

Biologie

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

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Mirco Schmolke aus Ahlen

2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Pathogenese der HIV-Infektion	2
1.2 HIV-1 Genomstruktur	4
1.3 Struktur und Funktion der HIV-1 Proteine	5
1.3.1 Die gruppenspezifische Antigene	5
1.3.2 Die viral codierten Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase	5
1.3.3 Der Oberflächen-Transmembran-Komplex	6
1.3.3.1 Das Oberflächenhüllprotein gp120	7
1.3.3.2 Das transmembrane Hüllprotein gp41	8
1.3.4 Die regulatorischen Proteine	11
1.4 HIV-1 Infektionszyklus	12
1.5 Die Wechselwirkung von HIV-1 mit dem humanen Immunsystem	13
1.5.1 Das angeborene Immunsystem gegen HIV-1	14
1.5.2 Die T-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort gegen HIV-1	14
1.5.3 Die B-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort gegen HIV-1	15
1.5.4 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen die HIV-1 Hüllproteine	15
1.5.4.1 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp120	16
1.5.4.2 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp41	17
1.6 Antivirale HIV-Therapie	20
1.7 Impfstoff-Strategien	21
1.8 Klinische Vakzinierungsversuche	22
1.9 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1 Chemikalien	24
2.2 Antikörper	24
2.3 Plasmide	24
2.4 Peptide	25

2.5 Methoden	26
2.5.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse	26
2.5.2 ELISA	27
2.5.3 Klonierung	29
2.5.3.1 PCR	29
2.5.3.2 Restriktionsverdau	30
2.5.3.3 Dephosphorylierung mit SAP	30
2.5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese	31
2.5.3.5 Plasmid-DNA-Präparation	31
2.5.3.6 Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten	31
2.5.3.7 Isolierung genomischer DNA	31
2.5.3.8 Ligation	31
2.5.3.9 Transformation	32
2.5.4 Sequenzierung	32
2.5.5 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	33
2.5.5.1 Bakterien und Medien	33
2.5.5.2 IPTG-induzierte Expression	33
2.5.5.3 Aufschluss der Bakterien	33
2.5.5.4 Affinitätschromatographie (NiNTA-Sepharose)	34
2.5.5.5 Aufreinigung der rekombinant produzierten Proteine CBP-rgp41, Hybrid I, II und III	34
2.5.6 Immunisierung von Ratten und Ziegen	35
2.5.6.1 Ratten und Ziegen	35
2.5.6.2 Applikation	35
2.5.6.3 Blutabnahme und Serumgewinnung	35
2.5.7 Zellkultur	36
2.5.7.1 Zellen und Medien	36
2.5.7.2 Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien	36
2.5.7.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.5.8 Viren	37
2.5.8.1 Anlegen von Virusstocks	37
2.5.8.2 <i>In vitro</i> Selektion neutralisationsresistenter HIV-1 Quasispezies	38
2.5.9 Rekombinante Expression in eukaryotischen Zellen	38
2.5.9.1 Transfektion eukaryoter Zellen	38
2.5.9.2 Immunfluoreszenzmikroskopie	38
2.5.9.3 Durchflusscytometrie	39
2.5.9.4 Präparation von Zellen für die Raster- und Transmissions- elektronenmikroskopie	40

2.5.10	Ballistische Immunisierung von Ratten mit der Helios Gene Gun	41
2.5.11	Epitopkartierung mit einer Pepsot Membran	42
2.5.12	<i>In vitro</i> Virusneutralisationstest	42
2.5.13	<i>Realtime</i> -PCR	42
3.	Ergebnisse	44
3.1	Wirkmechanismus des virusneutralisierenden, monoklonalen Antikörpers 2F5	45
3.1.1	Kartierung des 2F5-Epitops mit einer Pepsot-Membran	45
3.1.2	2F5 bindet besser an die vollständige Ektodomäne von gp41 als an DP178	46
3.1.3	<i>In vitro</i> Selektion einer 2F5-resistenten HIV-1 IIIB Mutante	47
3.1.3.1	Das gp41 der <i>in vitro</i> selektionierten HIV-1 IIIB Mutante wurde nicht durch 2F5 gebunden	48
3.1.3.2	HIV-1 IIIB 2F5mut wurde nicht durch 2F5 neutralisiert	49
3.1.3.3	2F5 induzierte <i>in vitro</i> Aminosäuresubstitutionen in der Sequenz ELDKWA durch Punktmutationen	51
3.1.4	Identifizierung einer Sequenz innerhalb der Ektodomäne von gp41, die die Bindung von 2F5 an ELDKWA unterstützt	52
3.1.5	Einfluss von Aminosäureaustauschen im P6342 auf die Steigerung der Bindungsstärke von 2F5 an ELDKWA	55
3.1.6	Auswirkung des stöchiometrischen Verhältnisses von P6342 und P6373 auf die Bindung von 2F5 an ELDKWA	56
3.1.7	Hemmung der virusneutralisierenden Aktivität von 2F5 durch die Peptide P6342 und P6373	57
3.1.8	Gesteigerte Virusneutralisation durch Vorinkubation von 2F5 und HIV-1 IIIB im <i>in vitro</i> Neutralisationsversuch	58
3.1.9	Gp41 auf der Oberfläche von infizierten Zellen und Syncythien wurde durch 2F5 gebunden	59
3.2	Entwicklung und Produktion von rekombinanten Antigenkonstrukten zur Induktion von gp41-spezifischen, virusneutralisierenden Antikörpern im Versuchstiermodell	63
3.2.1	Rekombinante Antigene	63
3.2.1.1	Gp41-Antigene	63
3.2.1.2	Hybrid-Antigene	67
3.2.1.3	Syngene-Antigene	74
3.2.2	Expression von rekombinanten Antigenen auf der Oberfläche von Zellen zur Induktion einer antiviralen Immunantwort	79
3.2.2.1	Expression von gp41-Antigenen auf der Oberfläche von Rattenzellen	79
3.2.2.2	Ballistische DNA-Immunisierung von Ratten mit pDisplay-gp41, pDisplay-gp41-NHR und pDisplay-gp41-CHR	81

4. Diskussion	85
Die Notwendigkeit eines HIV-Impfstoffes	85
Welche Eigenschaften sollte ein HIV-Impfstoff haben	85
Das 2F5-Epitop	86
2F5 übt <i>in vitro</i> Selektionsdruck auf die Sequenz ELDKWA aus	87
Die Konformation des 2F5-Eptiops	87
Zu welchem Zeitpunkt des Infektionszyklus neutralisiert 2F5 die HIV-Replikation?	89
Modelle zur Beschreibung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5	90
Vergleich des Bindungsmechanismus von 2F5 mit dem von neutralisierenden Antikörpern gegen andere Retroviren	94
Entwicklung von rekombinanten Antigenen zur Induktion einer HIV-neutralisierenden Immunantwort	95
Induktion von bindenden und neutralisierenden Antiseren	97
Welche Folgerungen lassen sich aus den Immunisierungsstudien mit rekombinanten Antigenen ziehen?	98
Induktion von hochaffinen, neutralisierenden Antikörpern	99
Exposition von gp41-abgeleiteten Antigenen auf Zelloberflächen	99
Welche Folgerungen lassen sich aus den Immunisierungsstudien mit membranständigen Antigenen ziehen?	101
Ist ein HIV-Impfstoff prinzipiell möglich?	101
Ausblick	103
5. Zusammenfassung	105
6. Literatur	106

7. Anhang	130
I. Sequenzvergleich aller HIV-1 Subtypen der Gruppe M	130
II. Primer und Sonden	131
III. Plasmidkarten	134
Publikationsliste	143
Danksagung	144

Abkürzungsverzeichnis

add	addieren auf ein Gesamtvolumen von
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrom</i>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
bzw.	beziehungsweise
CBP	Calmodulin-Bindeprotein
CCR	Chemokinrezeptoren für CC-Chemokine (Chemokingruppe mit zwei aufeinanderfolgenden Cysteinen)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD-Spektroskopie	Circulardichroismus-Spektroskopie
CHR	C-terminale Helixregion
CTL	Cytotoxische T-Zellen
CXCR	Chemokinrezeptoren für CXC-Chemokine (Chemokingruppe bei der zwei aufeinanderfolgende Cysteine durch eine Aminosäure getrennt sind)
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	Aqua bidest
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EAV	<i>Equine arteritis virus</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
Env	<i>envelope protein</i> , Hüllprotein
Fab	<i>fragment antigen binding</i> , Antigenbindendes Fragment von Immunglobulinen
FeLV	<i>feline leukemia virus</i> , Katzen-Leukämie-Virus
FIV	<i>feline immune deficiency virus</i> , Katzen-Immundefizienz-Virus
FKS	fötales Kälberserum
FP	Fusionspeptid
Gag	<i>group specific antigen</i> , Gruppenspezifisches Antigen
HAART	<i>highly active anti retroviral therapy</i> , Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPS	Hochgradig HIV-exponierte seronegative Personen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HIVIG	anti-HIV Immunglobuline (polyklonale anti-HIV-Seren)
HTLV	<i>human T cell leukemia virus</i> , humane T-Zell-Leukämie-Virus
Ig	Immunglobulin
IN	Integrase
IR	Infrarot
k _A	Assoziationskonstante
k _D	Dissoziationskonstante
kB	Kilo-Base
kD	Kilo-Dalton
LTR	<i>long terminal repeat</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Mio	Millionen
Mrd	Milliarden
mut	mutiert
MVA	<i>modified vaccinia Ankara virus</i>
Nef	negativer Faktor
NHR	N-terminale Helixregion
NIAID	<i>National Institute of Allergy and Infectious Diseases</i>
NIH	<i>National Institute of Health</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernmagnetresonanz
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE1	Peptid, abgeleitet von Epitopregion 1
PE2	Peptid, abgeleitet von Epitopregion 2
PERV	Porzines endogenes Retrovirus
PHI	Primäre HIV-Infektion

Pol	Polymerase
POD	Peroxydase
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SHIV	SIV-HIV-Hybrid-Viren
SIV	<i>simian immune deficiency virus</i> , Affen-Immundefizienz-Virus
Tat	Transaktivator
TM	Transmembranregion
UNAIDS	<i>United Nations Department of AIDS</i>
Vif	<i>virion infectivity factor</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
wt	Wildtyp

Aminosäuresequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt:

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

Die Basen von Oligonucleotidsequenzen sind in folgendem Code aufgeführt:

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

1. Einleitung

Die Infektion mit HIV und das daraus resultierende Krankheitsbild AIDS hat sich seit seiner Entdeckung Anfang der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts zu einer der größten globalen Virus-Epidemien entwickelt. Bis heute blieb die Suche nach einem präventiven Impfstoff und einer virusklärenden Therapie trotz massiver finanzieller Anstrengung und internationaler Forschung erfolglos.

Allein im Jahr 2003 infizierten sich weltweit bis zu 5,8 Millionen Menschen mit HIV, davon bis zu 810 000 Kinder unter 15 Jahren, bis zu 3,5 Millionen Menschen starben in Folge der HIV Infektion und/oder AIDS. Die Anzahl der mit HIV infizierten Menschen beläuft sich damit auf bis zu 46 Millionen. Seit Beginn der Epidemie wurden ca. 60 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Insgesamt sind bis heute mehr als 20 Millionen Menschen an HIV/AIDS gestorben (WHO/UNAIDS, UNAIDS *Facts Sheet*, 2002, *AIDS Epidemie Update* Dezember 2003, www.unaids.org). In Folge der HIV-Epidemie sank die mittlere Lebenserwartung im südlichen Afrika von 62 auf 42 Jahre, in Botswana liegt sie sogar unter 40 Jahren (UNAIDS *Facts Sheet*, 2002). Laut dem WHO-Gesundheitsbericht 2002 ist die Infektion mit HIV-1 und die daraus resultierende Immunschwäche AIDS die vierthäufigste Todesursache weltweit. Die Folgen der HIV-Epidemie für die Gesundheits- und Bildungssysteme sowie die Makro- und Mikroökonomie der betroffenen Länder sind dramatisch (UNAIDS *Facts Sheet*, 2002).

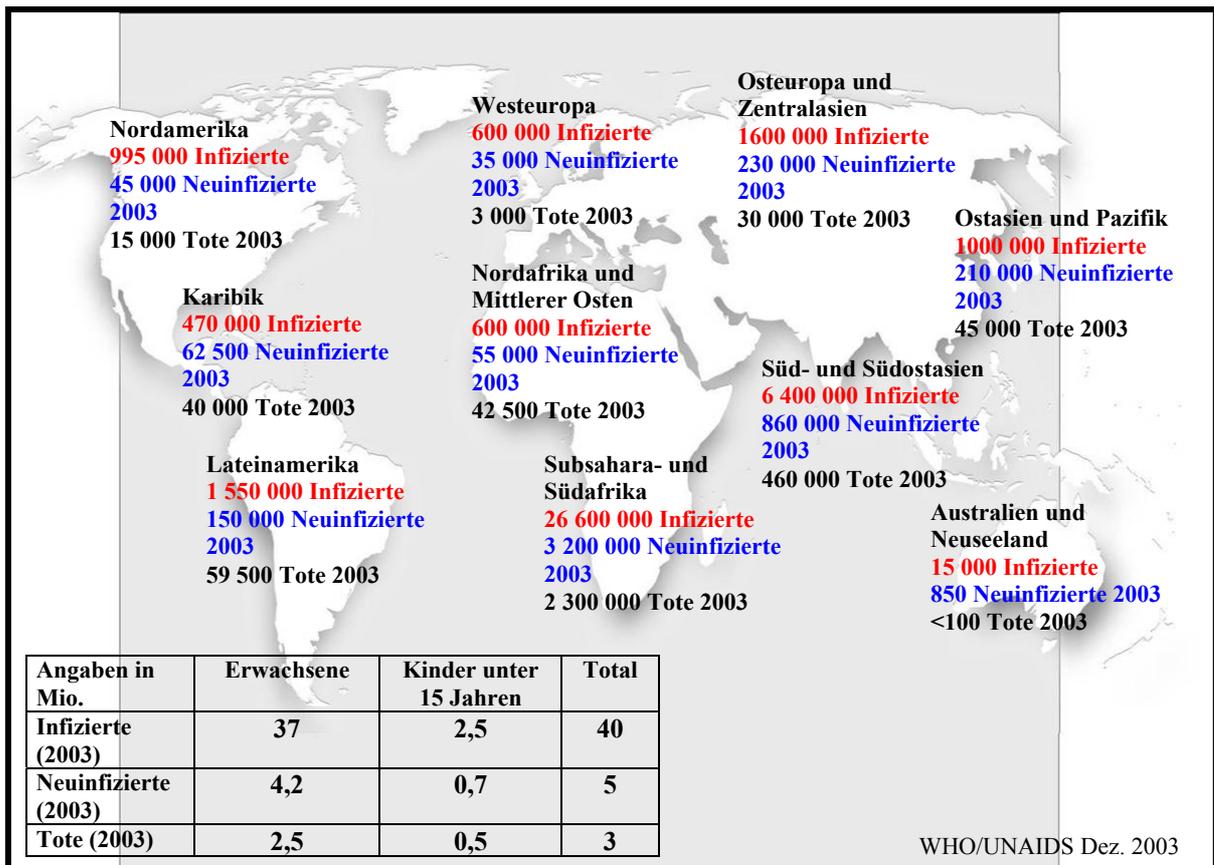


Abb.1: Weltweite Verbreitung der HIV-1 Epidemie. Die größten Durchseuchungen der Bevölkerung mit HIV sind konzentriert auf das südliche Afrika und Südost-Asien. Die eingezeichnete Tabelle zeigt die Mittelwerte verschiedener Schätzungen der weltweit von HIV-1 betroffenen Erwachsenen, Frauen und Kinder. (Quelle: WHO/UNAIDS, *AIDS epidemic update* Dezember 2003, www.unaids.org)

Schätzungen gehen davon aus, dass ohne effektive Gegenmaßnahmen, im Jahr 2010, 45 Millionen Neuinfektionen zu erwarten sind und im Jahr 2020 etwa 70 Millionen Tote (UNAIDS Facts Sheet, 2002). In Abbildung 1 ist die weltweite Verteilung der Infektionszahlen aufgeführt, mit einer deutlichen Häufung der Infektionszahlen im südlichen Afrika und Südost-Asien, zunehmend aber auch in Südamerika, Osteuropa und Ostasien.

1981 wurde erstmals die auffällige Häufung der seltenen Pilzinfektion mit *Pneumocystis carinii* bei fünf jungen, homosexuellen Männern beschrieben, die zuvor überwiegend bei immunsupprimierten Patienten aufgetreten war (Gottlieb et al., 1981). Neben den Infektionen mit *Pneumocystis carinii*, häuften sich Fälle von *Candida albicans* Infektionen, persistierender Lymphadenopathie und Kaposi-Sarkomen bei diesen Patienten (Siegal et al., 1981, Lawrence et al., 1983). 1982 wurde dieses komplexe Krankheitsbild, das sich über kontaminierte Blutkonserven, Geschlechtsverkehr und durch Mutter-Kind-Transfer epidemisch verbreitet, vom amerikanischen NIH (*National Institute of Health*) als AIDS (*acquired immune deficiency syndrom*) bezeichnet. Der Krankheitsverlauf war in nahezu 100% der Fälle in folge von opportunistischen Infektionen tödlich, wobei die Ursache für AIDS nicht bekannt war. Im gleichen Jahr wurden die ersten Fälle von infizierten Frauen durch heterosexuellen Kontakt mit AIDS-kranken Männern und von durch Bluttransfusion Infizierten publiziert (MMWR 1982 Sep 24). Bis zu diesem Zeitpunkt ging man davon aus, dass sich der unbekannte Erreger nur unter homosexuellen Männern ausbreitet. Die Arbeitsgruppe um Luc Montagnier isolierte 1983 aus Blutproben symptomatischer AIDS-Patienten am Institut Pasteur, Paris, den Erreger der erworbenen Immunschwäche, ein Retrovirus, das aufgrund serologischer und morphologischer Kriterien den Lentiviren zugeordnet wurde (Barre-Sinoussi et al., 1983). In den folgenden Monaten wurde dieser Befund durch andere Gruppen bestätigt (Markham et al., 1984, Levy et al., 1984, Popovic et al., 1984). Der Erreger wurde zunächst als LAV (Lymphadenopathie-assoziiertes Virus) (Barre-Sinoussi et al., 1983) oder HTLV-III (Humanes T-Zell-Leukämie-Virus) (Gallo et al., 1984) bezeichnet, 1986 aber in HIV (*human immune deficiency virus*) umbenannt (Brown et al., 1986). Es wurden zwei unterschiedliche HIV-Typen, HIV-1 und HIV-2 identifiziert, von denen sich allerdings nur HIV-1 weltweit ausgebreitet hat. HIV-2 verbleibt bis heute endemisch im westlichen Teil Zentralafrikas und Teilen von Indien, wobei einzelne Fälle auch aus anderen Ländern berichtet werden (Gao et al., 1992).

