhindern die Bindung an den jeweils verwendeten α - oder β -Chemokinrezeptor.

Aus Mutationsanalysen ist bekannt, dass einige Aminosäuren der V3-Domäne sowie die V1/V2-Domäne direkt zur Bindung beitragen. Durch die CD4-Umlagerung werden Epitope frei. Antikörper, welche gegen diese gerichtet sind, blockieren wirksam die Bindung an den Chemokinrezeptor. Diese CD4i- (CD4-induzierte) Epitope liegen hauptsächlich in einem konservierten Bereich, der vorher von der V2 / V3 - Domäne verdeckt wurde. Durch die Bindung an den Chemokin-Corezeptor kommt es zu weiteren Umlagerungen, in deren Folge

das gesamte gp120 seine Position so verändert, dass die fusionsaktive Domäne des gp41 freigelegt wird.

1.4.6. Die gp41-induzierte Membranfusion

Nach dem derzeitigen Fusionsmodell führt die Konformationsänderung des an den CD4/Chemokin-Corezeptor gebundenen gp120 zu einer Struktur, welche das Eindringen des Fusionspeptides in die Wirtszellmembran ermöglicht. In dessen Folge kommt es zu massiven Umlagerungen im gp41, die dafür sorgen, dass Virionen und Wirtszellmembran so nahe aneinander herangezogen werden, dass eine Verschmelzung der beiden Membranen möglich wird. Die Details dieses Vorgangs sind bisher nicht geklärt. Fest steht, dass sich die C-terminale-Helixregion in die Gruben der trimeren *coiled-coil*-Struktur der N-terminalen Helixregion einlagert und so ein Bündel aus 6 Helices entsteht (*6-helix-bundle*). Dies erfolgt durch ein Abknicken im Bereich des Cystein-Cystein-Loops, die jeweiligen C- und N-terminalen Helices ordnen sich dadurch gegenläufig orientiert an. Der Bereich um das Fusionspeptid und die MPER gelangen dadurch in Nachbarschaft, demzufolge haben sich auch die Membranen stark angenähert. Der eigentliche Membranfusionsprozess ist bisher nicht geklärt. Für eine Fusion müssen die Membranen ca. 1,5 nm Abstand haben, damit zwischenliegende Wassermoleküle keine Grenzfläche erzeugen. Möglich wäre dies durch eine Interaktion von Membranproteinen, wie sie auch unter normalen Umständen bei Membranfusionen abläuft. Eine Möglichkeit geht von einer Ähnlichkeit mit dem Hämagglutinin-vermittelten Fusionsprozess bei Influenza aus, bei dem mehrere Hämagglutininmoleküle die Membran zur Bildung einer Fusionspore zwingen. Eine andere Möglichkeit ist das Modell der Interaktion von SNAP-Proteinen (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein*) mit ihrem jeweiligen SNARE-Gegenpart (*SNAP-Rezeptor*). Einmal induziert, führt die Membranfusion zu einer Freisetzung des viralen Core-Partikels in das Zytoplasma. Mit der Freisetzung des viralen Genoms beginnt ein neuer Infektionszyklus.

1.5. HIV-1-spezifische monoklonale Antikörper 2F5 und 4E10

Die monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 sind breit neutralisierende Antikörper, die gegen gp41 gerichtet sind (Buchacher et al., 1994; Purtscher et al., 1994 und 1996). Sie wurden aus Patienten isoliert, die seit langer Zeit infiziert sind, jedoch keine AIDS-Symptome aufweisen. Die Konsensussequenzen der Epitope liegen in der MPER direkt beieinander, neutralisierende Antikörper gegen weiter N-terminal liegende Bereiche wurden bisher nicht

beschrieben. Da diese Region hochkonserviert und offenbar als einziger Bereich räumlich zugänglich ist, gilt sie als hoffnungsvoller Vakzinekandidat.

Eine Besonderheit beider monoklonalen Antikörper ist die außerordentlich lange CDRH3-Schleife der schweren Kette mit einer Reihe aromatischer und anderer hydrophober Reste. Lange hydrophobe CDR3-Regionen sind generell typisch für polyreaktive Antikörper und Autoantikörper (Meffre et al., 2001). Sowohl 2F5 als auch 4E10 reagieren mit Cardiolipin, einem gewöhnlichen Bestandteil der zellulären Phospholipidmembran. Zusätzlich reagiert 2F5 mit Histonen sowie dem Centromer-B-Autoantigen und 4E10 mit SLE-typischen Autoantigenen (Haynes et al., 2005). Nach einem anderen Modell richtet sich die Reaktivität der monoklonalen Antikörper nicht direkt gegen autoantigene Strukturen. Vielmehr könnten diese in die Epitopbindung mit einbezogen werden, wenn sie in direkter räumliche Nachbarschaft stehen und Wechselwirkungen mit Sequenzen auftreten, die das Paratop umgeben. Die starke Hydrophobizität der CDRH3-Schleife ist ein Hinweis auf eine Anpassung der Antikörper an die Bindung membrannaher Epitope und möglicherweise eine Bedingung für die Kernepitoperkennung (Sanchez-Martinez et al., 2006^a). Die Kernbereiche der Epitope umfassen die Sequenzen ELDKWA bei 2F5 (Muster et al., 1993) und NWF(D/N)IT bei 4E10 (Zwick et al., 2001, Sanchez-Martinez et al., 2006^a). In Abb. 1.4.5. ist ein Modell für die Bindung der mAB 2F5 und 4E10 an ihre Epitope vorgeschlagen.

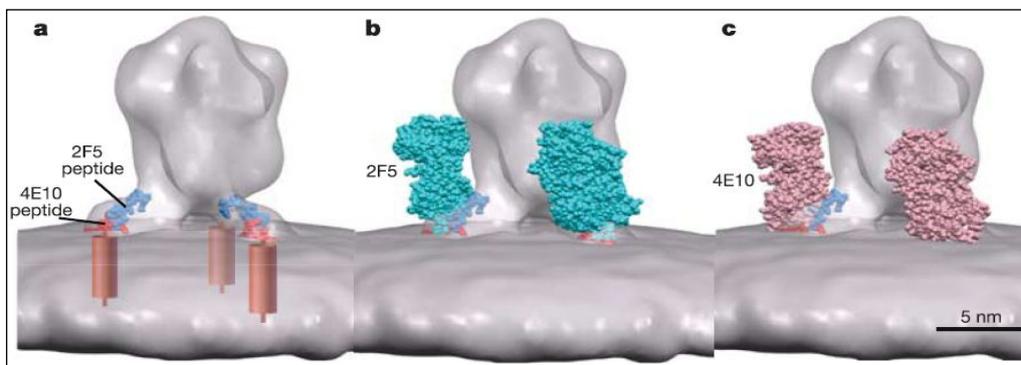


Abb. 1.5.: Mittels cryo-EM-Tomographie berechnetes Oberflächenmodell eines SIV-spikes und vorhergesagte Bindung der Fab-Fragmente von 2F5 und 4E10. (a) Basierend auf einem Abgleich hydrophober AS in den Peptiden und Antikörpern parallel zur Membran, rote Zylinder kennzeichnen die berechnete Position der helikalen zytoplasmatischen Domäne. (b) und (c) Berechnete Position der Fab-Fragmente von 2F5 und 4E10 (Zhu et al., 2006).

1.6. Die Epitope E1 und E2

Der Aufbau und die Funktion des transmembranen Hüllproteins ist bei allen Retroviren ähnlich. Die AG Denner konnte zeigen, dass sich mit dem transmembranen Hüllprotein p15E von PERV (porcines endogenes Retrovirus, γ -Retrovirus) und FeLV (Felines Leukämievirus) neutralisierende Antikörper gegen PERV (Fiebig et al., 2003) bzw. FeLV (Langhammer et al.,

2005 und 2006^b) induzieren lassen. Diese neutralisierenden Antikörper binden an Epitope in der MPER des transmembranen Hüllproteins von PERV/FeLV, welche an analogen Stellen der 2F5/4E10-Epitope bei gp41 von HIV liegen. Weiterhin wurde ein N-terminales Epitop identifiziert und von der AG Denner als E1 bezeichnet, das Epitop in der MPER als E2 (Fiebig et al., 2003). Ähnliche neutralisierende Antikörper, die entsprechend mit E1 und E2 von FeLVp15E reagieren, wurden nach Immunisierung von Ziegen, Ratten und Katzen mit dem transmembranen Hüllprotein p15E von FeLV erzielt (Langhammer et al., 2005, 2006^{a+b}), wobei hier eine Unterteilung der Epitope in E1a, E1b, E2a und E2b unternommen wurde. Auch hier konnte die Ähnlichkeit zur Lage der Epitope bei den HIV-neutralisierenden Antikörpern 2F5 (E2a) und 4E10 (E2b) gezeigt werden.

Für die Epitope neutralisierender Antikörper gegen gp41 von HIV wurden nach der gleichen Nomenklatur die E1 und E2-Bereiche definiert, das HIV-E2 enthält die Konsensussequenz des Epitops von 2F5. Die Arbeitsgruppe Denner konnte zeigen, dass im gp41 von HIV eine E1-Domäne vorhanden ist, die die Bindung von 2F5 und 4E10 an ihr entsprechendes Epitop erhöhte und damit eine Konformation schafft, die für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern notwendig ist (Fiebig et al., 2005^{a+b}, 2006^{a+b}). Diese Daten wurden von Arbeitsgruppen in den USA (Hager Braun et al., 2006) und in Spanien (Lorizate et al., 2006) bestätigt, wobei noch Unterschiede in der genauen Lokalisierung von E1 bestehen. Die E2 Epitope sind klar definiert (ELDKWA für 2F5 und NWF(D/N)IT für 4E10), die Größe und genaue Lokalisation von E1 ist jedoch noch unklar. Während die Daten der Arbeitsgruppe Denner auf die Sequenz **LTVQARQLLSDIVQQQ** hinweisen, identifizierten andere Arbeitsgruppen die weiter N-terminal liegende Sequenz **AVGIGAVFLGFLGAAGSTMGAASMTLTVQAR** (Lorizate et al., 2006; Hager-Braun et al., 2006), wobei beschrieben wurde, dass die Sequenz **VGIGAVFLGFLGAAG** am effektivsten die Bindung von 2F5 an sein Epitop erhöhte. Im Fall von 4E10 wurde **AV(L/M)FL** als E1-Epitop beschrieben. Die von dieser Arbeitsgruppe definierten Sequenzen für HIV 1-E1 und -E2 (Stamm HIV I_{III}B) sind:

E1: **LTVQARQLLSDIVQQQ**, entspricht Aminosäuren 538 bis 553.

E2: **ELDKWASLWNWFNITNWLWY**, entspricht Aminosäuren 662 bis 681.

Die Konsensussequenzen von 2F5 (ELDKWA) und 4E10 (WFN/DITN) sind unterstrichen.

Die Sequenz WFN ist bei HIV und PERV vorhanden und wird auch jeweils von den neutralisierenden Antikörpern, wie dem 4E10 bei HIV-1, erkannt (Zwick et al., 2001).

1.7. HIV-1 Infektionszyklus

Der Prozess des HIV-*uncoating* - das Freisetzen des viralen Genoms in das Zytoplasma - ist bis jetzt noch nicht vollständig geklärt. Nach der Fusion von viraler und zellulärer Membran wird das Kapsid in das Zytoplasma abgegeben, wobei die Struktur der viralen Matrix zerfällt. Das freigelegte Kapsid wird anfangs nur an einer Stelle geöffnet - es zerfällt nicht völlig, sondern wird sukzessive disassembliert. Der entscheidende Faktor hierbei scheint der zytosolische pH-Wert zu sein. Für die korrekte Bildung des viralen Präintegrationskomplexes ist ein regulärer *uncoating*-Prozess notwendig. Der Präintegrationskomplex besteht aus dem diploiden RNA-Genom mit Nukleokapsid, Primer ($tRNA_{Lys}$), Reverser Transkriptase, Integrase, Virales Protein R und verschiedenen Wirtszellproteinen. Fehler beim *uncoating* äußern sich meist in der Unfähigkeit, einen funktionierenden Präintegrationskomplex zu erzeugen. Der Präintegrationskomplex wandert vermutlich entlang der Actinelemente des Zytoskelettes durch das Zytoplasma zum Zellkern, virale Faktoren wie z.B. Nef unterstützen zwar den Transport zum Nukleus, sind aber am eigentlichen *uncoating*-Prozess nicht beteiligt. Während dieser Zeit im Zytoplasma wird das RNA-Genom in cDNA umgeschrieben. Der Prozess der reversen Transkription wird initiiert von einer $tRNA_{Lys}$, die 5' an der Primerbindungsstelle sitzt. Die Transkription erfolgt in mehreren Schritten, welche hier nur kurz benannt werden:

1. Synthese einer kurzen DNA Sequenz (3' R-U5- $tRNA_{Lys}$ 5')
2. Abbau des RNA-Anteils durch RNase-Funktion der RT
3. Primertransfer des DNA-Stückes an 3'-Ende der RNA, Anlagerung über R-Regionen
4. DNA-Erststrangsynthese
5. Abbau des RNA-Anteils bis auf eine kurze Primersequenz im Polypurintrakt
6. Beginn der Zweitstrangsynthese, dieser beinhaltet auch die Primerbindungsstelle der noch gebundenen $tRNA_{Lys}$
7. Zirkularisierung des DNA-Stranges, Anlagerung über die Primerbindungsstellen an 3' und 5'
8. Elongation des Zweitstranges, dabei Vervollständigung der LTR (3' U3-R-U5 5')

Bei der reversen Transkription kann die Reverse Transkriptase zwischen beiden RNA-Strängen des diploiden viralen Genoms hin und her springen und so ein zusammengesetztes DNA-Genom erzeugen (*copy choice*-Rekombination). Bei der DNA Synthese werden mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 10^{-4} falsche Basen eingebaut, was zu der genetischen Heterogenität von HIV beiträgt. Entscheidend für das schnelle und häufige Auftreten von Mutanten ist jedoch die zelluläre RNA-Polymerase II, welche die Genome der

Folgegeneration mit ähnlicher Fehlerquote synthetisiert. Auf dem Weg in den Zellkern ist der Präintegrationskomplex mit einer Reihe von Hindernissen konfrontiert. Einzelne mit dem Präintegrationskomplex assoziierte Matrixproteine sowie Vpr sorgen für den Transport durch die Poren der Kernmembran. Daher kann HIV als einziges humanes Retrovirus auch ruhende Zellen mit intakter Kernmembran infizieren. Erschwerend bei der Etablierung einer Infektion sind die hohe intrazelluläre Proteinkonzentration und Proteine zur Virusabwehr wie TRIM5 alpha und APOBEC3G. Daneben bewirkt die Signalgebung über TNF-alpha, z.B. von benachbarten infizierten Zellen, in der zu infizierenden Zelle die Induktion eines antiviralen Status, bei dem die virale RNA bzw. fremde DNA schneller abgebaut wird.

Im Zellkern angekommen, sorgt die Intergrase für die Integration in das Zellgenom. Dazu schneidet sie an den 3'-Enden jedes Stranges (erzeugt so 5'-Überhänge) und ligiert die Einzelstrangbrüche an den Schnittstellen. Das integrierte virale Genom wird als Provirus bezeichnet. Wie die Integrationssequenz im Wirtszellgenom ausgewählt wird, ist bislang unklar. Die HIV-cDNA integriert nicht völlig willkürlich, es gibt Bereiche bevorzugter Integration. Die Gründe hierfür könnten eine offene Chromatinstruktur oder auch an die DNA gebundene Wirtszellproteine an den entsprechenden Stellen sein (Dismuke und Aiken, 2006). Bei der Integration können zelluläre Gene ihre Funktion verlieren oder auch unter Kontrolle des viralen Promotors geraten.

Für die Transkription der viralen Gene sind zelluläre Faktoren wie NFκB und andere notwendig, die sich an den U3-Bereich der LTR binden. Dieser Mechanismus verstärkt die Pathogenität des HIV, denn bei einer Aktivierung der T-Zelle ist viel aktives NFκB vorhanden. Die Transkription viraler RNA verstärkt sich folglich in einer Phase, in der das Immunsystem ohnehin durch andere Infektionen beansprucht wird. Anfangs ist die Transkription sehr ineffizient und bricht meist nach den *tar*-Sequenzen ab. Es entstehen jedoch auch einige längere RNAs, von welchen das Tat-Protein translatiert wird. Tat bindet als Transkriptionsaktivator an *tar*-Elemente und erhöht die Transkriptionseffizienz um das hundertfache.

In dieser frühen Phase der Infektion findet man drei Größenklassen viraler mRNA im Zellkern:

- ungespleißte mRNA für das Gag und Gag/Pol-Vorläuferprotein als Vollängen-RNA (äquivalent den RNA-Genomen)
- einfach gespleißte mRNA für Env, Vif, Vpr und Vpu, Länge etwa 4 kb
- mehrfach gespleißte mRNA für Tat, Rev, Nef, Tey, jeweils ohne dem RRE (*rev responsive element*), Länge etwa 2 kb

Die dementsprechend translatierten Proteine werden für die Herstellung neuer Virionen gebraucht, wobei Tat, Rev, Nef und Tev nicht in neue Partikel integriert werden, sondern regulatorische Funktion besitzen. Beispielsweise lässt sich Rev schon früh bei einer Infektion nachweisen und sorgt durch Bindung an das RRE für den Kernexport aller einfach- oder ungespleißten RNA Spezies. Die Synthese der Env-Proteine erfolgt an der Membran des rauen Endoplasmatischen Retikulums in dessen Lumen. Der Transport an die Zelloberfläche erfolgt über den Golgi-Apparat, in dem auch die zellulären Proteasen das Env-Protein (gp160) schneiden. Auf der Zelloberfläche können die Hüllproteine ihre fusionsaktive Wirkung auch gegenüber noch nicht infizierten Zellen in der direkten Nachbarschaft ausüben. Diese Synzytienbildung ist eine weitere Möglichkeit für die Virusverbreitung und auch ein Marker für Virusproduktion bei *in vitro* Zellkulturexperimenten. Alle anderen viralen Proteine werden an freien Ribosomen im Zytoplasma translatiert. Gag- und Gag/Pol-Proteine werden aminoterminal myristyliert und gelangen so mithilfe zellulärer Faktoren zur Zytoplasmamembran. Die Morphogenese findet nur in bestimmten Bereichen der Zellmembran statt, die Vesikelbildung wird durch Kontakt der RNA mit der Membran induziert. Vermutlich durch Wechselwirkung mit den Matrix- und Kapsidproteinen entstehen Partikel, die über *budding* von der Zellmembran abgeschnürt werden. Die abgeschnürten Vesikel stellen noch unreife und avirulente Partikel dar, in ihnen liegen die Gag und Gag/Pol-Proteine unprozessiert vor. Aufgrund der Aminosäuresequenz der Proteine herrscht im Partikel, anders als in der Zelle, ein leicht saurer pH-Wert von 6,0-6,2. Dadurch finden die Proteaseanteile von Gag/Pol optimale Bedingungen für die autokatalytische Spaltung der Vorläuferproteine in die einzelnen Bestandteile vor. Erst nach der Reifungsphase sind sämtliche Virusbestandteile wie Kapsid und Nukleokapsid voll ausgeprägt und das virale Partikel ein infektiöses Virion. Würde die Proteaseaktivität schon in der Zelle wirken, ginge die Verbindung der anderen Proteinbestandteile mit der Membran verloren, eine defekte Partikelbildung wäre die Folge. Die Fehlerquote bei den HIV-Partikeln ist sehr hoch, nur ein von 10^4 Partikeln durchläuft den vollständigen Zyklus bis zur Ausbildung der nächsten Virusgeneration. Die übrigen sind nicht infektiös, erzeugen Fehler beim *uncoating*, besitzen ein defektes Genom oder werden von zellulären Abwehrmaßnahmen neutralisiert.

1.8. Klinik und Pathologie einer HIV-Infektion

Der Infektionsverlauf lässt sich in drei Phasen, CDC I, II und III gliedern (Nomenklatur des Center of Disease Control, USA). CDC I bezeichnet die Primärinfektion, bei welcher der erste Kontakt mit einem neuen Wirt erfolgt. In dieser Phase entscheidet sich häufig schon der

weitere Krankheitsverlauf, wenn während der Serokonversion die Infektion etabliert wird. Nur in knapp 1/3 aller Infektionen treten innerhalb von 3-8 Wochen nach Infektion grippeähnliche Symptome mit Fieber, Mononukleose und Lymphknotenschwellungen auf, der Großteil der Infektionen verläuft inapparent.

In dieser ersten virämischen Phase befinden sich bis zu 10^8 und mehr Partikel je ml Blut, welches jetzt auch hochinfektiös ist. Die Viruspopulation verdoppelt sich rund alle 8 h, wobei von den Viren einer Zelle rund 20 weitere neu infiziert werden. Nach dem Auftreten von anti-p24 IgM (nach ~ 4-5 Wochen) und anti-p24 IgG (nach ~ 6-8 Wochen) wird die Virusinfektion zurückgedrängt. Nach zwei bis vier Monaten lassen sich auch gegen andere HIV-Bestandteile gerichtete Antikörper finden. Die Immunantwort kann die Viruslast soweit zurückdrängen, dass sich kaum noch infektiöse Partikel im Blut finden, Werte um 10^2 - 10^3 Genomäquivalente/ml Blut gelten als ein geringer Wert. Es schließt sich die symptomfreie Phase CDC II (Latenzphase) an, welche ohne Behandlung mehrere Monate bis hin zu 15 und mehr Jahren andauern kann. Man hat beobachtet, dass eine relativ hohe anfängliche Viruslast ($> 10^4$ Genomäquivalente/ml Blut) nach der ersten virämischen Phase mit einer schnellen Progression bei der $CD4^+$ -T-Zell-Depletion und einem damit einhergehenden schnelleren Krankheitsverlauf assoziiert ist. Es wird davon ausgegangen, dass nahezu jeder vorher gesunde Mensch eine Immunantwort entwickelt, diese jedoch immer wieder von Fluchtmutanten unterlaufen wird. Entscheidend für die Kontrolle der Infektion ist, wie viele Viren sich in für das Immunsystem unzugängliche Reservoirs zurückgezogen haben und vor allem wie stabil die Reaktion der $CD8^+$ -T-Lymphozyten ist. In Bezug auf die zytotoxische Immunantwort hängt es davon ab, welche viralen Epitope über die verfügbaren MHC-Subtypen präsentiert werden können. Präsentiert MHC I konservierte essentielle Domänen viraler Proteine (HLA-B35/B53) ist die zytotoxische T-Zell-Antwort schlecht zu unterlaufen und daher effizienter. Weiterhin ist wichtig, dass von Beginn an ausreichend virussupprimierende Zytokine von den $CD8^+$ -T-Lymphozyten sezerniert werden.

Zu Beginn einer Infektion finden sich überwiegend makrophagotrophe Stämme (CCR5 als Korezeptor) im Blut und vor allem in den lymphoiden Geweben. Diese replizieren sich in Makrophagen und T-Zellen relativ langsam und nicht zu hohen Titern, eine Synzytienbildung ist selten (S/L- bzw. NSI-Stämme). Die Verringerung der $CD4^+$ -T-Zellen erfolgt nicht nur durch die zytolytische Wirkung, sondern auch durch die Sezernierung proapoptotischer Zytokine. Ebenfalls negativ auf die T-Zell-Funktion wirken Konglomerate aus freien gp120-Proteinen, welche durch spezifische Antikörper gebunden wurden, sog. Antikörperkomplexe. Ohne die kostimulatorischen Signale einer antigenpräsentierenden Zelle tritt die $CD4^+$ -T-Zelle

bei der Bindung von Antikörperkomplexen in die Anergie, ein Schutzmechanismus, der T-Zellen mit autoantigener Spezifität stilllegen soll. In den Spätstadien einer Infektion (CDC III) ändern sich Tropismus und Charakteristika der Stämme. Es treten überwiegend T-Zell-trophe Varianten auf (CXCR4-Corezeptor), die in CD4⁺-T-Zellen sehr schnell zu hohen Titern replizieren. Diese Stämme sind hochvirulent und induzieren durch Synzytienbildung die charakteristische Riesenzellbildung (R/H- bzw. SI-Stämme). Die Folge ist eine explosionsartige Ausbreitung in den lymphatischen Geweben, welche dadurch zerstört werden (Lymphatrophie), in der Klinik spricht man vom AIDS-Vollbild (CDC III). Durch das zusammenbrechende Immunsystem ist der Körper nicht mehr vor normalerweise ungefährlichen Krankheitserregern geschützt und es treten die AIDS-typischen opportunistischen Infektionen auf, welche die eigentliche Todesursache bei einer HIV-Infektion sind.

1.9. Therapie und Impfstoffentwicklung

1.9.1. Allgemeine Impfstoffe

Impfungen dienen dem Schutz eines Individuums vor einer Krankheit, bevor sich eine Infektion im Körper etablieren kann. Dieser Schutz kann umgehend, dafür nur mit kurzer Wirkungsdauer von wenigen Wochen durch eine passive Immunisierung mit spezifischen Antikörpern erworben werden. Prophylaktische Impfungen können im Körper eine humorale und/oder zelluläre Immunantwort induzieren. Diese unterscheidet sich in ihrer Stärke, Spezifität und Wirkungsdauer abhängig vom Impfstoff. Bei den Impfstoffen unterscheidet man zwischen attenuierten Lebendimpfstoffen, Totimpfstoffen, Toxoidimpfstoffen, rekombinante Vektoren (tragen Proteine/Peptide) oder DNA-Impfstoffen.

Attenuierte Lebendimpfstoffe sind in ihren pathogenen Eigenschaften stark eingeschränkt, tragen jedoch noch fast alle immunogenen Merkmale des originalen Erregers. Ihre Vermehrung läuft vollständig, jedoch meist verlangsamt ab. Eine pathogene Infektion ist nicht möglich, solange nicht durch Rückmutationen die Attenuation neutralisiert wird. Es wird eine starke und für lange Zeit stabile Immunreaktion induziert, die alle Merkmale einer regulären Infektion umfasst. Der Impfschutz ist daher am umfassendsten. Beispiele sind Impfstoffe gegen Polio, Pocken oder Röteln.

Totimpfstoffe bestehen aus abgetöteten Erregern, diese sind nicht mehr infektiös. Ihre biologische Sicherheit ist zwar höher als bei Lebendimpfstoffen, dennoch können DNA-Fragmente zur Rekombination mit verwandten Erregern dienen. In der Regel erfolgt nur eine

humorale Immunantwort, der Impfstoff an sich ist auch weniger immunogen. Beispiele sind die Spaltvakzine von Influenza oder Subunitvakzine von Hepatitis B.