1.1 Pathogenese der HIV-Infektion

Eine HIV-1- Infektion ist gekennzeichnet durch einen langsamen Abfall der $CD4^+$ -T-Zell-Zahl, was in den meisten Patienten unterhalb eines Schwellenwertes von 2×10^{11} $CD4^+$ -T-Zellen/Liter zu Immundefizienz, einhergehend mit einer erhöhten Anfälligkeit für opportunistische Infektionen und virusinduzierten Tumoren führt (Weber, 2001). Neben $CD4^+$ -T-Zellen infiziert HIV-1 weitere Zellen des hämatopoietischen Systems (B-Lymphozyten, Makrophagen, NK-Zellen, u.a.), Zellen des Zentralnervensystems (Astrozyten, Ganglienzellen, Mikroglia, u.a.), sowie eine Vielzahl anderer Zelltypen (Langerhanszellen der Haut, Fibroblasten, Nebennierenzellen, Prostatazellen, u.a.) (Levy et al., 1993). Die Infektion mit HIV-1 kann auf drei Wegen erfolgen: (1) Geschlechtsverkehr, (2) Kontakt mit kontaminiertem Blut oder Blutprodukten und (3) Mutter-Kind-Transmission. Dabei kann die Übertragung in Form von freien Viruspartikeln oder infizierten Zellen stattfinden. Bei der häufigsten Übertragungsform, dem heterosexuellen und homosexuellen Geschlechtsverkehr, können mit der Samenflüssigkeit eines HIV-1-infizierten Mannes bis zu 50 freie Viruspartikel/ml und 5×10^4 infizierte Lymphozyten übertragen werden, was 5% der insgesamt 10^6 übertragenen Lymphozyten ausmacht (Levy et al., 1989).

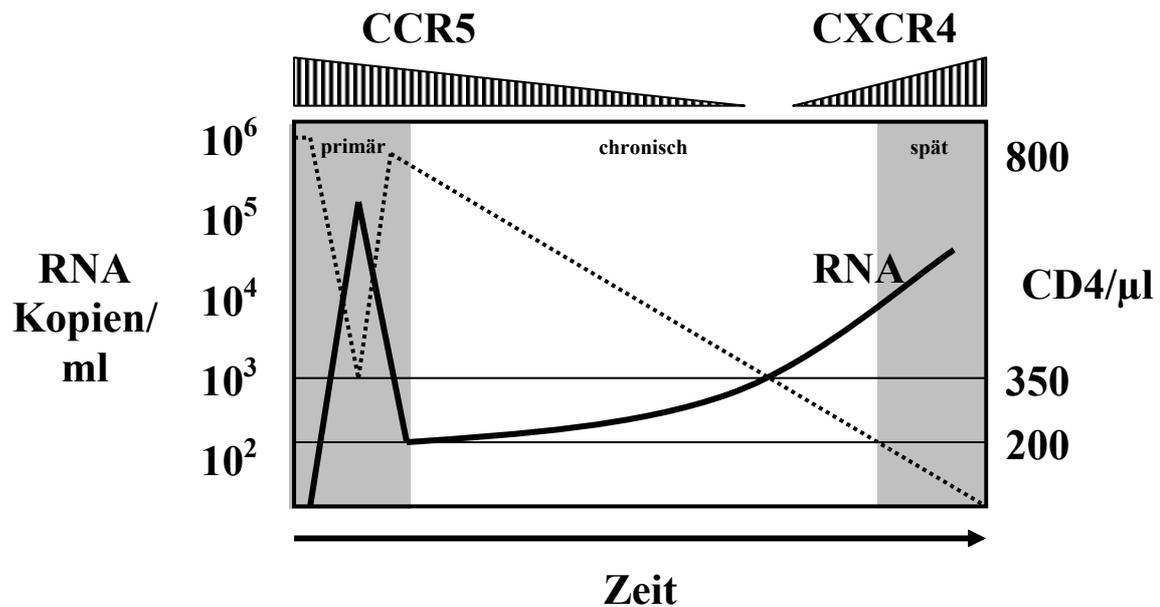


Abb.2: Schematischer Verlauf einer typischen HIV-1 Infektion. Auf der X-Achse ist der zeitliche Verlauf dargestellt, auf der linken Y-Achse ist die Anzahl der HIV-RNA-Kopien/ml Blut des Patienten aufgetragen (durchgezogene Linie), auf der rechten die Zahl der CD4⁺ Zellen/µl Blut (unterbrochene Linie). Oberhalb des Diagramms ist der von den Viren zum jeweiligen Zeitpunkt präferenziell genutzte Korezeptor aufgetragen (Weber, 2001).

Die Pathogenese einer HIV-1-Infektion lässt sich in drei Stadien unterteilen (Übersicht siehe Weber et al., 2001) (Abb.2). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass bei der primären Infektion mit HIV-1 über Schleimhäute die Viren entweder direkt CD4/CCR5-positive Zellen infizieren oder zunächst mit dem Oberflächenmolekül gp120 an C-Typ Lektine (DC-SIGN, *dendritic cell-specific intracellular adhesion molecule 3 (ICAM3)-grabbing non-integrin*) auf der Oberfläche von mukosalen Langerhans' Zellen (mLc, modifizierte Makrophagen) binden. Diese mLc transferieren das so gebundene Virus von der mukosalen Oberfläche in engen Kontakt zu CD4⁺/CCR5⁺-T-Zellen in lymphatischen Organen. Daher wird dieser Prozess auch als „trans“-Infektion bezeichnet (Mascola et al., 2000). Nach der Infektion durch HIV-1 wandern diese CD4⁺/CCR5⁺-T-Zellen in die regionalen Lymphknoten, wo sie verbleiben, bis ein Schwellenwert bei der viralen Replikation überschritten wird. Nach 2-6 Wochen tritt dann eine massive Plasma-Virämie mit z.T. mehr als 5×10^6 nachweisbaren Kopien RNA/ml auf, die so genannte primäre HIV-Infektion (PHI). In Folge der PHI breitet sich das Virus im Wirtsorganismus aus und bildet, über den Körper verteilt, lokale Reservoirs. Während der PHI sinkt die Zahl der CD4⁺ Zellen (z.T. unter $200 \times 10^9/l$), steigt aber nach der Serokonversion wieder an, ohne allerdings den Präinfektionswert zu erreichen. Begleitet werden kann die PHI von so genannten Serokonversionskrankheiten, rasch ansteigendem Fieber, schmerzhaften Lymphadenopathien oder Arthropathien, wobei sie zumeist aber symptomfrei bleibt. Nach 2-4 Wochen klingt die primäre Virämie rasch wieder ab, assoziiert mit der primären Immunantwort, wobei es nicht zur vollständigen Eliminierung des Virus kommt.

Während der anschließenden, chronischen Phase sinkt die Zahl der CD4⁺ Zellen langsam aufgrund eines 70fach gesteigerten CD4⁺ Zellen-Turnovers in Folge von HIV-1 vermitteltem CD4⁺-Zelltod. Während dieser Phase ist die durchschnittliche Lebensdauer einer CD4⁺ Zelle von 100 Tagen auf etwa 24-36h reduziert.

In der späten Phase der Infektion, sobald die $CD4^+$ Zellzahl unter $200 \times 10^9/l$ sinkt, fällt diese nicht mehr linear ab, wie in der chronischen Phase, sondern exponentiell. Ursache hierfür ist der Wechsel im Korezeptortropismus innerhalb der Viruspopulation. Während in der primären und chronischen Phase fast ausschließlich Viren präsent sind, die CCR5 als Korezeptor für die Infektion nutzen (R5-trope Stämme), dominieren in der späten Phase Viren, die überwiegend CXCR4 (X4-trope Stämme) oder beide Korezeptoren (R5X4-dualtrope Stämme) nutzen. Der Austausch von zwei Aminosäuren im variablen Loop 3 (V3) des Oberflächenproteins gp120 bedingt das Fehlen einer N-Glykosylierungsstelle (Polzer et al., 2002). Diese weniger stark glykosylierten X4-tropen Viren sind infektiöser, aber auch anfälliger für neutralisierende Antikörper. Daher werden sie von einem funktionierenden Immunsystem weitestgehend unterdrückt und erhalten erst in der späten Phase der Infektion einen Selektionsvorteil gegenüber den langsamer replizierenden R5-tropen Viren. Darüber hinaus induzieren die X4-tropen Viren *in vitro* die Bildung von Syncytien, vielkernigen Zellfusionen, weshalb sie auch als SI-Stämme (Syncytien-induzierende Stämme im Gegensatz zu NSI-Stämmen, nicht-Syncytien-induzierende Stämme) bezeichnet werden.

CCR5 wird überwiegend auf aktivierten T-Zellen und Makrophagen exprimiert, während CXCR4 auf ruhenden oder inaktivierten Immunzellen zu finden ist. Durch den Wechsel im Korezeptortropismus nutzt die Viruspopulation ein breiteres Angebot an Zielzellen.

Sowohl in der primären, als auch in der späten Phase der Infektion kann man von einem direkten virusinduzierten T-Zelltod ausgehen. Die Mechanismen, die zum langsamen Abfall der $CD4^+$ Zellen während der chronischen Phase führen, scheinen eher indirekt zu sein und sind bisher nicht geklärt.

1.2 HIV-1 Genomstruktur

HIV wird der Familie der Lentiviren zugeordnet, die zur Gruppe der Retroviren gehören (van Regenmortel et al., 2000). Diese Gruppe ist durch ein Positiv-RNA-Genom, ein Nukleokapsid und ein Kapsid, umgeben von einer Lipidhülle mit eingelagertem Oberflächen-Transmembranprotein-Komplex, gekennzeichnet. Namensgeber für diese Virusfamilie ist die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die Umschreibung des viralen RNA-Genoms in das provirale DNA-Genom katalysiert (Übersicht siehe Gonda, 1988, Turner und Summers 1999).

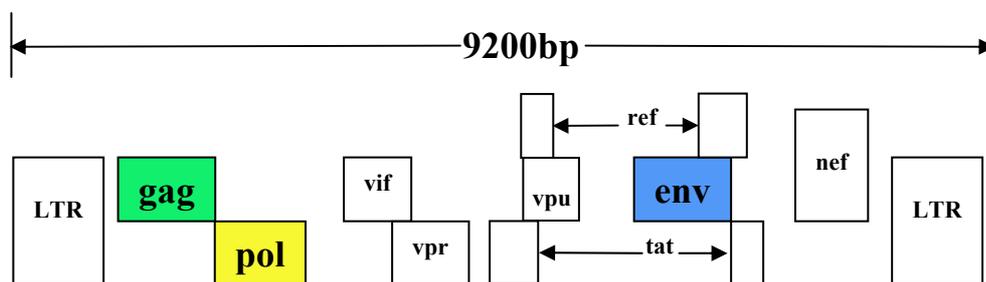


Abb.3: Schema der Genomstruktur von HIV-1. Die Gene für die Strukturproteine *gag* (grün) und *env* (blau), sowie die viral kodierte Enzyme *pol* (gelb) sind farbig hervorgehoben. Flankierend sind die 5'LTR und die 3'LTR, die erst bei der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms in das provirale DNA-Genom generiert werden, eingezeichnet. Die regulatorische und akzessorischen Gene *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* und *vpu* sind weiß dargestellt (AIDS-Pathway: <http://medstat.med.utah.edu/WebPath/Tutorial/AIDS.html#1>).

Das Genom aller Retroviren enthält die kodierenden Sequenzen für das gruppenspezifische Antigen (*gag*), für die viral kodierte Enzyme Reverse Transkriptase/Polymerase und Integrase (*pol*) und für die Oberflächen- und Transmembranhüllproteine (*env*). Im proviralen Genom werden diese Gene von 5' und 3'-*long terminal repeats* (LTR) flankiert, die als

Promotoren und Transkriptionenhancer fungieren. Darüber hinaus beinhalten die Genome einiger Retroviren virale Onkogene, wie das *src*-Gen des Rous-Sarkom-Virus (Wang et al., 1987), ein ursprünglich zelluläres Protoonkogen, oder regulatorische Gene.

Im Vergleich zu anderen Retroviren ist das Genom von HIV-1 und anderen Lentiviren komplexer aufgebaut. Neben den Genen für Strukturproteine und viral kodierte Enzyme (*gag*, *pol*, *env*) sind im HIV-1-Genom die regulatorischen und akzessorischen Gene *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* und *vpu* vorhanden (Abb.3).

1.3 Struktur und Funktion der HIV-1-Proteine

1.3.1 Die gruppenspezifischen Antigene

Das HIV *gag*-Gen kodiert ein 55kD schweres Polyprotein (Abb.4, Übersicht siehe Turner und Summers, 1999). Dieses Polyprotein (Gag) wird durch die viral kodierte Protease während der Partikelreifung in ein 17kD Matrixprotein (MA), ein 24kD Kapsidprotein (CA), ein 7kD Nukleokapsidprotein (NC), das 6kD schwere p6 und zwei niedermolekulare Spacerpeptide p1 und p2 gespalten (Wieggers et al., 1998). Das Matrixprotein bildet trimere Aggregate, die als fundamentale Baueinheit der Matrix fungieren. Diese Trimere interagieren über den myristoylierten N-Terminus mit der angrenzenden Lipidmembran (Nermut und Thomas, 1994). Auch in Abwesenheit anderer viraler Proteine können die Matrixproteine virusähnliche Partikel bilden, wobei zwischen 1200 und 2000 Gag-Kopien an einem unreifen Partikel beteiligt sind (Gheysen et al., 1989). Das Kapsidprotein bildet eine konische, elektronendichte Struktur im Zentrum des reifen Viruspartikels und umschließt das in zwei Kopien vorliegende RNA-Genom, die Nukleokapsidproteine und die viralen Enzyme. Das Nukleokapsidprotein bildet gemeinsam mit der viralen RNA einen Ribonukleo-Proteinkomplex, unterstützt das Verpacken der RNA und der t-RNA_{Lys}-Primer (De Rocguigny et al., 1992, Gorelik et al., 1993) in die neu gebildeten Viruspartikel und initiiert die Reverse Transkription durch die Anlagerung dieser Primer an das virale Genom. Darüber hinaus stabilisieren sie die provirale DNA und unterstützen die Partikelbildung. P6 ist essentiell für die Knospung der Viruspartikel von der Zelloberfläche und interagiert dazu mit zellulären Komponenten des vakuolären Protein-Sortierungs-Apparates (VPS) (Strack et al., 2003). Ist hier die hoch konservierte L-Domäne (*late*) mit dem Motiv P-T/S-A-P am N-terminus mutiert, so wird die Partikelfreisetzung dramatisch reduziert.

1.3.2 Die viral kodierten Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase

Die *pol*-kodierten Enzyme werden durch eine Leserahmenverschiebung während der p55-Gag-Polyprotein-Translation als 160kD großes Gag-Pol-Polyprotein generiert und erst während der Virusreifung, also kurz nach der Knospung (*budding*), durch eine sequentiell ablaufende Proteolyse als individuelle Enzyme freigesetzt.

Die Protease (PR) bildet ähnlich wie anderen Aspartyl-Proteasen aus der Pepsin-Familie symmetrische Homodimere. Nach der Knospung der unreifen Viruspartikel von der Zelloberfläche, spaltet die Protease das Gag-Pol-Polyprotein in die strukturellen Gag-Untereinheiten und die funktionalen Enzyme (siehe 1.4.1).

Die Reverse Transkriptase (RT) katalysiert die Umschreibung der viralen RNA in die provirale DNA. Diese Reaktion findet unter Beteiligung von Matrixproteinen, Nukleokapsidproteinen und Nef (negativer Faktor) im Cytosol kurz nach dem Eintritt des Virus in die Zielzelle statt. Reverse Transkriptase-Hemmer (z.B. AZT, ddI, ddC) und

Proteasehemmer werden in Kombination in den meisten HAART (*highly active anti retroviral therapy*) eingesetzt.

Die Integrase (IN) ist Bestandteil des Präintegrationskomplexes. Sie erkennt und schneidet die 5' und 3' LTR (*long terminal repeats*) der neu synthetisierten viralen DNA-Duplex zwei oder drei Basen von den 3' Enden. Über diese Enden wird die provirale DNA in die Wirts-DNA ligiert, präferentiell an Stellen an denen die genomische DNA geknickt ist. Die so entstehenden freien 3' Enden der zellulären DNA werden im Anschluss aufgefüllt und die provirale DNA wird kovalent integriert.

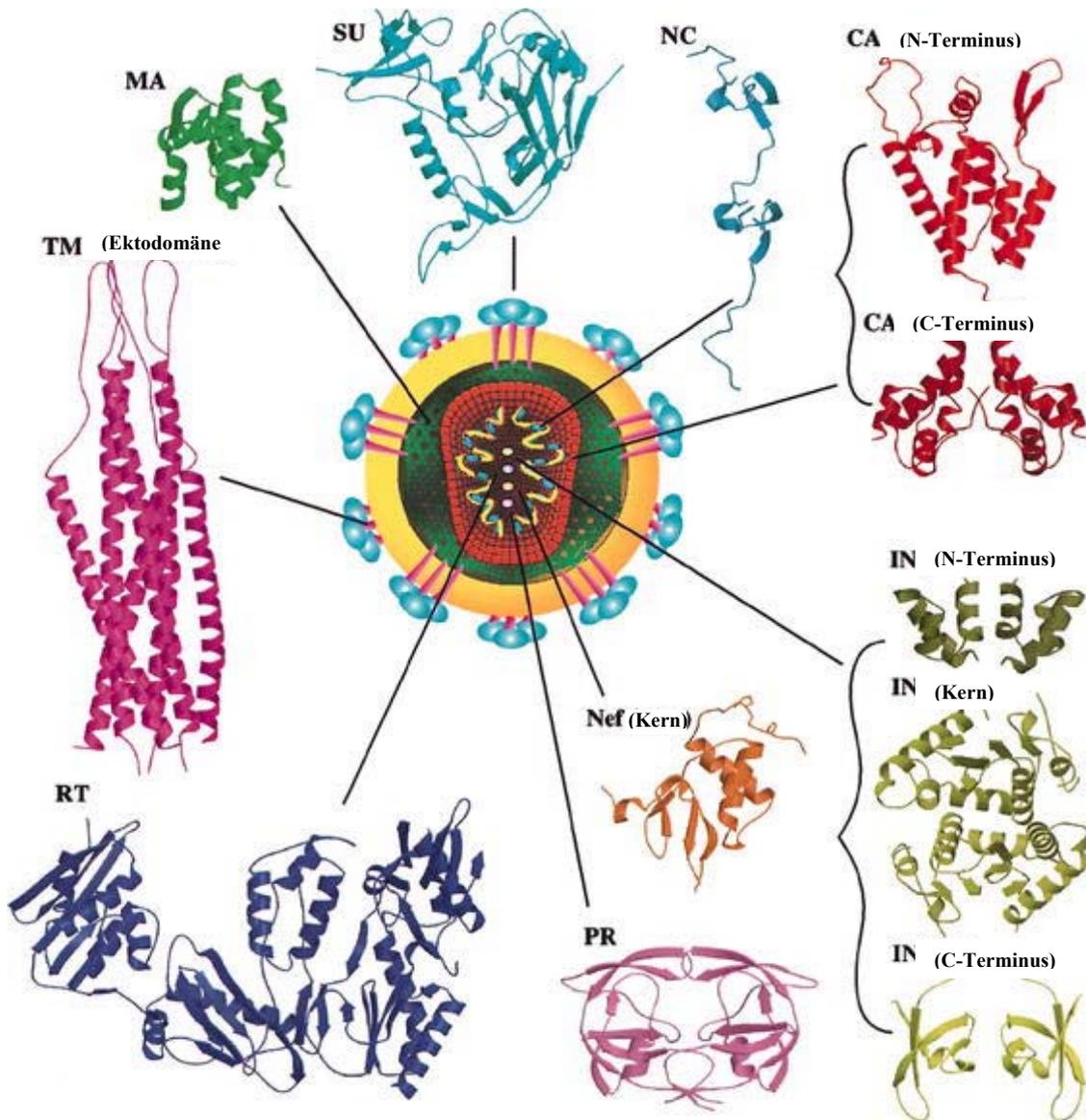


Abb.4: Übersicht über die Proteine von HIV-1. Die Proteine sind maßstabsgerecht dargestellt (Turner und Summers, 1999). MA (Matrix-Protein, p17), SU (Oberflächenhüllprotein, gp120), NC (Nucleokapsid-Protein, p7), CA (Capsid-Protein, p24), IN (Integrase), PR, (Protease), (Nef (negativer Faktor), RT (Polymerase/Reverse Transkriptase), TM (Transmembranhüllprotein, gp41, hier nur die Ektodomäne).

1.3.3 Der Oberflächen-Transmembran-Komplex

Die Infektion einer Zielzelle durch HIV wird über die Interaktion des Oberflächenhüllprotein gp120 mit dem Primärrezeptor CD4 und dem Korezeptor (CCR5 oder CXCR4) auf der Zelloberfläche initiiert. Das transmembrane Hüllprotein gp41 vermittelt im Anschluss die Annäherung und Verschmelzung von Virus- und Zellmembran (siehe Kapitel 1.4.3 und Abb.7). Env (*envelope*) wird als 160kD großes Vorläuferprotein (gp160) im rauen ER exprimiert und Chaperon-unterstützt gefaltet. Die Trimerisierung des ungeschnittenen *Precursors* ist notwendig für den Transport aus dem ER in den Golgi-Apparat. Hier wird gp160 durch eine zelluläre Protease (Furin oder verwandte Proteasen) in das Oberflächenhüllprotein gp120 und das transmembrane Hüllprotein gp41 gespalten. Auf der Virusoberfläche liegen gp120 und gp41 als Komplex vor, bestehend aus drei gp120, die nicht kovalent mit drei darunter liegenden gp41 verbunden sind. Die Verankerung dieses trimeren Komplexes in der Virushülle erfolgt über den Transmembranbereich des gp41.

1.3.3.1 Das Oberflächenhüllprotein gp120

Das Oberflächenprotein gp120 (SU) untergliedert sich in eine äußere und eine innere Domäne verbunden durch ein viersträngiges β -*Bridging Sheet*. Die innere Domäne wird aus zwei α -Helices, einem fünfsträngigen β -Faltblatt und mehreren Schleifen gebildet. Die äußere Domäne bildet eine *Double-Barrel*-Struktur, wobei das eine *Barrel* aus einem sechssträngigen β -Faltblatt und einer α -Helix, das andere aus einem siebensträngigen, antiparallelen β -Faltblatt besteht. Der distale Bereich ist gekennzeichnet durch die exponierten, variablen Schleifen V1-V5, die durch Disulfidbrücken an ihrer Basis stabilisiert werden. Gp120 zählt zu den am stärksten glykosylierten Proteinen, die bekannt sind. Infolge von 24 bis 26 potentiellen Glykosylierungsstellen (Zhu et al., 2000) nehmen Polyglykane mehr als 50% der Gesamtmasse von gp120 ein (Leonard et al., 1990, Abb.5).

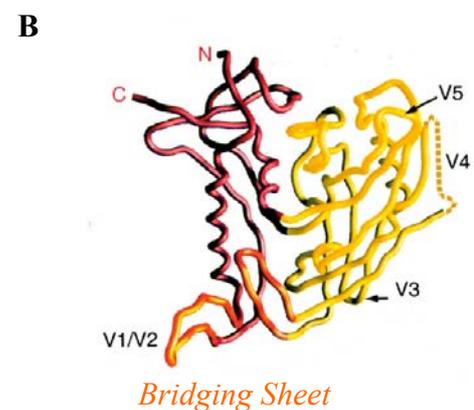
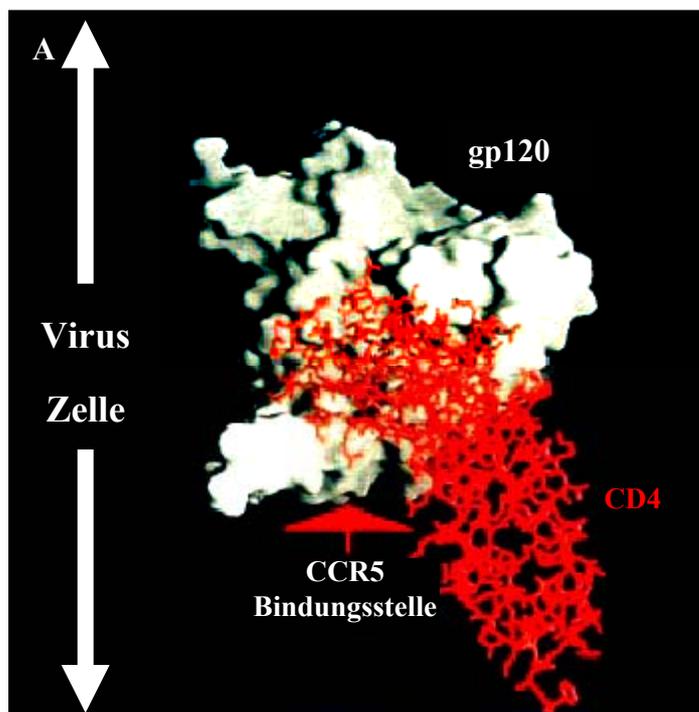


Abb.5: Struktur von HIV-1 gp120: A) Computermodell der Raumstruktur von gp120 (weiss) gebunden an CD4 (rot) (Clapham et al., 2002) B) Anordnung der variablen Schleifen V1-V5 im HIV-1-Oberflächenhüllprotein gp120. Die äußere Domäne ist gelb eingezeichnet, die innere Domäne ist rot, das *Bridging Sheet* orange (Wyatt et al., 1998).

Bei der Infektion einer Zielzelle vermittelt gp120 über den Kontakt zu zwei zellulären Rezeptoren die Bindung des Viruspartikels an die Zelloberfläche. Der primäre HIV-Rezeptor CD4 bindet an eine carbohydratefreie Tasche an der Schnittstelle von innerer Domäne, äußerer Domäne und *Bridging Sheet*.

Die Bindung einer gp120 Untereinheit innerhalb des trimeren Oberflächenkomplexes an CD4 bewirkt eine Konformationsänderung aller am Trimer beteiligter gp120-Moleküle (Salzwedel und Berger, 2000). Durch die Bindung an CD4 verschiebt sich der V2-Loop (Wyatt et al., 1995), was zur Exposition und Stabilisierung des *Bridging Sheets* und damit der Korezeptorbindungsstelle führt (Kwong et al., 1998). Gleichzeitig bewirkt die Bindung von gp120 an CD4 aber auch konformationelle Änderungen im C1 und C4/5-Bereich von gp120, der gp120-gp41-Interaktionsfläche (Moore et al., 1996).

1986 wurde bereits gezeigt, dass das HIV an die Oberfläche von CD4-exprimierende Mauszellen bindet, diese aber nicht infizieren kann (McDoughal et al., 1986). Nur durch die zusätzliche Expression eines der beiden HIV-Korezeptoren CXCR4 (Feng et al., 1996) oder CCR5 (Alkhatib et al., 1996) sind murine CD4⁺-Zellen infizierbar. Beide gehören zur Familie der Siebenhelix-Chemokinrezeptoren. Sequenzanalysen von X4-tropen und R5-tropen Viren zeigten vornehmlich Unterschiede in der V3 Schleife des gp120 (Hwang et al., 1991). R5-monotrope HIV-Stämme treten zu Beginn der HIV-Infektion auf und replizieren relativ langsam. X4-monotrope Viren bilden die vorherrschende Viruspopulation im Endstadium der Infektion und können aus etwa 50% aller Patienten im AIDS-Stadium isoliert werden (siehe Kapitel 1.2).

Die Interaktion von gp120 mit dem Korezeptor erfolgt nach dem CD4-induzierten Umfaltungsprozess über die variablen Schleifen V1-3 und Teile des Bridging sheets im gp120 und den N-Terminus (R5-trope Stämme) und die extrazelluläre Schleife E2 (R5-trope und X4-trope Stämme) des Chemokinrezeptors. Diese Interaktion leitet weitere, konformationelle Änderungen im gp120 ein, die zur Lockerung der nicht-kovalenten Gp120-gp41-Bindung führen. Dieser Vorgang kann bis zur Ablösung des gp120 von gp41 führen (*shedding*) und legt das bisher verdeckte transmembrane Hüllprotein gp41 frei.

1.3.3.2 Das transmembrane Hüllprotein gp41

Das transmembrane Hüllprotein gp41 (TM) vermittelt die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran. Die dafür notwendigen Regionen innerhalb des extraviralen Bereichs weisen strukturelle Homologien zu den transmembranen Hüllproteinen anderer Viren (z.B. Hämagglutinin 2 von Influenza und Masern, p15E von MuLV, FeLV und PERV, gp36 von SIV, Protein G von VSV) (Gallaher et al., 1989, Benit et al., 2001), aber auch zu dem heterotrimeren, löslichen N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor-Bindungsproteinrezeptor (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*, SNARE) (Skehel und Wiley, 1998), der an der Fusion von präsynaptischen Vesikeln mit der präsynaptischen Zellmembranen in Neuronen beteiligt ist, auf.

Gp41 lässt sich in drei Bereiche untergliedern, den N-terminal angeordneten, extraviralen Bereich (Ektodomäne), den transmembranen Bereich und den C-terminal gelegenen intraviralen Bereich (cytoplasmatischer Teil) (Abb. 6C). Die Ektodomäne untergliedert sich in das Fusionspeptid, die N-terminale Helixregion mit der immunsuppressiven Domäne (Denner et al., 1994), die immunodominante Schleife (oder Cystein-Loop), die C-terminale Helixregion und einen membranproximalen, tryptophanreichen Abschnitt (von N-Terminus zum C-Terminus). Das Fusionspeptid dient bei der Infektion einer Zielzelle als hydrophober Anker und dringt mit den N-terminalen 20-30 Aminosäuren in die Lipidmembran ein (Freed et al., 1990; Pereira et al., 1997). So werden Virus und Zielzelle miteinander arretiert. In der kompakten, proteaseunempfindlichen und entropisch günstigen Sechshelix-Konformation

bilden die drei N-terminalen Helices eine trimere *Coiled-Coil*-Struktur, die durch hydrophobe Wechselwirkungen von konservierten Aminosäuren an den Positionen a und d der Helix stabilisiert wird (siehe Abb. 6B)(Weissenhorn et al., 1997).

In die außen verlaufenden Furchen, gebildet aus je zwei N-terminalen Helices, lagern sich die drei C-terminalen Helices antiparallel ein. Dabei interagieren die Aminosäuren der Positionen a und d der C-Helix mit den Positionen e und g zweier benachbarter N-Helices (Abb.6). Die zwischen den beiden Helices gelegene, Disulfid-Brücken-stabilisierte Schleife wird von den Seren der meisten HIV-1-Infizierten erkannt, daher die Bezeichnung „immundominante Schleife“. In Membran-Modellsystemen interagiert dieser Abschnitt mit der Lipidphase (Santos et al., 1998). Am C-terminalen Ende der N-Helix liegt die immunsuppressive Domäne (ISU). Peptide die von dieser Domäne abgeleitet wurden induzieren *in vitro* die Proliferationshemmung von humanen Lymphozyten (Denner et al., 1994 und 1996) und modulieren die Cytokinproduktion (Denner et al.1998).

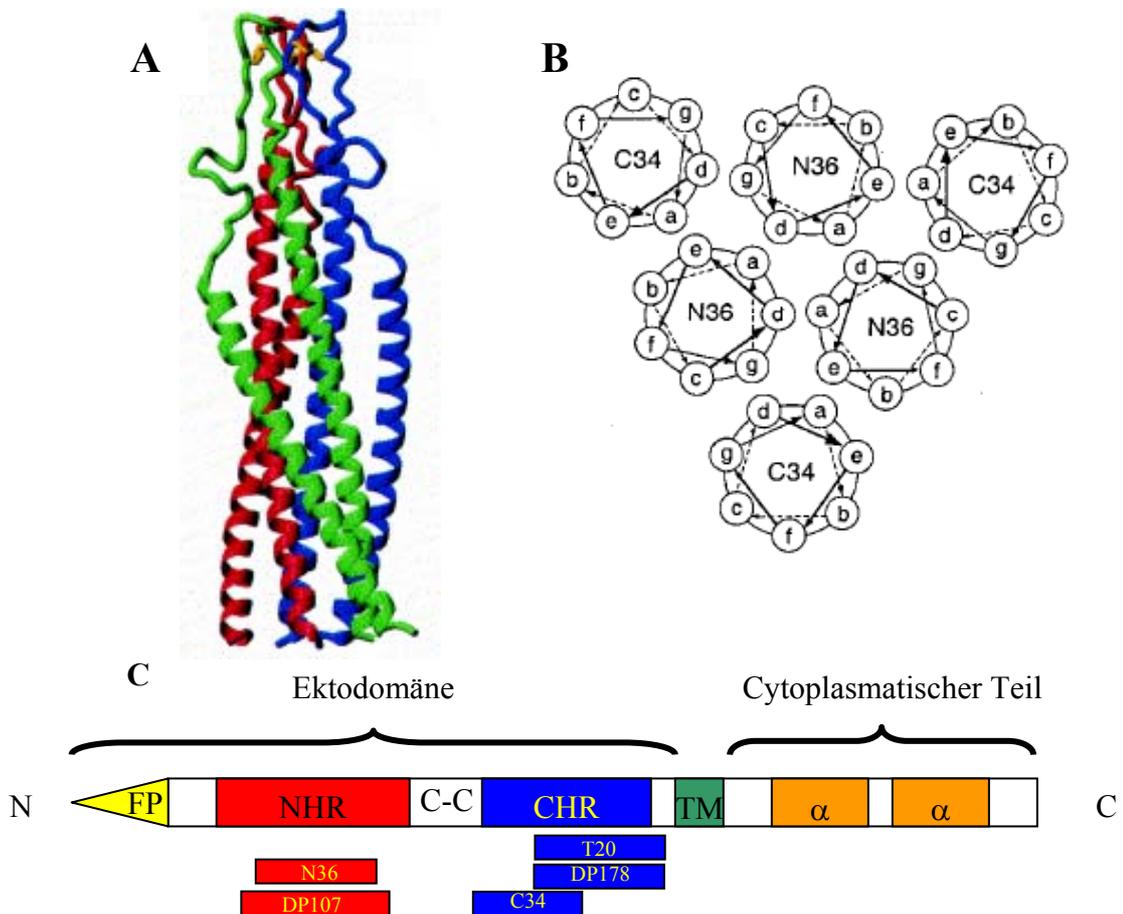


Abb.6. Die Struktur des transmembranen Hüllproteins gp41 von HIV-1: A) Coiled Coil-Struktur der Ektodomäne des gp41 Trimers. Die gp41-Monomere sind unterschiedlich eingefärbt, die Disulfidbrücken der immundominanten Schleife sind gelb hervorgehoben (Caffrey et al., 2001). B) Aufsicht auf die Sechshelix-Konformation, gebildet aus Peptiden, die von der N-terminalen Helixregion (N36) und C-terminalen Helixregion abgeleitet wurden (C34). Drei N36 bilden eine zentrale Coiled Coil-Struktur, um die sich drei C34 gruppieren (Markosyan et al. 2002). C) Schematische Darstellung des gesamten gp41 und der abgeleiteten Peptide (T20, DP178 C34, N36 und DP107). Die strukturellen und funktionalen Untereinheiten sind farblich hervorgehoben (FP: Fusionspeptid, NHR: N-terminale Helixregion, C-C: immundominante Schleife, CHR: C-terminale Helixregion, TM: Transmembranbereich, α: aliphatische α-Helix).

Proximal zum Membrandurchgang liegt ein α-helicaler, tryptophanreicher Abschnitt. Dieser stabilisiert den Transmembrandurchgang, interagiert mit der Lipiddoppelschicht des Virus (Schibli et al., 2001) und ist unerlässlich für die Infektiosität des Virus (Salzwedel et al., 1999). Aufgrund dieser strukturellen und funktionalen Eigenheiten erfordert die

Aminosäuresequenz der Ektodomäne von gp41 einen höheren Konservierungsgrad als die von gp120. Der 20 Aminosäuren lange Transmembranbereich von gp41 besteht überwiegend aus hydrophoben Aminosäuren und fixiert den trimeren Oberflächenkomplex in der Virushülle. Der N-terminal vom Transmembrandurchgang gelegene, tryptophanreiche Bereich fixiert den transmembranen Anteil zusätzlich in der Membran und bildet vermutlich eine α -helicale Sekundärstruktur, die mit der Lipidphase wechselwirkt (Schibli et al., 2001). Im Gegensatz zu anderen Retroviren besitzen die Transmembranproteine der Lentiviren einen relativ großen intraviralen Anteil (150AS bei HIV und SIV, <200AS bei Visna-Viren; 20-40 AS bei anderen Retroviren). Aus Versuchen mit Deletionsmutanten geht hervor, dass die Replikationsfähigkeit von HIV-1 dramatisch sinkt, sobald der cytoplasmatische Anteil auf 20 oder weniger Aminosäuren reduziert wird (Dubay et al., 1992, Freed und Martin, 1995).