Toxoidimpfstoffe sind gereinigte und inaktivierte Toxine wie z.B. inaktiviertes Tetanustoxin. Sie induzieren ebenfalls nur die humorale Immunantwort.

Genetische Impfstoffe auf der Basis viraler oder bakterieller Vektoren enthalten Teile der DNA eines krankmachenden Mikroorganismus in der Hülle eines weniger pathogenen und virulenten Vektors. Die rekombinant eingefügte DNA wird von einer Zelle exprimiert und über MHC I dem Immunsystem präsentiert.

DNA-Impfstoffe sind DNA-Moleküle, welche z.B. mit einer Gene Gun in Zellen eingebracht werden. Die eingebrachte DNA hat die Eigenschaften eines Episoms, das codierte Antigen wird für eine Zeit lang exprimiert und über MHC I dem Immunsystem präsentiert. Wie bei den genetischen Impfstoffen auf der Basis viraler oder bakterieller Vektoren wird auch hier eine starke zytotoxische Immunantwort erzeugt.

1.9.2. Impfstoffentwicklung bei Retroviren

Trotz intensiver Forschung gelang es bisher nicht, Impfstoffe gegen humanpathogene Retroviren wie HTLV (δ -Retrovirus) und HIV (Lentivirus) zu entwickeln. Eine Immunisierung erreicht beim Impfling im idealen Fall eine sterilisierende Immunität gegen eine breite Anzahl von Virusstämmen. Doch selbst wenn dieses Ziel nur teilweise erreicht wurde, könnte auch eine suboptimale Impfung die Herdimmunität verbessern und die Ausbreitung z.B. der HIV-Epidemie eindämmen. Daher müssen neue Ansätze ermittelt werden, um erfolgreich Impfstoffe gegen Retroviren herstellen zu können.

Derzeit werden verschiedene Wege verfolgt, um eine Immunreaktion gegen Retroviren zu induzieren ohne dabei die biologische Sicherheit zu vernachlässigen. In den 1990iger Jahren konnte in Studien mit nichthumanen Primaten gezeigt werden, dass ein Schutz gegen eine Infektion mit Lentiviren durch passive Immunisierung möglich ist (Mascola et al., 1999). Eine ständige Applikation von Antikörpern wäre als Therapie jedoch nicht praktikabel. Daher ist ein Ansatz der Impfstoffentwicklung die Induktion neutralisierender Antikörper. Um diese zu erhalten, werden verschiedene Möglichkeiten untersucht.

Die Verwendung von proteinogenen Impfstoffen, welche von HIV-Oberflächenproteinen abgeleitet sind, gilt als die biologisch sicherste Variante der HIV-Impfung. Allerdings konnten in Bezug auf HIV bislang keine hohen Antikörpertiter induziert werden, die generierten Antikörper zeigen nur begrenzte neutralisierende Eigenschaften gegen Wildtypstämme und sind auch nicht subtypübergreifend.

Auf dem Gebiet der HIV-Impfstoffentwicklung befindet sich aktuell nur ein einziger Impfstoff in der klinischen Phase III. Als Vakzine kommen hier für die Prime-Immunsierung ein viraler Vektor zum Einsatz (ALVAC-HIV) sowie für die Boost-Immunsierung ein auf HIV-I-gp120 basierendes Antigen (VaxGen gp120 B/E). Weitere 4 Studien haben das klinische Stadium II erreicht und 32 Studien befinden sich derzeit in Phase I (IAVI-Report, Juni 2006).

Lediglich gegen das tierpathogene feline Leukämievirus, ein γ -Retrovirus, gibt es kommerziell erhältliche Impfstoffe, welche die Katzen jedoch nicht zu 100 Prozent vor einer Infektion schützen. Um den Impfschutz weiter zu verbessern, wurden von der Arbeitsgruppe Denner Impfstoffe gegen FeLV auf Basis des transmembranen Hüllproteins p15E von FeLV hergestellt. Mithilfe des rekombinanten FeLV p15E konnten nach Immunisierung in Ziegen, Ratten und Katzen neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden (Langhammer et al., 2005, 2006^{a+b}). Diese richteten sich gegen Epitope, welche als E1a, E1b, E2a und E2b bezeichnet wurden. Die in der Ratte induzierten neutralisierenden Antikörper gegen FeLV-p15E verstärkten die neutralisierende Aktivität des kommerziellen Impfstoffes Leucogen (analoge Untersuchungen an Katzen sind in Arbeit). Leucogen besteht aus p45, dem nicht-glykosylierten Oberflächenhüllprotein von FeLV. In einem Infektionsversuch mit FeLV (Challenge nach Immunisierung) konnte gezeigt werden, dass drei von sechs der mit p15E von FeLV immunisierten Katzen geschützt im Sinne einer fehlender Antigenämie waren (Langhammer et al., 2006^a). Damit wurde gezeigt, dass derartige Antikörper *in vivo* wirksam sind. Das Zusammenspiel beider Impfstoffe bietet für die Zukunft die Möglichkeit einer Verbesserung des Impfschutzes, der gegen eine FeLV-Infektion erreicht werden kann. Bei Untersuchungen zur Virussicherheit der Xenotransplantation und der Entwicklung eines Impfstoffes gegen die porcinen endogenen Retroviren (PERV) konnten nach Immunisierung von Ziegen und Ratten mit der Ectodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV ebenfalls PERV-neutralisierende Antikörper nachgewiesen werden, die an zwei Epitope im p15E (E1 und E2) binden (Fiebig et al., 2003). Diese Beispiele zeigen, dass die Immunisierung gegen Retrovirusinfektionen durch einen oder mehrere kombinierte Impfstoffe möglich ist. Ob diese Erfolge auch bei HIV wiederholt werden können bleibt abzuwarten, da das HI-Virus eine extreme Wandlungsfähigkeit besitzt und komplexer ist als Vertreter der γ -Retroviren. Analoge Versuche zu den Immunisierungen mit PERV p15E, bei denen mit der gesamten Ectodomäne von HIV-1 gp41 immunisiert wurde, schlugen fehl. Ursache war entweder die extreme Unlöslichkeit freier rekombinanter Proteine oder, wenn sie

mit Hilfe von Chaperonen solubilisiert wurden, dass keine neutralisierenden Antikörper induziert wurden (Fiebig et al., 2005^c; Schmolke, 2004).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in der Arbeitsgruppe Hybridkonstrukte auf Basis des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV und FeLV erzeugt, welche HIV-Sequenzen tragen. Die für die Substitution in den Hybridproteinen verwendeten HIV-Sequenzen entsprechen den Epitopen der gegen das transmembrane Hüllprotein von HIV-1 gerichteten breit neutralisierenden Antikörper 2F5 und 4E10. Nach Immunisierung mit diesen Antigenen wurden in ersten Untersuchungen HIV-spezifische neutralisierende Antikörper gewonnen, die sowohl Laborstämme als auch Primärviren neutralisierten (Fiebig et al., 2005^a; 2006^b). Mit einem ähnlichen Konstrukt konnte von einer anderen Arbeitsgruppe ebenfalls bewiesen werden, dass bindende Antikörper induziert wurden, die neutralisierende Effekte zeigten (Luo et al., 2006).

Ein nahe liegender Gedanke bei der Induzierung HIV-1 neutralisierender Antikörper war die Verwendung des 2F5-Epitopes ELDKWA als Peptidsequenz. In einer Reihe von Anläufen wurde mit entsprechenden Peptid-Multimeren, chimären Konstrukten mit immunogenen Proteinen oder verlängerten Epitopen versucht, 2F5 ähnliche neutralisierende Antikörper zu induzieren (Eckhart et al., 1996; Ferko et al., 1998; Coeffier et al., 2000). Es wurden jedoch lediglich bindende Antikörper gegen ELDKWA induziert, neutralisierende Eigenschaften konnten nicht gezeigt werden (Menendez et al., 2004). Ebenso erfolglos blieben Immunisierungsversuche mit dem kompletten HIV-1 gp41 als Antigen, auch hier konnten keine neutralisierenden Antikörper erzeugt werden (Schmolke, 2004).

Das Design der rekombinanten Impfantigene leitet sich aus den funktionellen Strukturumlagerungen bei der Fusionsinduktion her. Dabei kommen nach dem aktuellen Faltungsmodellen die C- und N-terminalen Regionen mit den Epitopen E1 und E2, sowohl bei PERV als auch bei HIV, in räumliche Nähe und könnten jetzt als ein Konformationsepitop erkannt werden (Fiebig et al., 2005^b; Lorizate et al., 2006). Es wird angenommen, dass die Paratope der Antikörper nur an die E2-Epitope fest binden und dass eine Interaktion mit E1, eventuell über nicht zum Paratop gehörenden Sequenzen, für einen neutralisierenden Effekt jedoch notwendig ist. Diese Besonderheit muss bei der Entwicklung und dem Design eines Impfstoffes berücksichtigt werden, eventuell ist genau diese postulierte Interaktion mit E1 eine Schlüsseleigenschaft für Neutralisation.

An dieser Stelle muss jedoch erwähnt werden, dass Proteinimpfstoffe allein noch keine zytotoxische Immunreaktion erzeugen, es wird nur der humorale Arm des Immunsystems aktiviert. Schon früh wurde in verschiedenen Studien festgestellt, dass eine starke zelluläre

Immunantwort, zytotoxisch als auch nicht zytotoxisch, häufig mit einer langen, nichtklinischen Persistenzphase assoziiert ist.

Eine weitere Möglichkeit für die Induktion neutralisierenden Antikörper ist die Verwendung von DNA-Vakzinen, welche in Körperzellen die Expression eines entsprechenden Antigens ermöglichen. Die DNA trägt Fragmente des Virusgenoms, vorzugsweise Bestandteile der Hüllproteine. Das Antigen wird über MHC I präsentiert und so dem Immunsystem zugänglich gemacht, um eine zelluläre Immunantwort zu erzeugen. Je nach Zelltyp wird die als Episom vorliegende DNA unterschiedlich schnell abgebaut und bei Zellteilungen ausverdünnt. Die biologische Sicherheit ist hoch, dennoch ist die Möglichkeit der Integration in das Zellgenom nicht ganz ausgeschlossen. Im Menschen wurde jedoch häufig eine geringe Immunität gegen das Ursprungspathogen beobachtet, in Kombination einer DNA-Vakzine als Prime-Immunsierung mit Proteinimpfstoffen oder Impfstoffen auf Basis viraler Vektoren als Boost konnte die Immunantwort oft verbessert werden.

Intensive Bemühungen werden derzeit auf dem Gebiet der Impfstoffe auf der Basis rekombinanter viraler Vektoren unternommen. Ein Großteil der aktuellen HIV-Impfstudien nutzen derartige Vakzine auf Basis viraler Vektoren, die allein oder in Kombination mit DNA- oder Proteinvakzinen getestet werden. Es kommen Pockenvirenderivate (mittel- bis hochimmunogen) oder adenovirale Vektoren zum Einsatz. Als limitierend für eine Immunantwort gegen ein Impfantigen ist hier eine bereits existierende Immunität, die gegen den Vektor an sich gerichtet ist, z.B. durch Interferenz mit einer Pockenimmunsierung. Der große Vorteil liegt in der starken und stabilen Antwort zytotoxische T-Zellen. Diese ist eminent für die Kontrolle einer bereits bestehenden Infektion mit HIV.

2. Zielsetzung

Zur Verhinderung der Etablierung einer Infektion muss ein Impfstoff entwickelt werden, leider sind bislang alle Versuche zur Herstellung eines AIDS-Vakzines erfolglos geblieben. Eine HIV-Infektion kann nur durch Medikamente behandelt werden (HAART), dabei gelingt es meist, die Viruslast bis unter die Nachweisgrenze zu senken und die symptomfreie Phase um ein Vielfaches zu verlängern. Eine Eliminierung von HIV aus dem Körper ist bei einer etablierten Infektion jedoch nicht möglich. Die bei der Behandlung eingesetzten Therapeutika weisen starke Nebenwirkungen auf, so dass eine ununterbrochene Langzeittherapie nicht möglich ist. Auch können sich gegen jedes derzeit eingesetzte Medikament Fluchtmutanten entwickeln. Die einzigen Vorgänge im Infektionszyklus von HIV, bei denen der humoralen Immunantwort die Neutralisierung einer Infektion möglich ist, sind die Interaktionen der Hüllproteine mit der Zielzelle. Daher war das Ziel dieser Arbeit die Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV.

In vorangegangenen Immunisierungsstudien mit von den transmembranen Hüllproteinen p15E von PERV und FeLV abgeleiteten rekombinanten Proteinen konnten neutralisierende Antikörper gegen PERV bzw. FeLV induziert werden. Diese binden an zwei Epitope im p15E, im N-terminalen Bereich (E1) und im Bereich der Membran-proximale externe Region (MPER; E2). Die von HIV-Infizierten isolierten, breit neutralisierenden monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 erkennen Epitope des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1. Von der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass der an das N-terminale Fusionspeptid sich anschließende Sequenzbereich (E1) dabei eine wichtige Rolle spielt. Der Sequenzbereich der Kernepitope (E2) liegt in der MPER, in Bindungsstudien verstärkt E1 die Bindung von 2F5 an E2. Die zusätzliche Interaktion mit dem E1-Bereich scheint die entscheidende Voraussetzung für einen neutralisierenden Antikörper zu sein.

In der Arbeitsgruppe wurden verschiedene Hybridproteine auf Basis der transmembranen Hüllproteine p15E von PERV und KoRV erzeugt, welche HIV-Sequenzen tragen. In dem von PERV p15E abgeleiteten Konstrukt Hybrid II sind die E1/E2 Bereiche von PERV durch die E1/E2 Bereiche von HIV-1-gp41 substituiert. In dieser Arbeit soll für Hybrid II in Impfstudien an Ratten ermittelt werden, wie sich Variationen in der Impfstrategie auf die Induzierung Hybrid II-spezifischer Antikörper auswirken. Für weitere Immunisierungsstudien mit modifiziertem Hybrid II sollen durch Insertionen in der Nukleotidsequenz zusätzliche Aminosäuren vor E2 eingefügt werden. Dadurch verschiebt sich die Position von E1 relativ zu E2. Alle Rattenserien sollten auf neutralisierende und bindende Antikörper untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von der Firma Roth bezogen. Chemikalien und Reagenzien anderer Hersteller sowie die verwendeten Antikörper werden im Anhang aufgeführt.

3.1.2. Puffer

Herstellung chemokompetenter *E. coli*

TFB I (pH 5,8): 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10mM CaCl, 15 % Glycerol

TFB II (pH 6,8): 10 mM RbCl, 10 mM MOPS, 75mM CaCl, 15 % Glycerol

SDS-Gelelektrophorese

Gelpuffer: 3,0 M Tris-HCl, 0,3% (v/v) SDS, pH 8,4

Probenpuffer: 50 mM Tris, 12% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 4% (v/v) SDS, 0,01% (w/v) Coomassie Blue G250

Anodenpuffer: 0,2 M Tris, pH 8,9

Kathodenpuffer: 0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% (v/v) SDS

Entfärbelösung: 25% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure

Größenstandard: SeeBlue[®] Plus2 , Standard nach Tricine-Puffersystem (Invitrogen)
PageRuler[™] Prestained Protein Ladder (Fermentas)

Agarose-Gelelektrophorese

50x TAE-Puffer: 2M Tris, 1M Acetat, 50mM EDTA

10xDNA-Ladepuffer: 5 ml Glycerol, 350 µl gesättigte Bromphenolblaulösung,
250µl Xylen-Cyanol-Lösung (10%), 200µl 50xTAE, add. H₂O_{dd} 10ml

ELISA

Waschpuffer: 1 x PBS + 0,05% (v/v) Tween-20

Blockpuffer 1 x PBS + 10% FCS + 3% BSA

Entwicklerlösung 30 ml PBS + 30 mg OPD (Sigma) + 300 µl H₂O₂ (30%, Merck)

Western Blot

Blockpuffer: 1 x PBS + 0,05% (v/v) Tween-20 + 5% (w/v) Milchpulver (Sucofin)

Waschpuffer: 1 x PBS + 0,05% (v/v) Tween-20

Substratlösung: 30 ml PBS + 30 mg DAB (Sigma) + 300 µl 30% H₂O₂

Epitopkartierung

Blockpuffer:	TBS + 0,05% (v/v) Tween-20 + 5% (w/v) Milchpulver (Sucofin)
Waschpuffer	TBS + 0,05% Tween 20
Entwicklerlösung	ECL Detection Reagent (Pierce)

3.1.3. MedienKulturmedium *E. coli*

LB Grundmedium ohne weitere Nährstoffzusätze

Einfriermedium

90% FKS + 10 % DMSO

Zellkulturmedium C8166-Zellen

Grundmedium: RPMI 1640 1x

Supplemente	10 % (v/v)	FKS
	2 % (v/v)	Glutamin
	1 % (v/v)	HEPES
	1 % (v/v)	Penicillin / Streptomycin (Biochrom)

Zellkulturmedium GHOST R4-Zellen

Grundmedium: DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)

Supplemente:	1 % (w/v)	Glucose)
	10 % (v/v)	FKS
	2 % (v/v)	L-Glutamin
	1,5 % (v/v)	HEPES
	1 % (v/v)	Penicillin / Streptomycin (Biochrom)

vor Verwendung frisch zugeben:

500 µg/ml	Genitacin (Invitrogen/Gibco) → selektiert auf CD4
100 µg/ml	Hygromycin (Invitrogen)
2 µg/ml	Puromycin (Sigma) → selektiert auf Chemokin-Korezeptor

Zellkulturmedium 293-Zellen

Grundmedium: DMEM

Supplemente:	1 % (w/v)	Glucose
	10 % (v/v)	FKS
	2 % (v/v)	L-Glutamin
	1,5 % (v/v)	HEPES
	1 % (v/v)	Penicillin / Streptomycin (Biochrom)

3.1.4. Primer, Sonden und Peptide

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von der Firma Sigma Genosys synthetisiert.

Klonierungsprimer für die modifizierten Hybrid II-Konstrukte:

Vorwärtsprimer (1./2.) PCR ist der T7 Promotor Primer: 5´ TAATACGACTCACTATA 3´

Rückwärtsprimer 1. Klonierungs-PCR (einklonieren der Inserts)

Hyb II-C1-rev: (5´) CGA CGC CCA CCT ATC CAG TTC **TAG** TTC CCT TCG ACG
CCT CTC AAT (3´)

Hyb II-C2-rev: (5´) CGA CGC CCA CCT ATC CAG TTC **TAG TAG** TTC CCT TCG
ACG CCT CTC AAT (3´)

Hyb II-C3-rev: (5´) CGA CGC CCA CCT ATC CAG TTC **TAG TAG CTC** TTC CCT
TCG ACG CCT CTC AAT (3´)

Hyb II-C4-rev: (5´) CGA CGC CCA CCT ATC CAG TTC **TAG TAG CTG CTC** TTC
CCT TCG ACG CCT CTC AAT (3´)

Rückwärtsprimer 2. Klonierungs-PCR (Verlängerung des C-Terminus)

(5´) CGC TCG AGC TAA TAC CAC AGC CAA TTT GTT ATG TTG AAC CAG
TTC CAA AGC GAC GCC CA (3´)

Primer und Sonden für die quantitative RealTime PCR der Neutralisationsassays:

Sonden

HIV env (5´) 6Fam-TGACGCTGACGGTACAGGCCAGAC-BHQ-1 (3´)

GAPDH human (5´) Hex-CTTCACCACCATGGAGAAGGCTGGG-BHQ-1 (3´)

Primer HIV env (Produktlänge 145 bp)

Vorwärts (SK68i) (5´) GGARCAGCIGGAAGCACIATGG (3´)

Rückwärts (SK69i) (5´) CCCCAGACIGTGAGITICAACA (3´)

(Cassol et al., 1991)

Primer GAPDH human (Produktlänge 147 bp)

Vorwärts (5´) GGCGATGCTGGCGCTGAGTAC (3´)

Rückwärts (5´) TGGTCCACACCCATGACGA (3´)

Der *quenching*-Bereich von BHQ-1 liegt bei $\lambda=480\text{nm}-580\text{ nm}$. 6Fam (6-Carboxy-Fluorescein) ist ein Fluorophor mit einer maximalen Emmission bei $\lambda = 517\text{nm}$, Hex (Hexachloro-6-Carboxyfluorescein, Fluorophor) mit einer maximalen Emmission bei $\lambda = 553\text{nm}$. Die verwendeten HIV-Primer beinhalten degenerierten Basen (R = A/G, I = Desoxy-Inosin), um sie subtypübergreifend einzusetzen.

Peptide HIV-1 - E1 und - E2

Die verwendeten Peptide wurden von der Firma Jerini Biotools GmbH (Berlin, Deutschland) synthetisiert.

Peptid Aminosäuresequenz

HIV-E1_{long}: LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSC

HIV-E2_{long}: CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Bakterienkulturbedingungen

Die Bakterien wurden immer bei 37°C kultiviert - Flüssigkulturen im Schüttler bei 220 rpm, Kulturplatten im Kulturschrank. Als Bakterienstämme kamen kommerziell erhältliche *E. coli* Top10 F' (Stratagene) sowie *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene) zum Einsatz. Um eine Kontamination mit anderen Mikroorganismen oder *E. coli*-Stämmen zu verhindern, wurde ein Selektionsantibiotikum zugegeben. Für mit pCal-n transformierte *E. coli* war dies Ampicillin, die verwendete Konzentration lag bei 100 µg/ml, Kanamycin als Selektionsantibiotika wurde mit der Konzentration 35 µg/ml verwendet.

3.2.2. Herstellung eines Glycerinstocks

Diese Methode dient der einfachen und schnellen Konservierung von Bakterienkulturen zur mittelfristigen Lagerung. Zur Herstellung wurden 900 µl auf 4°C gekühltes Glycerin in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend 450 µl einer entsprechenden *E. coli*-Vorkultur zugegeben, mit der Pipette gut vermischt (alle Arbeiten auf Eis) und bei -80°C gelagert.

3.2.3. Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetenz bei Bakterien beschreibt die Fähigkeit, fremde DNA aufzunehmen und die darauf codierten Gene zu transkribieren. Nicht natürlich kompetente Bakterien müssen zur Übertragung von Vektoren künstlich kompetent gemacht werden. Basis für das Vorgehen ist das Quiagen-Protokoll (QIAexpressionist 06/2003, S.39) zur Herstellung kompetenter *E. coli* mit Rubidiumchlorid. Kompetente *E. coli* Top10 (Aliquot 500 µl, LB_{ohne}) wurden aufgetaut und zur Animpfung einer Übernachtskultur (5ml LB_{Amp}) benutzt. Von dieser Übernachtskultur wurden 100 µl in 100 ml LB_{Amp} überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde danach auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (4000g bei 4°C für 10 min), anschließend in 30 ml TFB-I-Puffer resuspendiert. Die Inkubationszeit im TFB-I-Puffer betrug 90 min, danach erneutes Abzentrifugieren und Resuspendieren in 4 ml TFB-II-Puffer.

Die Kultur wurde in 100µl aliquotiert und entweder gleich für die Transformation weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.4. Transformation

Bei der Transformation wird ein DNA-Vektor in kompetente Bakterien, Hefen oder andere Zellen eingebracht, um das enthaltene Zielgen exprimieren zu lassen. Das Zielprotein kann anschließend aus der Zellkultur isoliert werden. Dazu wurde ein Aliquot (100 µl) chemokompetente *E. coli* Top10 Bakterien (Lagerung -80°C) auf Eis aufgetaut. Zu der Bakterienkultur wurde die entsprechende DNA, in der Regel 20µl eines Ligationsansatzes, gegeben, sehr vorsichtig durch Schwenken vermischt und danach für 30min auf Eis inkubiert. Dabei lagerte sich ein Teil der DNA an den Zellen an. Anschließend wurden die Zellen im Heizblock (Eppendorf) für 60 sek einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Dabei bilden sich kurzzeitig Poren in der Membran, durch welche die DNA in die Zellen gelangt. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien sofort für weitere 3 min in Eis inkubiert. Entscheidend sind schnelle Temperatursprünge von 0°C auf 42°C und zurück, deshalb wurde das Eis mit etwas Wasser aufgefüllt, so dass der Transformationsansatz in 0°C kaltem Wasser steht. Nach der Transformation wurden 500 µl LB_{ohne} (auf 37°C vorgewärmt) zugegeben und bei 37°C für 45min im Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden für 2 min bei 4000g abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl LB_{AMP}-Medium resuspendiert, um die Zellen auf LB_{AMP}-Platten auszustreichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, gewachsene Bakterienkulturen zeigten eine erfolgreiche Plasmidaufnahme an. Von einigen Klonen wurde eine Kultur angezogen (LB_{Amp}), aliquotiert und als Glycerinstock eingefroren.

3.2.5. Proteinherstellung mit E.coli

Transformierte *E. coli* tragen einen Vektor mit dem Zielgen für ein bestimmtes rekombinantes Protein, welches sie mit exprimieren. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 verwendet, welcher in der Regel als Glycerinstock vorlag. Vorbereitend wurde eine Vorkultur angesetzt, diese dienen dazu, eine Bakterienkultur aus einem Glycerinstock oder einer Einzelkolonie anzuziehen. Für eine Vorkultur wurden 6 ml LB_{+Amp} mit einer Einzelkolonie oder 4µl eines Glycerinstocks angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Zum Ansetzen der Expressionskultur wurden 5 ml der Vorkultur in 500 ml LB_{Amp} gegeben und inkubiert. In der log-Phase – bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 – erfolgte die Induktion mit IPTG (Endkonzentration 1mM). IPTG ist ein Lactose-Analogen und bindet anstelle der Lactose an den Repressor des Lac-Operons, dieser dissoziiert ab und gibt einen starken

Promotor frei. Dadurch können alle von diesem Promotor regulierten Gene, unter anderem das Zielgen, exprimiert werden. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert (6.000 g, 15 min, 4°C). Das Bakterienpellet wurde weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.

3.3. Zellkultur

3.3.1. Zellkulturbedingungen für eukaryotische Zellen

Die Zellkulturbedingungen für alle eukaryotischen Zellen in dieser Arbeit sind gleich, die Brutschränke halten die Kulturbedingungen automatisch bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Verwendet wurden Zellkulturflaschen (Nunc) mit Filter in unterschiedlichen Größen, je nach gebrauchter Zellmenge.

3.3.2. Kryokonservierung

Zur dauerhaften Lagerung von eukaryotischen Zellen ist es nötig, diese einzufrieren ohne die Zellen dabei zu zerstören. Hauptproblem sind wachsende Eiskristalle, welche die Zellen bzw. deren Membran zerstören. Erster Schritt war die Herstellung von Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FKS + 10 % DMSO), welches durch Eis auf ca. 0°C gekühlt wurde. Die Zellen wurden pelletiert (10 min bei 1.000 g), ein Mal mit Zellkulturmedium (+ 10 % FKS) gewaschen und in einer geringen Menge Einfriermedium aufgenommen, um sie zu zählen. Anschließend wurde die Zelllösung auf 1×10^7 Zellen verdünnt und in 1ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Es musste für gleichmäßiges, nicht zu schnelles Herunterkühlen gesorgt werden, daher wurden die Kryoröhrchen in Zellstoff gepackt und in einem Container bei -80°C ÜN eingefroren, um sie danach dauerhaft in flüssigem Stickstoff (-196°C) zu lagern.

3.3.3. Auftauen kryokonservierter Zellen

Die Kryoröhrchen wurden aus dem Stickstoff direkt ins Wasserbad gestellt, um möglichst schnell aufzutauen. Sobald kein Eis mehr zu sehen war, wurden die Zellen in auf 37°C vorgewärmtes Medium überführt (10 ml Medium je ml Kryostock) um die toxischen Effekte des DMSO möglichst zu minimieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 37°C, 1.000 g) und wieder in gleichem Volumen (10 ml) frischem, vorgewärmten Medium aufgenommen und in Zellkulturflaschen überführt. Um letzte Reste des DMSO auszuwaschen, wurde das Medium nach 24h durch frisches Medium ersetzt und die Zellen entsprechend der üblichen Zellkulturbedingungen weitergeführt.

3.3.4. C8166-Zellen

Die humane T-Zelllinie C8166 wurde durch ein defektes HTLV-Genom immortalisiert. Die Zellen sind nicht adhären und mussten alle 3-4 Tage passagiert werden. C8166 sind Suspensionszellen, sie wurden deshalb zum Passagieren abgesaugt, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 5min bei 800g abzentrifugiert. Der alte Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit frischem Medium (37°C) resuspendiert und 1/5 des Volumens wieder in die Zellkulturflasche gegeben. Abschließend wurde die entsprechende Menge Medium (37°C) aufgefüllt, so dass der Flüssigkeitsstand in der Zellkulturflasche etwa 5 mm betrug.

3.3.5. GHOST R4/R5-Zellen

Die GHOST R4-Zelllinie stammt von humanen Osteosarcomzellen ab und wurde zur stabilen Expression von CD4 mit dem MV7neo-T4 retroviralen Vektor transduziert. Der Zusatz R4 bzw. R5 weist auf das transduzierte Plasmid für den jeweiligen Korezeptor - CXCR4 bzw. CCR5 - hin. Die Plasmide tragen Resistenzen für die Selektionsantibiotika (Genitacin für CD4, Puromycin für CXCR4/CCR5). Zum Passagieren wurde das alte Medium abgesaugt und durch eine geringe Menge Frisches ersetzt. Die Zellen sind adhären und wurden daher mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelöst, im Medium resuspendiert und 1:10 gesplittet. Abschließend wurde entsprechend der Kulturflasche Medium auf eine Füllhöhe von max. 5mm aufgefüllt. Die Selektionsantibiotika wurden kurz vor dem Gebrauch dem vorgewärmten (37°C) Medium zugegeben.

3.3.6. 293-Zellen

Die humane embryonale Nierenzelllinie 293 ist adhären und wurde durch das humane Adenovirus (HAdV) 5 immortalisiert. Die Passagierung erfolgt analog wie bei den GHOST-Zellen, gesplittet wurde im Verhältnis 1:7 - 1:8.

3.3.7. HIV-Neutralisationsassay

Mit einem Neutralisationsassay sollte die neutralisierende Eigenschaft von Seren bzw. deren Antikörpern untersucht werden. Dazu wurde das entsprechende Serum mit einer definierten Menge Viren zur Adsorption inkubiert. Sind genügend neutralisierende Antikörper vorhanden, werden nahezu alle infektiösen Viren gebunden und auch an der Infektion der Zellen gehindert. Je weniger Viren sich vermehren können, desto weniger Provirus-DNA lässt sich in der anschließenden Real Time-PCR nachweisen.

Als neutralisierend wurde ein Serum gewertet, wenn die Provirusintegration um mehr als 75% zurückgegangen war, ohne dass zytotoxische Effekte auftraten. In der Real Time PCR entspricht dies einem Δ ct von +2, d.h. 2 PCR-Zyklen später als bei einem Vergleichswert wurde ein errechneter Grenzwert bei der Amplifikatmenge (die HIV-Sequenz) überschritten. Für den Neutralisationsassay mit GHOST-Zellen wurden vorbereitend am Vortag 4.000 Zellen in 100 μ l Medium auf eine 96-well-Flachbodenplatte zum Anwachsen ausgesät. Die Seren wurden 30 min bei 56°C dekomplementiert, um die zytotoxischen Komplementproteine zu denaturieren. Zur Adsorption der Serumantikörper an die Viren wurden in einer separaten Platte 25 μ l Serum 1:2 mit Medium verdünnt. Anschließend wurden 50 μ l einer verdünnten HIV-Viruslösung zugegeben und die Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Virusverdünnung richtet sich nach der Infektiosität des Virusstocks, dieser wurde bei der Herstellung austitriert. Die vorletzte, noch vollständig durchinfizierende Verdünnungsstufe (beim verwendeten Virusstock 1:32), wurde als Maßstab für die Neutralisationsassays genommen. Die adsorbierte Serum-/Viruslösung wurde anschließend direkt in die wells mit den Zellen gegeben (Gesamtvolumen 200 μ l).

Der Neutralisationsassay mit C8166-Zellen verlangte einige Abwandlungen, da es sich um Suspensionszellen handelt. Es wurden U-well-Platten (Nunc) verwendet und die Zellen (5×10^4 in 100 μ l Medium) direkt nach der Adsorption zupipettiert.

Zur Infektion wurden die Zellen 72 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit sollten die Viren, sofern nicht durch Antikörper neutralisiert, die Zellen infizieren, sodass die Provirusintegration stattfinden konnte. Nach 72 h wurde der Überstand abgenommen und die Zellen durch dreimaliges Einfrieren/Auftauen (jeweils 20min bei -80°C / +95°C) lysiert.

3.4. Biochemische Methoden

3.4.1. SDS-PAGE / Gelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode zur massenabhängigen Auftrennung von Proteinen. Durch Coomassie-Färbung können Proteine fixiert und direkt im Gel sichtbar gemacht werden. Das anionische Detergenz SDS lagert sich in die Proteinstruktur ein und erzeugt so in jedem Protein einen negativen Ladungsüberschuss, wodurch alle Proteine gerichtet zur Anode laufen. Zugleich wird das Protein weitgehend denaturiert, dadurch wird eine strukturunabhängige Auftrennung nur nach der Molekülmasse möglich.

Für die Gelelektrophorese wurde das Biorad *MiniProtean II*-System verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurde ein Standardgel mit 12 % Acrylamid im Trenngel sowie 5 % im

Sammelgel (nach Schagger und von Jagow, 1987) benutzt. Die Proteinproben wurden 1:1 in Probenpuffer aufgenommen und zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 95°C inkubiert. Ein kommerzieller Größenstandard wurde mitgeführt. Die Laufbedingungen variieren zwischen 60-120 V. Die Färbung erfolgt mit Coomassie Blue G250 für 1 h bei Raumtemperatur, die Entfärbung nicht komplexierten Farbstoffes erfolgt für mindestens 4h bei Raumtemperatur in der Entfärbelösung.

3.4.2. Proteinaufreinigung durch Auswaschen löslicher Proteine

Schlecht lösliche Proteine lassen sich auf unterschiedliche Art in unterschiedlichen Reinheitsgraden aufreinigen. Die einfachste Methode ist das Auswaschen löslicher Proteine mit PBS. Das Bakterienpellet aus der Expressionsskultur wurde in 20 ml PBS resuspendiert und im 5min Ultraschallbad aufgeschlossen. Das Lysat wurde jeweils drei Mal gewaschen, das heißt in 200 ml PBS aufgenommen, gut suspendiert und anschließend wieder abzentrifugiert (6000 g; 15 min bei 4°C), der Überstand wurde verworfen.

3.4.3. Proteinaufreinigung durch Acetonfällung

Die Acetonfällung dient der Abtrennung von Lipidbestandteilen, die abgetrennten Proteine liegen nach der Fällung und Trocknung als ein pulverartiges Präparat vor. Zur Herstellung der Proteinpräparation von Hybrid II wurde das *E. coli* Zelllysat drei Mal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert, um möglichst viel lösliches Protein abzutrennen. Das Proteinpellet wurde auf Eis gekühlt, mit 12 ml Aceton (-20°C) versetzt, resuspendiert und für 30 min bei -20°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (10 min bei 3.000 g) und in 3 ml frischem Aceton (-20°C) resuspendiert, danach erneut zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet zum Trocknen auf einer Glasplatte ausgestrichen, bei Raumtemperatur getrocknet und zu feinem Pulver zermahlen.

3.4.4. Proteinaufreinigung durch SDS-Page und Elutrap

Ein sehr hoher Reinheitsgrad der Proteine wurde durch die Elektroelution von entsprechend ausgeschnittenen SDS-Gelbanden möglich.

Das Auswaschen löslicher Proteinfractionen erfolgte in PBS. Zur Aufreinigung über ein SDS Gel und Elektroelution wurden präparative Gelkämme mit durchgehenden Taschen sowie einer Markertasche verwendet, um möglichst viel Protein verarbeiten zu können. Die sonstigen Bedingungen entsprachen der Standard-SDS-Gelelektrophorese. Zur Färbung wurde eine nicht fixierende Färbelösung (*GelCode Blue Stain*, Pierce) verwendet.

Abweichend von der Herstellerempfehlung wurde nur so lange gefärbt, bis sich auf der entsprechenden Höhe die Hybrid II-Bande abzeichnete. Anschließend wurde mit Glasplatten die Bande möglichst schmal ausgestanzt und der Gelstreifen zum Entfärben 5 min in Wasser geschwenkt. Die Elektroelution des Proteins aus dem Gel erfolgte in einer Elektroelutionsapparatur des Typs Elutrap (Schleicher & Schuell) und den vom Hersteller mitgelieferten Membranen (Bt1 und Bt2). Die Elektroelution fand über Nacht bei 80 V statt, die Proteinlösung wurde herauspipettiert und durch Kathodenpuffer ersetzt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde anschließend das elektrische Feld umgepolt und bei 200 V für 20 sek angeschaltet, um an den Membranen haftende Proteine abzulösen und als zweite Fraktion abzunehmen. Die verwendeten Kathoden- und Anodenpuffer entsprechen denen der SDS-Gelelektrophorese.

3.4.5. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Es wurden zwei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration angewendet, die Proteinbestimmung nach Bradford und der Pierce Protein-Assay. Die Bestimmung der Werte erfolgte bei beiden Methoden im Abgleich mit einer Eichgeraden aus einem BSA-Standard (200 - 1.200 µg/ml). Zur Messung wurden Triplikate erstellt, gemessen wurde in einer 96 well Mikrotiterplatte im ELISA-Reader.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau R-250 lagert sich an Proteinseitenketten an, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Zur Herstellung der Färbelösung wurde die Coomassie-Stammlösung 1:5 in H₂O_{dd} verdünnt. Jeweils 196µl der Färbelösung wurden mit 4 µl Probe, Standard oder H₂O_{dd} verdünnt, gut durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Werte erfolgte im Tecan Elisa Reader bei 560 nm.

Pierce Protein Assay

Die Proteinkonzentration wird hier über eine Farbreaktion gemessen. Diese beruht auf einer Reduktion von Cu²⁺ zu einwertigem Cu⁺ durch Cystein, Tryptophan und Tyrosin. Das Cu⁺ wird durch 2 Moleküle Bicinchoninsäure (BCA) chelatiert (Biuret-Reaktion), es entsteht ein violetter Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Für die Nachweisreaktion musste eine Gebrauchslösung aus Reagenz A und B im Verhältnis 50:1 frisch hergestellt werden. Von dieser Gebrauchslösung wurden 200 µl in eine Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend 10 µl der Probe, des Standards oder der Wasserkontrolle zugegeben und die

Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten im Tecan Elisa Reader bei 570 nm gemessen, die Referenzwellenlänge betrug 492 nm.

Da die zu bestimmenden Proteine teilweise unlöslich waren, wurde über diese Methoden eine Standardlösung mit löslichem Lysozym erstellt. Zur Mengenbestimmung wurde eine SDS PAGE mit dem nichtlöslichen Protein und einer Verdünnungsreihe des Lysozymstandards durchgeführt, um anhand der Bandenstärke im direkten Vergleich die aufgetragene Menge nichtlöslichen Proteins zu ermitteln.

3.5. Molekularbiologische Methoden

3.5.1. DNA - Isolierung

Plasmid-Mini-Präparation (Miniprep)

Eine Einzelkolonie z.B. von einem Transformationsklon wurde in Kultur genommen (in 3 ml LB_{AMP} für 6-8 h bei 37°C) um genügend Bakterien für die Plasmidpräparation anzuziehen. Für die Plasmid-Mini-Präparation wurde ein kommerzielles Kit verwendet (JetStar-Miniprep-Kit / 200, Genomed) und dabei das vom Hersteller vorgegebene Protokoll verwendet. Das Prinzip dieses Kits ist die alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Bindung der Plasmide an eine Anionenaustauscher-Matrix, der Bindungsprozess ist reversibel. Die Elution erfolgte mit H₂O_{dd}, zur besseren Ausbeute bei erwarteter geringer Plasmidmenge wurde die Mini-Säule im Heizblock auf 70°C gebracht und mit 70°C warmen H₂O_{dd} eluiert.

Plasmid-Maxi-Präparation (Maxiprep)

Das Vorgehen bei der Maxiprep erfolgte analog der Miniprep. Verwendet wurde ein kommerzielles Kit (JetStar-Maxiprep-Kit / 20, Genomed). Ausgangsmaterial war in der Regel eine 100-150 ml *E. coli* Kultur deren OD₆₀₀ um 2,0 lag. Es wurde nach dem Herstellerprotokoll gearbeitet. Vor der Präparation wurde die Säule mit der Anionen-Austauscher-Matrix mit Äquilibrierungspuffer äquilibriert. Es folgte die alkalische Lyse der Bakterien, anschließend die Neutralisierung des Puffers. Der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren (12.000g für 10min) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule gewaschen und die Plasmid-DNA eluiert. Aus dem Eluat musste die DNA mit Isopropanol präzipitiert werden. Im Folgenden wurde die DNA wieder abzentrifugiert und mit Ethanol gewaschen sowie getrocknet. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 20 µl H₂O_{dd} resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.5.2. Agarose-Gelelektrophorese

In einem Agarosegel werden durch Anlegen einer elektrischen Spannung DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt. Agarose bezeichnet ein Zuckerpolymer aus D-Galactose, welche 3,6 glycosidisch mit Anhydrogalactose vernetzt ist. Dadurch entsteht ein engmaschiges Netz, durch das die DNA im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode gezogen wird. Die Auftrennung basiert auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit durch die je nach Agarosekonzentration mehr oder weniger dichte Agarose-Gelmatrix. Übliche Zusammensetzungen sind 0,8-2 g Agarose je 100 ml TAE-Puffer (0,8 - 2 % w/v). Die Dichte des Gels wurde abhängig von der Größe der aufgetragenen Nucleinsäuren gewählt, d.h. für Fragmente um 300-500 bp z.B. 1,5%.

Das TAE-Puffer-Agarose-Gemisch wurde in einem Erlenmeyerkolben kurz aufgeköcht und blasenfrei in den Gelschritten gegossen, zu einer Geldicke von etwa 7-9 mm. Die angelegte Spannung betrug standardmäßig 120 V. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Ladepuffer (10x) gemischt -Endkonzentration 1x. Zur Auswertung wurde das Gel nach der Elektrophorese für 30 min in ein Bad aus Ethidiumbromidlösung gelegt. Die DNA-Banden wurden durch das interkalierte Ethidiumbromid im UV-Licht (Bio-Rad Gel Doc 2000) sichtbar und konnten abfotografiert werden.

3.5.3. DNA - Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von Nucleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Das Photometer berechnet die Extinktion nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} * c * d$$

E_{λ} : Extinktion, Absorption an der Wellenlänge λ ; ϵ_{λ} : molarer (dekadischer) Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge λ (in l / mol * m); c: Konzentration der absorbierenden Substanz (in mol/l);

d: Schichtdicke der Küvette (in m)

Die Konzentration der DNA wurde bei $\lambda = 260$ nm gemessen. Um den Grad der Verunreinigung mit RNA zu ermitteln, wurde zusätzlich die Extinktion bei $\lambda = 280$ nm bestimmt. Das Verhältnis beider Extinktionswerte (260/280-ratio) gibt einen abstrakten Wert über die Reinheit der DNA-Probe an. Dieser sollte über 1,8 liegen, ein Wert von 1,95 bedeutet einen sehr hohen Reinheitsgrad. Zur Messung wurden Kunststoffküvetten (Eppendorf UVette) mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet, das Photometer stammt von der Firma Eppendorf.

3.5.4. Restriktionsverdau

Mithilfe von Restriktionsenzymen (Restriktionsendonucleasen) wurden Vektor und Insert linearisiert und so mit kompatiblen Enden für die Ligation versehen. Die Enzyme spalten sequenzspezifisch unter ATP-Spaltung die kovalente Bindung zwischen Zucker und Phosphat im DNA-Rückgrat. Entscheidend ist die Wahl der Restriktionsenzyme, welche unterschiedliche Erkennungs- bzw. Schnittsequenzen haben. Alle in der Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme schneiden innerhalb ihrer Erkennungssequenz und erzeugen überlappende Enden (*sticky ends*). Die Vektoren enthalten eine MCS (*multiple cloning site*), die Auswahl der Restriktionsenzyme richtet sich in der Regel nach den bereits vorhandenen Enden des Inserts. Der Verdau erfolgte mit den vom Enzymhersteller (NEB) vorgegebenen Puffern und Reaktionsbedingungen. Die Reaktionen liefen in der Regel im Heizblock bei 37°C für 1-2 h ab.

Standardansatz:

10-50 µg	DNA
2 µl	Restriktionsenzym(e) → 20 U/µl
5 µl	Puffer 10x
5 µl	<u>BSA 10x</u>
add. H ₂ O _{dd} → Σ 50 µl	

3.5.5. Dephosphorylierung der 5'-Enden

Um die Religation bei linearisierter DNA mit komplementären Schnittenden zu verhindern, wurde mit SAP (Shrimp alkalischer Phosphatase) dephosphoryliert. An 5' befindet sich nach der Restriktion noch ein freies Phosphat, über welches unter Umständen die Schließung des DNA-Rückgrates erfolgen kann. Um die Religation auch bei unterschiedlichen *sticky ends* völlig auszuschließen, wurde als zusätzliche Maßnahme eine Dephosphorylierung mit SAP durchgeführt. Vor der Dephosphorylierung musste die DNA von den Restriktionsenzymen und Restriktionspufferresten befreit werden, dazu wurde ein Quiagen PCR-Purification-Kit benutzt und die DNA in H₂O_{dd} aufgenommen. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei 37°C, anschließend wurde die SAP bei 65°C hitzeinaktiviert.

Standardansatz:

20-40µl	Vektor-DNA
5µl	Reaktionspuffer RX 10x (NEB)
5-20 U	<u>SAP (NEB), Menge je nach DNA-Konzentration</u>
add. H ₂ O _{dd} → Σ 50µl	

3.5.6. Ligation

Nach der Restriktion sollten Vektor und Insert durch Ligation zusammengeführt werden. DNA-Ligasen katalysieren in einer ATP-abhängigen Reaktion die Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen den jeweiligen 3'-OH und 5'-Phosphat-Enden von Vektor und Insert. Voraussetzung war, dass die Schnittstellen an den überlappenden Bereichen übereinstimmen, dies wurde über die Auswahl der Restriktionsenzyme über ihre spezifischen Schnittsequenzen erreicht. Für möglichst große Effizienz bzw. die Verhinderung unspezifischer Zusammenlagerung von Vektor und Insert betrug die Reaktionstemperatur 14°C, die Reaktionszeit 12-16 h. Zur Kühlung auf 14°C wurde ein Thermocycler oder Heiz/Kühlblock (beide Eppendorf) verwendet.

Standardansatz:

1 µg	Vektor-DNA
3 µg	Insert-DNA
5 µl	T4-Ligase Puffer 10x (NEB)
20 U	T4 Ligase (NEB)

add H₂O_{dd} → Σ 50µl

3.5.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch eine PCR lassen sich kleine Ausgangsmengen an DNA-Vorlage (Template) in einer zyklischen Reaktion vermehren. Die DNA-Menge steigt quadratisch mit der Anzahl der Zyklen. Ein Zyklus besteht aus 3 Schritten:

- Aufschmelzen des Template-DNA Doppelstranges bei 95°C
- Anlagerung (annealing) der spezifischen Primer bei 45°C - 65°C - je nach Primereigenschaft und -länge
- Polymerisationsreaktion bei 72°C, die freien dNTPs werden entsprechend ihrer Spezifität durch die Polymerase (AmpliTaq Gold) kovalent an den Primer gebunden
- Einmalig am Ende aller Zyklen erfolgt ein Elongationsschritt, bei dem nicht vollständige Kopien sich ähnlich einem Primer an Templates anlagern und an 3' vervollständigt werden

Die Reaktionsenergie für die Polymerisation entsteht bei Abspaltung von Pyrophosphat (P-P) vom dNTP. Das Desoxynucleotid-Monophosphat wird durch die Taq-Polymerase kovalent an das freie 3'-Ende des Primers gebunden.

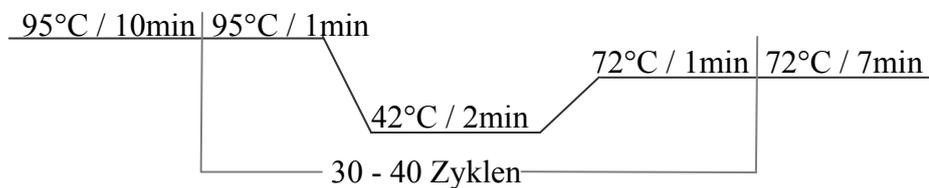
Standard-PCR Ansatz für die Klonierung:

- 3,0 µl Template
- 0,5 µl Vorwärtsprimer
- 0,5 µl Rückwärtsprimer
- 2,5 µl PCR-Puffer 10x
- 0,5 µl dNTP Mix 10 mM
- 0,2 µl Taq-Polymerase

add. 13,2 µl H₂O bidest

Σ 25,0 µl je Ansatz

Thermales-Profil für die Standard-PCR:



In der Regel wurden 35 Zyklen durchlaufen, nach etwa 40 Zyklen endet die logarithmische Phase der DNA-Vervielfältigung. Nur bei besonders geringen Ausgangskonzentrationen der Template-DNA wurden mehr Zyklen durchlaufen.

3.5.8. Real Time - PCR

Die Real Time PCR dient der quantitativen Erfassung von Amplifikaten über fluoreszenzmarkierte Sonden, welche spezifisch ein Replikat, z.B. HIV-Sequenzen, erkennen und komplementär binden. Die Sonden sind kurze Oligonucleotide, welche an den Enden einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Fluorescein / FAM) und einen Quencher tragen. Sie binden auf einem Sequenzabschnitt zwischen den Primern. Der Quencher absorbiert durch strahlungsfreie Energieübertragung (FRET) die Fluoreszenzstrahlung. Bei der Synthese des Zweitstranges baut die Taq-Polymerase über ihre 5'-3'-Exonucleaseaktivität die Sonde ab, so dass sich Quencher und Fluoreszenzfarbstoff voneinander entfernen. Dadurch wird die Fluoreszenz detektierbar (TaqMan[®]-Prinzip). Für die Detektion des HIV-Provirusgenoms wurden Primer verwendet (vorwärts SG68i / rückwärts SK69i), welche auf der *env*-Sequenz binden (Cassol et al., 1991). Die interne Kontrolle zur Überprüfung der Zellzahl wurde mit GAPDH-Primern durchgeführt.

Für die Real Time PCR wurde Zelllysat aus HIV-Neutralisationsassays verwendet, um die Häufigkeit der Provirusintegration zu untersuchen. Zelllysat wurde durch dreimaliges

Einfrieren/Auftauen (jeweils 20 min bei -80°C / 95°C) hergestellt (siehe HIV-Neutralisationsassay). Zum Zelllysat wurden $100\mu\text{l}$ einer Proteinase-K - Lösung gegeben und bei 3 h bei 56°C inkubiert, um zelluläre Enzyme zu zerstören. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der Proteinase-K für 30 min bei 99°C im Hybridisierungssofen.

Ein typischer Real Time PCR - Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

3 μl	Lysat
2,3 μl	PCR-Puffer 10x
0,625 μl	dNTPs
1,7 μl	MgCl_2
0,5 μl	fw-Primer (5 pmol)
0,5 μl	rev-Primer (5 pmol)
0,5 μl	Sonde (5 pmol)
0,25 μl	Ampli Taq Gold
15,63 μl	$\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$

Für die eigentliche Real Time-PCR wurde das Mx4000[®] Multiplex Quantitative PCR System von Stratagene verwendet. Bei den PCR-Gefäßen wurde genauestens darauf geachtet, dass vor der PCR die Deckel richtig verschlossen und die Gefäße absolut sauber waren.

Temperaturprofil für die PCR:

10 min bei 95°C [30 sek bei 95°C ----- $\Delta T 1,6^{\circ}\text{C/s}$ -----> 60 sek bei 55°C] für 45 Zyklen

Die Ergebnisse wurden als ct-Wert (*threshold cycle*) ausgegeben, dieser entspricht dem PCR-Zyklus, ab dem die gemessene Fluoreszenz den Schwellenwert signifikant überschreitet, dieser Schwellenwert liegt am Anfang der logarithmischen Phase der PCR.

3.6. Immunologische Methoden

3.6.1. Enzym Linked Immuno Sorbant Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine quantitative Nachweismethode für Proteine und Peptide, der Nachweis erfolgt über spezifische Antikörper. Ein primärer Antikörper erkennt seine Epitope auf Proteinen oder Peptide, welche auf die Oberfläche der Vertiefungen (*wells*) einer 96-well-Mikrotiterplatte aufgebracht wurden (*coating*). An den Primärantikörper (z.B. der Ratte) bindet ein Sekundärantikörper (anti-Ratte), an welchen ein Enzym zum Farbnachweis gekoppelt ist, bei den hier verwendeten Enzymen eine Peroxidase. Nach Zugabe des

enzym-spezifischen Substrates entsteht eine mengenäquivalente Farbreaktion (Avrameas und Ternynck, 1971).