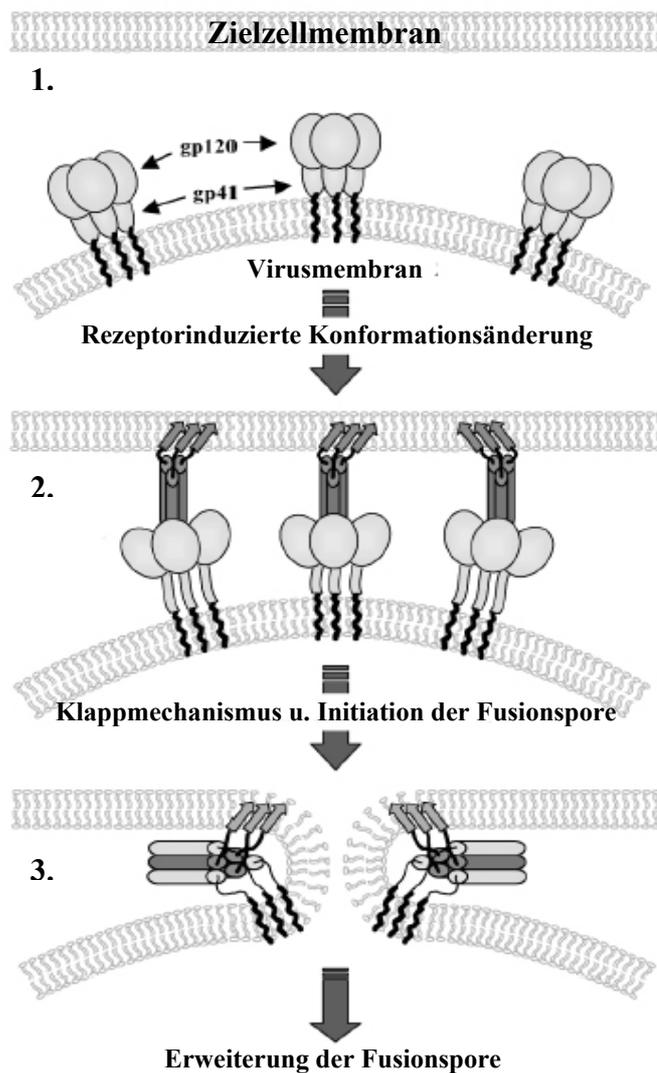


Abb.7: Faltungsvorgänge im HIV-1-Oberflächen-Transmembran-Komplex während der Anlagerung und der Membranfusion (Sackett et al., 2003):

1) Native Konformation des Oberflächen-Transmembran-Komplexes vor der Anlagerung an die zellulären Rezeptoren.
 2) Prä-Hairpin-Konformation: Die Bindung von gp120 an CD4 und Korezeptor führt zur Freilegung von gp41, das in mit dem N-terminalen Fusioszeptid (grauer Pfeil) in die Zielzellmembran eindringt.

3) Klappmechanismus: Durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den N- (dunkelgrau) und C-terminalen Helices (hellgrau) der Ektodomäne von gp41 werden Virus- und Zielzellmembran einander angenähert. Das führt zur Bildung einer Fusionspore. Nach der Membranfusion liegt gp41 als Sechshelices-Bündel auf der Zielzellmembran vor.

Der cytoplasmatische Anteil von HIV-1, HIV-2 und SIV enthält zwei amphipatische Helices, ein Motiv, dass auch in Calmodulin-aktivierten Enzymen anzufinden ist. Proximal zur Innenseite der Virusmembran ist ein konserviertes Endocytosesignal angeordnet (Y-X-P-L/V AS 721-724 des HXB2 Referenzgenoms). Die Endocytose von gp41 verringert vermutlich die Immunogenität von infizierten Zellen (Hunter, 1997). Sobald p55 gag exprimiert wird, ist der Internalisierungsprozess von gp41 blockiert, so dass bei der Knospung von neu gebildeten Viren gp41 in die Virushülle integriert werden kann. Das transmembrane Hüllprotein gp41 ermöglicht HIV-1 nach der gp120-vermittelten Anlagerung in die Zielzelle einzudringen. Dieser Prozess erfordert zwei konformationelle Änderungen in der Struktur von gp41

(Abb.7). Im nativen Zustand liegt das transmembrane Hüllprotein nahezu vollständig abgeschirmt unter dem Oberflächenprotein gp120. Welche Konformation es zu diesem Zeitpunkt einnimmt ist unklar. Aufgrund der strukturellen und funktionalen Ähnlichkeiten zum Hämagglutinin 2 von Influenza kann aber davon ausgegangen werden, dass es sich um eine metastabile Konformation handelt, die durch das darüber liegende gp120 stabilisiert wird (Kwong et al., 2000). Die Bindung von gp120 an CD4 und Korezeptor schwächt die nicht kovalente Interaktion zwischen gp120 und gp41, so dass das transmembrane Hüllprotein freigelegt wird. Dieser Prozess nimmt weniger als eine Minute in Anspruch (Jones et al., 1998). Bei X4-tropen Viren kommt es häufig zur vollständigen Ablösung von gp120 (Moore et al., 1990; Moore et al., 1993; O'Brien et al., 1994). Das gp41-Trimer liegt nun in einer Präfusionskonformation vor, in der die gp41-Monomere eine gestreckte Form besitzen und das N-terminal gelegene, hydrophobe Fusionspeptid in die Zielzellmembran eindringt. Inhibitionskinetiken mit C-Peptid-Fusionshemmern, Peptide die von der C-terminalen Helix der gp41-Ektodomäne abgeleitet sind und den Fusionsprozess durch Interaktion mit den N-terminalen Helices blockieren, haben gezeigt, dass dieses transiente gp41-Intermediat für etwa 15min besteht. Der gesamte Fusionsprozess nimmt bei 37°C etwa 19min in Anspruch. (gezeigt für SIV gp41, Raviv et al., 2002). Diese Inhibitionsversuche mit Fusionshemmern haben ebenfalls gezeigt, dass die offene, für Fusionshemmer zugängliche Konformation erst nach Bindung von CD4 und Korezeptor zustande kommt (Furuta et al., 1998). Für Fusionshemmer, die die C-terminale Helix binden (z.B. 5-helix), konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie erst nach der CD4/Korezeptor-induzierten Konformationsänderung im gp120 an gp41 binden können, d.h. die C-terminale Helix liegt in der Präfusionskonformation ebenfalls zugänglich vor (Sattentau et al., 1995a, Nyambi et al., 2000, Koshiba et al., 2002). Durch hydrophobe Wechselwirkungen lagert sich die C-terminale Helix wie ein Reisverschluß in die Furche, die aus zwei N-Helices im Trimer gebildet wird. Bei diesem Vorgang wird die C-terminale Helix komprimiert und die über den Transmembranteil fixierte Virusmembran der Zielzellmembran angenähert. Der eigentliche Fusionsprozess von Virus- und Zielzellmembran ist nicht vollständig verstanden. Ein mögliches Konzept bietet das „*Stalk-pore*“-Paradigma. Es geht davon aus, dass der Fusionsprozess in zwei Stufen stattfindet. Zunächst verschmelzen die in Kontakt stehenden, *cis*-Monolayer der Lipidmembran, während die distalen *trans*-Monolayer intakt bleiben. Dieser Membranzustand wird als Hemifusions-Diaphragma bezeichnet. Durch den Bruch der *trans*-Monolayer entsteht die vollständige Fusionspore. Die Energie, die notwendig ist, die Membranpore zu öffnen und zu stabilisieren wird während der Faltung des gp41 in dessen Struktur eingebracht und durch gp120 stabilisiert (Gallo et al., 2003).

1.3.4 Die regulatorischen Proteine

Der HIV-1 negative Faktor (Nef) gehört zu den früh exprimierten, viralen Proteinen und liegt bereits kurz nach der Infektion in großen Mengen im Cytosol vor. Dieses 27kD-Protein steigert die virale Replikation und reguliert die Expression von CD4-Molekülen auf der Wirtszelloberfläche durch Endocytose herunter, indem es an den AP-2 Adapterkomplex bindet und so die Bildung von Clathrinen fördert. Die Reduktion von Oberflächen-CD4 verhindert eine Komplexierung von neu gebildetem Env mit diesem Rezeptor, was zu einer gesteigerten Env-Inkorporation in die Virushülle führt und unterbindet gleichzeitig die Reinfektion der bereits infizierten Zelle durch knospende Viren. Darüber hinaus verringert Nef die Anzahl der MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II Moleküle auf der Oberfläche von infizierten Zellen und nimmt Einfluß auf die Expression von mehr als dreißig zellulären Proteinen.

Rev ist am sequenzspezifischen Transport der ungespleißten, viralen mRNA vom Nukleus in das Cytoplasma beteiligt. Dabei bindet es an die RRE-Zielsequenz (*Rev-response element*) im *env*-Gen und rekrutiert das Kernshuttleprotein Exportin-1 und den Kernexportfaktor Ran-Guanosin-Triphosphatase-GTP. Rev wirkt als Schalter zwischen der Transkription früher Gene (Synthese von hochgradig gespleißter mRNA (kodierend für Tat, Rev und Nef)) und der Transkription später Gene (Synthese ungespleißter mRNA (kodierend für Gag-Pol) bzw. einfach gespleißter mRNA (kodierend für Env, Vpu, Vif und Vpr)).

In der frühen Phase des HIV-1 Infektionszyklus wird die Transkription der proviralen DNA durch Unterdrückung der Elongationsphase terminiert. Tat bindet während der Transkription der proviralen DNA an das TAR (*trans-activating response element*) auf der neu entstehenden mRNA. Der so gebildete Tat-Cyclin-T-Komplex rekrutiert Cdk9 (*Cyclin dependent protein kinase 9*), die durch Phosphorylierung der RNA-Polymerase II die transkriptionelle Elongation stimuliert.

Vif ist an den frühen Schritten nach dem Eintritt des Virus in die Zelle beteiligt und liegt mit 7-100 Kopien pro Partikel vor. Es wird vermutet, dass es beim *Uncoating* und bei der Initiation der Reversen Transkription eine wichtige Rolle spielt. Dabei geht man davon aus, dass Vif den Proteasomen-abhängigen Abbau einer zellulären Deoxycytidin-Deaminase (APOBEC3G) bewirkt, was die Produktion infektiöser Viruspartikel in nichtpermissiven Zellen ermöglicht (Mehle et al., 2003).

Vpr leitet den Präintegrationskomplex in den Nukleus indem es an den zellulären Kernimportkomplex (Importin- α und Nukleoporin) bindet und verankert darüber hinaus die Zelle im G2 Stadium des Zellzyklus.

Vpu bindet an CD4 im endoplasmatischen Retikulum (ER) und leitet damit dessen Abbau über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg ein. Damit wird das neu gebildete Env im ER vor der Komplexierung mit ebenfalls dort lokalisiertem CD4 geschützt.

1.4 HIV-1 Infektionszyklus

Der HIV-1 Infektionszyklus ist untergliedert in eine frühe Phase, in der die Zielzellerkennung durch das reife Virus, der Eintritt in die Zielzelle und die Integration des proviralen Genoms in das Wirtszellgenom erfolgen, und eine späte Phase, in der die Expression der viralen Strukturproteine, der Zusammenbau der Viren und die Knospung von der Wirtszellmembran und die Partikelreifung stattfinden (Abb.8).

Die frühe Phase des Infektionszyklus beginnt mit der Bindung des reifen Viruspartikels über sein Oberflächenprotein gp120 an CD4 und den Korezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle. Dadurch wird das darunterliegende, transmembrane Hüllprotein gp41 freigelegt. Dieses dringt mit dem N-terminal angeordneten Fusionspeptid in die Wirtszellmembran ein und leitet über einen Klappmechanismus (Abb.7) die Fusion von Virus- und Wirtszellmembran ein. Durch die entstehende Fusionspore dringt das Virus in die Zelle ein. Der sich anschließende *Uncoating*-Prozess legt die virale RNA im Cytosol frei und ermöglicht der Reversen Transkriptase die Umschreibung in die virale DNA. An die neu synthetisierte DNA lagern sich die Komponenten des Präintegrationskomplexes (IN, MA, RT, Vpr und das zelluläre HMG-I(Y)) an und werden durch das Vpr in den Nukleus geleitet. Katalysiert durch die virale Integrase wird die virale DNA kovalent ins Wirtszellgenom integriert.

Die späte Phase beginnt mit der Transkription der akzessorischen Gene *tat*, *rev* und *nef*. Tat ermöglicht über die Cdk9 abhängige Phosphorylierung der RNA-Polymerase II die Elongation der mRNA bei der Transkription viraler Gene und Rev steuert den Export gespleißter und ungespleißter mRNA aus dem Zellkern. Der Env-Precursor gp160 wird von der gespleißten *env*-mRNA im ER translatiert. Posttranslationale Modifikationen, wie die hochgradige Glykosylierung und die Spaltung in das Oberflächenprotein gp120 und das

das gleiche Pathogen, so reagiert das angeborene Immunsystem stets mit der gleichen Geschwindigkeit und Intensität.

Das adaptive Immunsystem ist anpassungsfähiger und spezifischer als die angeborene Immunität und kann bei wiederholter Infektion des gleichen Pathogens schneller und effektiver reagieren als bei einer Erstinfektion. Diese Anpassungsfähigkeit basiert auf der klonalen Selektion einer bestmöglichen antigenspezifischen B- und T-Zellantwort, die mehrere Tage bis Wochen in Anspruch nimmt. HIV-1 besitzt verschiedene Möglichkeiten der angeborenen und der adaptiven (humoralen und zellulären) Immunantwort zu entgehen, bzw. die Mechanismen dieser für die Infektion und Replikation auszunutzen.

1.5.1 Das angeborene Immunsystem gegen HIV-1

Das angeborene Immunsystem nutzt ein breites Spektrum an zellulären Komponenten (z.B. dendritische B-1 Zellen, plasmacytoide, dendritische Zellen (PDCs) und nichtcytotoxische, antivirale CD8⁺ Zellen) und löslichen Faktoren (z.B. Cytokine (wie Typ1 Interferone), Chemokine, Defensine, Komplement, Collectine (Lektinbindende Proteine), Pentraxine und Cathelicidine) zur Abwehr von Pathogenen (Levy et al., 2003). Die Wirkung der löslichen Komponenten gegen HIV-1 kann direkt sein, wie bei Typ1 Interferonen (Bogdan et al., 2000) oder Komplement (Sullivan et al., 1996) oder indirekt wie bei Manose-bindenden Lektinen (MBL). Diese binden an das stark glykosylierte Oberflächenmolekül gp120 (siehe Kapitel 1.5.3.1) von HIV-1 und steigern so die Aufnahme der Viren durch Makrophagen. Niedrige MBL-Spiegel im Blut gehen einher mit einer höheren Chance für die Infektion mit HIV-1, einer schnelleren Progression zu AIDS und einer kürzeren Überlebensrate nach Diagnose von AIDS (Garred et al., 1997). Der infektionshemmende Einfluss von β -Chemokinen wie RANTES, MIP1- α und MIP1- β , die genau wie R5-trope HIV-1 Stämme an CCR5 binden, ist *in vitro* unbestritten (Berger et al., 1999). Ob eine gesteigerte Produktion dieser Chemokine zu einem günstigeren Krankheitsverlauf führt, ist allerdings unklar (Cocchi et al., 1995, Mackewicz et al., 1996). Sicher ist, dass Menschen mit einer 32-Basenpaar-Deletion im CCR5-Gen (CCR5 Δ 32) bei Heterozygotie mit HIV-1 deutlich schwerer infizierbar sind, bei Homozygotie praktisch resistent gegen eine HIV-1-Infektion sind (Liu et al., 1996, Samson et al., 1996).

Für die Abwehr von HIV-1 sind im Wesentlichen zwei Zelltypen des angeborenen Immunsystems von Bedeutung, PDCs und nichtcytotoxische, antivirale CD8⁺ Zellen. PDCs produzieren Typ1-Interferone (z.B. Interferon α). HIV-1-positive Patienten mit einer Interferon α -Konzentration von >300 U/ml im Blut zeigen weniger häufig opportunistische Infektion als solche mit einem geringeren Interferon α -Spiegel (Lopez et al., 1983, Siegal et al., 1986). Die antivirale Wirkung von nichtcytotoxischen CD8⁺ Zellen, basiert auf der Hemmung der retroviralen Transkription (für HIV-1 und -2 und SIV, aber auch für murine und aviäre Retroviren) (Copeland et al., 1995, Levy et al., 1996). Sie ist HLA-Typ unabhängig (Mackewicz et al., 1998) und wurde auch in HIV-exponierten aber uninfizierten Personen gefunden (Stranford et al., 1999). Vermittelt wird die antivirale Wirkung von nichtcytotoxischen CD8⁺ Zellen durch einen löslichen Faktor (CAF, *CD8⁺ cell anti-HIV-factor*) (Walker et al., 1989, Levy et al., 2003).

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

Die zelluläre Immunantwort bildet neben der humoralen Immunantwort den zweiten Bereich des adaptiven Immunsystems. Sie dient der Abwehr von intrazellulären und phagozytierten Erregern und erkennt und eliminiert zu Krebszellen transformierte Körperzellen. Die Vermittlung der zellulären Immunantwort erfolgt durch T-Lymphozyten, die in der Lage sind,

die Zielzellen zu lysieren (CTL, cytotoxische T-Lymphozyten) bzw. deren Apoptose, also den programmierten Zelltod, einzuleiten.