Für die ELISAs wurden 96-*well*-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno[®] Maxisorb) benutzt, das *coating* erfolgte mit 100 ng des entsprechenden Peptides oder Proteins. Diese binden an die polymere Matrix, mit denen der Boden der *wells* beschichtet ist. Für das *coating* wurden die Proteine bzw. Peptide in Kbonatpuffer verdünnt (1 µg / ml). Von dieser Lösung wurden je 100 µl in die *wells* gegeben und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor dem Gebrauch der beschichteten Platten mussten eventuelle freie Bindungsstellen geblockt werden, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Dazu wurde in jedes *well* 200 µl Blockierungspuffer gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Es folgten 3 Waschzyklen für je 10 sek mit T-PBS im Tecan ELISA-*washer*. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte für 2 h bei 37°C. Rattenserum wurde 1:200 in Blockierungspuffer verdünnt, das Volumen je *well* betrug 100 µl (2F5-Kontrolle 33 µg/*well*). Es folgten wieder 3 Waschzyklen, danach die Inkubation mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (anti-Ratte für Seren, anti-human für 2F5) für 1 h bei 37°C. Die Sekundärantikörper wurden entsprechend den Herstellerangaben verdünnt im ELISA eingesetzt. Es folgten wieder 3 Waschzyklen, anschließend die Inkubation mit 100 µl OPD-Entwicklerlösung/*well* bei RT. Die Entwicklungszeit wurde so gewählt, dass eine deutliche, nicht übersättigte Farbreaktion zu erkennen war - maximal 12 Minuten. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde 100 µl/*well* H₂SO₄ (5N) in der gleichen Pipettierreihenfolge wie die Entwicklerlösung zugegeben. Die Messung erfolgte mit dem Tecan ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenz: 620 nm).

3.6.2. Western Blot

Der Western Blot dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Antikörpern. Blot bezeichnet die Immobilisierung von Proteinen auf einem Medium, hier einer PVDF (Polyvinylidendifluorid) - Membran. Ausgangspunkt ist ein Gel aus einer SDS-PAGE, in der die Proteine eines Proteingemisches der Größe nach aufgetrennt wurden. Dies ist der Vorteil gegenüber der zweiten immunologischen Nachweismethode - dem ELISA - bei dem ohne Unterscheidungsmöglichkeit aus einem heterogenen Proteingemisch ein Produkt hochspezifisch nachgewiesen wird. Beim Western-Blot werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes (Elektroblot) 1:1 vom Gel auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,2 mm, Millipore) übertragen. Auf der Blotmembran können die Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Als Primärantikörper dienten die Seren bzw. Kontrollantikörper (2F5), die Sekundärantikörper sind Peroxidase-Konjugiert und erkennen

spezifisch den Fc-Teil der jeweiligen Primärantikörper. Beim Western Blot ist nur ein qualitativer Nachweis möglich, als quantitativer Nachweis ist der Western Blot unbrauchbar.

Vor dem Blotten wurde die PVDF-Membran zur besseren Benetzbarkeit für 5 min in Methanol geschwenkt. Membran und SDS-Gel wurden für 15 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des Blots erfolgte in Sandwichbauweise in dieser Reihenfolge (von oben nach unten): Deckelplatte der Blotkammer als Kathode - 3 Lagen Blotpapier - SDS-Gel - Membran - 3 Lagen Blotpapier - Bodenplatte der Blotkammer als Anode. Das Blotpapier wurde bis zur Sättigung mit Blotpuffer getränkt, es dient als Pufferreservoir und ermöglicht gleichmäßigen Stromfluss. Blotpapier und Membran müssen die gleiche Größe wie das Gel haben, andernfalls läuft der Blot ungleichmäßig. Der Elektrobplot wurde für 20 min bei 12-15 V durchgeführt.

Zum Blockieren freier Bindungsstellen wurde die Membran für mindestens 1h in Blockierungspuffer geschwenkt. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation der Membran mit dem in Blockierungspuffer verdünnten Primärantikörper für 2 h bei RT (Verdünnung Seren 1:200, monoklonale AK 2F5 1:20.000). Es folgten drei Waschstschritte für je 10 min mit Waschpuffer, danach die Inkubation für 1 h bei RT mit entsprechenden Sekundärantikörpern (1:2.000 in Blockierungspuffer), sowie wiederholtes Waschen (3 x 10 min mit Waschpuffer).

Der Farbnachweis erfolgte über die Entwicklung mit DAB-Substratlösung. Dazu wurde die Substratlösung immer frisch angesetzt und die Membran darin so lange inkubiert, bis die gewünschten Banden sichtbar wurden, maximal jedoch 10 min.

Wurden viele verschiedene Primärantikörper verwendet, so wurde die geblottete Membran in eine Kapillarininkubationskammer gespannt. Diese Kammer ist mit Aussparungen versehen, welche über der eingespannten Membran separate Kavitäten bildeten, welche einzeln mit Primärantikörpern beschickt werden konnten.

3.6.3. Epitopkartierung

Die Epitopkartierung dient der Charakterisierung der Bindungsspezifität von Antikörpern. Dazu wurde eine spezielle, kommerziell erhältliche Nitrozellulosemembran benutzt, auf der die gesamte Aminosäuresequenz in Form von 15mer Peptiden immobilisiert war (Jerini, Berlin). Die Peptide sind in der Sequenzfolge um jeweils 2-3 AS versetzt und überlappen mit dem benachbarten Peptid um jeweils 12 AS. Je größer der Überlappungsbereich, desto genauer die Trennschärfe bei der Eingrenzung der Epitope, die von den Antikörpern erkannt wurden. Je nachdem, auf welchen Peptidspots der Membran die Antikörper signifikant binden, lässt sich die Epitopsequenz über die entsprechende Peptidsequenz bestimmen. Das

Prinzip der Antikörperbindung und -detektion ist analog dem Western Blot. Der Primärantikörper (aus dem Serum) bindet an die Epitope auf der Membran und wurde seinerseits von Fc-spezifischen Sekundärantikörpern gebunden. Diese waren Peroxidase-Konjugiert wodurch die ECL-Detektion möglich wurde.

Der erste Schritt war das Blockieren der Membran mit Blockierungspuffer für 1h bei 37°C. Die Seren bzw. die Antikörper wurden zur Inkubation jeweils in Blockierungspuffer verdünnt. Danach erfolgte die Inkubation mit den Seren (Verdünnung 1:1.000) für 2 h bei Raumtemperatur. Der dritte Schritt war die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Ratte-HRP, 1:10.000, Dako), ebenfalls für 2 h bei RT. Zwischen jedem Schritt wurde die Membran drei Mal mit Waschpuffer für jeweils 10 min gewaschen. Die Regeneration der Membran erfolgte nach dem Herstellerprotokoll Membran-Regeneration I.

3.6.4. ECL-Detektion

Die ECL-Detektion ist eine Möglichkeit zum Nachweis spezifischer Antikörperbindung auf Membranen (siehe Epitopkartierung). Eine an den Sekundärantikörper konjugierte Meerrettichperoxidase setzt unter Spaltung von H_2O_2 (Elektronendonator) das Entwicklersubstrat in eine phosphorisierende Substanz, das Luminol, um. Für die Reaktion wurde die ECL-Entwicklerlösung frisch hergestellt (Komponente I und II gemischt – 2 ml+2 ml, ECL detection kit von Amersham) und die Membran für 2 min unter Lichtausschluss inkubiert (bei RT). Zur Messung der Lumineszenz wurde in einer Dunkelkammer mit der Membran ein Röntgenfilm für ca. 1min in einer Filmkassette belichtet und sofort entwickelt. Die Antikörperbindung auf der Membran äußert sich durch schwach leuchtende Punkte, welche als dunkle Spots auf dem entwickelten Film erkennbar sind.

3.7. Immunisierungsstudien

3.7.1. Versuchstiere

Für die Immunisierung wurden ca. 10 Wochen alte, weibliche Wistar-Ratten (BfR, Tierversuchsanstalt Marienfelde, Deutschland) verwendet. Die Ratten wurden in Gruppen zu je 4 Tieren in Boxen gehalten, alle Tiere hatten das gleiche Alter. Wistar-Ratten sind Immunkompetent und verfügen über Albinismus.

3.7.2. Immunisierungsstrategie

Die Antigene wurden an mindestens drei Stellen appliziert. Standard war ein Antigenvolumen von 1ml je Tier. Davon wurden je 250 μ in den Oberschenkel des rechten

und linken Hinterlaufes (intramuskulär, i.m.) appliziert, die verbleibenden 500 µl unter die Nackenhaut (subcutan, s.c.). Abweichende Immunisierungen werden gekennzeichnet, dabei wurden 500µl Antigen, anstatt subcutan, in die Bauchhöhle gespritzt (intraperitoneal, i.p.). Um den Stress für die Tiere möglichst gering zu halten, wurden die Tiere kurzzeitig mit einem Inhalationsnarkotikum (Isofluran) leicht betäubt. Jeweils 21 Tage nach der Prime-Immunisierung wurde die erste *boost*-Immunisierung durchgeführt, nach weiteren 21 Tagen die zweite (bzw. dritte) *boost*-Immunisierung. Direkt vor der Immunisierung wurden die Antigene 1:1 mit öligem Adjuvans sorgfältig zu einer gleichmäßigen Suspension vermischt. Die Immunisierungen aller zu einem Versuchsteil gehörenden Rattengruppen wurden zusammen durchgeführt.

Eine Woche vor jeder Immunisierung wurde den Tieren Blut abgenommen. Die Blutabnahmen für das *prime*- bzw. *boost*-Blut wurden 2 Wochen nach der jeweiligen Immunisierung an der Augenvene durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Versuchsstrategie

Wie in der Zielsetzung ausgeführt, sollten mit verschiedenen Konstrukten, die HIV-Sequenzen enthalten, neutralisierende Antikörper induziert werden. Bei der Immunisierung von Ratten, unter anderem mit dem Hybrid II-Protein, hatte man in vorangegangenen Studien dieser Arbeitsgruppe neutralisierende Seren erhalten. Hybrid II ist ein Konstrukt aus dem *backbone* des p15E vom porcinen endogenen Retrovirus (PERV), es enthält die HIV gp41 abgeleiteten Sequenzbereiche E1 und E2. Im E2 Bereich befinden sich die Epitope der als breit neutralisierend beschriebenen Antikörper 4E10 und 2F5 (Abb. 4.1.).

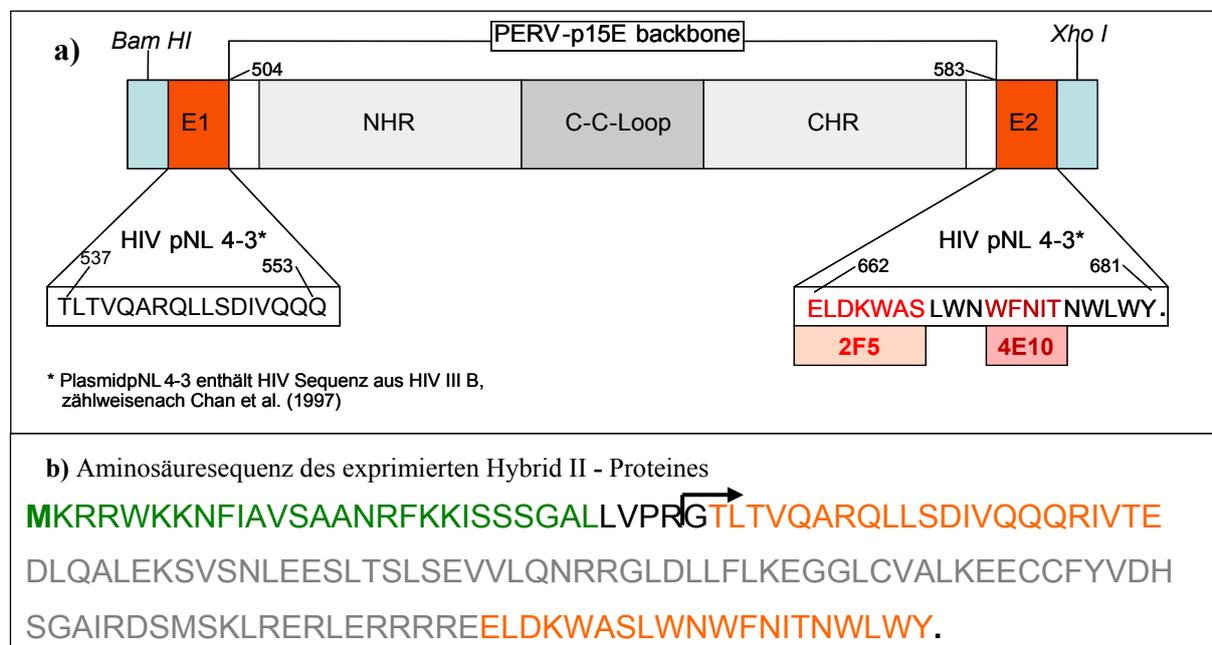


Abb. 4.1. a) Schematischer Aufbau des Hybrid II-Konstruktes mit den Aminosäuresequenzen der E1 / E2 - Regionen und Kennzeichnung der 2F5/4E10-Epitope. NHR/CHR: N-terminale/C-terminale Helixregion, C-C-Loop: Cystein-Cystein-Schleife

b) Aminosäuresequenz des exprimierten Hybrid II-Proteins. Legende: Pfeil - Beginn des Hybrid II-Konstruktes, grün - Calmodulin-Bindeprotein (zu pCal-n), schwarz - orange - HIV-E1-(C-terminal) und HIV-E2-(N-terminal) Bereich, grau - PERV-p15E-*backbone*.

Zur Generierung neutralisierender Antikörper wurden verschiedene Antigene für die Immunisierungsstudien benutzt. Auf Basis des Hybrid II-Konstruktes wurde entsprechendes Hybrid II Protein hergestellt und in vergleichenden Immunisierungsstudien eingesetzt. Von Hybrid II wurden im zweiten Versuchsteil modifizierte Konstrukte mit Insertionen vor dem 2F5 Epitop kloniert, um durch das Impfantigen eine eventuelle Verbesserung der neutralisierenden Eigenschaften der induzierten Antikörper zu erhalten.

Im dritten Ansatz wurden mit HIV-gp41 transfizierte 293 Zellen (293-gp41) verwendet, deren Zelllysate als Impfantigen eingesetzt worden war, um gp41 im Membrankontext eine möglichst natürliche Konformation zu ermöglichen. Die transfizierten 293gp41 Zellen mussten vor der Verwendung nur auf ihre Expression von gp41 überprüft werden. In Abbildung 4.2. ist ein Fließschema dargestellt, welches einen Überblick über die Abfolge der einzelnen Versuchsreihen gibt.

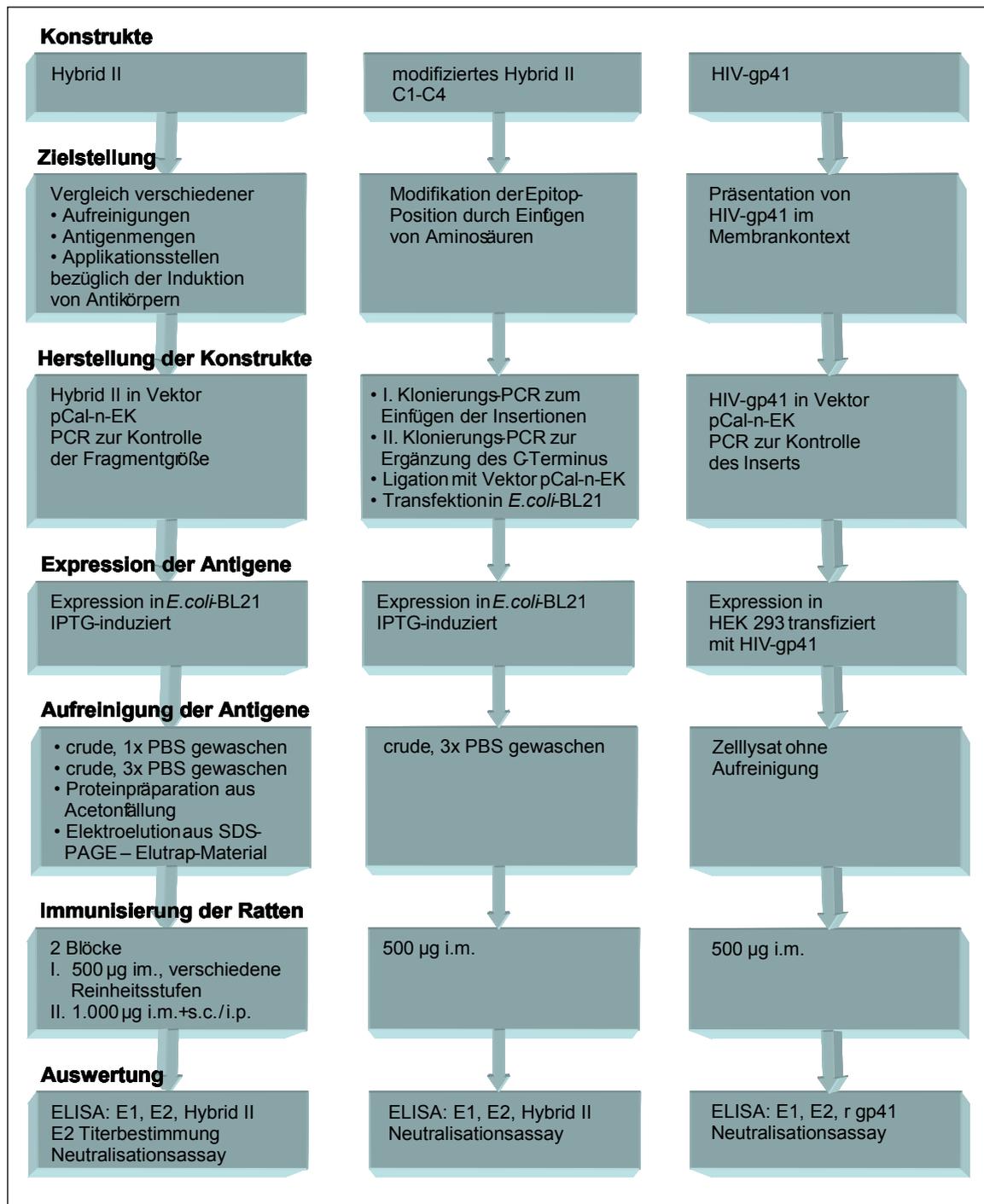


Abb. 4.2. Fließschema zur Darstellung des Experimentellen Aufbaus

4.2. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die durchgeführten Immunisierungsstudien bauen auf verschiedenen Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe auf (Fiebig et al., 2005^{a+b}; Schmolke et al., 2004). Aufgrund der erfolgreichen Induzierung PERV-neutralisierender Antikörper durch Immunisierung mit dem transmembranen Hüllprotein p15E (siehe Abschnitt 1.9.2.) wurde das PERV p15E-*backbone* als Basis für verschiedene Hybridkonstrukte verwendet, die in dieser Arbeitsgruppe erzeugt wurden. Diese tragen ein oder zwei verschieden lange Sequenzen von HIV (E1 und/oder E2). Das Hybrid II-Protein ist ein Hybridkonstrukt aus der zweiten Generation der erzeugten rekombinanten Proteine, der Aufbau wurde in Abschnitt 4.1. (Abb. 4.1.) dargestellt. Das Konstrukt Hybrid II war in den Vektor p-Cal-n kloniert und in *E.coli* BL21 transfiziert worden. Mit Hybrid II wurden im Vorfeld dieser Diplomarbeit Immunisierungsstudien durchgeführt, bei denen neutralisierende Seren erhalten wurden.

4.3. Herstellung der Antigene für die Immunisierung

4.3.1. Herstellung des Hybrid II-Antigens

Für die Immunisierungsversuche wurden große Mengen an Hybrid II hergestellt und aufgereinigt. Dazu wurden für die Produktion mit dem pCal-n-HybridII-Plasmid transfizierte *E. coli* BL21 aus einem entsprechenden Kryostock aufgetaut und eine Vorkultur angezogen.

4.3.2. Produktion und Aufreinigung von Hybrid II

Zur Gewinnung von ausreichend Protein für die Immunisierungsstudien wurden die *E. coli* - Kulturen mit IPTG induziert, um eine Überexpression des Antigens zu erreichen. Für die Immunisierung wurden die Antigene in unterschiedlicher Qualität aufgereinigt. Folgende Reinheitsstufen von Hybrid II wurden hergestellt:

- crudes Zelllysate 1 x mit PBS gewaschen
- crudes Zelllysate 3 x mit PBS gewaschen
- Präparation aus einer Azetonfällung von crudem Zelllysate
- Elutrap-Material aus der Elektroelution von SDS-Gelaufragenen

In Abbildung 4.3. wird die drei Mal mit PBS gewaschene Fraktion gezeigt, wie sie auch für präparative Gele zur Elektroelution verwendet wurde.

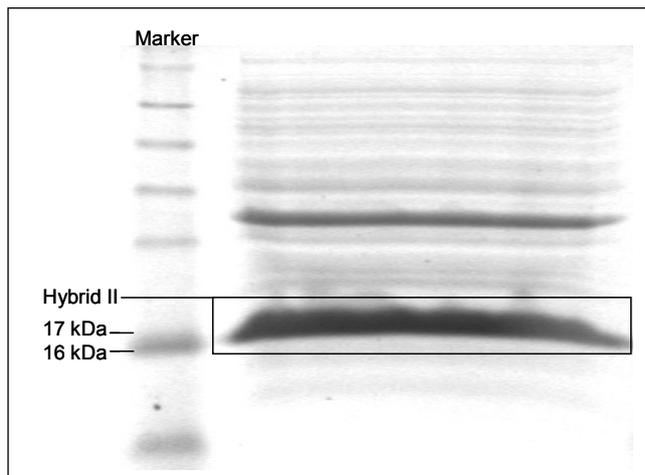


Abb. 4.3. Präparativen SDS-PAGE des E.coli Hybrid II-Zelllysates. Zelllysate 3x mit PBS gewaschen
 Marker: SeeBlue Plus2 - prestained
 Färbung: Pierce GelCode Blue Stain

Die Stärke der Proteinbande bei ca. 17 kDa zeigte eine erfolgreiche Überexpression des Hybrid II Proteins. Ein Großteil der löslichen Proteine wurde bereits mit PBS ausgewaschen. Zur Herstellung von Elutrapmaterial wurde die markierte Bande aus dem Gel geschnitten und in einer Elutrap-Apparatur elektroeluiert. Um die eluierte Proteinmenge abzuschätzen, wurden alle Eluatfraktionen gepoolt und die Proteinmenge mit Hilfe eines Lysozymstandards bestimmt (Abb. 4.4.). Anhand der Lysozymverdünnung wurde die Stärke der Hybrid II-Bande als 40 μg aufgetragenes Protein abgeschätzt.

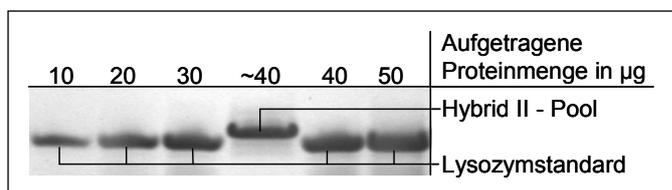


Abb. 4.4. Konzentrationsbestimmung des Hybrid II Elutrap - Pools in einer SDS-PAGE mit Hilfe eines Lysozymstandards

Auf die Auftragsmenge zurückgerechnet betrug die Konzentration des Hybrid II-Elutrap-Pools 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dieser Wert wurde als Basis für weitere Berechnungen benutzt. Alle Versuche mit Hybrid II wurden mit Protein aus diesem Pool durchgeführt. Es wurden insgesamt 42 mg des Proteins hergestellt.

4.3.3. Klonierung der modifizierten Hybrid II-Konstrukte

Ziel war es, zusätzliche Nukleotide vor die E2-Sequenz einzuklonieren, um die E1- und E2-Peptidsequenzen gegeneinander zu verschieben (Abb. 4.5.). Die Konformation des Hybrid II, bezüglich der Stellung von E1 und E2, soll dabei der nativen Konformation des HIV-gp41 angepasst werden. Das Einfügen der Triplets für die zusätzlichen Aminosäuren erfolgte über den reversen Primer der ersten Klonierungs-PCR (Abb. 4.5.).

Der Größenunterschied im Vergleich zur ersten PCR (+45 bp) ist deutlich zu erkennen. Die unterschiedliche Höhe der Banden ist auf ein ungleichmäßig gelaufenes Gel zurückzuführen.

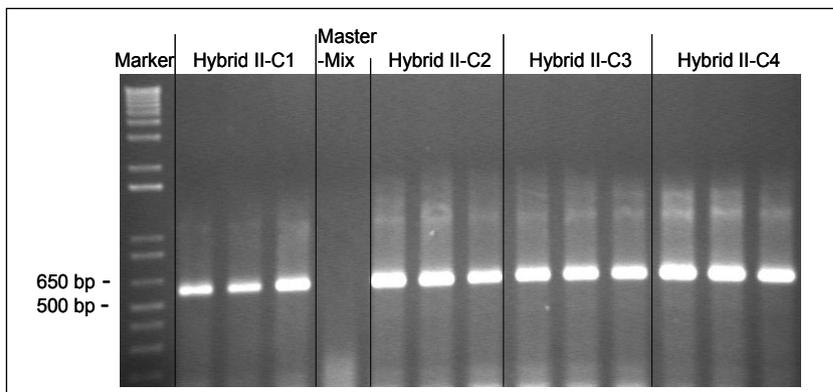


Abb. 4.8. Kontrolle der Produkte des zweiten Schrittes der Klonierungs-PCR zur Ergänzung des C-Terminus im Agarose-Gel. Marker: Invitrogen 1kb plus DNA ladder
Leerwert: Mastermix ohne Template

Die Negativkontrollen beider Auftragungen bestanden aus dem PCR-Mastermix ohne Template. Nach der DNA Aufreinigung wurden die Konstrukte mit dem Vektor p-CAL-n ligiert. Vektoren ohne Insert konnten aufgrund der nicht komplementären Enden (*Bam HI* / *Eco RI* geschnitten) nicht religieren und folglich auch nicht als Plasmid bei der Transfektion eingebaut werden. Bakterien ohne aufgenommenes Plasmid wurden durch das Selektionsmedium (Ampicillin) abgetötet. Der Nachweis der erfolgreichen Transfektion wurde mittels der IPTG-induzierten Expression von Hybrid II bzw. der abgeleiteten Konstrukte geführt. Eine erfolgreiche Transfektion wurde durch die effiziente Proteinexpression nachgewiesen.

4.3.4. Produktion und Aufreinigung der modifizierten Hybrid II - Konstrukte

Wie Hybrid II wurden auch die modifizierten Konstrukte in entsprechender Menge hergestellt, um Ratten immunisieren zu können. Nach der Induktion mit IPTG exprimierten die Bakterien die Konstrukte in großer Menge. Um die Effizienz überprüfen zu können, wurden die Zellysate im SDS-Gel aufgetragen. Die Stärke der Bande bei ~17 kDa kennzeichnet eine Überexpression von Hybrid II C1-C4 (Abb. 4.9.).

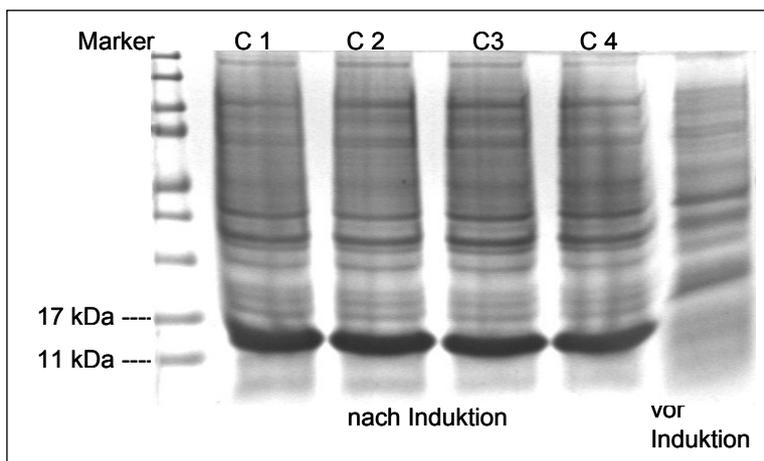


Abb. 4.9. Nachweis der Hybrid II Produktion in der SDS-PAGE. Vergleich der transformierten *E. coli*-Zellysate nach (Spur 1-4) und vor IPTG-Induktion (Spur 5). Marker: Page Ruler™ prestained Protein Ladder

4.3.5. Herstellung der HIV-1-gp41 Antigene

Es wurde ein Zelllysate von mit gp41 transfizierten 293 Zellen hergestellt, um bei den Immunisierungen gp41 im Membrankontext als Antigen darzubieten zu können. Dazu wurden bereits transfizierte 293-Zellen genutzt, aus denen in zwei Mini-Präparationen die DNA isoliert wurde. Die Kontrolle auf das Insert erfolgte mit einer gp41 spezifischen PCR, die Produkte wurden auf ein Agarose - Gel aufgetragen. Das amplifizierte Konstrukt lag bei ~ 1.500 bp und entspricht damit der erwarteten Größe bei Verwendung dieser Primer (Abb. 4.10.).

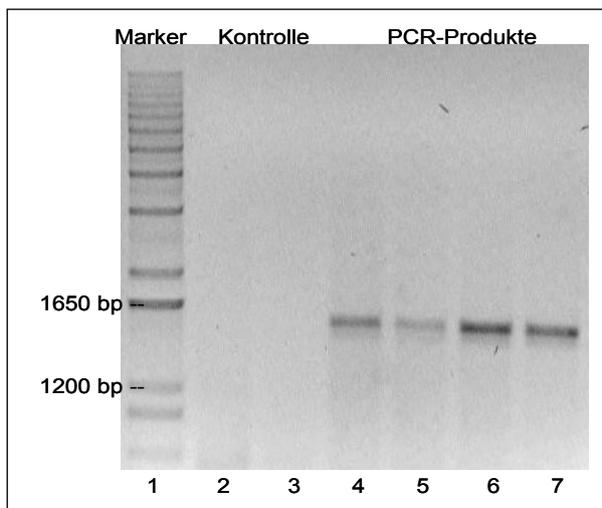


Abb. 4.10. Kontroll PCR auf das gp41-Insert in den transfizierten 293-Zellen mit gp41 spezifischen Primern in einer SDS-PAGE
 Marker / Spur 1: 1 kb Plus DNA-Ladder, Invitrogen
 Kontrolle Spur 2: Mastermix (Negativkontrolle)
 Spur 3: H₂O
 Spur 4/5 : PCR von Miniprep 1
 Spur 6/7 : PCR von Miniprep 2

Der Expressionsnachweis des gp41 mit Hilfe eines Western Blot erbrachte ein positives, wenn auch schwaches Ergebnis (Abb. 4.11.). Die HIV-1-gp41-Bande läuft knapp unterhalb der 49 kDa-Markerbande, es wurden 20µl des Zelllysates aufgetragen. Das vom transfizierten gp41-Konstrukt translatierte Protein ist etwas größer als das native HIV1--gp41, da es noch das Calmodulin-Bindeprotein trägt.

Es wurde davon ausgegangen, dass exprimiertes gp41 auch in die Membran der 293-Zellen eingelagert ist. Zur Immunisierung der Ratten wurde das komplette Zelllysate ohne weitere Reinigungs- oder Waschschrirte verwendet.

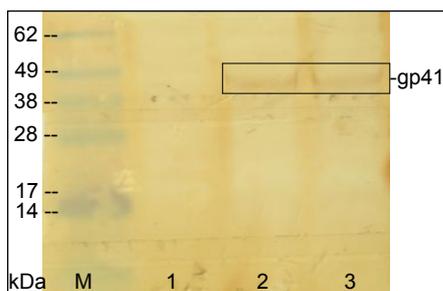


Abb. 4.11. Kontrolle auf HIV-gp41 im Zelllysate von HIV-gp41 transfizierten 293-Zellen im Western Blot.
 Nachweis mit mAK 2F5.
 Marker: SeeBlue Plus2
 Spur 1: untransfizierte 293-Zellen
 Spur 2/3: transfizierte 293-Zellen

4.4. Analyse der bindenden Antikörper

4.4.1. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II

Die in den Immunisierungsstudien mit Ratten gewonnenen Seren wurden auf die Bindungsspezifität der enthaltenen Antikörper untersucht. Dazu wurden ELISA-Tests mit den entsprechenden Antigenen durchgeführt. Es wurde untersucht, ob und wie sich unterschiedliche Reinheitsgrade auf die Induzierung von Antikörpern gegen das Zielprotein bzw. die Domänen E1 und E2 auswirken. Die in den ELISA-Tests eingesetzten Antigene waren Peptide, welche den E1 bzw. E2 Sequenzen von HIV entsprachen, dargestellt wird die Bindung an die einzelnen Peptide sowie gemeinsam aufgebrachte E1- und E2-Peptide (Abb. 4.12.). Bei der Rattengruppe 105 (crudes Zelllysats, 1x mit PBS gewaschen) wurden nur wenige Antikörper induziert, bei den Rattengruppen 106 (crudes Zelllysats, 3x mit PBS gewaschen) und 107 (Acetonfällung von crudem Material, 3x mit PBS gewaschen) wurden signifikant mehr Antikörper induziert. Bei den Ratten, welche mit hochreinem Elutrap-Material immunisiert worden waren, konnten keine wesentlich höheren Titer an E2-spezifischen Antikörpern gegenüber den Ratten der Gruppe 105 beobachtet werden. In diesem Versuch wurden mit der Proteinpräparation aus einer Acetonfällung die besten Ergebnisse erzielt. Zum besseren Vergleich wurden auch die Mittelwerte jeder Gruppe dargestellt (Abb. 4.12.).

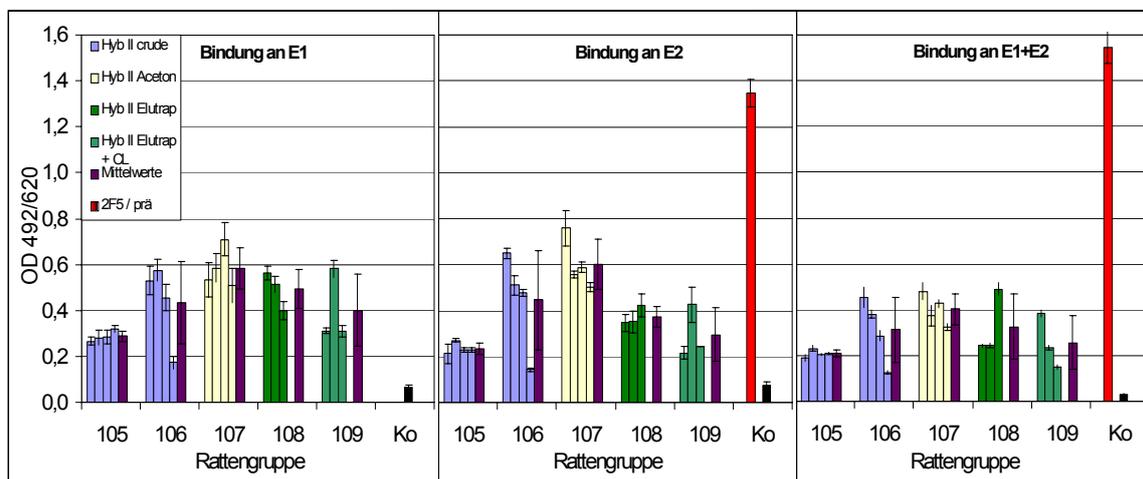


Abb. 4.12. Bindung der Rattenserum an E1, E2, E1+E2 - ELISA-Auswertung. Versuchsblock I - Vergleich unterschiedlicher Aufreinigungen: blau: crudes Material 1x (105) bzw. 3x (106) mit PBS gewaschen, beige: Proteinpräparation aus Acetonfällung (107), grün: Elutrap-Material (108), marine: Elutrap-Material + CL (250µg Cardiolipin, 109), lila: Mittelwerte einer Gruppe, rot: 2F5- (positiv) Kontrolle, schwarz: Präimmuneserum als Negativkontrolle. Alle Seren 1:100 verdünnt.

In früheren Versuchen verstärkte die gleichzeitige Präsenz von E1 und E2 die Bindung von 2F5-Antikörpern an ihr Epitop (Fiebig et al., 2005^b). Diese Beobachtung konnte nicht im

erwarteten Maß reproduziert werden, die 2F5-Kontrolle bindet nur minimal besser an gemeinsam aufgebracht E1 und E2.

Im zweiten Versuchblock sollte zum einen der Einfluss unterschiedlicher Applikationspunkte bei der Immunisierung untersucht werden, zum anderen wurde die doppelte Menge Antigen verwendet, um eventuell eine stärkere Immunantwort zu erhalten. Immunisiert wurde deshalb jeweils eine Hälfte des entsprechenden Volumens intramuskulär, die andere Hälfte subcutan in den Nacken oder intraperitoneal. Die Immunisierung der Rattengruppe 111 im zweiten Block entspricht der Immunisierung der Rattengruppe 105 im ersten Block (500µg Hybrid II, intramuskulär) und ermöglichte einen direkten Abgleich beider Immunisierungen. Die Immunisierung mit der doppelten Menge Antigen (Gruppen 112, 113, 114) ergab keine Verbesserung der Titer bindender Antikörper gegen E1, E2 und E1+E2 gemessen an der Vergleichsgruppe 111 (Abb. 4.13.). Auch veränderte Applikationsstellen (Gruppe 112: intramuskulär und subcutan, Gruppe 113: intramuskulär und intraperitoneal) führten zu keinen Unterschieden in den Antikörpertitern der erhaltenen Seren. Sowohl Rattengruppe 109 als auch 114 bekamen zusätzlich zum Antigen Cardiolipin (250µg) verabreicht, um dessen Einfluss auf die Induzierung 2F5-ähnlicher, neutralisierender Antikörper zu testen. Cardiolipin wurde als möglicher Interaktionspartner für 2F5 beschrieben (Haynes et al., 2005; Sanchez-Martinez et al., 2006^b). Eine Zugabe von Cardiolipin könnte dieser Theorie zufolge die Induktion neutralisierender Antikörper verbessern. Die Zugabe von Cardiolipin hatte hier jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf die Induktion bindender Antikörper.

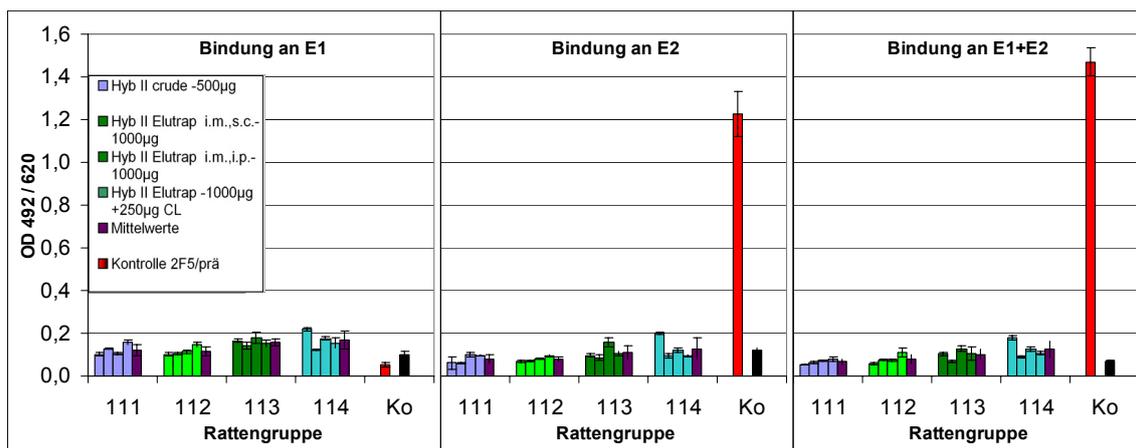


Abb. 4.13. Bindung der Rattenserum an E1, E2, E1+E2, ELISA-Auswertung zum Versuchsblock II: Vergleich unterschiedlicher Applikationsstellen / Antigenmengen. Legende - blau: crudes Material 1x gewaschen, hellgrün: 1000 µg Elutrap-Material *i.m.* (intramuskulär) und *s.c.* (subcutan in den Nacken) appliziert, dunkelgrün: 1000µg Elutrap-Material *i.m.* und *i.p.* (intraperitoneal) appliziert, marine: 1000 µg Elutrap-Material + CL (Cardiolipin, 250µg je Tier) *i.m.* und *s.c.* appliziert, rot: 2F5-(positiv) Kontrolle, schwarz: Präimmunserum als Negativkontrolle. Alle Seren 1:100 verdünnt.

4.4.2. Analyse der Induzierung von Hybrid II - spezifischen Antikörpern

Um zu untersuchen, wie viele Hybrid II-spezifische Antikörper in den Seren vorhanden sind, wurde eine Titration gegen Hybrid II durchgeführt. Die Seren wurden ausgehend von einer Serumverdünnung von 1:300 in Verdünnungsstufen von 1:3 bis auf 1:1.968.300 (8. Stufe) verdünnt. Gewertet wurde jeweils die höchste Verdünnungsstufe, welche signifikant über dem Wert des jeweiligen Präimmunserums lag. Seren von Tieren, die mit Elutrap-Material immunisiert worden waren, zeigten sowohl im ersten (Gruppen 105-109) als auch im zweiten Versuchsblock im Schnitt signifikant höhere Antikörpertiter gegen Hybrid II (Abb. 4.14.). Je größer die höchste Verdünnungsstufe ist, bei der noch signifikant höhere Werte gegenüber den Präimmunseren gemessen wurden, desto höher ist die Antikörperkonzentration im ursprünglichen Serum.

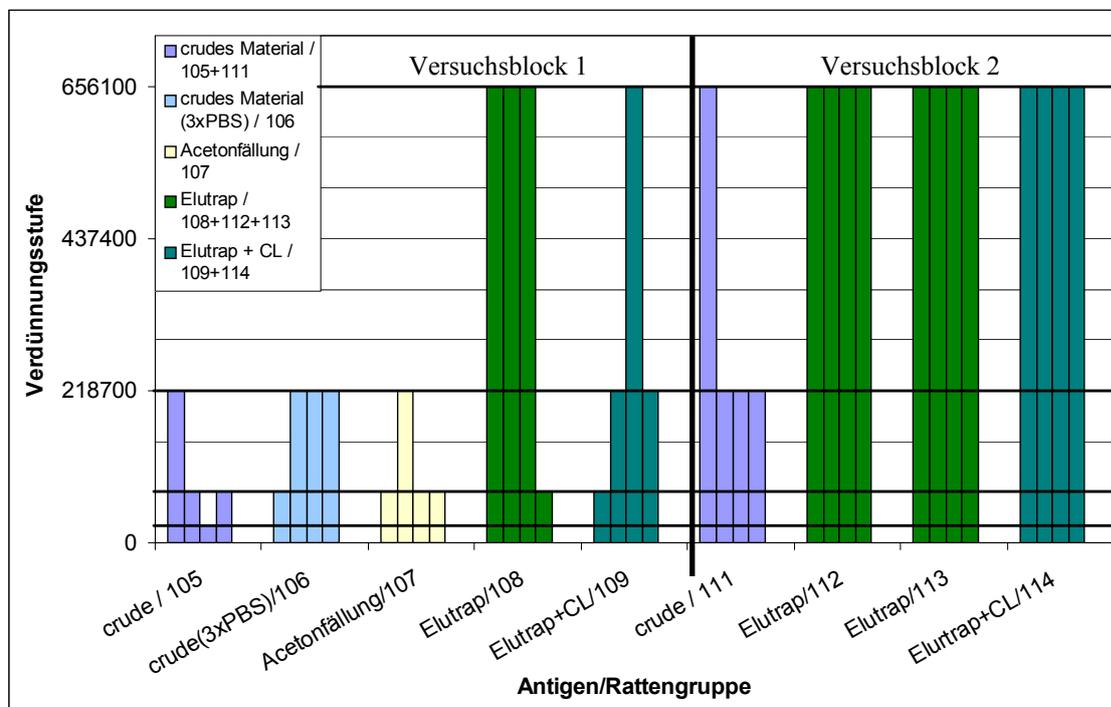


Abb. 4.14. Austitrierung Hybrid II-spezifischer Antikörper im ELISA. Legende – dunkelblau: crudes Material (1xPBS gewaschen), hellblau: crudes Material (3xPBS gewaschen), beige: Präparation aus Acetonfällung, grün: Elutrap-Material, marine: Elutrap-Material + CL (Cardiolipin 250µg je Tier), Verdünnungsstufen: von 1:300 ausgehend jeweils um 1:3 weiter verdünnt. Die schwarzen Balken entsprechend den Titrationsstufen 4-7 (1:24.300, 1:72.900, 1:218.700, 1:656.100).

Vergleicht man Gruppen aus dem ersten und dem zweiten Block, die das gleiche Antigen appliziert bekamen (crudes Material 1xPBS gewaschen: 105 / 111; Elutrap-Material 108 / 112+113; 114: Elutrap-Material + Cardiolipin) so ist erkennbar, dass bei Gruppen aus Block zwei die Titer im Schnitt höher liegen. Das Verhältnis der Antikörpertiter nach Immunisierung mit crudem Material zur Immunisierung mit Elutrap-Material ist bei beiden

Versuchsblöcken etwa 1:3 - sie unterscheiden sich im Durchschnitt um eine Titrationsstufe. Tiere, welche mit Elutrap-Material immunisiert wurden, zeigten sowohl im ersten (Gruppen 105-109) als auch im zweiten Versuchblock im Schnitt signifikant höhere Antikörpertiter gegen Hybrid II.

4.4.3. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II C1-C4

Um bindende Antikörper in den Seren der mit Hybrid II C1 - C4 immunisierten Tiere nachzuweisen, wurden ebenfalls ELISAs durchgeführt. Verglichen wurde die Bindung der Serumantikörper an die auf die ELISA-Platte aufgetragenen Peptide E1 und E2, als die wesentlichen Epitope, sowie an das unveränderte Hybrid II -Protein.

Die Bindung der Serumantikörper an E2 war mit durchschnittlichen Extinktionswerten von 0,3-0,4 wesentlich schlechter als die Bindung an E1 (0,6-0,7) oder Hybrid II (0,8-1,0), dargestellt in Abbildung 4.15. Zwischen den Seren der Rattengruppen bestand kein signifikanter Unterschied in der Bindungsstärke der Antikörper an das jeweilige Antigen. Die Bindungswerte der Kontrollen entsprachen denen vergangener Messungen, 2F5 hat an Hybrid II immer schlechter gebunden als an reines E2-Peptid (persönliche Mitteilung Uwe Fiebig). Eine Bindung des monoklonalen Antikörpers 2F5 an E1 fand erwartungsgemäß nicht statt.

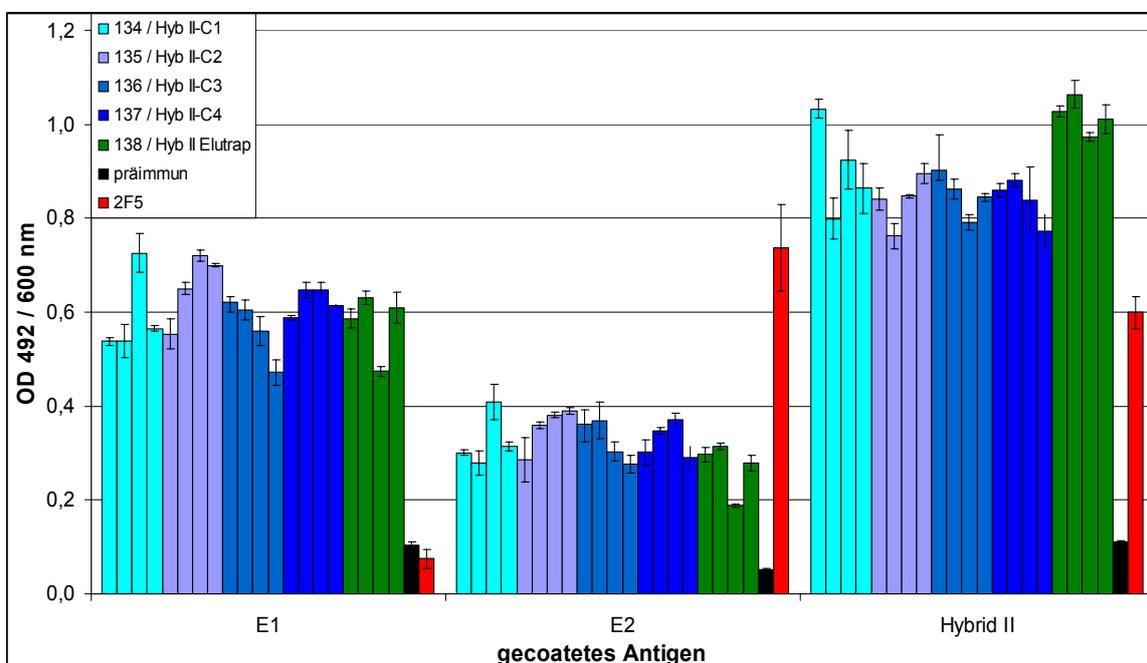


Abb. 4.15. Bindungsanalyse der Serumantikörper von mit Hybrid II C1 - C4 immunisierten Ratten in einem ELISA. Plattencoat: E1, E2 und Hybrid II. Impfantigene für Rattenserum - blau: Hybrid II C1 - C4, grün: Hybrid II Elutrap (Vergleichswert), schwarz: Negativkontrolle Präimmunserum, rot: Positivkontrolle 2F5-Antikörper, 33ng / well in 100 µl. Serumverdünnung 1:100.

4.4.4. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit 293/293gp41-Zelllysate

Mit Hilfe eines ELISA wurde untersucht, ob die Darbietung der E2-Region im Kontext eines membranständigen HIV-gp41 eine stärkere Antikörperreaktion gegen diese induziert. Der Ansatz der Versuchsreihe unterscheidet sich von den Hybrid II-Experimenten. Da nicht genau bekannt ist, welche Konformation die Konstrukte haben und wie sie ihre Epitope präsentieren, wurde das komplette gp41 im Membrankontext dargeboten, um möglichst native Bedingungen zu schaffen. Dazu wurden transfizierte 293-Zellen, die HIV-gp41 auf der Oberfläche exprimieren, verwendet. Im ELISA wurde die Bindung der Serumantikörper an E1, E2 und rekombinantes gp41 (rgp41) ermittelt (Abb. 4.16.). Es zeigte sich, dass mit den Zelllysaten von gp41 transfizierten 293 Zellen keine spezifischen Antikörper gegen E1, E2 oder rgp41 induziert werden konnten. Für alle drei Antigene gilt, dass sich die Werte von nicht transfizierten zu transfizierten 293-Zellen nur unwesentlich unterscheiden. Die Präimmunkontrolle reagiert bei rgp41 stärker, die 2F5-Kontrolle bei rgp41 etwas schwächer als bei reinem E2. Letzteres wurde auch bei anderen Experimenten schon bei Hybrid II beobachtet (Abschnitt 4.3.3.). Die Rattenserum von Gruppe 68 dienten als Vergleich, diese Seren erwiesen sich in früheren Assays als neutralisierend. Ein Unterschied in der Bindungsfähigkeit der Seren nach Immunisierung mit 293- bzw. 293-gp41-Zelllysate als Antigen ist nicht erkennbar.

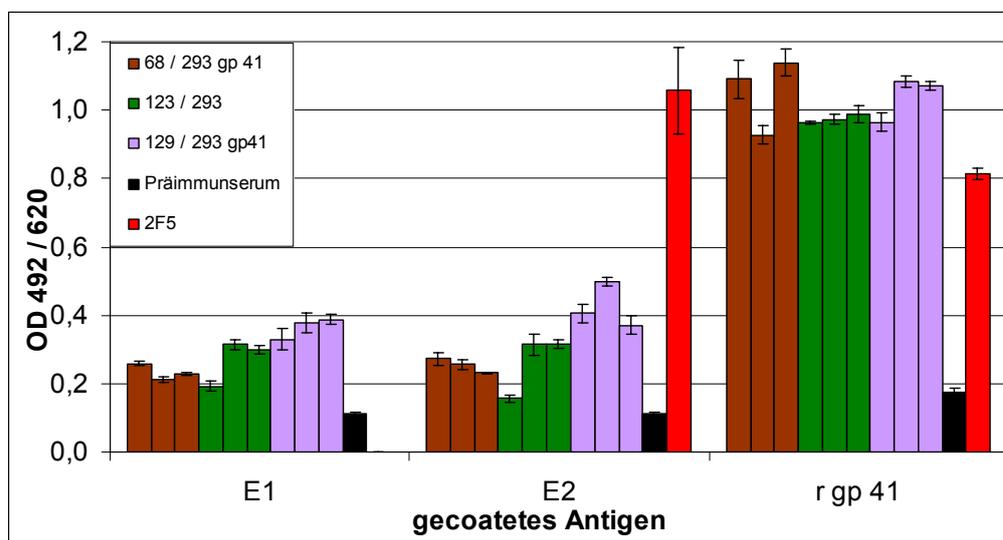


Abb. 4.16. Vergleich der Antikörperbindung bei Seren von Tieren, welche mit 293- oder transfizierten 293 gp41-Zellen (Zelllysate) immunisiert wurden, im ELISA. Plattencoat: E1, E2, rekombinantes gp41, jeweils 100 ng/well. braun: Rattengruppe 68 Ratten immunisiert mit transfizierten 293-gp41-Zelllysate, grün: Rattengruppe 123 immunisiert mit 293 Zelllysate, lila: Rattengruppe 129 immunisiert mit transfizierten 293 gp41 Zelllysate, rot: Kontrolle mit mAK 2F5, schwarz: Präimmuserum Ratte 123-3, Serumverdünnung 1:200

Die Bindung aller Immunsereen an die drei auf der ELISA-Platte aufgetragenen Antigene war gleich hoch. Offenbar induzierten allein die 293-Zelllysate die Bildung von Antikörpern, welche unspezifisch gegen rekombinantes gp41 reagierten. Alle Präimmunsereen waren negativ, die Serumverdünnung betrug 1:200.