Im HIV-1-Infizierten ist die CTL-Immunantwort unerlässlich für die Kontrolle der Infektion. In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass eine starke CTL-Antwort zur verzögerten Progression der Infektion führt (Rinaldo et al., 1995, Harrer et al., 1996, Greenough et al., 1997) (z.T. sind 1% aller zirkulierenden T-Zellen im Patienten HIV-1 spezifische CTLs (Altman et al., 1996), ohne allerdings jemals zu einer Klärung des Virus aus dem Patienten zu führen. In einigen HIV-1 exponierten, aber uninfizierten Personen, führt eine HIV-1 spezifische CTL-Antwort jedoch zu einem gewissen Schutz gegenüber der Infektion durch HIV-1 (Goh et al., 1998). Die hohe genetische Variabilität von HIV-1 (siehe Kapitel 1.6) ermöglicht allerdings jederzeit die Bildung von Fluchtmutanten mit Resistenzen gegenüber einer CTL- oder Antikörperantwort (Peeters und Sharp, 2000)

1.5.3 Die B-Zell-vermittelte adaptive Immunantwort gegen HIV-1

Die B-Zell-vermittelte, humorale Immunantwort schützt den extrazellulären Bereich des Wirtsorganismus vor Erregern und sezernierten Toxinen. Diese werden von Immunglobulinen spezifisch gebunden, was entweder zur gesteigerten Aufnahme und Präsentation von Erreger-Antigenen durch Makrophagen, zur Opsonisierung des Erregers/Toxins oder zur direkten Neutralisation eines Erregers durch Blockierung von Proteinen, die für die Infektion relevant sind, führt. Antikörper können auch infizierte Zellen erkennen und eine antikörperabhängige, cytotoxische (ADCC, *antibody dependend cytotoxicity*) Reaktion auslösen. Für die Abwehr einer viralen Infektion ist besonders der Titer an virusneutralisierenden Antikörper von Interesse. Diese Antikörper binden hoch avid an Strukturen, die für den Infektionsweg des Pathogens essentiell sind. Bei HIV-1 sind das, wie bei allen Retroviren, die Proteine des Oberflächen-Transmembran-Komplexes gp120 und gp41. In HIV-1 positiven Patienten ist der Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen die im Körper dominierende Quasispezies von HIV-1 im Regelfall nicht ausreichend für die Kontrolle der Infektion (Ruppach et al., 2000). Das liegt zum einen an der geringen Antigenität des Oberflächenhüllkomplexes (Wei et al., 2003), zum anderen an der hohen genetischen Variabilität von HIV-1. Wie alle Viren mit RNA-Genom, ist HIV-1 in seiner Replikation abhängig von der RNA-Polymerase. Diese weist eine deutlich höhere Fehlerrate bei der matrizenabhängigen Synthese von neuer RNA auf (10^{-4}), als die DNA-Polymerase bei der matrizenabhängigen Synthese neuer DNA (10^{-6} - 10^{-7}) (Preston et al., 1988, Roberts et al., 1988, Levine, et al, 1991). Zum anderen kann HIV durch das in zwei Kopien vorliegende Genom nach der Doppelinfektion einer Zelle durch HIV-1 unterschiedlicher Quasispezies sehr effizient rekombinieren. Diese genetische Variabilität führt zur raschen Bildung von Fluchtmutanten gegenüber jeglichem Selektionsdruck, von Seiten des Immunsystems oder medikamentöser Behandlung (Übersichtsartikel von Evans und Desrosiers, 2001, Kijak et al., 2002, Kwong et al., 2002, Wei et al., 2003). Die wenigen konservierten Strukturen sind das Ziel von neuen Therapien und Impfstoffkonzepten.

1.5.4 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen die HIV-1 Hüllproteine

Trotz einer mehr als 20-jährigen Erfahrung in der HIV-1-Vakzin-Entwicklung ist es bisher nicht gelungen, potente neutralisierende Antikörper im Tiermodell und klinischen Tests gegen ein breites Spektrum von Virusisolaten unterschiedlicher Subtypen zu induzieren. Auch im HIV-1-infizierten Patienten sind Antikörper mit einem breiten Neutralisationsspektrum unterrepräsentiert (Trkola et al., 1995), aber verschiedene Studien weisen darauf hin, dass

hohe Titer von neutralisierenden Antikörpern im Serum der Patienten eine Verzögerung der HIV-Pathogenese unterstützen (Reitz et al., 1988, Nara et al., 1990, Watkins et al., 1996, Parren et al., 1999, Dianzani et al., 2002).

Bis heute sind nur drei monokonale, neutralisierende Antikörper aus HIV-1-positiven Patienten isoliert worden, die diese Anforderungen erfüllen. Zwei davon, IgG1 2G12 und IgG1b12, binden an gp120, der dritte, IgG1 2F5, an die Ektodomäne von gp41. Darüber hinaus wurden mehrere Antikörper mit einem weniger breiten, aber immer noch Subtyp-übergreifenden Neutralisierungspotential beschrieben (Fab-Fragment X5, IgG447-52D und 17b gegen gp120 und 4E10 und Z13 gegen gp41).

1.5.4.1 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp120

2G12

Der monoklonale Antikörper (IgG1) 2G12 zählt neben IgG1b12 sowie 2F5 und 4E10 zu den wenigen bekannten Antikörpern mit einem breiten Neutralisationsspektrum gegenüber HIV-1 Primärisolaten und laboradaptierten Stämmen verschiedener Subtypen (TCID₅₀: 0,1-50µg/ml) (Trkola, et al, 1995). Er bindet an ein Epitop in der C4/V4 Region von gp120, das mehrere N-Glykosylierungen aufweist. Für die Bindung von 2G12 müssen α -1→2 Mannose-Reste an Position N295, N332 und N392 vorhanden sein (Scanlan et al., 2002).

2G12 weist Besonderheiten in der variablen Region der schweren Kette auf. Das D(H)-Segment des 2G12 Gens ist mit 32 Nukleotiden relativ lang und zeigt Sequenzhomologien zu Genabschnitten zwischen D3-22 und D4-23, sowie D1-26 und D7-27, die aufgrund fehlender Erkennungssignale bei der Rekombination der Genabschnitte für die variable Region nicht als D(H)-Segmente erkannt werden sollten. Kristallstrukturanalysen haben gezeigt, dass das IgG1 2G12 aufgrund von spezifischen Aminosäureaustauschen einen kleineren Winkel zwischen den V(H)-Regionen aufweist als andere IgGs. Darüber hinaus bindet er das Polyglycan-Epitop über variable Anteile von zwei schweren Ketten, nicht aber über die für IgGs übliche Bindungsstelle (Calarese et al., 2003). Aktuelle Modelle verweisen auf Analogien in der Bindung von Zuckerresten durch Lektine (z.B. DC-SIGN, siehe Kapitel 1.1).

Durch einen rekombinanten Isotypenwechsel von IgG zu IgM konnte die neutralisierende Wirkung von 2G12 und das Spektrum der neutralisierbaren Virusisolate deutlich gesteigert werden (Wolbank et al., 2003). 2G12 wurde in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 erfolgreich in eine klinischen Studie (Phase I) im Menschen getestet (Stiegler et al., 2002, Armbruster et al., 2002).

IgG1b12

Das Epitop von IgG1b12 überlappt mit der CD4-Rezeptorstelle des HIV-1-Oberflächenmoleküls gp120 (Burton et al., 1994). Damit kompetiert der Antikörper mit der Bindung an den Primärrezeptor CD4 und verhindert so die Anlagerung des Virus an die Zielzelle. Die Bindung erfolgt dabei über eine fingerartige, dritte hypervariable Schleife der schweren Kette, die mit einer Tryptophanseitenkette in eine hydrophobe Tasche der CD4-Rezeptorstelle eindringt (Zwick et al., 2003). IgG1b12 neutralisiert Isolate der Subtypen D und E, sowie einige ausgesuchte Isolate der Subtypen A, B, C und F (TCID₅₀: 0,017-200µg/ml) (Trkola et al., 1995, Moulard et al., 2002).

17b und Fab-Fragment X5

Der monoklonale Antikörper 17b und das Fab-Fragment X5 binden an Epitope, die mit der Korezeptorbindungsstelle überlappen. Der 17b-produzierende B-Zellklon wurde aus einem

HIV-positiven Patienten isoliert (Thali et al., 1993). Das Fab-Fragment X5 wurde über eine Phagen-Bank aus einem HIV-positiven Patienten mit relativ hohen neutralisierenden Antikörpertitern im Serum isoliert. X5 bindet genau wie der monoklonale Antikörper 17b an ein Epitop, das mit der Korezeptorbindungsstelle überlappt. Dieses Epitop wird ähnlich wie das des monoklonalen Antikörpers 17b erst nach der Bindung von gp120 an CD4 freigelegt. Das Neutralisationsspektrum von X5 umfasst Primärisolate der Subtypen A, B, C, D, E, F und G mit einer TCID₅₀ zwischen 0,29 und 125µg/ml (Moulard et al., 2002).

1.5.4.2 Neutralisierende monoklonale Antikörper gegen gp41

2F5

Die HIV-1-neutralisierende Wirkung des monoklonalen Antikörpers 2F5 wurde erstmals 1993 beschrieben (Muster et al., 1993). Er wird in einer Hybridoma-Zelllinie exprimiert, die durch die Verschmelzung von B-Lymphozyten eines HIV-positiven Spenders mit einer humanen Krebszelllinie entstand (Buchacher et al., 1994). Das 2F5 kodierende Gen weist genau wie das 2G12 kodierende Gen eine Besonderheit im D(H)-Segment für die schwere Immunglobulin-Kette auf (Kunert et al., 1998). Dieser Genabschnitt ist bei 2F5 mit 52 Nukleotiden ungewöhnlich lang und zeigt eine untypische Rekombination im D(H)-Segment. Eine solche Rekombination wurde bisher nicht beschrieben und erklärt die relativ lange CDR3-Schleife (22AS) des Immunglobulins 2F5.

2F5 gehört zu den vier bekannten monoklonalen Antikörpern, die ein Subtyp-übergreifendes Neutralisationsspektrum gegenüber laboradaptierten und Primärstämmen der Gruppe M aufweisen und *in vitro* bereits in relativ niedrigen Konzentrationen (TCID₅₀<1µg/ml, abhängig vom Subtyp) virusneutralisierend wirken (Conley et al., 1994, Muster et al., 1994, Purtscher et al., 1994, Trkola et al., 1995, Purtscher et al., 1996). 2F5 bindet an die lineare Sequenz ELDKWA (AS 662-667, HIV-Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner et al., 1985) wobei die zentralen drei bis vier Aminosäuren (L)DKW für die Bindung und Neutralisation unerlässlich sind (Muster et al., 1993, McGaughey et al., 2003). Virusstämme, die hier eine Aminosäuresubstitution aufweisen, z.B. Isolate aus der Gruppe O, werden gar nicht oder nur bei sehr hohen Konzentrationen von 2F5 *in vitro* neutralisiert (Trkola et al., 1995, Parren et al., 1998). In Kombination mit anderen HIV-1-neutralisierenden Antikörpern konnte eine synergistisch gesteigerte Hemmwirkung *in vitro* gezeigt werden (Li et al., 1997, Mascola et al., 1997, Zwick et al., 2001, Kitabwalla et al., 2003). Das 2F5-Epitop liegt am C-terminalen Ende der Ektodomäne von gp41, im Übergang von der C-terminalen Helix zum tryptophanreichen Abschnitt, kurz vor dem Transmembrandurchgang. Dieser Bereich von gp41 ist innerhalb der Subtypen der Gruppe M stark konserviert (siehe Anhang I, Zwick et al., 2001), wodurch das breite Neutralisationsspektrum von 2F5 zu erklären ist.

Das neutralisierende Potential von 2F5 wird durch *in vivo* Studien unterstrichen. Die passive Immunisierung mit 2F5, also die Applikation von extern produzierten, neutralisierenden Antikörpern, ohne Induktion einer adaptiven B-Zell-Antwort, von SHIV-infizierten, schwangeren Makaken-Weibchen verhinderte eine Mutter-Kind-Übertragung. Die passive Immunisierung von neugeborenen Makaken mit einer Kombination aus mehreren neutralisierenden Antikörpern, die an den Oberflächen-Transmembrankomplex binden, blockiert den oralen Infektionsweg über die Muttermilch SHIV-infizierter Tiere (Chen et al., 2001, Hofmann-Lehmann et al., 2001, Mascola et al., 2002, Xu et al., 2002, Ruprecht et al., 2003). Sogar in HIV-positiven Patienten konnte durch die Injektion hoher Dosen verschiedener neutralisierender Antikörper die Viruslast deutlich abgesenkt werden, zum Teil unter die Nachweisgrenze (Stiegler et al., 2002, Armbruster et al., 2002).

Trotz der vielversprechenden Erfolge der *in vitro* und *in vivo* Studien ist es bisher nicht gelungen, gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41, in dem das von

2F5 gebundene Epitop liegt, neutralisierende Antikörper mit einem breiten Neutralisationspektrum zu induzieren. Sowohl Immunisierungsversuche mit kurzen Peptidvakzinen, als auch mit längeren, rekombinanten Proteinkonstrukten oder rekombinanten Viren, die alle als Träger für die ELDKWA-Sequenz dienten, induzierten lediglich bindende Antikörper ohne subtypübergreifende Neutralisationswirkung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der rekombinanten Peptid-, Protein- und Viruskonstrukte zur Induktion neutralisierender Antikörper gegen das Epitop von 2F5:

Antigen	HIV-Sequenzen	Tiermodell	Induktion bindender/neutral. Antikörper	Literatur
Rekombinantes Hepatitis-A-Virus, HIV-Sequenz eingefügt in 2A	ELDKWAS	-	+ / k.A.	Beneduce et al., 2002
Rekombinantes PVX (potato virus X) mit HIV Sequenz am N-Terminus des Coat Protein	ELDKWA	hu-PBL-SCID-Mäuse	+ /+ (Seren inhibieren die Syncytienbildung von C8166 nach Infektion mit HIV-1 IIIB)	Marusic et al., 2001
Rekombinantes Hepatitis-B-Oberflächenantigen in 22nm Lipoproteinpartikeln	ELDKWA	BALB/c-Mäuse	+ / -	Eckhart et al., 1996
Rekombinantes Influenza Hämagglutinin generiert mit einem Baculo-Oberflächenexpressionssystem	ELDKWAS	-	+ / k.A.	Ernst et al., 1998 Ferko et al., 1998
Baculovirus <i>Autographa californica</i> gp64	ELDKWA	-	+ / k.A.	Spenger et al., 2002
Peptid-Vakzine ELDKWA, ELEKWA, ELNKWA, ELDEWA	- [C-(ELNKWAG) ₄] - CGELNKWAGELDKWA - CGELNKWAGELNKWA - CGELEKWAGELEKWA - CGELDEWAGELDEWA - CTSLHSLIEEQNQEK-NEGELLELDKWA -CKNELELLELNKWASLWN -CQEKNVKALLELDEWASLWN -CKNEQWLLELEKWASLWN -SQNQEKNEQELLELDKVASLWNWFNITC	BALB/c-Mäuse	+ / k.A.	Liao et al., 2000 Xiao et al., 2000a Xiao et al., 2000b Xiao et al., 2000c Xiao et al., 2000d Dong et al., 2001 Huang et al., 2002

Antigen	HIV-Sequenzen	Tiermodell	Induktion bindender/neutral. Antikörper	Literatur
Multi-Epitop-Vakzine	CG-(ELDKWAGPGRAFY) ₂ -K CGGPGRAFYEYLDKWAGRI LAVERYLKD	BALB/c-Mäuse	+ / k.A.	Lu et al., 2000 Tian et al., 2001a , 2001b
Modifiziertes DP178 (Modifikationen steigern die α -Helikalität und damit die Affinität zu 2F5)	-HLENEVARLKKLVGGEYTS- SLIHSLIEESQNQQEKNE- QELLELDKWASLWNWF -VARLKKLVGGEYTSLIHS- LIEESQNQQEKNEQELLE- LDKWASLWNWF -WMEWDREINNYTSLIHS- LIEESQNQQEKNEQELLE- LDKWASLWNWF -YTSLIHSLIEESQNQQEK- NEQELLELDKWASLWN- WF -LESLIESLKEEIEENLKEKI- EQLKLELDKWASLWMW- F	Meerschweinchen	+ / -	Joyce et al., 2002
Peptide, zyklisiert über eine Lactambrücke	ELLELDKWASLWN	Meerschweinchen	+ / -	Mc Gaughey et al., 2003
Rekombinantes E. coli, MalE	ELDKWAS LLELDKWASL Und multimere Varianten davon	BALB/c-Mäuse C3H/He-Mäuse C57BL/6-Mäuse DBA/1-Mäuse	+ / -	Coëffier et al., 2001
Anti-idiotypischer Antikörper Ab2/3H6, der gegen das Fab-Fragment von 2F5 gerichtet ist	-	BALB/c-Mäuse	+ / 2 von 3 Mäusen produzieren nach Immunisierung mit Ab2/3H6 neutralisierende Seren gegen den Laborstamm RF _{NT} .	Kunert et al., 2002
Anti-HLA(DR)-Antikörper mit rekombinant eingefügter HIV-Sequenz an unterschiedlichen Positionen	ELDKWAS		+ / k.A.	Ho et al., 2002
ELDKWASLW-Pan DR-Epitop	ELDKWASLW	BALB/c-Mäuse	+ (IgA) / k.A.	Decroix et al., 2002
ELDKWA-Pan DR-Epitop über Disulfidbrücke gekoppelt an Tetanus-Toxin	ELDKWASLW	BALB/c-Mäuse	+ (IgA) / k.A.	Decroix et al., 2003

4E10 und Z13

Im Jahr 2001 beschrieben Zwick et al. zwei weitere neutralisierende monoklonale Antikörper, die gegen den membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 gerichtet sind, 4E10 und Z13 (Zwick et al., 2001a). Genau wie bei 2F5 waren die 4E10/Z13-produzierenden Hybridomazelllinien durch Verschmelzung eines B-Zellklons, isoliert aus einem HIV-positiven Patienten, mit einer humanen Krebszelllinie entstanden. Das von 4E10 und Z13 erkannte Epitop (NWFN/DIT) liegt drei Aminosäuren C-terminal vom 2F5-Epitop im tryptophanreichen Abschnitt der gp41-Ektodomäne. Allerdings konnte für diese beiden Antikörper gezeigt werden, dass sie auch HIV-1-Isolate mit abweichenden Sequenzen neutralisieren können und einige Isolate, die das kartierte Epitop (NWFN/DIT) enthalten, nicht neutralisieren können. Möglicherweise zeigt sich hier eine starke Abhängigkeit bezüglich der Konformation des zu bindenden Epitops und der daraus resultierenden Virusneutralisation. Durch Immunisierung von Katzen mit einem Peptidkonstrukt, das vom tryptophanreichen Abschnitt des transmembranen Hüllproteins von FIV (*feline immune deficiency virus*) abgeleitet wurde, konnte die Infektion dieser Tiere verzögert werden (Richardson et al., 1998). Für das porcine endogene Retrovirus (PERV) konnten ebenfalls neutralisierende Antikörper induziert werden, die das Virus *in vitro* neutralisieren und ein Epitop im membranproximalen Bereich der Ektodomäne von des transmembranen Hüllproteins von PERV binden, das eine 50% Sequenzübereinstimmung mit dem 4E10-Epitop aufweist (Fiebig et al., 2003). Als Antigen wurde dazu ein rekombinant produziertes p15E verwendet, das aus der Ektodomäne des Transmembranproteins bestand, wobei das Fusionspeptid deletiert war.