4.5. Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der Seren

4.5.1. Seren von Tieren, die mit Hybrid II immunisiert wurden

Um die neutralisierenden Eigenschaften der Seren zu untersuchen, wurden Neutralisationsassays mit verschiedenen Zellen (C8166 und GHOST R4) durchgeführt. Gemessen wurde die HIV-Provirusintegration von HIV_{IIIB} in den Zellen mithilfe einer Real-Time-PCR im Abgleich gegen eine GAPDH-Kontrolle. Keines der getesteten Seren wies eine signifikante Neutralisation ohne zytotoxische Effekte auf (Tab. 4.1.).

Neutralisation Versuchsblock 1									
105/1	-	106/1	-	107/1	t	108/1	-	109/1	t
105/2	-	106/2	t	107/2	-	108/2	-	109/2	-
105/3	-	106/3	-	107/3	-	108/3	-	109/3	-
105/4	-	106/4	-	107/4	-	108/4	-	109/4	-
Neutralisation Versuchsblock 2									
111/1	t	112/1	-	113/1	-	114/1	-	mAK 2F5	+
111/2	-	112/2	-	113/2	-	114/2	-	präimmun	-
111/3	-	112/3	-	113/3	-	114/3	-		
111/4	-	112/4	-	113/4	-	114/4	-		

Tab. 4.1. Neutralisierende Eigenschaften der Rattensereen aus Versuchsblock 1 und 2. Die Tiere waren mit Hybrid II immunisiert worden. Legende: (-) = nicht neutralisierend, (+) neutralisierend, (t) = zytotoxisch.

Als Negativkontrollen wurden die jeweiligen Präimmunsereen verwendet, sie waren erwartungsgemäß alle negativ. Als Bewertungskriterium für eine signifikante Neutralisation galt ein ct-Wert beim HIV-Provirus-Nachweis, der deutlich über +2 ct-Werte gegenüber dem Mittelwert der normalisierten, nicht zytotoxischen Seren lag (entspricht 75 % Neutralisation). Dabei durfte der ct-Wert der GAPDH-Kontrolle einen festgelegten Grenzwert nicht überschreiten. Dieser Grenzwert errechnete sich aus dem Wert der Positivkontrolle für Neutralisation (mit 2F5) plus der Standardabweichung, maximal jedoch +1 ct-Wert über dem GAPDH-Mittelwert aller als nicht zytotoxisch eingestuften Seren. Die Kontrollen waren korrekt (Positivkontrolle 1 - HIV-Durchinfektion, Positivkontrolle 2 - Neutralisation von HIV_{IIIB} mit dem monoklonalen Antikörper 2F5, Negativkontrolle - ohne Virus und Serum).

Vier Rattenserum zeigten ct - Werte für HIV-Provirusintegration, wie sie bei Neutralisation beobachtet worden waren, sie erwiesen sich jedoch als zytotoxisch: 106/2, 107/1, 109/1 aus Versuchsblock 1; 111/1 aus Block 2. Ein Zusammenhang zwischen der Stärke der E2-Bindung und der Neutralisationseigenschaft konnte nicht gezeigt werden. Eine grafische Auswertung eines Neutralisationsassays ist in Abb. 4.17. exemplarisch dargestellt. Unabhängig von den bindenden Eigenschaften der Seren gegen E2 oder das Impfantigen waren neutralisierende Effekte nicht nachzuweisen.

4.5.2. Seren von Ratten, die mit modifiziertem Hybrid II - C1-C4 immunisiert wurden

Die Rattenserum von mit modifizierten Hybrid II C1-C4 - Protein immunisierten Tieren wurden ebenfalls auf ihre neutralisierenden Eigenschaften getestet. Die Analyse der induzierten Antikörper wurde mit Seren der mit Hybrid II-C1 - C4 immunisierten Ratten in einem Neutralisationsassay mit HIV_{III B} durchgeführt (Abb. 4.17.).

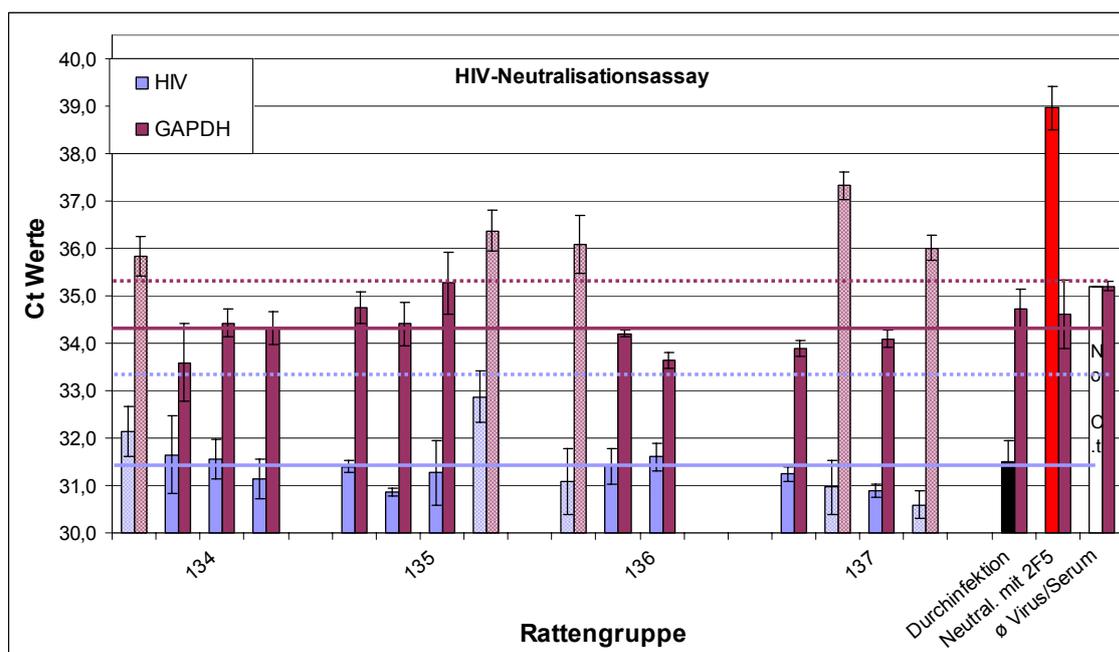


Abb. 4.17. Neutralisationseigenschaften der Hybrid II-C1 - C4 Rattenserum. Messung der Provirusintegration von HIV in der Real Time PCR, interne Kontrolle mit GAPDH. HIV-ct sind über den Durchschnitt aller nicht zytotoxischen GAPDH-ct normalisiert (rote Linie). Legende: blaue Linie - Durchschnitt aller nicht zytotoxischen HIV-ct (31,3), blau gepunktete Linie - Grenzwert für Neutralisation > 75% (33,3), rote Linie - Durchschnitt der GAPDH nicht zytotoxischer Seren (34,26), rot gepunktete Linie - Grenzwert für Bewertung als zytotoxischer Effekt (35,26 → Basis: Durchschnitt nicht zytotoxischer GAPDH-ct +1). Werte zytotoxischer Seren sind mit strukturierten Balken dargestellt. Blaue Balken - normalisierte HIV-ct, rote Balken - GAPDH-ct.

Keines der Seren konnte als neutralisierend angesehen werden. Als neutralisierend wurden Seren gewertet, deren HIV-ct (blauer Balken) mindestens um 2 über dem Durchschnitt lag (blau gepunktete Linie). In die Bewertung nicht mit einbezogen wurden jeweils die ct-Werte der toxischen Seren – Rattenserien 134/1, 135/4, 136/1, 137/2, 137/4.

Für die Immunisierungsstudien mit den Hybrid II C1 - C4 Konstrukten wurde 3x mit PBS gewaschenes Zelllysate verwendet. Demnach wurden auch gegen *E. coli* - Proteine Antikörper gebildet. Allerdings konnte in Kapitel 4.3.1. gezeigt werden, dass auch eine aufwändige Reinigung der Proteine keine bessere Induzierung bindender Antikörper bewirkt.

Als problematisch bei den Neutralisationsassays mit GHOST-R4-Zellen erwiesen sich Seren, die bei -20°C gelagert wurden. Diese Seren zeigten sich in den Neutralisationsassays als zytotoxisch, die Werte werden daher nicht dargestellt. Neutralisierende Eigenschaften konnten somit auch bei Seren von Ratten, die mit modifizierten Hybrid II-Konstrukten immunisiert wurden, nicht gezeigt werden.

4.5.3. Seren von Ratten, die mit gp41 transfizierten 293 - Zellen immunisiert wurden

Auch diese Seren wurden mit Hilfe eines Neutralisationsassays analysiert, um zu sehen, ob die Präsentation von gp41 im Membrankontext einen Einfluss auf die Antikörperinduktion und damit auf die Neutralisationseigenschaften hat. Es konnte jedoch keine Neutralisation bei den eingesetzten Seren beobachtet werden. Dabei wurde auch beobachtet, dass die Zellen in den *wells* alle eine stark veränderte Morphologie aufwiesen. Sie waren abgekugelt und auch wesentlich kleiner als normal, was auf eine Störung des Zellwachstums schließen ließ. Die GAPDH-Kontrolle wies jedoch nicht auf Zytotoxizität hin.

4.6. Nachweis einer KoRV-Infektion in den immunisierten Tieren

Während der Arbeit wurden Ergebnisse erzielt, die nicht mit denen früherer Experimente der Arbeitsgruppe übereinstimmen. So konnten keine neutralisierenden Seren induziert werden, E2 spezifische Antikörper hatten einen geringen Titer und einige Seren zeigten starke Kreuzreaktionen gegen das transmembrane Hüllprotein p15E von KoRV (Koala-Retrovirus). Mit KoRV wurde zu dieser Zeit ebenfalls in der Arbeitsgruppe gearbeitet. Aufgrund dieser Befunde wurde eine Untersuchung aller zu der Zeit in der Arbeitsgruppe verwendeten Konstrukte und Seren durchgeführt, um eine Verwechslung oder Kontamination auszuschließen. In Untersuchungen zur Kreuzreaktivität der Seren wurde entgegen früherer Untersuchungen beobachtet, dass KoRV p15E ähnlich gut erkannt wurde wie PERV p15E.

Die KoRV - Sequenz stimmt zu 68% mit der PERV - Sequenz überein, ein Grossteil der Sequenzübereinstimmung betrifft die als wenig immunogen geltenden Helixregionen sowie eine als immundominant beschriebenen Domäne (IDO), die den Cystein-Cystein-Loop einschließt. Daraufhin wurde gereinigtes KoRV-Hüllprotein im Western Blot eingesetzt (Abb. 4.18.).

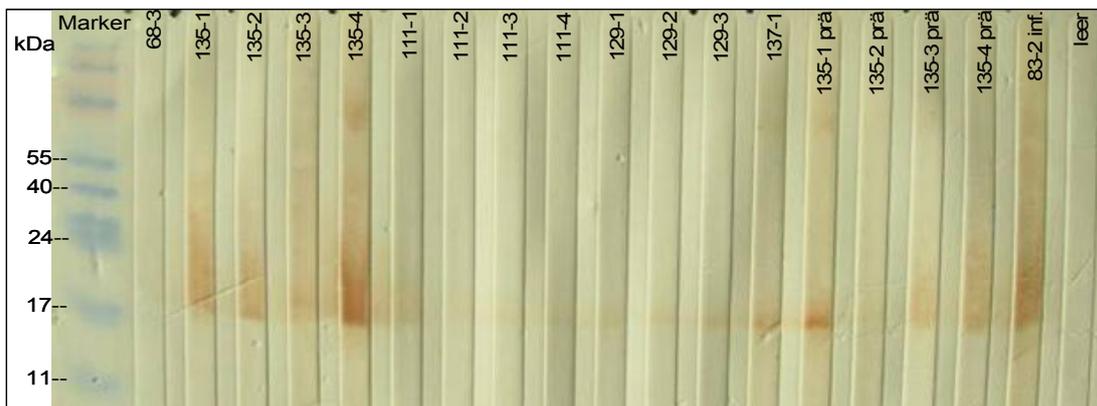


Abb. 4.18. Nachweis einer Antikörperreaktion gegen KoRV p15E in Rattenserum von verschiedenen Versuchen im Western Blot. Marker: PageRuler®, Rattenserum mit Impfantigen : 68-3 (Serum von 2004) als Negativkontrolle, Gruppe 135 (Hybrid II-C2), Gruppe 111 (Hybrid II crude), Gruppe 129 (293-gp41-Zellysat), 137-1 (Hybrid II-C4), Gruppe 135prä (Präimmunserum), 83-2 inf. (regulär mit KoRV infiziert) als Positivkontrolle, leer= kein Serum, nur Zweitantikörper. SDS-PAGE als präparatives Gel, 10 µg KoRV p15E. Zweitantikörper: anti-rat HRP 1:2.000.

Bei der Rattengruppe 135 zeigten alle Seren eine positive Reaktion auf p15E von KoRV, unabhängig davon, ob die Seren vor oder nach der Immunisierung gewonnen wurden. Die Reaktion der Immunsere war jedoch deutlich stärker. Bei den Seren der Rattengruppen 111 und 129 war eine sehr schwache Bande zu erkennen, die als positive Reaktion gewertet wurde. Das Serum der Ratte 68-3 stammt aus dem Jahr 2004, das Tier konnte nicht mit KoRV infiziert sein und wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Das Serum der Ratte 85-2 diente als Positivkontrolle, das Tier war experimentell mit KoRV infiziert worden. Es wurden bei einer Reihe weiterer in dieser Arbeitsgruppe eingesetzter Ratten Untersuchungen durchgeführt, bei allen untersuchten Tieren ließ sich eine KoRV-Infektion mit immunologischen und molekularbiologischen Tests nachweisen. Daraus wurde abgeleitet, dass bei allen Tieren, die für die Immunisierung verwendet wurden, eine Infektion mit KoRV stattgefunden hatte. Bei einigen Tieren, wie in den Rattengruppen 135 und 129, wurde dies zweifelsfrei bestätigt. Mehrere Tiere entwickelten nach einiger Zeit sogar einen Tumor (Abb.4.19.), für KoRV-Infektionen bei der Ratte wurde dies kürzlich beschrieben (Fiebig et al., 2006). Ratte 145-3 war ein infiziertes, nicht immunisiertes Tier, welches einen Tumor entwickelte. Der Tumor

saß in der Beinbeuge, wo sich auch Lymphknoten befinden, eine genaue Gewebsuntersuchung wird derzeit durchgeführt.

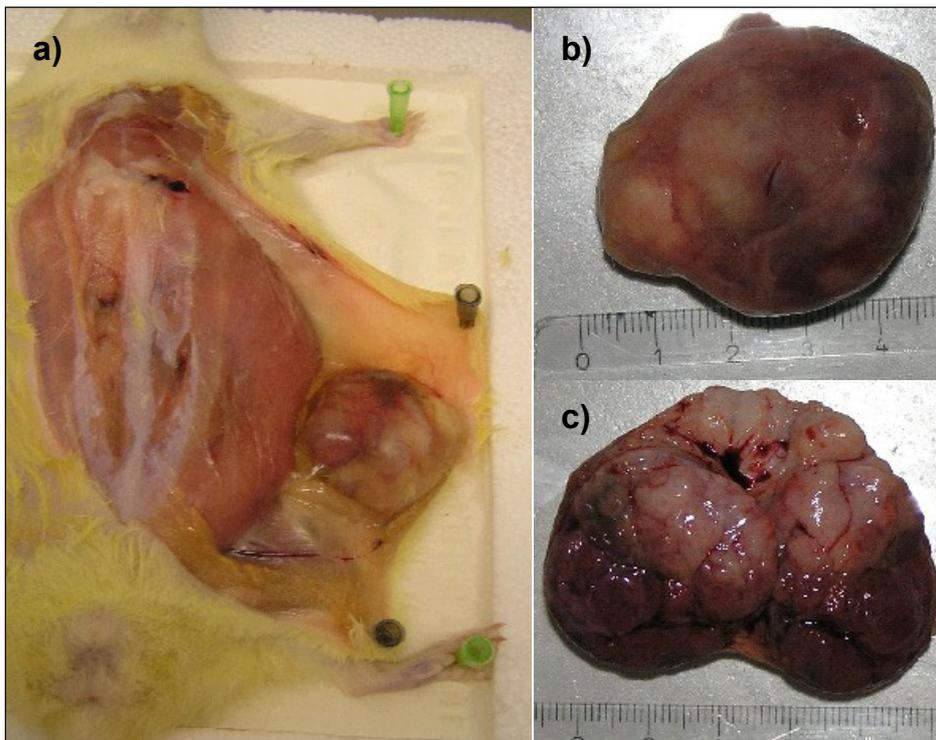


Abb. 4.19. Bilder der Tumore von Ratte 145-3. a) Präparierte Ratte 145-3, der Tumor entwickelte sich außerhalb des Bauchraumes direkt unter der Haut. b) herauspräparierter Tumor, Breite ca. 4 cm. c) Querschnitt des Tumors.

Der Tumor war von Bindegewebe eingekapselt und gut durchblutet (Abb 4.19. b und c). Mit KoRV-spezifischen Primern wurde mittels PCR der Nachweis von KoRV-Provirus-DNA im Tumor, aber auch in anderen Geweben des Tieres erbracht (Abb. 4.20.).

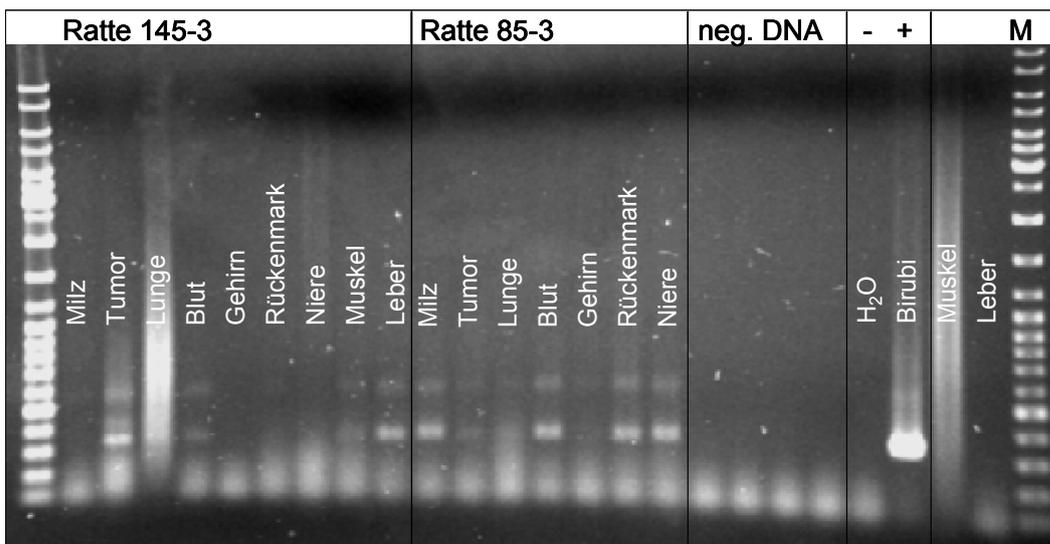


Abb. 4.20. Überprüfung auf KoRV-Provirus-Integration mittels einer PCR. M=Marker, Ratte 145-3 KoRV infiziert, Ratte 85-3 war eine experimentell mit KoRV infizierte Ratte, Birubi: Koala aus dem der verwendete KoRV-Stamm isoliert wurde, dient als Vergleich für Positivkontrolle (85-3), H₂O: Wasserkontrolle.

Die PCR wurde im Rahmen der Untersuchungen von Uwe Fiebig durchgeführt. Die Templates stammen aus verschiedenen Organen zweier Ratten. Ratte 85-3 ist ein regulär mit KoRV infiziertes Tier und dient als Positivkontrolle, Ratte 145. Birubi ist der Name des Koalas, aus dem der in dieser Arbeitsgruppe verwendete Koalastamm isoliert wurde. Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe konnten Provirus-DNA in verschiedenen Organen der Tumorratten nachweisen, dargestellt in Abbildung 4.20. Dass eine Infektion mit KoRV sowohl von Rattenzellen (rat1) als auch von humanen und murinen Zelllinien experimentell möglich ist, konnte in dieser Arbeitsgruppe kürzlich bewiesen werden (Fiebig et al., 2006).

Aufgrund der Ergebnisse war davon auszugehen, dass die KoRV-Infektion mit den Immunisierungen interferierte. Deshalb wurden die entsprechenden Immunisierungen mit den modifizierten Konstrukten Hybrid II C1-C4 wiederholt und die Seren erneut getestet.

4.7. Neue Immunisierung mit den modifizierten Hybrid II-C1-C4 Konstrukten

Um die Immunisierung neuer Rattengruppen mit den modifizierten Hybrid II-C1-C4 Konstrukten erneut durchzuführen, wurden die entsprechenden *E. coli*-Expressionskulturen (*E. coli* BL21 transfiziert mit pCal-n-EK-Hybrid II-C1/-C2/-C3/-C4) in Kultur genommen und die benötigten Mengen an Protein hergestellt. Zur Überprüfung auf korrekte Expression sowie zum spezifischen Nachweis von Hybrid II sowie der enthaltenen *E. coli*-Verunreinigungen wurden SDS-PAGE und Western Blot-Analysen durchgeführt (Abb. 4.21.)

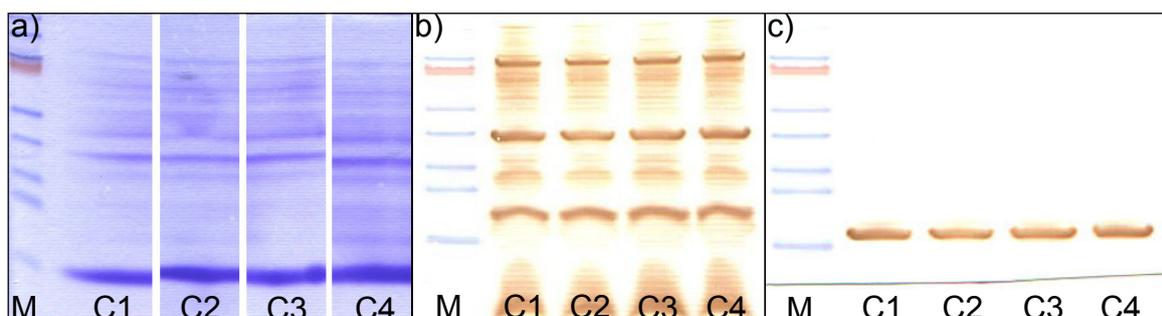


Abb. 4.21. **a)** Coomassiefärbung einer SDS-PAGE zur Überprüfung der Hybrid II-C1-C4 Antigene. Aufgetragen wurde *E. coli*-Zelllysat nach Induktion der Überexpression der Antigene. **b)** Western Blot zur Überprüfung auf *E. coli*-Verunreinigungen. Aufgetragen wurde Hybrid II-C1-C4, Primärantikörper Rattenserum 156-1 (immunisiert mit Zelllysat von mit FeLV p15E-transfizierte *E. coli*, 1xPBS gewaschen) in 1:200 Verdünnung, Sekundärantikörper anti-rat-HRP-konjugiert 1:4000. **c)** Western Blot zum spezifischen Hybrid II-Nachweis mit den Hybrid II-C1-C4 Konstrukten als Antigen und 2F5 (1:15.000) als Primärantikörper, Sekundärantikörper anti-human-POD-konjugiert (1:10.000).

Die Induktion mit IPTG führte zur erfolgreichen Überexpression von Hybrid II (Abb 4.21. a) Da zur Reinigung des Antigens das *E. coli*-Zelllysat nur drei Mal mit PBS gewaschen wurde, befinden sich noch *E. coli*-Verunreinigungen in der Antigenpräparation. Diese wurden mit Serum der Ratte 156-1 im Western Blot (Abb. 4.21. b) nachgewiesen. Das

Immunisierungsantigen der Ratte 156-1 war FeLV p15E, welches mit entsprechend transfizierten *E. coli* hergestellt wurde, daher werden nur *E. coli* spezifische Banden erkannt. Hybrid II bzw. das enthaltene HIV-1 E2 wurde in einem weiteren Western-Blot mit 2F5 als Primärantikörper nachgewiesen. Die Analyse der Bindungsspezifität der durch die Immunisierung enthaltenen Seren wird derzeit durchgeführt.

5. Diskussion

5.1. Herstellung der Antigene für die Immunisierung

Ziel der Arbeit war es, Ratten mit Hybrid II-Antigen zu immunisieren und die dabei erhaltenen Seren bezüglich ihrer bindenden und neutralisierenden Eigenschaften zu analysieren. Die Arbeit gliedert sich in drei Abschnitte: Für den ersten Abschnitt wurde das Hybrid II-Antigen in verschiedenen Aufreinigungen (Versuchsblock 1) sowie in unterschiedlichen Mengen und an verschiedenen Immunisierungspunkten (Versuchsblock 2) appliziert, im zweiten Teil wurde modifiziertes Hybrid II als Antigen verwendet (Hybrid II C1-C4), für den dritten Teil wurde gp41 von HIV-1 als Antigen eingesetzt.

Im Versuchsblock 1 des ersten Abschnitts wurde durch die verschiedenen Aufreinigungsmethoden das Antigen in unterschiedlichen Reinheitsstufen präpariert. Die noch im Antigen enthaltenen Verunreinigungen können Einfluss auf die Induzierung von bindenden oder neutralisierenden Antikörpern haben. Der Effekt dieser Einflüsse sollte untersucht werden, unter anderem auch, um zukünftige Immunisierungsstudien zu optimieren.