4E10 wurde ursprünglich als ein IgG3-Antikörper produziert. Der Austausch der konstanten Regionen gegen die eines IgG1 von 2F5 steigerte (Kunert et al., 2000) die Neutralisationsfähigkeit und das Spektrum der neutralisierbaren Isolate von 4E10 (Stiegler et al., 2001). Ähnlich wie 2F5, allerdings mit einem weniger breiten Neutralisationsspektrum, neutralisiert auch der monoklonale Antikörper IgG1 4E10 HIV-1-Primärisolate und laboradaptierte Virusstämme verschiedener Subtypen aus der Gruppe M und wurde ebenfalls in passiven Immunisierungsversuchen *in vivo* in Kombination mit anderen neutralisierenden Antikörpern getestet (Stiegler et al., 2001, Zwick et al., 2001b, Ruprecht et al., 2003, Kitabwalla et al., 2003).

Weitere neutralisierende Antikörper gegen gp41

Aus den Seren von hochgradig HIV-exponierten, uninfizierten Personen (HEPS), konnte IgAs isoliert werden, die gegen die immunsuppressive Domäne (AS 583-599, HXB2, Referenzgenom, (Denner et al., 1994)) und die immundominante Schleife gerichtet sind und zur Hemmung der HIV-1 Replikation *in vitro* führen (Clerici et al., 2002).

Neben den virusneutralisierenden Antikörpern, die das Oberflächenprotein gp120 (oder dessen Rezeptoren) bzw. die Ektodomäne des Transmembranhüllproteins gp41 binden, gibt es auch Hinweise auf neutralisierende Antikörper, die den cytoplasmatischen Teil von gp41 zum Ziel haben (Reading et al., 2003). Bisher ist allerdings ungeklärt, wie diese Antikörper Zugang zu ihrem Epitop bekommen, das nach gängigen Modellen im Inneren des Viruspartikels unzugänglich ist.

1.6 Antivirale HIV-Therapie

Die derzeit eingesetzten Antiretrovirale-HIV-Therapeutika lassen sich nach ihrem Wirkmechanismus in drei Gruppen einteilen, (1) Reverse Transkriptase/Polymerase-Hemmer, (2) Protease-Hemmer und (3) Fusionshemmer. Gruppe 1 gliedert sich in Nukleosid/Nukleotid-Hemmstoffe (NRTI: *Nukleosid/Nukleotid reverse transkriptase*

inhibitor) und Nicht-Nukleosid-Hemmstoffe (NNRTI: *non-Nukleosid reverse transkriptase inhibitor*). Therapeutika der Gruppen 1 und 2 werden häufig als Kombinationstherapie eingesetzt, z.T. bestehend aus einer Kombination von vier Präparaten (Jiang et al., 2002). Durch diese Kombinationstherapien reduzierte sich die Sterberate bei den HIV-1-positiven Patienten dramatisch (Dore et al., 1998, Mocroft et al., 2000). Der Nachteil dieser hochdosierten Chemotherapie sind zum Teil massive Nebenwirkungen (Carpenter et al., 1998, Carr et al., 1998, Carr et al., 1999, Williamson et al., 1999). In der Gruppe der Fusionshemmer gibt es bisher erst ein zugelassenes Medikament, T20 (Fuzeon, Enfuvirtide), ein Peptid, das von der C-terminalen Helix der Ektodomäne von gp41 abgeleitet wurde, und den Fusionsprozess effektiv unterbindet (Wild et al., 1994). Für alle zugelassenen Anti-HIV-Therapeutika sind Resistenzbildungen beschrieben worden (Richman et al., 1996, Wong et al., 1997, Gunthard et al., 1998, Hanna et al., 2002), die langfristig zum Therapieversagen führen. Trotz aller Bemühungen gibt es bis heute keinen Therapieansatz, der eine vollständige Beseitigung des Virus aus dem Patienten ermöglicht.

1.7 Impfstoff-Strategien

Totimpfstoffe

Bei der mittlerweile jährlich erfolgenden Impfung gegen Influenza und der Impfung gegen Polyomyelitis werden inaktivierte Viruspartikel mit großem Erfolg als Vakzin eingesetzt. Die ersten Versuche zur Übertragung dieses Impfkonzpts auf Immundefizienzviren, zeigten im Rhesusmodell vielversprechende Ergebnisse (Hartung et al., 1992). Der Impfschutz wurde jedoch durch eine Antikörperantwort gegen humane Proteine auf der SIVmac-Virushülle vermittelt, die bei der Produktion der Viren auf humanen Zellen eingebaut worden waren. SIVmac Viruspartikel aus allogenen (Rhesus-) Zellen konnten als Totimpfstoff keine schützende Immunität vermitteln (Norley et al., 1996b). In jedem Fall muss bei einem Totimpfstoff gegen HIV-1 ausgeschlossen werden, dass infektiöse Viruspartikel die Inaktivierung überstehen.

Attenuierte Lebendimpfstoffe

Attenuierte, also abgeschwächte Viren, unterscheiden sich von den Wildtyp-Viren durch eine verminderte Replikationsfähigkeit und Pathogenität. Sie aktivieren sowohl die humorale, als auch die zelluläre adaptive Immunantwort und erlauben die klonale Selektion hoch avider Antikörper im Rahmen der Antikörperreifung. Gegen Pocken, Polio und Masern wurden und werden attenuierte Lebendimpfstoffe bis heute erfolgreich verwendet. Die Pocken konnten bis 1977 durch strategische Ringimpfung, sogar vollständig ausgerottet werden (Mahler et al., 1977). Vakzinierungs-Versuche mit attenuierten SIVmac-Viren (SIVmac Δ *nef* und SIVmac Δ 3), die Deletionen im regulatorischen Gen *nef* aufweisen, wurden in Rhesusaffen und Meerkatzen durchgeführt. Die transiente Vermehrung dieser abgeschwächten SIVs wurde durch das Immunsystem der Tiere kontrolliert und die Tiere waren geschützt gegen das Belastungsvirus (Kestler et al., 1991, Daniel et al., 1992, Norley et al., 1996a, Titti et al., 1997). Neben der Gefahr durch Rückmutationen und Insertionsmutagenese durch das Impfvirus, gab es weitere Befunde, die die Sicherheit eines attenuierten Lebendimpfstoffes gegen HIV fraglich machen. Juvenile und immunsupprimierte adulte Affen zeigten nach der Immunisierung eine persistierende Infektion, die sich bis ins Stadium von AIDS fortsetzte (Baba et al., 1995, Cohen et al., 1997). Durch kontaminierte Blutkonserven wurden in Sydney, Australien, acht Personen mit HIV- Δ *nef*-Mutanten infiziert (Deacon et al., 1995, Birch et al., 2001). Auch hier zeigt zumindest ein Infizierter eine Viruslast im Serum, die eine antiretrovirale Therapie notwendig macht (Learmont et al., 1999).

Protein-/Peptid-Impfstoffe (Subunit-Vakzine)

Der Einsatz von rekombinant hergestellten HIV-1-Proteinen oder synthetischen Peptiden schließt Kontaminationen mit infektiösen HI-Viren, wie sie im Fall der Totimpfstoffe und attenuierter Lebendimpfstoffe auftreten können, aus. Schimpansen konnten durch die Impfung mit rekombinatem gp120 zum Teil vor einer HIV-1-Infektion geschützt werden (Berman et al., 1990). Im Menschen konnten diese Daten bisher in klinischen Phase I und II Studien nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 1.10). Die so induzierten Antikörper aus den Probanden neutralisieren lediglich laboradaptierte Virusstämme und keine Primärisolate (Kahn et al., 1994).

DNA-Impfstoffe

DNA-Vakzine aktivieren primär die zelluläre Immunantwort (Lemieux, 2002). Die meist intramuskulär applizierte DNA wird von den Zellen aufgenommen, die kodierten Proteine werden exprimiert und im MHC I präsentiert. In Kombination mit rekombinanten Proteinen und/oder MVA-Vektoren, (*Modified Vaccinia Ankara Virus*) induziert die Immunisierung mit DNA-Vakzinen eine Pathogen-spezifische CTL-Antwort, ohne bisher einen vollständigen Schutz gegen eine HIV-1 Infektion zu bieten.

1.8 Klinische Vakzinierungsversuche

Trotz einer großen Anzahl vielversprechender Impfstoffansätze, die ihre Wirkung in verschiedenen Tiermodellen unter Beweis gestellt haben, wurde bis zum Jahr 2003 erst eine klinische Phase III Großstudie abgeschlossen. Diese wurde 1998 gestartet und beinhaltete 56 klinische Versuche in den USA, drei in Canada, einen in Puerto Rico und einen in den Niederlanden. Das getestete Vakzin war ein rekombinantes Protein mit Sequenzanteilen aus den Oberflächen- und Transmembranproteinen von zwei HIV-1 Subtyp B Stämmen (AIDSVAX B/B von der Firma VaxGen, Brisbane, CA, USA). Parallel dazu läuft seit 1999 eine klinische Phase III Studie in Bangkok, Thailand, mit 17 klinischen Versuchen, die Ende des Jahres 2003 abgeschlossen wurde. Hier wurden rekombinante Untereinheiten-Vakzine mit Sequenzen aus den Oberflächen- und Transmembranproteinen von HIV-1 eingesetzt, die von den Subtypen B und E abgeleitet wurden (AIDSVAX B/E, VaxGen, Brisbane, CA, USA). Die Daten der abgeschlossenen Studie zeigen in der vakzinierten Probandengruppe keinen Schutz vor Infektion im Vergleich zu den Probanden aus der Placebogruppe (Aids Alert, 2003).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

20 Jahre HIV-Forschung haben deutlich gemacht, dass der Einsatz eines effektiven Impfstoffs den einzigen gangbaren Weg darstellt, die HIV-1-Epidemie in absehbarer Zeit einzudämmen. Umstritten ist bis heute, ob ein präventiver HIV-Impfstoff eine humorale Immunantwort, eine zelluläre Immunantwort, oder beide Bereiche der adaptiven Immunantwort induzieren muss. Die Vorteile der humoralen Immunantwort liegen in der Prävention einer primären Infektion und der schnellen Verfügbarkeit von Antikörpern in den Schleimhäuten, über die die meisten HIV-Transmissionen stattfinden.

Die bis heute klinisch umgesetzten Impfstoffkonzepte gegen HIV-1 nutzen überwiegend das Oberflächenhüllprotein gp120 als Antigen, das aufgrund der stark glykosylierten Oberfläche und der genetischen Variabilität der codierenden Sequenz kein geeignetes Ziel ist, um eine Immunantwort auf Basis von neutralisierenden Antikörpern gegen ein breites Spektrum von HIV-1-Subtypen zu induzieren. Das transmembrane Hüllprotein gp41 ist dagegen in der Gruppe M, unter die fast alle HIV-Subtypen fallen, die für die globale HIV-Epidemie verantwortlich sind, hoch konserviert. Neutralisierende Antikörper aus HIV-positiven Patienten, die gegen gp41 gerichtet sind zeigen ein breit wirksames Neutralisationsspektrum (2F5 und 4E10). Die Induktion solcher Antikörper ist bisher nicht gelungen und ihr Wirkmechanismus ist unvollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit ist die Aufklärung des Wirkmechanismus des HIV-1-neutralisierenden Antikörpers 2F5. Er bindet an eine hoch konservierte Sequenz im membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41 und wurde erfolgreich in passiven Immunisierungen eingesetzt. Auf der Basis des Wirkmechanismus sollen im Anschluss rekombinante Antigene entwickelt und produziert werden, die die konservierten membranproximalen Strukturen der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins gp41, an die 2F5 bindet, nachahmen. Diese Antigene sollen sowohl als freie als auch als membranständige Proteine (auf der Oberfläche von Zellen) in verschiedenen Spezies virusneutralisierende Seren gegen HIV-1 induzieren.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Wenn nicht anders in den Protokollen aufgeführt, wurden alle verwendeten Chemikalien von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

2.2 Antikörper

Antikörper	Gebrauchskonzentration	Hersteller
2F5	0,2-1µg/ml	Zur Verfügung gestellt durch das AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAD, NIH: HIV gp41monoklonaler Antikörper (2F5) von Dr. H. Katinger) (Muster, et al., 1993)
Ag3 (monoklonaler Maus-anti SIV-Gag, kreuzreagierend mit HIV-Gag)	0,2-1µg/ml	Zur Verfügung gestellt von Dr. Stephen Norley (Robert Koch-Institut, Berlin)
Ziege-anti-Human-IgG-Fc Peroxydase-Konjugat	0,2-1µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ziege-anti-Ratte-IgG-Fc Peroxydase-Konjugat	0,2-1µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Fc Peroxydase-Konjugat	0,2-1µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ziege-anti-Human-IgG-Fc FITC-Konjugat	0,5µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Fc FITC-Konjugat	0,5µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Kaninchen-anti-Maus-IgG-Fc FITC-Konjugat	0,5µg/ml	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
Ziege-anti-Human-IgG-Fc-Gold-Konjugat (5 und 10nm)	0,5-1µg/ml	British Biocell (Cardiff, GB)
Maus-anti-HA-Antikörper Klon 12CA5	1µg/ml	Roche (Mannheim, Deutschland)

2.3 Plasmide

pNL4-3	(zur Verfügung gestellt vom AIDS Research and Reference reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, Dr Malcom Martin (Adachi, et al., 1986))
pCaln	(Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
pDisplay	(Invitrogen, Leek, Niederlande)
pDual	(Stratagene, Amsterdam, Niederlande)
pET30A Syngene1	(Entelechon, Regensburg, Deutschland)

2.4 Peptide

Aminosäuresequenz der verwendeten Peptide. Die angegebenen Aminosäurezahlen, beziehen sich auf den Referenzstamm HIV-1 HXB2. Wenn nicht anders angegeben wurden die Peptide vom NIH (*AIDS reagent and reference program*, #6451 MN Env 15mer peptide set) bezogen.

Peptid	Aminosäuresequenz (AS Referenzgenom)
P6336	QREKRAAIGALFLGF (507-521)
P6337	RAAIGALFLGFLGAA (511-526)
P6338	GALFLGFLGAAGSTM (516-530)
P6339	LGFLGAAGSTMGAAS (520-534)
P6340	GAAGSTMGAASVTLT (524-539)
P6341	STMGAASVTLTVQAR (528-542)
P6342	AASVTLTVQARQLLS (532-546)
P6343	TLTVQARQLLSGIVQ (536-550)
P6344	QARQLLSGIVQQQNN (540-554)
P6345	LLSGIVQQQNNLLRA (544-558)
P6346	IVQQQNNLLRAIEAQ (548-562)
P6347	QNNLLRAIEAQQHML (552-566)
P6348	LRAIEAQQHMLQLTV (556-570)
P6349	EAQQHMLQLTVWGIK (560-574)
P6350	HMLQLTVWGIKQLQA (564-578)
P6351	LTWVWGIKQLQARVLA (568-582)
P6352	GIKQLQARVLAVERY (572-586)
P6353	LQARVLAVERYLKDQ (576-590)
P6354	VLAVERYLKDQQLLG (580-594)
P6355	ERYLKDQQLLGFWGC (584-598)
P6373	NEQELLELDKWASLW (656-670)
P6374	LLELDKWASLWNWFD (660-674)
DP107	NNLLRAIEAQOHLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQ (553-590) , (Wild, et al., 1992), Jerini, Berlin, Deutschland
DP178	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF (638-673) (Wild, et al., 1994), Jerini, Berlin, Deutschland
DP178Δ	YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL (638-661) , Jerini, Berlin, Deutschland
β-Gal-gp41	AS 466-753 , Virogen, Watertown, MA, USA
PE1	LGAAGSTMGAASVTLTVQARLLLSLSC , Jerini, Berlin, Deutschland
PE2	CNEQELLELDKWASLWNWFDITNWL , Jerini, Berlin, Deutschland
PERV E1	AALITGPQQLEKGLSNLHRICKKK , Jerini, Berlin, Deutschland
PERV E2	KKKCCRERERDQGWFEQWFWNSPWW , Jerini, Berlin, Deutschland

2.5 Methoden

2.5.1 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamide-Gelelektrophorese) ist eine überwiegend analytisch genutzte Methode zur massenabhängigen Auftrennung von Proteinen (Laemmli, et al., 1970). Dabei wandern SDS-beladene, weitgehend entfaltete Proteine durch ein Polyacrylamidgel, angetrieben durch ein angelegtes, elektrisches Feld. Die gleichmäßige Beladung mit dem anionischen Detergenz SDS, das eine Mizelle um das Protein bildet, ermöglicht eine massenabhängige Auftrennung der Proteine.

Die Proteinproben (E. coli-Lysate, Zell-Lysate, aufgereinigte Proteine, synthetische Peptide, etc.) wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5-15min bei 95°C inkubiert. Unlösliches Material wurde bei 15000xg 10min pelletiert. Die SDS-PAGE bestand aus einem vierprozentigen Sammelgel und einem zehn- bis fünfzehnprozentigen Trenngel, je nach Masse der aufzutrennenden Proteine (Schägger und von Jagow, 1987). Ein kommerzieller, vorgefärbter Größenstandard (Seablue Plus II, Invitrogen, Leek, Niederlande) wurde mitgeführt. Die Proben wurden mit einer Hamilton-Glasspritze aufgetragen. An das Gel wurde mit einem Biorad Pac 300™ ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 100V angelegt. Die Gele wurden 1h bei Raumtemperatur mit Coomassie Blue G250 (Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. Im Anschluß wurde nicht komplexierter Farbstoff 4h bei Raumtemperatur mit Entfärbe-Lösung entfernt.