Für die Produktion von Hybrid II-Antigen wurden *E. coli*-BL21 benutzt, die mit dem Hybrid II-Konstrukt transfiziert worden waren. Um die benötigten Mengen an Antigen zu erhalten, wurde die Überexpression des unter Kontrolle eines lac-Operons stehendem Hybrid II-Konstruktes durch IPTG induziert. Folgende Aufreinigungen wurden hergestellt: (a) *E. coli*-Zelllysat 1 mal mit PBS gewaschen, (b) *E. coli*-Zelllysat 3 mal mit PBS gewaschen, (c) Zelllysat aus (b), welches durch Acetonfällung gereinigt wurde sowie (d) Zelllysat welches in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Hybrid II-Proteine durch Elektroelution gewonnen wurden (Elutrap-Präparation). Aufgrund der sehr schlechten Löslichkeit in Wasser und der Eigenschaft, Aggregate zu bilden, konnte Hybrid II nicht über eine Calmodulin-Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Im Versuchsblock 2 des ersten Abschnitts wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Immunisierungsstellen bei der Induktion einer Immunantwort auswirken. Je nachdem, wo das Antigen appliziert wird, beeinflussen die unterschiedlichen Resorptionseigenschaften die Aufnahmegeschwindigkeit und die Verteilung des Antigens im Organismus. Da die Stärke einer Immunantwort auch von der Menge und der Immunogenität des eingesetzten Antigens abhängig ist, wurden die Tiere mit 1000µg anstelle der sonst verwendeten 500µg Antigen immunisiert, eine ausreichend starke Immunantwort sollte so sichergestellt werden. In beiden Versuchsblöcken wurde bei je einer

Gruppe dem Immunisationsantigen kurz vor der Immunisierung Cardioliipin (250µg je Tier) beigefügt, um dessen Einfluss bei der Antikörperinduktion zu untersuchen.

Im zweiten Abschnitt der Versuchsreihe wurden erfolgreich modifizierte Hybrid II-Konstrukte hergestellt. Diese Konstrukte bekamen Insertionen aus 1-4 Tripletts inkloniert, die entsprechenden translatierten Hybrid II-Proteine tragen 1-4 Aminosäuren direkt vor der E2-Sequenz. Diese wird in ihrer Position relativ zu E1 verschoben, wodurch sich die Antigenpräsentation verändert.

Im dritten Teil der Versuchsreihe sollte gp41 von HIV-1 dem Immunsystem eingelagert in eine Membran dargeboten werden, um möglichst native Bedingungen bei der Antigenpräsentation zu modellieren. Dazu wurde als Antigen Zellysate von 293-Zellen, welche mit HIV-gp41 transfiziert worden waren, für die Immunisierung verwendet. Obwohl die PCR zum Nachweis des translatierten gp41-Konstruktes eindeutig positiv war, musste bei der Analyse der Expression des gp41 festgestellt werden, dass die Expression nur mit geringer Effizienz erfolgte.

5.2. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II

Bei der Analyse der Seren des ersten Versuchsblocks konnte nachgewiesen werden, dass die Induzierung E2-spezifischer Antikörper am besten mit der Proteinpräparation aus der Acetonfällung und 3x PBS gewaschenem cruden Material funktioniert hat (Abb. 4.12.). Die geringsten Werte für die E2-Bindung wurden bei 1x mit PBS gewaschenem Zellysate als Antigen gemessen. Entgegen den Erwartungen ließen sich mit hochreinem Elutrap-Material keine besseren Werte erzielen als mit den anderen Aufreinigungen.

Diskutiert werden müssen die Unterschiede in den applizierten Antigenen, die durch die unterschiedlichen Aufreinigungen entstanden sind, in der Hauptsache sind dies Unterschiede in der Menge und der Zusammensetzung der enthaltenen Verunreinigungen. Die Präparation aus ein Mal mit PBS gewaschenem *E. coli*-Zellysate enthält noch einen Teil löslicher Proteine, die bei der Immunisierung als Antigen wirken können. Einander Gegenüberzustellen sind daher die adjuvante Wirkung zusätzlicher bakterieller Antigene und die geringere Spezifität der induzierten Immunantwort gegen das Zielantigen (Hybrid II). Die Ergebnisse zeigen jedoch einen Unterschied in der Antikörperreaktion gegen E2, abhängig von der Aufreinigung.

Beim Vergleich der induzierten bindenden Antikörper in Seren der Gruppe 106 (b, crudes Antigen, drei Mal PBS gewaschen) mit denen in der Gruppe 107 (wie b + Acetonfällung) konnte festgestellt werden, dass der Unterschied nur gering ist. Der Unterschied zwischen den

Antigenen nach Aufreinigung (b) und (c) besteht darin, dass durch die zusätzliche Acetonfällung lipidhaltige Zellbestandteile wie Phospholipide ausgewaschen wurden. Phospholipide, zu denen auch das Cardiolipin gehört, sind teilweise sehr immunogen und könnten eine spezifische Immunantwort gegen das Zielantigen stören. Durch das Aceton werden Proteine allerdings nahezu vollständig denaturiert, inwieweit das Hybrid II in wässriger Lösung renaturiert, ist nicht bekannt. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass nach der Acetonfällung die Proteinstruktur nicht mehr der ursprünglichen Struktur entspricht. Daraus könnte eine veränderte Antigenpräsentation resultieren.

Dass die Seren von mit Elutrap-Material immunisierten Ratten keine besseren Ergebnisse zeigten als Seren von mit anderen Aufreinigungen immunisierten Tieren, kann mehrere Gründe haben. Bekannt ist, dass sich SDS an die Proteinstruktur von Proteinen anlagert, der massive Eintrag von negativen Ladungen durch das SDS denaturiert das Protein und verändert die Tertiär- und Quatiärstruktur. Bei der Elektroelution gelangt das Protein zwar wieder in wässrige Umgebung, jedoch bleiben SDS-Moleküle fest am Protein haften. Dadurch wird eine vollständige Renaturierung des Proteins verhindert und das Protein ist nicht nativ gefaltet. Des Weiteren verändert das negativ geladene SDS die Ladungsverhältnisse am Protein, beide Störfaktoren könnten eine veränderte Epitopräsentation hervorrufen. Die Folge könnten Antikörper sein, welche zwar spezifisch gegen das Impfantigen mit seiner Konformation sind, jedoch eine geringere Avidität gegenüber dem nativen Antigen besitzen. Für die 2F5-Kontrolle ist zu sehen, dass die Bindung an E1+E2 stärker ist als nur an E2, ein additiver Effekt ist dabei auszuschließen, da 2F5 nicht an E1 bindet. Für die induzierten Antikörper ist ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. Ursache für den Unterschied könnte eine veränderte Konformation der für die Plattenbeschichtung verwendeten Antigene im Vergleich zum gelösten Antigen sein.

Ein Einfluss von Cardiolipin auf die Antikörperinduktion konnte nicht gezeigt werden. Es wurde berichtet, dass 2F5 und 4E10 an Cardiolipin binden, mithin autoreaktive Eigenschaften besitzen könnten (Haynes et al., 2005). Die Bindung an Cardiolipin ist kreuzreaktiv, umgekehrt vermindern Antikörper, die gegen Cardiolipin gerichtet sind, auch das Risiko einer HIV-Infektion (Barthel und Wallace, 1993). Es wurde postuliert, dass Cardiolipin mit seinen hydrophoben Eigenschaften das ursprüngliche Epitop imitiert (molekulare Mimikry) und so die Antikörperbindung ermöglicht (Sanchez-Martinez et al., 2006^b). In der durchgeführten Immunisierungsstudie sollte das parallel zugegebene Cardiolipin die Induktion E2-spezifischer Antikörper verbessern. Hintergrund ist, dass die bei der ersten Immunisierung

induzierten Antikörper in der Regel noch keine sehr hohe Spezifität gegen ihr Antigen besitzen, erst durch den Mechanismus der Affinitätsreifung nach einer *boost*-Immunisierung entstehen B-Zell-Klone mit hochaffinen Antikörpern. Durch somatische Hypermutation in den variablen Bereichen der Antikörpergene werden gezielt Mutationen eingefügt, welche die Antigenspezifität leicht verändern. Nur die B-Zell-Klone mit der höchsten Spezifität expandieren weiter und bilden Plasmazellen. Die Zugabe von Cardiolipin sollte den Pool an B-Zell-Klonen vergrößern, die bei nochmaligem Antigenkontakt die Affinitätsreifung durchlaufen. Eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Effekt ist, dass eine entsprechende Bindung an Cardiolipin nur dann stattfinden kann, wenn es - wie in vivo auch - in der Membran integriert vorliegt. Eine Bindung von 2F5 konnte für membranständiges Dilysocardiolipin (2 anstatt 4 Fettsäurereste) gezeigt werden, sie führte zu kompetitiver Hemmung der neutralisierenden Eigenschaft von 2F5 (Sanchez-Martinez et al., 2006^b).

Im zweiten Versuchsblock der Immunisierungsstudien (Rattengruppen 111-114) wurden unterschiedliche Immunisierungsstellen und Antigenmengen bezüglich ihrer Effekte auf die Antikörperinduktion getestet (Abb. 4.13.). Im Unterschied zu früheren Untersuchungen, z.B. des ersten Versuchsblocks, zeigte keines der Seren eine signifikante Bindung an E1 oder E2. Da jedoch die 2F5-Kontrolle normale Werte aufwies, kann die Ursache kein methodischer Fehler beim ELISA sein, sondern muss auf eine unzureichende Induzierung von bindenden Antikörpern nach der Immunisierung zurückgeführt werden.

Die verschiedenen Körperstellen, an denen die Applikation des Impfantigens durchgeführt wurde, bieten unterschiedliche Resorptionseigenschaften, folglich sind auch Unterschiede bei der Induktion einer Immunantwort möglich. Bei subcutaner (s.c.) Applikation wird direkt unter die Haut gespritzt, bei den in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungen in den Nacken. Die Resorption über das Unterhautgewebe erfolgt nur langsam, die Gefahr von Entzündungen ist jedoch geringer als bei intramuskulärer Immunisierung (Hendriksen und Hau, 2003). Die Antigengabe durch direkte Applikation ins Muskelgewebe (i.m.) hat den Vorteil, dass die Resorption des Antigens schneller erfolgt und systemisch ist (Morton et al., 2001). Bei der i.m.-Immunisierung treten jedoch häufiger Spritzabszesse auf, in diesem Fall könnten durch die Entzündungsreaktion Seiteneffekte auftreten, welche die Immunisierung stören, z.B. durch sehr schnellen Abbau des Antigens (Bundesamt für Veterinärwesen, Tierschutzrichtlinie 3.04). Die Immunisierung in den Bauchraum (intraperitoneal, i.p.) bietet den Vorteil, dass ein großes Volumen an Antigen gespritzt werden kann, die Resorption über die Auskleidung der Bauchhöhle (*Tunica serosa*) erfolgt schnell (Hendriksen und Hau, 2003).

Bei allen Immunisierungen wurde das Antigen 1:1 mit öligem Adjuvans vermischt (Freundsches Adjuvans *incomplete*), welches eine Depotfunktion gegenüber dem Antigen ausübt. Das Hybrid II befindet sich in einer Suspension und wird mit zeitlicher Verzögerung freigesetzt. Der wichtigste adjuvante Effekt ist die immunstimulierende Wirkung der öligen Phase.

Weiterhin sollte verglichen werden, wie sich die Immunisierung mit 500µg bzw. 1000µg Hybrid II auf die Antikörperinduktion auswirkt. Da die Antikörperinduktion offensichtlich gestört wurde, lassen sich keine Schlussfolgerungen ziehen, deshalb wird nur der experimentelle Hintergrund diskutiert.

Die Stärke einer Immunantwort ist abhängig von der Immunogenität eines Antigens sowie dessen Menge, demnach kann eine Erhöhung der Antigenmenge bei geringer Effizienz der Antikörperinduktion den Antikörpertiter verbessern. Dabei ist jedoch zu beachten, dass bei zu hoher Antigendosis ein gegenteiliger Effekt eintreten kann und das Immunsystem, ähnlich wie bei einer Desensibilisierung, mit Immuntoleranz reagiert. Es wurden auch immunspressive oder immunmodulative Effekte bei zu hoher Antigendosis beschrieben (Hanly et al. 1995). Die niedrigen Titer bindender Antikörper in den Seren von Ratten, die mit 1000µg Hybrid II immunisiert wurden, können jedoch nicht als Ausdruck einer Immuntoleranz oder Immunsuppression gegen das Antigen gewertet werden, da eine starke Reaktion der Seren gegen Hybrid II im ELISA gezeigt wurde (Abb. 4.14.). Da jedoch die Seren aller Tiere in etwa gleich hohe Werte aufwiesen, auch bei der Vergleichsgruppe (105 bei Versuchsteil 1 und 111 bei Versuchsteil 2), wird davon ausgegangen, dass die Antikörperinduktion durch ein anderes Ereignis gestört wurde.

Um zu ergründen, ob überhaupt Hybrid II-spezifische Antikörper induziert worden waren, wurde in einem ELISA die Bindung von Antikörpern gegen das komplette Hybrid II bei allen Seren aus dem ersten Versuchsteil untersucht und der Titer bestimmt (Abb. 4.14.). Da eine nennenswerte Bindung HIV E1/E2 spezifischer Antikörper nicht zu erwarten war, mussten praktisch alle bindenden Antikörper gegen das von PERV p15E abgeleitete Protein-*backbone* gerichtet sein. Ein hoher Titer gegen PERV p15E wurde besonders bei jenen Seren nachgewiesen, welche E1 und E2 schlecht gebunden hatten.

Seren von Tieren des ersten Versuchsteils erreichten kaum hohe Titer gegen Hybrid II, bei Seren von Tieren des zweiten Versuchsteils waren hohe Titer gegen Hybrid II die Regel. Die als Negativkontrolle mitgeführten Präimmunseren erreichten bereits bei der ersten Verdünnungsstufe keine signifikante Bindung. Im ELISA zur Titration hybrid II spezifischer

Antikörper (Abb. 4.14.) wurde Hybrid II aus der Elutrap-Präparation als Antigen verwendet, um möglichst wenig Seiteneffekte durch Bindung *E. coli*-spezifischer Antikörper zuzulassen. Dabei ist festzustellen, dass hohe Antikörpertiter gegen Hybrid II bei fast ausschließlich jenen Seren gemessen wurden, welche von mit der Hybrid II-Antigenpräparation aus der Elektroelution immunisierten Ratten stammen. Als Erklärung kommen zwei Möglichkeiten in Betracht: a) Elektroeluiertes Hybrid II-Antigen induziert Hybrid II spezifische Antikörper aufgrund fehlender Verunreinigungen besser und b) elektroeluiertes Hybrid II hat andere antigene Eigenschaften als natives Hybrid II, dadurch werden auch Antikörper mit unterschiedlicher Spezifität (gegenüber nativem Hybrid II-Antigen) induziert. Im ELISA würde beides zu einer verbesserten Erkennung von elektroeluiertem Hybrid II als Antigen führen. Ein möglicher Analyseweg wäre die Elektroelution des Antigens aus einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Unterschiede in der Antikörperinduktion wären dann nur noch auf die unterschiedliche Reinheit zurückzuführen.

Auf der Basis vielseitiger Untersuchungen wurde in der Kolonie der immunisierten Ratten eine Infektion mit dem PERV verwandten Koala- Retrovirus (KoRV) festgestellt. Durch die Infektion kam es zu einer Stimulierung der Antikörperantwort gegen das PERV p15E-*backbone*, da dieses eine starke Sequenzhomologie zum KoRV p15E aufweist. Der Effekt ähnelt einem ständigen selektiven *boost* der *backbone*-spezifischen Antikörper. Der Einfluss einer Koala-Retrovirus Infektion im Einzelnen wird in Abschnitt 5.6. diskutiert.

5.3. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit Hybrid II C1-C4

Mithilfe modifizierter Hybrid II-Konstrukte wurde untersucht, wie sich eine Positionsänderung des E2-Bereichs relativ zum E1-Bereich auf die Induzierung E2-bindender und neutralisierender Antikörper auswirkt. Dem Hybrid II-Konstrukt wurden dazu vor der E2 Sequenz zusätzliche Triplets eingefügt (Hybrid II C1-C4), die modifizierten Hybrid II-Proteine tragen Insertionen von 1-4 Aminosäuren direkt vor dem E2-Bereich, dieser wird dadurch in seiner Position relativ zu E1 verschoben. Die Bindung an E2 war relativ schwach (Abb. 4.15.), in früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe (Fiebig et al., 2005^b) wurde nach Immunisierungen eine wesentlich stärkere Reaktion der Seren gegen E2 gemessen. Die Bindung an E1 und an Hybrid II war signifikant stärker als gegen E2. Die im Vergleich stärkste Antikörperreaktion wurde gegen Hybrid II gemessen. Offensichtlich haben PERV p15E-bindende Antikörper zu der starken Hybrid-Erkennung beitragen, induziert durch die überproportional starke Induzierung kreuzreaktiver KoRV-p15E spezifischer Antikörper

durch die KoRV-Infektion. Um dies zu überprüfen, wurden mehrere Epitopkartierungen durchgeführt. Eine mikroskopische Untersuchung zeigte jedoch, dass einige Peptidspots eine veränderte Oberfläche zeigten. Möglicherweise wurden einige Peptidspots bei den Regenerationsprozeduren in Mitleidenschaft gezogen, infolge dessen könnten die Membranen Unzuverlässige Ergebnisse erzeugen. Die beim Epitopmapping erhaltenen Ergebnisse haben deshalb in dieser Arbeit keinen Eingang gefunden.

Die Immunisierungsversuche mit den modifizierten Hybrid-II-Antigenen (Hybrid II C1-C4) wurden wiederholt, eine Analyse wird derzeit durchgeführt.

5.4. Analyse der bindenden Antikörper nach Immunisierung mit 293 oder 293gp41-

Zellysat

Dem Immunsystem der Ratten sollte HIV-1-gp41 in eine Membran eingelagert dargeboten werden, um die Epitope E1 und E2 in möglichst nativer Konformation zu präsentieren. Dazu war HIV-1-gp41 in pDisplay[®] kloniert und der Vektor in 293 Zellen transfiziert worden. Laut Herstellerangaben ist der pDisplay[®]-Vektor so aufgebaut, dass von ihm exprimierte Proteine am N-terminus mit der *leader*-Sequenz der murinen Ig- κ -Kette fusioniert sind. Diese *leader*-Sequenz sorgt für einen Transport über den sekretorischen Weg auf die Zelloberfläche.

Die gp41-Expression in den transfizierten 293-gp41-Zellen war gering, obwohl das Konstrukt unter Kontrolle eines CMV-Promotors stand. Dieser Promotor gilt, besonders in humanen Zelllinien wie 293, als starker Promotor (Andersson et al., 1989; Boshart et al., 1985; Nelson et al., 1987). Der Grund für die geringe Expression ist nicht bekannt, eventuell war die Selektion von pDisplay[®]-gp41 - exprimierenden 293-Zellen nicht ausreichend. Dazu trägt das Plasmid pDisplay[®] ein Kanamycin-Gen unter Kontrolle eines frühen SV40-Promotors, dies erlaubt in Säugerzellen die Selektion mit Hilfe von Geneticin[®]. Bei ungenügender Selektion wäre es möglich, dass ein Teil der 293-Zellen kein Plasmid mehr getragen hat und demnach auch kein gp41 exprimieren konnte. Folglich ist die Gesamtmenge an gp41 im Zellysat vergleichsweise niedrig. Um dies zu überprüfen, müssten in der weiteren Analyse die transfizierten 293 Zellen mit gp41 spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf ihre Expression getestet werden.

Bei der Analyse der Bindung von Seren der mit 293- oder 293-gp41-Zellysat immunisierten Tiere zeigte sich, dass sich die Bindung von E1, E2 oder gp41-spezifischen Antikörpern bei transfizierten und untransfizierten 293-Zellen nicht unterschieden hat (Abb. 4.16.). Daraus wird abgeleitet, dass schon allein durch das 293-Zellysat kreuzreaktive Antikörper induziert

wurden, welche gegen das auf die ELISA-Platte aufgebrachte rekombinante gp41 oder gegen die darin enthaltenen *E. coli*-Verunreinigungen gerichtet waren (rgp41 wurde aus *E. coli*-Zelllysate aufgereinigt). Es wurde angenommen, dass ein starker Background gegen die Präparation des rekombinanten gp41 als Plattenbeschichtung im ELISA nicht auftreten würde, da mit humanen Zellen immunisiert wurde. Die Negativkontrolle mit Präimmunsereum zeigt, dass keine signifikante Bindung an das Antigen stattfindet, woraus gefolgert werden könnte, daß die Reaktion der Immunsereen nicht auf *E. coli*-spezifische Antikörper zurückzuführen ist. Die Daten zeigen demnach, dass eine unspezifische Bindung an das rekombinante gp41 vorliegt, die Ursache ist noch unklar. Seren von Tieren, die mit 293-Zelllysate immunisiert wurden, zeigen ebenfalls eine signifikante Bindung von gereinigtem Peptid sowohl bei E1 als auch bei E2. Seren von mit 293-gp41 immunisierten Tieren zeigen nur eine minimal bessere Bindung an E2, der Unterschied der Werte bewegt sich an der Grenze dessen, was als signifikant gewertet werden kann. Ursache für den sehr geringen Unterschied ist wahrscheinlich eine zu geringe gp41-Antigenmenge bei der Immunisierung. Es musste jedoch abgewogen werden, welche Menge an applizierten Immunisierungsentigen für die Versuchstiere noch verträglich war.

Um belastbare Daten zu erhalten, muss eine hohe Expression sichergestellt werden. Eine Möglichkeit wäre, das Konstrukt unter Kontrolle eines anderen Promotors gestellt werden, dessen Aktivität sich von außen steuern lässt. Dafür wäre jedoch eine Klonierung in einen anderen Expressionsvektor nötig gewesen, da pDisplay[®] keinen alternativen Promotor bietet. Zusätzlich müsste die Expression z.B. mit einem Immunperoxidase-Test nachgewiesen werden.

5.5. Analyse der neutralisierenden Eigenschaften der Seren

Mit Hilfe von Neutralisations-Assays wurden die neutralisierenden Eigenschaften der bei den Immunisierungsstudien erhaltenen Seren getestet. Dabei wurde in der quantitativen Real-Time-PCR die Provirusintegration gemessen (Abb. 4.17.). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten keine neutralisierenden Seren nach Immunisierung mit Hybrid II oder modifizierten Hybrid II (C1-C4) Konstrukten nachgewiesen werden. Als Ursache werden, wie schon in Abschnitt 6.2. angedeutet, interferierende Effekte einer Infektion mit KoRV angesehen (siehe Abschnitt 5.6.). Im Gegensatz zu den gezeigten Ergebnissen wurde in früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe nach Immunisierung mit Hybrid II neutralisierende Seren erhalten (Fiebig et al., 2005^b). Bisherige Versuche

anderer Arbeitsgruppen, neutralisierende Antikörper ähnlich 2F5 oder 4E10 durch Immunisierung mit von HIV-1 gp41 abgeleiteten Proteinen oder Peptiden zu induzieren, schlugen fehl (Eckhart et al., 1996; Coeffier et al., 2000; Joyce et al., 2002; McGaughey et al., 2003)

Bei der Bewertung der Neutralisationsassays war es wichtig, zytotoxische Effekte von Neutralisation zu unterscheiden. Um Zytotoxizität festzustellen, wurde eine interne GAPDH-Kontrolle bei der PCR mitgeführt (Duplex-PCR), welche Auskunft über die Zellzahl je *well* liefert. Der quantitative Nachweis von GAPDH ist eine häufig gebrauchte interne Kontrolle bei RT-PCR-Assays, GAPDH zählt zu den *housekeeping*-Genen (Silver et al., 2006). Die Unterschiede in der Zellzahl müssen bei der Bewertung der Menge an integrierter Provirus-DNA mit berücksichtigt werden, die GAPDH-Kontrolle dient zur Normalisierung der *ct*-Werte für HIV.

5.6. Analyse des Einflusses einer Infektion mit Koala-Retrovirus auf die Immunisierung mit Hybrid II und abgeleiteten Konstrukten

Die bei den Immunisierungsstudien dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weichen von denen ab, die bei vorhergehenden Experimenten dieser Arbeitsgruppe erzielt wurden (Fiebig et al., 2005^b). Als deutliches Beispiel werden die Ergebnisse des zweiten Versuchsteils der vergleichenden Immunisierungsstudien mit dem Hybrid II-Antigen angeführt. Wie unter 5.2. bereits diskutiert, ist es sehr ungewöhnlich, dass die bei bestimmten Rattengruppen (111-114) erhaltenen Seren keine signifikante Bindung an E1 oder E2 zeigen, dafür jedoch vergleichsweise hohe Antikörpertiter gegen Hybrid II haben. Als Vergleichswerte werden die Messungen des ersten Versuchsteils sowie früherer Experimente herangezogen. Dabei war festzustellen: Bei den bisherigen Immunisierungen mit Hybrid II und ähnlichen Hybridproteinen auf Basis transmembraner Hüllproteine von γ -Retroviren (PERV, KoRV, FeLV) wurden bei den erhaltenen Seren nur schwache Antikörpertiter gegen das *backbone* der jeweiligen Hybridproteine gemessen. Weiterhin war die Bindung der Immunsere an E2 immer signifikant stärker als der Hintergrundwert der Präimmunsere. In früheren Neutralisationsassays wurden vereinzelt Seren mit neutralisierenden Eigenschaften festgestellt. Bei den Ergebnissen der Neutralisationsassays mit Seren von Immunisierungsstudien dieser Arbeit konnte kein einziges Serum festgestellt werden, welches neutralisierende Effekte zeigte.

Bei genauer Analyse konnte ein positiver Nachweis einer KoRV-Infektion bei fast allen untersuchten Tieren erbracht werden. Es wurde daher davon ausgegangen, dass jedes Tier in der Rattenkolonie mit KoRV infiziert war. Wann die einzelnen Tiere mit KoRV infiziert wurden ist im Nachhinein nicht mehr festzustellen, die Blutabnahmen wurden für eine solche Untersuchung in einem zu großen Intervall durchgeführt.

Das Koala-Retrovirus gehört zu den γ -Retroviren. Wie auch für andere Retroviren, z.B. FeLV (Richards, 2005; Schneider-Schaulies und Dittmer, 2006), werden bei einer KoRV-Infektion immunsuppressive Effekte beschrieben (Fiebig et al., 2006). Diese sind je nach Infektion mehr oder weniger stark und äußern sich in einer Leukämie (Hanger et al., 2000) oder in opportunistischen Erkrankungen wie einer Chlamydieninfektion (Brown et al., 1987), ebenso wird die Entstehung bestimmter Arten von Krebs begünstigt (Canfield et al., 1988). Für die Auswertung der vorliegenden Immunisierungsstudien bedeutet dies, dass eine Infektion der Versuchstiere mit KoRV massiv in den normalen Ablauf einer Immunantwort gegen ein appliziertes Antigen eingreift. Das Ausmaß der Beeinflussung auf die Immunreaktion gegen das immunisierte Antigen ist je nach Tier verschieden, abhängig vom Infektionszeitpunkt und der individuellen Immunantwort. Zwei Effekte können jedoch klar herausgestellt werden:

- 1) Eine Infektion mit KoRV induziert Antikörper offenbar gegen andere Bereiche des transmembranen Hüllproteins (KoRV p15E) als eine Immunisierung mit einem Antigen in Form von Hybrid II. Die Sequenzhomologie zwischen KoRV p15E und PERV p15E beträgt 68% für das gesamte Protein, in dem Bereich des *backbones* beträgt die Homologie über 90%. Der Sequenzbereich der Cystein-Cystein-Loops, in welchem sich beim verwandten HIV-1-gp41 die IDO- (immundominante) sowie die ISU- (immunsuppressive) Domäne befinden (Denner et al., 1994), unterscheidet sich bei KoRV und PERV nur in einer Aminosäure. Die gegen das KoRV-*backbone* gerichteten Antikörper, die im Laufe der Infektion induziert wurden, waren mit hoher Wahrscheinlichkeit kreuzreagierend.