Gelpuffer:	0,1M 0,3% (w/v) pH 8,4	Tris SDS
Probenpuffer:	50mM 12% (v/v) 4% (w/v) 5% (v/v) 0,01% (w/v)	Tris Glycerin SDS β-Mercaptoethanol Coomassie Blue G250 (Biorad, Hercules, USA)
Kathodenpuffer:	0,1M 0,1M 0,1% (w/v) pH 8,25	Tris Tricin SDS
Anodenpuffer :	0,2M pH 8,9	Tris
Entfärbe-Lösung:	10%(v/v) 25%(v/v) in ddH ₂ O	Essigsäure Methanol

Biorad Mini-Protean II-Gelsystem

Die Western Blot Analyse ist eine immunoanalytische Methode zur Detektion von Proteinen auf einer Trägermembran mit spezifischen Antikörpern (Towbin, et al., 1989). Beim verwendeten *Semidry-Blotting*-Verfahren (Biorad, Hercules, USA) wurden die Proteine nach der Auftrennung in der SDS-PAGE durch ein senkrecht zum Gel orientiertes elektrisches Feld (10-15V für 20-45min) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, 0,2µm Poren von Millipore, Billerica, MA USA) geblotet. Bindungsstellen auf der Membran, die nicht durch Proteine besetzt waren, wurden durch einstündige Inkubation der Membran in einer gepufferten, 5%-Magermilch-Lösung blockiert. Die blockierte Membran wurde mit dem primären Antikörper (bzw. dem primären Antiserum, Verdünnung von 1:50 bis 1:20000) über Nacht bei 4°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen (je 10min) entfernt. Die Membran wurde für 2h bei Raumtemperatur mit einem Primärantikörper-spezifischen, Meerrettich-Peroxidase (POD)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion wurde mit einer DAB-Substratlösung (Diaminobenzidin, Merck, Darmstadt, Deutschland) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Transferpuffer:	48mM	Tris
	39mM	Glycin
	20% (v/v)	Methanol
	0,0375% (w/v)	SDS
	pH 9,2	

PBS (Dulbecco's Standard Phoshat-gepufferte Kochsalzlösung):

8,0g	NaCl
0,2g	KCl
1,15g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O
0,2g	KH ₂ PO ₄
add 1000ml	ddH ₂ O
pH 7,2	

Blockierungspuffer:	PBS	
	0,05% (v/v)	Tween-20
	5% (w/v)	Magermilchpulver
	pH 7,4	

Waschpuffer:	PBS	
	0,05% (v/v)	Tween-20
	pH 7,4	

Substratlösung:	40ml	25mM Tris pH 8,0
	Spatelspitze	Diaminobenzidin
	100µl	H ₂ O ₂

Biorad Trans-Blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell

2.5.2 ELISA

Der ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*) ist genau wie die Western Blot Analyse eine immunoanalytische Methode zur spezifischen Detektion von Proteinen mittels einer Antikörper-Antigen-Reaktion. Dabei werden die Proteine jedoch nicht auf eine Membran

aufgebracht, sondern auf die Oberfläche von speziell beschichteten 96-Well-Platten (Nunc Probind™ oder Nunc Immuno-Maxisorb™, Nunc, Wiesbaden, Deutschland) adsorbiert. Die Detektion erfolgt, genau wie beim Western Blot mittels eines spezifischen Primärantikörpers, der durch ein Sekundärantikörper-Enzym-Konjugat (POD) gebunden wird. Dadurch wird eine quantifizierbare, farbgebende Substratumsetzung möglich.

Um die Bindungsavidität von verschiedenen Seren und Antikörpern an Peptide und rekombinante Proteine zu vergleichen, wurden zunächst diese Antigene in einem geeigneten Lösungsmittel (DMSO oder ddH₂O) auf eine Nunc Probind™-96-Well-Platte aufgebracht und für 16h bei 37°C eingedampft. Ungesättigte Bindungsstellen auf der Plattenoberfläche wurden durch einstündige Inkubation mit 200µl Blockierungspuffer/Well blockiert. Die Platte wurde in einem Tecan ELISA-Washer mit 300µl Waschpuffer/Well dreimal gewaschen. Die Primärseren/-antikörper wurden in geeigneter Konzentration (1:5-1:50000) in PBS (100µl Volumen) mit unterschiedlichen Konzentrationen Harnstoff (0-8M) für 2h bei 37°C inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch drei Waschzyklen entfernt. Das Sekundärantikörper-POD-Konjugat (100µl Volumen) wurde in geeigneter Konzentration (0,2-1µg/ml) in Blockierungspuffer für 2h bei 37°C auf der Platte inkubiert. Ungebundene Sekundärantikörperkonjugate wurden durch fünf Waschzyklen entfernt. Die Platte wurde durch Ausschlagen von allen Flüssigkeitsresten befreit und mit 50µl/well Substratlösung inkubiert bis eine deutliche Farbreaktion festzustellen war (5-30min). Durch Zugabe von 25µl Tritisol™ (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurde die enzymatische Substratumsetzung gestoppt. Die Farbreaktion wurde mit einem Tecan ELISA-Reader Classic bei 492/620nm quantifiziert. Alle Ansätze wurden in drei oder vier Replikaten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft-Excel berechnet.

Blockierungspuffer:	PBS 10% FKS pH 7,4
Waschpuffer:	PBS 0,05% Tween pH 7,4
Substratlösung:	PBS 1mg/ml OPD (o-Phenylendiamine-Dihydrochlorid) pH 6,0

Capture ELISA

Bei einer speziellen Form des ELISA, dem *Capture*-ELISA, wird auf die Trägerplatte zunächst ein antigenspezifischer *Capture*-Antikörper aufgebracht. Auf diesen wird dann das Probenmaterial gegeben. Die Detektion erfolgt auch hier über Primär- und Sekundärantikörper. Durch den *Capture*-Antikörper erhöht sich die Spezifität des Nachweissystems.

Blockierungspuffer: PBS
10% (v/v) FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland)

Substratlösung: PBS
1mg/ml OPD
pH 6,0

2.5.3 Klonierung

2.5.3.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Polymerase Kettenreaktion)

Mit Hilfe der PCR lassen sich spezifische DNA-Fragmente, ausgehend von sehr kleinen DNA-Ausgangsmengen, durch eine zyklisch ablaufende Reaktion exponentiell vermehren (Mullis, et al., 1986). Dabei wird die Doppelhelix der Ausgangs-DNA (*Template*) durch Erhitzen auf 95°C in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im Anschluß binden durch Absenken der Reaktionstemperatur (auf ca. 45-65°C, abhängig von der Schmelztemperatur der *Primer*) kurze, komplementäre Einzelstrang-DNAs (*Primer*) an die *Template*-DNA. Bei einer Reaktionstemperatur von 72°C werden die *Primer* am 3'OH-Ende durch die kovalente Anfügung eines Nucleosidtriphosphates unter Abspaltung von Pyrophosphat verlängert. Diese Reaktion wird von hitzestabilen DNA-Polymerasen, gewonnen aus thermophilen Bakterien, katalysiert. Durch zyklische Wiederholung von DNA-Denaturierung, Primeranlagerung und Kettenverlängerung (20x-40x) kann so eine spezifische Sequenz amplifiziert werden.

Die PCR kann genutzt werden, um an die zu amplifizierende Sequenz spezifische Restriktionsschnittstellen für eine bestimmte Endonuclease zu fusionieren, die die Voraussetzung für das gerichtete Einbringen dieses Amplifikats in ein Plasmid sind. Die für die Klonierung verwendeten *Primer* und die Klonierungsschemata sind im Anhang II nachzulesen. Ein typischer PCR-Ansatz ist im Folgenden aufgeführt:

10-15ng	Plasmid-DNA (oder bis zu 300ng genomische DNA)
2,5µl	10x PCR-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland)
10-15pmol	Primer1 (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland)
10-15pmol	Primer2 (Sigma-Genosys Steinheim, Deutschland)
10nmol	dNTP-Mix (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
1-5U	Ampli-Taq-Gold DNA-Polymerase (Roche, Mannheim, Deutschland)
add 25µl	ddH ₂ O

MJ Research, PTC-200 Thermocycler
Perkin Elmer, GeneAmp 2400 PCR-System

Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR dient dem gezielten Einbringen von Sequenzsubstitutionen in einen vorliegenden DNA-Doppelstrang. Dazu werden *Primer* verwendet, die direkt vor und hinter der auszutauschenden Sequenz komplementär zum *Template* binden und am 3'OH-Ende die Substitutionssequenz tragen. Je einen dieser *Primer* lässt man getrennt auf der *Template*-DNA mit einem terminal bindenden Außenprimer reagieren. Die so entstehenden PCR-Produkte werden in einer zweiten PCR gemeinsam als *Template* eingesetzt, wobei nur die zuvor verwendeten Außenprimer zugegeben werden. Über die komplementären

Substitutionssequenzen lagern sich die beiden PCR-Produkte aus der ersten Reaktion aneinander und werden über die Außenprimer verlängert. Das so entstehende PCR-Produkt trägt eine sequenzspezifische und lokusdefinierte Substitution.

Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine schnelle Nachweismethode zur Überprüfung von vielen, klonalen Bakterienkolonien auf eingebrachte Plasmide. Von einer Transformationsplatte wurde eine Bakterienkolonie mit einem sterilen Zahnstocker gepickt und kurz in einem vorbereiteten PCR-Reaktionsansatz geschwenkt. Die nachfolgende PCR erfolgte identisch zu der unter 2.5.3.1 beschriebenen Reaktion, wobei der initiale Denaturierungsschritt mindestens 10min betragen hat, um die Bakterienwand zu zerstören und die cytoplasmatische Plasmid-DNA freizulegen. Die Wahl der spezifischen Primer erfolgte in Abhängigkeit vom nachzuweisenden Plasmid und überspannte ein zu amplifizierende Sequenz von 300bp-1kb.

2.5.3.2 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen liegen als Homodimere vor und katalysieren ATP-abhängig die sequenzspezifische Spaltung der kovalenten Phosphat-Zuckerbindung in der DNA-Doppelhelix. Die Erkennungssequenz dieser Enzyme kann 4-8 Nukleotide lang sein und ist im Regelfall palindromisch aufgebaut. Die Aufspaltung der DNA-Doppelhelix erfolgt meist innerhalb der Erkennungssequenz und kann sowohl glatte Enden (*blunt ends*) als auch überhängende Ende (*sticky ends*) ergeben.

Die Auswahl der verwendeten Restriktionsendonukleasen (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) und des zugehörigen Reaktionspuffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) erfolgte in Abhängigkeit vom Zielvektor und dem einzubringenden DNA-Fragment (*Insert*). Bei Doppelverdauansätzen wurde nach Angaben des Herstellers ein für beide Enzyme geeigneter Puffer verwendet, oder, bei Pufferinkompatibilität, ein sequentieller Verdau durchgeführt. Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

100ng-2µg	Plasmid-DNA oder PCR-Amplifikat
2µl	10x Reaktionspuffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
2µl	10x BSA (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) (optional)
2-5units	Enzym 1 (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
2-5units	Enzym 2 (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
add 20µl	ddH ₂ O

Die Reaktion erfolgte in der Regel bei 37°C (z.T., abhängig vom Temperaturoptimum der verwendeten Enzyme, davon abweichend) für 45min bis 2h.

2.5.3.3 Dephosphorylierung mit SAP

Um ein Religation von einfach geschnittenen Vektorfragmenten zu unterbinden, wurden diese DNA-Fragmente mit der SAP (*shrimp* alkalische Phosphatase, NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu mußte die DNA zunächst mit einem PCR-Purification-Kit (Qiagen, siehe 2.5.3.6) aus dem Restriktionspuffer in ddH₂O überführt werden. Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

30µl	Vektor-DNA in ddH ₂ O (aus der PCR-Purification-Reaktion)
4µl	10x Reaktionspuffer RX (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
2-5units	SAP (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
add 40µl	ddH ₂ O

Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1h. Im Anschluss wurde die SAP durch Erhitzen auf 65°C für 30min inaktiviert.

2.5.3.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele wurden zur größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten, z.B. nach einer PCR oder einem Restriktionsverdau verwendet. Dabei läuft die negativ geladene DNA im elektrischen Feld Richtung Anode durch ein grobmaschiges Netz aus Zuckerpolymeren. Je nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 0,7-2,5% (w/v) Agarosegele verwendet. Als Größenstandard diente ein kommerziell erhältlicher DNA-Standard (Invitrogen, Leek, Niederlande). Die DNA wurde durch einen interkalierenden, UV-detektierbaren Farbstoff (Ethidiumbromid) markiert.

2.5.3.5 Plasmid-DNA-Präparation

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden kommerzielle Kits auf der Basis der Anionentauscher-Säulenchromatographie verwendet (Genomed Jetstar Maxi/Mini Plasmid Purification System, Genomed, Löhne, Deutschland). Um endotoxinfreie Plasmid-DNA zu reinigen, wurde ein spezielles Reinigungssystem verwendet (Qiagen EndoFree® Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.3.6 Aufreinigung von linearen DNA-Fragmenten

Zur Aufreinigung von Endonuklease-verdauter DNA aus Agarosegelen oder PCR-Produkten aus dem PCR-Reaktionsmix wurden kommerzielle Kits auf der Basis der Anionentauscher-Säulenchromatographie verwendet (Qiagen Gel Extraction Kit und Qiagen PCR Purification Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.3.7 Isolierung genomischer DNA

Zur Aufreinigung von genomischer DNA aus Zellysate wurde ein kommerzielles Kit verwendet (Qiagen Blood Mini Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland). Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.3.8 Ligation

DNA-Ligasen katalysieren ATP-abhängig die Bildung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen einem freien 5'-Phosphat- und einem freien 3'-OH-Ende von DNA-Molekülen. Restriktionsverdauter DNA-Fragmente wurden mit passend dazu geschnittenen Vektoren in einer Ligation fusioniert. Ligationsansätze wurden bei 14°C, 8-16h

inkubiert, um eine möglichst große Reaktionseffizienz zu gewährleisten. Ein typischer Ligationsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

100-200ng	Vektor-DNA
300-600ng	Insert-DNA
2µl	10x T4-Ligase-Puffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
1-5units	T4 Ligase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland)
add 20µl	ddH ₂ O

2.5.3.9 Transformation

Bakterien

Top10 F' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *E. coli* (F'(lacI^q, Tn10(Tet^R)) *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80 *lacZ*Δ*m15* Δ*lacX74* *deoR* *recA1* Δ(*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL*(Str^R) *endA1* *nupG*)

BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, Amsterdam, Niederlande): *E. coli* B F *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B) *dcm*⁺ *Tet*^r *gal* λ(*DE3*) *endA* *Hte* [*argU* *proL* *Cam*^r]

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterien und Hefen bezeichnet (Cohen, et al., 1972). Chemokompetente *E. coli* Top10 F' und BL21-CodonPlus(DE3)-RP wurden nach den Angaben im QIAexpressionist (Qiagen, 5. Auflage, 2002, S.39f) generiert und in 100µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Bei einer Transformation wurden 10µl Ligationsansatz (siehe 2.5.3.8) oder 100ng gereinigte Plasmid-DNA zu einem auf Eis aufgetauten 100µl Bakterien-Aliquot gegeben. Der Ansatz wurde durchmischt und 30min auf Eis inkubiert. Durch Erhitzen auf 42°C wurde für 60s ein Hitzeschock durchgeführt, wodurch sich Poren in der Bakterienwand bilden, durch die die DNA aufgenommen wird. Im Anschluss wurde der Ansatz für 3min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500µl LB-Medium (ohne Zusatz von Antibiotika) wurde der Ansatz 30min bei 37°C geschüttelt, so dass die über das eingebrachte Plasmid vermittelten Resistenzgene abgelesen werden konnten. Die Bakterien wurden bei 2000xg 2min pelletiert und in 100µl Medium aufgenommen. 50-100µl Bakteriensuspension wurden auf eine LB-Agar-Platte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und 16h bei 37°C inkubiert.

LB-Medium:	1%	(w/v)	Trypton
	0,5%	(w/v)	Hefeextrakt
	1%	(w/v)	NaCl

Antibiotika: Ampicillin (100µg/ml Endkonz.), Kanamycin (50µg/ml Endkonz.)

2.5.4 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung (Sanger, et al., 1977) wurde zur Überprüfung von neu rekombinierter DNA verwendet. Die moderne DNA-Sequenzierung nutzt die PCR (2.5.3.1), wobei neben den Desoxy-Nuklosidtriphosphaten (dNTP) auch Didesoxy-Nuklosidtriphosphate (ddNTP) im Reaktionsmix eingesetzt werden. Diese besitzen anstelle eines freien 3'OH-Endes, das als Ansatz zur Kettenverlängerung dient, einen Wasserstoffrest. Wird ein solches ddNTP in der Elongationsphase durch die Polymerase in den naszierenden

DNA-Strang eingebaut, folgt ein Kettenabbruch. Durch die Nutzung von fluoreszenzmarkierten Primern und ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP in separierten Reaktionsansätzen und die Auftrennung der unterschiedlich langen PCR-Abbruchprodukte in einem feinmaschigen Polyacrylamidgel, kann das für den Kettenabbruch verantwortliche ddNTP einer Position in dem zu sequenzierenden DNA-Abschnitt zugeordnet werden. Alternativ werden ddNTPs mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern in einem Reaktionsansatz verwendet. In beiden Systemen wird das markierte DNA-Fragment durch fluoreszenzspezifische Detektoren erkannt. Bei dem verwendeten DNA-Sequenzierungsprotokoll wurden markierte ddNTPs im ABI BigDye 3.1-Mastermix verwendet. Ein typischer Sequenzierungsansatz ist im Folgenden aufgeführt:

1ng-3µg	<i>Template</i> -DNA (PCR-Produkte: 1-20ng, Plasmide:150ng-3µg)
5pmol	<i>Primer</i>
1-3,5µl	BigDye-Mastermix (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
3µl	5xPuffer (ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
add 20µl	ddH ₂ O

Lycor 3200-Sequencer

2.5.5 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

2.5.5.1 Bakterien und Medien

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden chemokompetente *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) verwendet (siehe Kapitel 2.5.3.9).

2.5.5.2 IPTG-induzierte Expression

Isopropylthiogalaktopyranosid (IPTG) ist ein Galaktoseanalogon und wirkt genau wie dieses als Aktivator der *lac*-Promotor-abhängigen Transkription von nachgeschalteten Genen. Im Wildtyp *E. coli* wird so ein Umschalten zwischen der Verwertung der Substrate Glucose und Galaktose ermöglicht. Viele kommerziell erwerbliche Expressionsplasmide tragen diesen Promotor, so dass die Transkription des eingebrachten Gens und die nachfolgende Proteinproduktion gezielt durch Zugabe des Pseudosubstrates IPTG von außen eingeleitet werden kann.