In bisherigen Versuchen der Arbeitsgruppe wurde jedoch festgestellt, dass nach Immunisierung mit Hybridproteinen kaum Antikörper gegen das *backbone* induziert wurden. Bei Infektionen mit KoRV als auch mit dem entfernt verwandten HIV wird eine Immunantwort gegen Bereiche des transmembranen Hüllproteins, die nicht den E1 oder E1-Bereich betreffen, induziert. Von HIV ist bekannt, dass in nahezu allen HIV-Patienten gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von Antikörper gebildet werden (Parren et al., 1999), dies wird z.B. für Tests zum Nachweis von gp41-spezifischen Antikörpern ausgenutzt um

eine HIV-Infektion zu belegen. Für HIV-gp41 ist eine immundominante Domäne beschrieben, welche im Bereich des Cystein-Cystein-Loops liegt und gegen die häufig Antikörper gerichtet sind (Denner et al., 1994). Für das Koala-Retrovirus (KoRV) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass bei einer Infektion von Ratten Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein p15E von KoRV gebildet werden (Fiebig et al., 2006). Bei der vorliegenden Infektion ist davon auszugehen, dass eine starke Immunantwort gegen Epitope induziert wurde, die im *backbone* des Impfantigens Hybrid II lokalisiert sind. Mit Sicht auf das immunisierte Antigen werden durch die Infektion somit ständig unerwünschte Antikörperantworten gegen verschiedene Epitope geboostet, die Immunreaktion gegen das Epitop des Interesses (HIV-E1/E2) bleibt jedoch verhältnismäßig schwach. Dieser Effekt würde besonders dann eintreten, wenn die Immunisierung vor der Infektion stattgefunden hat. Bei einer etablierten Immunantwort gegen KoRV kann es dazu führen, dass nachfolgend appliziertes Impfantigen schon kurz nach der Immunisierung durch KoRV-spezifische kreuzreagierende Antikörper opsoniert und aus dem Blutkreislauf entfernt wird. Entscheidend für die Stärke der Immunantwort ist jedoch, dass die Immunstimulation durch das Antigen ausreichend stark ist und auch über längere Zeit anhält.

2) Ein weiterer möglicher Effekt bei einer KoRV-Infektion ist die Retrovirus-induzierte Immunsuppression. Es wird eine immunsuppressive Domäne postuliert, welche die mitogenaktivierte Proliferation von T-Lymphozyten inhibiert (Denner et al., 1994, 1996). Zusätzlich zu den immunsuppressiven Effekten kommt es zu Zerstörung infizierter T-Zellen durch das Immunsystem sowie zu einem Verlust durch die virusinduzierte Zelllyse.

5.7. Wiederholung der Immunisierung mit Hybrid II C1-C4

Ein Teil der bereits durchgeführten Immunisierungsstudien wurden erneut mit gesichert nicht KoRV-infizierten Ratten durchgeführt. Die Immunisierungsantigene waren modifizierte Hybrid II-Konstrukte (C1-C4), das Design der neuen Immunisierungsstudie gleicht dem der bereits durchgeführten Studie mit Hybrid II C1-C4. Um unabhängig von den bisherigen Daten Vergleiche zwischen modifiziertem und nicht modifiziertem Hybrid II ziehen zu können, wurde zusätzlich eine Rattengruppe mit Hybrid II immunisiert. Die durch die Immunisierungsstudie erhaltenen Seren werden derzeit analysiert. Die Ergebnisse sollten Aufschluß darüber geben, ob eine Verschiebung des E2-Epitopes relativ zum E1-Bereich eine verbesserte Induktion bindender Antikörper induziert und ob Neutralisation bei den Seren festgestellt werden kann.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung effektiver Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten wie AIDS ist eines der Hauptziele der Biowissenschaften. Eine Impfung wäre die kostengünstigste Möglichkeit zu Eindämmung von HIV und auch mit weniger medizinischem Aufwand verbunden. Um neutralisierende Antikörper gegen HIV-1 zu gewinnen, wurde als Antigen das transmembrane Hüllprotein gp41 gewählt, weil es eine entscheidende Rolle bei der Induktion der Fusion spielt und hochkonserviert ist.

Aufbauend auf erfolgreichen Versuchen dieser Arbeitsgruppe, neutralisierende Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein p15E der porcinen endogenen Retroviren (PERVs) und des felines Leukämievirus (FeLV) zu gewinnen, wurden Hybridproteine entwickelt, die Epitope von gp41 von HIV im p15E von PERV enthalten. Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Hybridproteine zu produzieren, zu reinigen und die nach Immunisierung erhaltenen Seren auf bindende und neutralisierende Antikörper zu untersuchen.

Im ersten Abschnitt der Arbeit wurde das Hybrid II-Antigen, das aus p15E von PERV und zwei Epitopen des gp41 von HIV-1 (E1 und E2) zusammengesetzt ist, in unterschiedlichen Mengen und Reinheitsstufen in den Immunisierungsstudien eingesetzt. Weiterhin wurden die Applikationsstellen bei der Immunisierung variiert. Obwohl unterschiedliche Titer bindender Antikörper induziert wurden, konnten - im Unterschied zu früheren Versuchen - keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde das bestehende Hybrid II-Konstrukt durch Einklonieren zusätzlicher Nukleotide vor dem C-terminal integrierten HIV-Epitop E2 modifiziert. Im Protein wurde dadurch die E2-Sequenz durch die eingefügten Aminosäuren in ihrer Position relativ zum E1-Bereich verschoben und somit der Epitopcharakter verändert.

Allerdings konnten auch bei der Immunisierung mit diesen Hybriden nur bindende, jedoch keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Um die Diskrepanzen zu früheren Untersuchungen aufzuklären, wurden genaue Analysen der Seren der immunisierten Tiere durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Kolonie der Immunisierungsratten mit einem PERV-verwandten Retrovirus, dem Koala-Retrovirus (KoRV) infiziert war. Der Nachweis erfolgte mittels PCR und Antikörpernachweis, einige Ratten entwickelten Tumore. Offensichtlich interferierte die KoRV-Infektion mit der Induktion neutralisierender Antikörper.

Anhang

Anhang A: Literatur- und Bildverzeichnis

Andersson S, Davis D L, Dahlbäck H, Jörnvall H, Russell D W. Cloning, Structure, and Expression of the Mitochondrial Cytochrome P-450 Sterol 26-Hydroxylase, a Bile Acid Biosynthetic Enzyme. *J Biol Chem.* 1989; 264, 8222-8229.

Avrameas S, Ternynck T. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry.* 1971; 8:1175-9

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

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; 220(4599):868-71.

Barthel HR, Wallace DJ. False-positive human immunodeficiency virus testing in patients with lupus erythematosus. *Semin Arthritis Rheum.* 1993; 23: 7.

Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Häsler K, Fleckenstein B, Schaffner W. A Very Strong Enhancer is Located Upstream of an Immediate Early Gene of Human Cytomegalovirus. *Cell.* 1985; 41, 521-530.

Broder S, Gallo RC. A pathogenic retrovirus (HTLV-III) linked to AIDS. *N Engl J Med.* 1984; 311(20):1292-7.

Brown A S, Girjes AA, Lavin MF, Timms P, Woolcock JB. Chlamydial disease in koalas. *Aust Vet J.* 1987; 64:346-350

Buchacher A, Predl R, Strutzenberger K, Steinfeldner 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; 10:359-369.

Bundesamt für Veterinärwesen (Schweiz) BVET. Fachgerechte und tierschutzkonforme Antikörperproduktion in Kaninchen, Hühnern und Labornagetieren. Richtlinie Tierschutz 3.04. 1999

Burton DR, Stanfield RL, Wilson I A. Antibody vs. HIV in a clash of evolutionary titans. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102(42):14943-8.

Cassol S, Salas T, Lapointe N, Arella M, Rudnik J, O'Shaughnessy M. Improved detection of HIV-1 envelope sequences using optimized PCR and inosine-substituted primers. *Mol Cell Probes.* 1991; 5(2):157-60.

Coeffier E, Clement JM, Cussac V, Khodaei-Boorane N, Jehanno M, Rojas M, Dridi A, Latour M, El Habib R, Barre-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; 19(7-8):684-93.

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; 12(5):442-50.

Denner J, Norley S, Kurth R. The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients. *AIDS.* 1994; 8(8):1063-72.

Dismuke DJ, Aiken C. Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J Virol.* 2006; 80(8):3712-20.

- Eckhart** L, Raffelsberger W, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Katinger H, Ruker 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; 77 (Pt 9):2001-8. PMID: 8810996
- Fenouillet** E, Gluckman JC, Jones IM.; Functions of HIV envelope glycans. *Trends Biochem Sci.* 1994; 19(2):65-70.
- Ferko** B, Katinger D, Grassauer A, Egorov A, Romanova J, Niebler B, Katinger H, Muster T. Chimeric influenza virus replicating predominantly in the murine upper respiratory tract induces local immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in the genital tract. *J Infect Dis.* 1998; 178(5):1359-68
- Fiebig^a** U, Hartmann MG, Bannert N, Kurth R, Denner J. Transspecies transmission of the endogenous koala retrovirus. *J Virol.* 2006; 80(11):5651-4.
- Fiebig^a** U, Langhammer S, Kurth R, Denner J. Induction of HIV-neutralising antibodies of the 2F5/4E10 type. *Retrovirology.* 2005; 2(Suppl I):71.
- Fiebig^b** U, Schmolke M, Karlas A, Kurth R, Denner J. Induction of anti-viral neutralising antibodies. World Intellectual Property Organisation. WO 2005/021574.
- Fiebig^c** U, Langhammer S, Schmolke M, Klein S., Kurth R, Denner J. Attempts to induce HIV neutralising antibodies using gp41-derived constructs containing ELDKWA. *European J Med Res.* 2005; 10(2):67-8.
- Fiebig^b** U, Schmolke M, Kurth R, Denner J. Induction of HIV-neutralising antibodies specific for the membrane-proximal external region (MPER) of the transmembrane envelope protein gp41. *Antiviral Therapy.* 2006; 11(Suppl. 2)146, PO9a-53.
- 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; 307(2):406-13.
- Gottlieb** MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981; 305(24):1425-31.
- Grundner** C, Mirzabekov T, Sodroski J, Wyatt R. Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J Virol.* 2002; 76, 3511–3521.
- Hager-Braun** C, Katinger H, Tomer KB. The HIV-neutralizing monoclonal antibody 4E10 recognizes N-terminal sequences on the native antigen. *J Immunol.* 2006; 176(12):7471-81.
- Hanger** JJ, Bromham LD, McKee JJ, O'Brien TM, Robinson WF. The nucleotide sequence of koala (*Phascolarctos cinereus*) retrovirus: a novel type C endogenous virus related to gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 2000; 74:4264-4272
- Hanly** WC, Artwohl JE, Bennett BT. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR J* 1995; 37:93-118.
- Haynes** BF, Fleming J, St Clair EW, Katinger H, Stiegler G, Kunert R, Robinson J, Searce RM, Plonk K, Staats HF, Ortel TL, Liao HX, Alam SM. Cardiophilin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* 2005; 308(5730):1906-8.
- Hendriksen** C, Hau J. Production of polyclonal and monoclonal antibodies. *Handbook of laboratory Animal Science* 2003; 2nd ed. City: CRC Press LLC p 391-411.
- IAVI-Report** (International AIDS Vaccine Initiative). June 2006
- Joyce** JG, Hurni WM, Bogusky MJ, Garsky VM, Liang X, Citron MP, Danzeisen RC, Miller MD, Shiver JW, Keller PM. Enhancement of alpha -helicity in the HIV-1 inhibitory peptide DP178 leads to an increased affinity

for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses in vitro. Implications for vaccine design. *J Biol Chem.* 2002; 277(48):45811-20.

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; 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; 23(25):3341-8.

Langhammer^a S, Hübner J, Jarrett O, Kurth R, Denner J. Protection of cats by immunisation with the transmembrane envelope protein p15E of feline leukaemia virus (FeLV). *Antiviral Therapy.* 2006; 11(Suppl. 2):146,P10-07.

Langhammer^b S, Hübner J, Kurth R, Denner J. Antibodies neutralizing feline leukaemia virus (FeLV) in cats immunized with the transmembrane envelope protein p15E. *Immunology.* 2006; 117(2):229-37

Langhammer[#] S, Fiebig U, Kurth R, Denner J. Increased neutralising antibody response after simultaneous immunisation with Leucogen and the feline leukaemia virus transmembrane protein, *Vet. Microbiol.*, submitted.

Lorizate M, Gomara M J, de la Torre B G, Andreu D, Nieva J L. Membrane-transferring sequences of the HIV-1 Gp41 ectodomain assemble into an immunogenic complex. *J Mol Biol.* 2006; 360(1):45-55.

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; 24(4):435-42.

Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J Virol.* 1999; 73(5):4009-18.

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; 42(11):3214-23.

Meffre E, Milili M, Blanco-Betancourt C, Antunes H, Nussenzweig MC, Schiff C. Immunoglobulin heavy chain expression shapes the B cell receptor repertoire in human B cell development. *J Clin Invest.* 2001; 108(6):879-86.

Menendez A, Chow KC, Pan OC, Scott JK. Human immunodeficiency virus type 1-neutralizing monoclonal antibody 2F5 is multispecific for sequences flanking the DKW core epitope. *J Mol Biol.* 2004; 338(2):311-27.

Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L, Wilson AB; Joint Working Group on Refinement. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim.* 2001; 35(1):1-41.

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; 67(11):6642-7.

Nelson JA, Reynolds-Kohler C, Smith BA. Negative and Positive Regulation by a Short Segment in the 5'-Flanking Region of the Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Gene. *Mol Cell Biol.* 1987; 7, 4125-4129.

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; 78, 10724--10737.

- Pantophlet R**, Burton DR. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:739-69.
- Parren PW**, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ. The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS.* 1999; 13:137–162.
- Poignard P**, Saphire EO, Parren PW, Burton DR. Gp120: Biologic aspects of structural features. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19:253-74.
- Purtscher M**, Trkola A, Grassauer A, Schilz PM, Klima A, Dopfer S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H. Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing antibody 2F5. *AIDS.* 1996; **10**:587–593
- Purtscher M**, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A, Katinger H. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Human Retroviruses.* 1994; **10**:1651–1658
- Richards JR.** Feline immunodeficiency virus vaccine: implications for diagnostic testing and disease management. *Biologicals.* 2005; 33(4):215-7.
- Schmolke M.** Wirkmechanismus und Induktion neutralisierender Antikörper gegen das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1. Dissertation, Fachbereich Biologie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Berlin, 2004.
- Sanchez-Martinez^a S**, Lorizate M, Katinger H, Kunert R, Nieva JL. Membrane association and epitope recognition by HIV-1 neutralizing anti-gp41 2F5 and 4E10 antibodies. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2006; 22(10):998-1006.
- Sanchez-Martinez^b S**, Lorizate M, Hermann K, Kunert R, Basanez G, Nieva JL. Specific phospholipid recognition by human immunodeficiency virus type-1 neutralizing anti-gp41 2F5 antibody. *FEBS Lett.* 2006; 17;580(9):2395-99.
- Schneider-Schaulies S**, Dittmer U. Silencing T cells or T-cell silencing: concepts in virus-induced immunosuppression. *J Gen Virol.* 2006; 87(Pt 6):1423-38.
- Siegal FP**, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR. Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N Engl J Med.* 1981; 305(24):1439-44.
- Silver N**, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2006; 7:33.
- Wyatt R**, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science.* 1998; 280(5371):1884-8.
- Wyatt R**, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature.* 1998; 393:705–11.
- Zhu P**, Liu J, Bess J Jr, Chertova E, Lifson JD, Grise H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature.* 2006; 441(7095):847-52.
- 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; 79(2):1252-61.
- Zwick MB**, Saphire EO, Burton DR. gp41: HIV's shy protein. *Nat Med.* 2004; 10(2):133-4.

Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spencehauer C, Saphire 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.* 2001; 75(22):10892-905.

Quellenverzeichnis für Bilder und Tabellen aus externen Quellen

1.1. HIV-Virion:

Wikipedia Commons / United States Federal Government

1.2. Schematischer Aufbau des HIV-1 gp160:

Modrow / Falke / Truyen, *Molekulare Virologie* 2. Auflage, S.405

1.3. Oberflächenmodell für SIV-*spikes*

Zhu et al., 2006

1.5. Oberflächenmodell für SIV-*spikes* mit vorhergesagten Bindungsstellen von 2F5 und 4E10

Zhu et al., 2006

4.19. Bilder der Tumore von Ratte 145-3

Bilder freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Uwe Fiebig

4.20. Überprüfung auf KoRV-Provirus-Integration in einer PCR

Bild freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Uwe Fiebig

Tabelle 1.1. Aktuelle Zahlen zur HIV-Epidemie.

UNAIDS/WHO-Bericht „AIDS Epidemic Update 2006“

Tabelle 1.2. Einteilung der Retroviren.

Verändert nach Modrow, Falke, Truyen. *Molekulare Virologie*, 2. Auflage

Anhang B: Häufig verwendete Abkürzungen

5N	-	5-normale (Schwefelsäure, Konzentrationsangabe)
6Fam	-	6-Carboxy-Fluorescein
AG	-	Arbeitsgruppe
AIDS	-	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AK	-	Antikörper
Amp	-	Ampicillin
AS	-	Aminosäure
bp	-	Basenpaare
CBP	-	Calmodulin-Bindeprotein
BSA	-	bovine (Rinder) serum albumine
CD	-	cluster of differentiation
CDC	-	Center of Disease Control (Nomenklatur-Definition)
CDR	-	complementary determining region
CHR	-	C-terminale Helixregion
CL	-	Cardiolipin
CMV	-	Cytomegalievirus
ct	-	cycle-threshold
DAB	-	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
DMEM	-	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	-	Dimethyl-Sulfoxid
dNTP	-	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	-	Enzyme-linked immunosorbent assay
EM	-	Elektronen-Mikroskop
env	-	Envelope-protein
Fc	-	fixed chain (nicht variabler Antikörper-Anteil)
FelV	-	Felines Leukämievirus
FKS	-	Fetales Kälberserum
FP	-	Fusionspeptid
FRET	-	fluorescence resonance energy transfer
fw	-	forward / Vorwärts (Primer)
g	-	gravity (phys. Einheit)
gp	-	Glykoprotein
gag	-	Gruppenspezifisches Antigen
GAPDH	-	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H ₂ O _{dd}	-	Wasser, 2fach deionisiert
HAART	-	hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	-	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonsäure
Hex	-	Hexachloro-6-Carboxyfluorescein
HIV	-	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	-	humanes Leukozytenantigen
HRP	-	horseradish-peroxidase / Meerrettich-Peroxidase
HTLV	-	humanes T-Zell-Leukämievirus
IAVI	-	Internationale AIDS Vaccine Initiative
IgG/M	-	Immunglobulin Subklasse G / M
i.m.	-	intra-Muskulär
i.p.	-	intra-Peritoneal (in die Bauchhöhle)

IPTG	-	Isopropylthiogalaktosid
kb	-	Kilobasen
kDa	-	Kilodalton
KoRV	-	Koala Retrovirus
LB	-	lysogeny broth (Medium)
LINE	-	long interspersed nuclear element
LTR	-	long terminal repeat
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information
NF κ B	-	nuclear factor κ B
NHR	-	N-terminale Helixregion
NIH	-	National Institute of Health
mAK	-	monoklonaler Antikörper
MCS	-	multiple cloning site
MHC	-	major histocompatibility complex / Haup-Histokompatibilitätskomplex
MPER	-	Membran-proximale externe Region
OD	-	optische Dichte
OPD	-	O-Phenylendiamin
PAGE	-	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	-	Phosphate-buffered saline
PCR	-	Polymerase chain reaction
PERV	-	Porcines endogenes Retrovirus
POD	-	Peroxidase
Pol	-	Polymerase (Protein)
PVDF	-	Polyvenyl-Difluorid (Trägermembran-Material)
qRT-PCR	-	quantitative Real-time PCR
R	-	redundant region (Bestandteil HIV-LTR)
Rev	-	reverse 7 Rückwärts (Primer)
R/H	-	rapid / high (zu Klassifizierung Virusstämme)
rpm	-	rotations per minute
RPMI	-	Roswell Park Memorial Institut -Grundmedium
RRE	-	Rev responsive Element
RT	-	Raumtemperatur (23°C)
Σ	-	Summenzeichen
SAP	-	Shrimp Alkalische Phosphatase
s.c.	-	subcutan
SDS	-	Sodium-dodecyl-sulfat
SI	-	Synzytien-induzierend (zu Klassifizierung Virusstämme)
SINE	-	short interspersed nuclear element
SIV	-	simian immunodeficiency virus
SNAP	-	soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein
SNARE	-	SNAP-Rezeptor
TBS	-	Tris-bufferd saline
TEMED	-	Tetramethylethylendiamid
TNF α	-	Tumornekrose-Faktor alpha
Tris	-	Tris-(hydroxymethyl-) -aminomethan
U3/U5	-	unique region 3' / 5' (Bestandteil HIV-LTR)

Anhang C: Weitere Arbeitsmittel**Chemikalien**

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle benötigten Chemikalien von der Firma Roth bezogen.

PCR-Zusätze

PCR-Puffer 10x	Applied Biosystems
MgCl ₂	Applied Biosystems
Ampli Taq Gold	Applied Biosystems (5 U/μl)
dNTPs	Fermentas

Sonstige Chemikalien

Proteinase-K (20 mg/ml)	Invitrogen
FKS	Biochrom
BSA	Serva
ECL detection reagent	Pierce
SAP	NEB / New England Biolabs

Antikörper

Anti-Ratte: polyclonal rabbit anti-rat IgG HRP konjugiert (Dako)

Anti-human: anti-human IgG Peroxidase-konjugiert (Sigma)

Nachweis/Kontrollantikörper 2F5: Der monoklonale anti-HIV-1 gp41 Antikörper (2F5) wurde über das NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH von Dr. Herman Katinger bezogen.

Verwendete kommerzielle Kits**Plasmidpräparations-Kit**

JetStar 2.0 Plasmid - Miniprep Kit / 200 bzw. - Maxiprep Kit / 20 (Genomed)

Gelextraktions-Kit

Qiaquick[®] Gel Extraction Kit - 250 (Qiagen)

Elektroelution

Biotrap/Elutrap StarterKit BT1000 (Schleicher&Schuell)

Verwendete Messgeräte**Photometer**

BioPhotometer (Eppendorf)

Agarose-Gelelektrophorese

UV-Geldokumentations-Transilluminator (λ=302 nm) GelDoc2000 (BioRad)

Software: Quantity One Version 4.2.1.

ELISA

ELISA Microplate Washer 96PW (TECAN)
ELISA Reader Spectra Classic (TECAN)
Programm: Magellan Version 3.11. (TECAN)

Waage

Sartorius Iso Cal

Quantitative Real Time PCR

MX 4000 Multiplex Quantitative PCR-System (Stratagene)
Software: MX4000 Version 4.20 (Stratagene)

Transformatoren für Gelelektrophorese und WesternBlot

Powerpac 300 Power Supply (BioRad)

Verwendete Pipetten

Eppendorf Research

Verwendete PCR-Thermocycler

Eppendorf Mastercycler eppgradient S

Firmenverzeichnis

Applied Biosystems	-	Foster City, USA
Biochrom	-	Berlin, Deutschland
BioRad	-	München, Deutschland
Eppendorf	-	Hamburg, Deutschland
Fermentas	-	St. Leon Rot, Deutschland
Genomed	-	Löhne, Deutschland
Invitrogen	-	Leek, Niederlande
Jerini	-	Berlin, Deutschland
NEB	-	Frankfurt a. M., Deutschland
Pierce	-	Rockford, Il, US and A
Roth	-	Karlsruhe, Deutschland
Sartorius	-	Göttingen, Deutschland
Schleicher&Schuell	-	Dassel, Deutschland
Serva	-	Heidelberg, Deutschland
Sigma	-	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland Sigma-Genosys GmbH, Steinheim, Deutschland
Stratagene	-	La Jolla, Ca, US and A
Tecan	-	Crailsheim, Deutschland
Qiagen	-	Hilden, Deutschland

Anhang D: Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Robert Koch-Institut und die stetige Unterstützung möchte ich mich beim Leiter der Arbeitsgruppe Dr. Joachim Denner und beim Präsidenten des Robert Koch-Institutes, Prof. Dr. Reinhard Kurth, bedanken.

Mit Dankbarkeit möchte ich auch die Bereitschaft von Prof. Dr. Richard Lucius honorieren, welcher trotz sehr hoher Arbeitsbelastung ohne zu zögern die Tätigkeit als Gutachter annahm und mir dadurch die Möglichkeit eröffnete, diese Arbeit am Robert Koch-Institut anzufertigen

Zu Dank bin ich natürlich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe verpflichtet, für die Hilfestellung bei praktischen und fachlichen Problemen, für ein ausgesprochen gutes Arbeitsklima und die freundschaftliche Zusammenarbeit. Herausstellen möchte ich dabei das Engagement von Uwe Fiebig und Dr. Magdalena Konczal, welche mir immer mit Geduld, Rat und Hilfe zur Seite standen.

Besondere Erwähnung sollen an dieser Stelle meine Eltern Irene und Siegfried Rothe sowie mein Bruder Martin Rothe finden. Ihre Unterstützung reicht weit über die Zeit während der Diplomarbeit hinaus. Sie haben mich während des gesamten Studiums finanziell und insbesondere auch moralisch unterstützt, wenn es darum ging, Tiefpunkte zu überwinden. Vielen Dank dafür.

Folgende Reagenzien wurden durch das HIH AIDS Research and Reference Reagent Program zu Verfügung gestellt:

- HIV-1 gp41 monoklonaler Antikörper (2F5) von Dr. Herman Katinger
- C8166 von Dr. Robert Gallo

Anhang E: Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Diplomarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Michael Rothe

Berlin, den 28.02.2007