Von den verwendeten *E.coli* BL21 wurde über Nacht eine frische 5-10ml LB-Kultur mit Selektionsantibiotikum angesetzt. Am nächsten Tag wurden Expressionskulturen (100ml bis 1000ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum) mit 1-5ml dieser Vorkulturen angeimpft. Die Expressionskultur wurde bei 225rpm und 37°C bis geschüttelt bis eine optische Dichte von 0,5-0,8 bei einer Wellenlänge von 600nm erreicht war. Durch Zugabe von 1-2mM (Endkonzentration) IPTG wurde die Expression der rekombinanten Gene induziert. Nach 3-5h Inkubation bei 225rpm und 37°C wurden die Bakterien bei 6000xg pelletiert. Das Bakterienpellet wurde bei -20°C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

2.5.5.3 Aufschluss der Bakterien

Der Aufschluss der stabilen Wand von *gram*-negativen Bakterien (hier *E. coli*) kann sowohl mit mechanischen (Ultraschall, Branson Sonifer 250), als auch mit enzymatischen (Lysozym) Methoden erfolgen (Jolles, 1969). Die rekombinant produzierten Proteine werden häufig in sogenannten *Inclusion Bodies* im Zytoplasma der Bakterien gelagert. Durch die Bildung dieser unlöslichen Einschlüsse umgehen die *E. coli* Bakterien das Entstehen eines osmotischen Gradienten zwischen Umgebung und Bakterieninneren. Je nach Löslichkeit des produzierten Proteins und dem nachfolgenden Aufreinigungsverfahren kommen Lösungsmittel zum Einsatz, die das Protein in der nativen oder in einer denaturierten Struktur belassen.

Ein eingefrorenes Bakterienpellet aus 500ml Kulturvolumen wurde in 300ml Puffer B7 (Qiagen, NiNTA Spin Column Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland, enthält 7M Harnstoff) aufgenommen, resuspendiert und mit einer Ultraschallsonde zerkleinert. Die Suspension wurde 2h bei Raumtemperatur im Überkopf-Schüttler inkubiert. Ungelöste Bakterienbestandteile wurden durch Zentrifugation (25000xg, 30min, Raumtemperatur) abgeschieden und verworfen. Der lösliche Überstand wurde affinitätschromatographisch gereinigt.

2.5.5.4 Affinitätschromatographie (NiNTA-Sepharose)

Die Affinitätschromatographie mit NiNTA-Sepharose (Nickel-*Nitrilotriacetic Acid*) ermöglicht die spezifische Trennung von bakteriellen Proteinen und rekombinant exprimierten Proteinen, die einen 6xHis-Tag tragen (hier rgp41-6xHIS, Syngene1, CBP-Syngene1 und 2). Dabei bildet das zweiwertige Nickelion über zwei Interaktionsstellen eine stabile Chelatbrücke zu den Stickstoffen der Imidazolringe zweier benachbarter Histidinreste aus. Diese Bindung kann durch Zugabe von Imidazol kompetitiv gehemmt oder durch eine pH-Absenkung unter pH 4,5 gelöst werden.

Eine 12ml Glassäule (Amersham Pharmacia, Ø 10mm, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde mit 5ml-7,5ml Probind Sepharose (Invitrogen, Leek, Niederlande) gefüllt und mit 5-10 Säulenvolumen Bindungspuffer (B7) äquilibriert (Flußrate 1-2ml/min). Der Bakterienaufschluß wurde für 16-20h bei Raumtemperatur mit einer Flußrate von 1-2ml/min über das Säulenmaterial rezirkuliert. Ungebundenes Material wurde mit 5-10 Säulenvolumen Puffer C7 (Qiagen, NiNTA Spin Column Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland, enthält 7M Harnstoff) entfernt (Flußrate 1-2ml/min). Das gebundene Material wurde mit Puffer E8 (pH 4,0, Qiagen, NiNTA Spin Column Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland, enthält 8M Harnstoff) von der Säule eluiert (Flußrate 0,5-1ml/min) und in 1,5ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen wurden mit einem Bradford-Proteinassay (Biorad, Hercules, USA nach Angaben des Herstellers) auf ihren Proteingehalt getestet.

2.5.5.5 Aufreinigung der rekombinant produzierten Proteine CBPrgp41, Hybrid I, II und III

Die Aufreinigung von CBP-rgp41 und den Hybride I, II und III erfolgte nach einem abweichenden Protokoll. Hier wurde das Bakterienpellet aus 500ml Kulturvolumen zunächst in 600ml PBS aufgenommen, mit Ultraschall aufgeschlossen und für 2h bei 4°C mit einer Spatelspitze Lysozym inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurde durch Zentrifugation

(25000xg, 30min, 4°C) abgeschieden, in 8M Harnstoff in PBS aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde 2h bei Raumtemperatur im Überkopf-Schüttler inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (25000xg, 30min, Raumtemperatur) abgeschieden und die in Lösung befindlichen Proteine gegen ddH₂O dialysiert (Dialyseschlauch, MWCO 3500 Dalton *cut off*, Serva, Heidelberg, Deutschland). Dabei fielen die rekombinant exprimierten Proteine aus und konnten durch erneute Zentrifugation (25000xg, 30min, 4°C) abgetrennt werden.

2.5.6 Immunisierung von Ratten und Ziegen mit rekombinanten Konstrukten und Peptiden

2.5.6.1 Ratten und Ziegen

Es wurden zehn Wochen alte, weibliche Wistar Ratten (BfR, Bundesinstitut für Risikobewertung, Tierversuchsanstalt, Berlin-Marienfelde, Deutschland) zur Immunisierung verwendet. Die Ratten wurden in Gruppe von vier Tieren gehalten.

Die Ziegen wurden in der Tierversuchsanstalt, Berlin-Marienfelde (BfR) gehalten.

2.5.6.2 Applikation

Das Antigen wurde am Tag der Immunisierung in PBS aufgenommen und 1:1 mit öligem Adjuvant (Incomplete Freund's Adjuvant (Pierce, Bonn, Deutschland)) gemischt. Durch mehrfaches Resuspendieren durch eine Kanüle (Ø0,6mm, BD, Heidelberg, Deutschland) und Inkubation im Ultraschallbad (Sonirex, Bandelin, Berlin, Deutschland) erhielt das Antigen-Adjuvant-Gemisch eine halb feste, sahnige Konsistenz.

Die Immunisierung der Ratten erfolgte durch intramuskuläre und subcutane Injektion des Gemisches. In der Regel wurden je 200µl in die Muskulatur der Hinterläufe und 400µl s.c. unter das Nackenfell gespritzt. Dabei wurden pro Tier zwischen 250µg und 1mg Antigen appliziert. Je nach Antigen wurden drei bis zehn Tiere pro Gruppe verwendet.

Den Ziegen wurde je 400µg Antigen in öligem Adjuvant in die Oberschenkelmuskulatur injiziert.

Drei bis fünf Wochen nach der Immunisierung (*Prime*) erfolgte der *Boost* mit dem gleichen Immunogen-Adjuvant-Gemisch und nach dem gleichen Applikationsschema. In einigen Gruppen erfolgten im Rhythmus von drei bis fünf Wochen weitere *Boosts*.

2.5.6.3 Blutabnahme und Serumgewinnung

Die Ratten wurden durch retrobulbäre Punktion geblutet. Dazu wurden die Tiere mit einem Inhalationsnarkotikum (Halothan oder Isofluran (Curamed, Karlsruhe, Deutschland)) betäubt. Unter Narkose wurde eine Na-Heparin-beschichtete Glaskapillare am Augapfel vorbeigeführt. Durch leichte Drehbewegung der Kapillare wurden Blutgefäße hinter dem Auge verletzt, so dass Blut durch die Kapillare abfließen konnte. Mit dieser Methode lassen sich bis zu 2ml Blut aus einer Ratte entnehmen, ohne dem Tier bleibenden Schaden zuzufügen. Das Blut wurde bei 4°C über Nacht gelagert. Das entstandene Koagulat wurde am nächsten Tag bei 16000xg und 4°C 45min pelletiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und das Koagulat verworfen. Um die Seren zu dekomplementieren, d.h. die Bestandteile des Komplementsystems im Serum zu deaktivieren, wurden sie für 30min bis 45min bei 56°C inkubiert. Die Lagerung der Seren erfolgte bei -20°C.

Die Ziegen wurden aus der Halsvene geblutet und die Gewinnung der Seren aus dem Ziegenblut erfolgte analog zu der aus Rattenblut.

2.5.7 Zellkultur

2.5.7.1 Zellen und Medien

Zellen:

- C8166: humane T-Zelllinie, trägt ein defektes HTLV-II-Genom (bezogen vom AIDS Research and Reference Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: C8166 von Dr. Robert Gallo (Salahuddin, et al., 1983))
- CCL47: Ratten-Sarkom-Zelllinie (ATCC, Manassas, VA, USA)
- 293: humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC, Manassas, VA, USA)

Medien und Zusätze:

- | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------|
| 500ml | RPMI (Invitrogen, Leek, Niederlande) |
| 10% (v/v) | FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 10ml | L-Glutamin (200mM, Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 7,5ml | HEPES (1M, Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 5ml | Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin(10mg/ml) (Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 500ml | DMEM (Invitrogen, Leek, Niederlande) |
| 10% (v/v) | FKS (Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 10ml | L-Glutamin (200mM, Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 5ml | HEPES (1M, Biochrom, Berlin, Deutschland) |
| 5ml | Penicillin (10000U/ml)/Streptomycin(10mg/ml) (Biochrom, Berlin, Deutschland) |

Trypsin (0,25%, Invitrogen, Leek, Niederlande)

G418 (Invitrogen, Leek, Niederlande)

2.5.7.2 Kulturbedingungen für immortalisierte Zelllinien

Das Wachstum von immortalisierten Zelllinien wird prinzipiell nur durch das Angebot an Platz und Nährstoffen limitiert. Daher müssen Zellen in Kultur in regelmäßigem Abstand (je nach Zelllinie alle 2-4 Tage) verdünnt und mit frischem Nährmedium versorgt werden. Adhärenz wachsende Zellen (hier CCL47 und 293) müssen dazu vom Untergrund gelöst werden, entweder durch mechanische Methoden (Zellschaber) oder durch proteolytischen Verdau der Adhäsionsproteine (Trypsin). Suspensionszellen (hier C8166) können direkt verdünnt werden. Alle Zellkulturversuche fanden unter sterilen L3**⁺-Bedingungen (aufgrund der ausschließlichen Übertragung von HIV über Blut- und Schleimhautkontakt, ist unter L3**⁺-Bedingungen keine Luftschleuse notwendig. Glasgeräte und Kanülen wurden beim Arbeiten mit HIV vermieden) in dafür vorgesehen Sterilbänken (Kendro, Langensebold, Deutschland) mit laminarem Luftstrom statt.

Sowohl Suspensionszellen als auch adhärenz wachsenden Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T25, T75 und T175, TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA) mit den entsprechenden Medien kultiviert (siehe Kapitel 2.4.7.1, nach Angaben des Herstellers). Bei adhärenz

wachsenden Zellen wurde zunächst der verbrauchte Medienüberstand abgenommen, die Zellen wurden mit 10-30ml sterilem PBS gewaschen und mit 3-10ml Trypsin für 1-10min bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und durch Zugabe von Vollmedium beendet. Die abgelösten Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Ein Zehntel bis ein Drittel der Zellsuspension wurde mit frischem Vollmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Suspensionszellen wurden zunächst bei 500xg für 10min pelletiert. C8166 bilden Aggregate, die zu Boden sinken. Daher wurden diese Zellen nicht zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10-30ml sterilem PBS gewaschen erneut pelletiert. Das gewaschene Pellet wurde in 10-20ml Vollmedium aufgenommen und die Zellen wurden vereinzelt. Ein Zehntel bis ein Drittel der Zellsuspension wurde mit frischem Vollmedium auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ im Brutschrank (Kendro, Langensebold, Deutschland) inkubiert.

2.5.7.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die langfristige Lagerung von Zellen über mehrere Jahre ist nur in flüssigem Stickstoff bei -196°C möglich. Um zu gewährleisten, dass möglichst wenige Zellen in Folge der Bildung von Eiskristallen beim Einfrierprozess im Zellinneren Schaden nehmen, müssen diese mit einem Frostschutzmittel vorinkubiert werden.

Die Zellen wurden in Suspension gebracht, vereinzelt (2.5.7.2) und im Anschluss erneut pelletiert. Das Pellet wurde auf Eis in 1ml sterilem FKS mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)/1x10⁶-2x10⁶ Zellen aufgenommen und resuspendiert. Je 1ml der Suspension wurde in sterile 2ml Kryo-Röhrchen mit Schraubverschluss gegeben. Die Röhrchen wurden in mehrere Lagen Zellstoff gewickelt und in einer verschlossenen Styroporbox bei -80°C eingefroren. Durch die Isolierung aus Zellstoff und Styropor wird sichergestellt, dass der Einfrierprozess langsam abläuft und somit die Zellen geschont werden. Nach 16h wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.5.8 Viren

HIV-1 IIIB (zur Verfügung gestellt von Dr. Claudia Kücherer, Robert Koch, Institut)
HIV-1 MN (zur Verfügung gestellt von Dr. Claudia Kücherer, Robert Koch, Institut)
PERV/5° (Specke et al., 2001, Denner et al., 2003)

2.5.8.1 Anlegen von Virusstocks

Die Verwendung von einheitlichen Virusstocks für Infektionsversuche ermöglicht den Einsatz von konstanten Mengen infektiöser Partikel und damit die Vergleichbarkeit von verschiedenen Versuchen.

Eine frisch passagierte Kultur C8166 in einer T175 Zellkulturflasche (TPP, Midwest Scientific St. Louis, MO, USA) (1:6 verdünnt aus einer dicht gewachsenen Kultur) wurde mit 1x10⁴ TCID₅₀ HIV-IIIB infiziert und 72-84h bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO₂ inkubiert. Die Kultur wurde 10min bei 500xg pelletiert und der zellfreie Überstand in 2ml Aliquoten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Virusüberstände wurden zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Partikel auf C8166 titriert. Dazu wurde die Integration von Provirus nach 72h Inkubation über eine pol-spezifische PCR auf Basis des C8166-Zelllysats nachgewiesen.

Das Anlegen von PERV/5° erfolgte nach Kultivierung auf 293-Zellen wie beschrieben (Fiebig, et al., 2003).

Die TCID₅₀/ml berechnet sich nach der Formel:

$$\left(\text{Ds}^{\left(\frac{\text{X}}{\text{Reps}} + 0,5 \right)} \right) / \left(\left(\frac{1}{\text{D0}} \right) * \text{Ds} * \left(\frac{\text{Vol}}{1000} \right) \right)$$

Ds:	Verdünnungstufen
X:	Anzahl der infizierten wells
Reps:	Anzahl der Replikate
D0:	erste Verdünnung
V:	Virus-Volumen in µl/well

2.5.8.2 *In vitro* Selektion neutralisationsresistenter HIV-1 Quasispezies

In zwei T75-Zellkulturflaschen wurden je 5×10^6 - 2×10^7 C8166 in 25ml RPMI-Vollmedium kultiviert. Nach zwei Tagen wurde zu beiden Kulturen 0,5-1ml HIV-1 IIIB-Virusstock zugegeben (TCID₅₀: 2×10^4 /ml). Zusätzlich wurde zu einer Flasche der virusneutralisierende monoklonale Antikörper 2F5 gegeben (Endkonzentration 0,3µg/ml). Im Abstand von 3-4 Tagen wurden uninfizierte C8166 zugegeben und Medium und Antikörper erneuert. Sowohl von der Kontrollkultur (ohne mAb 2F5) als auch von der Selektionskultur (mit mAb 2F5) wurden alle 3-4 Tage Zellen entnommen, pelletiert und bei -20°C eingefroren.

2.5.9 Rekombinante Expression in eukaryoten Zellen

2.5.9.1 Transfektion eukaryoter Zellen

Das Einbringen von DNA (oder RNA) in eukaryote Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zellmembran und DNA müssen dazu chemisch derart vorbehandelt werden, dass die negativ geladene DNA nicht durch elektrostatische Abstoßung von der ebenfalls negativ geladenen Zellmembran entfernt wird. Dazu eignen sich sowohl Salze zweiwertiger Kationen (Calciumphosphat-Präzipitation), als auch die Verpackung der DNA in Lipidvesikel.

Hier wurde ein Lipidvesikel-Transfektionskit (Transfast™ von Promega, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Transfektion erfolgte nach Angaben des Herstellers. Im Regelfall wurden 80%-konfluent gewachsene, adhärenente Zellen in einer 6-well-Platte mit 3µg-10µg/Plasmid-DNA (Qiagen Mini/Maxi-Präparation) transfiziert. Nach 24-48h wurden die Zellen auf Expression der transfizierten Gene getestet, oder es wurden Selektionsantibiotika (200-800µg/ml G418) zugegeben, um stabile Transfektionen zu ermöglichen.

2.5.9.2 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht die spezifische Detektion von Proteinen auf der Oberfläche und im Inneren von Zellen. Dazu werden Zielprotein-spezifische, Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper mit diesen Zellen inkubiert. Bei einer intrazellulären Färbung muss zunächst die Zellmembran über ein Detergenz permeabilisiert werden, um den Antikörpern Zugang zum Antigen zu verschaffen. Die Fluoreszenz-markierten Antikörper werden über eine UV-Lichtquelle angeregt und emittieren Licht in einer Farbstoff-spezifischen, längeren Wellenlänge. Durch den Einsatz von genau auf den Farbstoff abgestimmten Filtern können interferierende Wellenlängen ausgeblendet werden.

Die adhärenent wachsenden Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und für 1-3 Tage kultiviert. Die Objektträger wurden mit PBS gespült und in 2%-Formaldehyd in PBS für 1h in

einer Färbewanne fixiert. Die Zellen wurden dreimal je 5min mit PBS gewaschen. Die Objektträger wurden in Blockierungspuffer für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluß wurde der Primärantikörper in einer Verdünnung von 1:100-1:10000 in Blockierungspuffer zugegeben und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut dreimal je 5min mit PBS gewaschen. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugierte Sekundärantikörper wurde in Blockierungspuffer in einer Konzentration von 0,5µg/ml zugegeben und 1h bei Raumtemperatur bei Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal je 5min mit PBS gewaschen. Überschüssige Flüssigkeit wurde entfernt. Suspensionszellen wurden nach dem gleichen Protokoll blockiert und mit Primär- und Sekundärantikörper behandelt. Die markierten Zellen wurden auf Alzian-Blau-beschichteten Objektträgern 1h bei RT adsorbiert und im Anschluss mit 2% (v/v) Formaldehyd in PBS fixiert.

Die Zellen wurden mit einem den Fluoreszenzfarbstoff stabilisierenden Eindeckmittel behandelt (Pro Long, Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit einem Nikon Eclipse 300 Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) gemacht.

2.5.9.3 Durchfluss-Zytometrie (Flow Cytometry/FACS, fluorescence activated cell sorting)

Die Durchfluss-Zytometrie ist eine Methode zur immunologischen Analyse und Sortierung von Zellen. Bei dieser Methode werden einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Messkammer geleitet. Die Zellen werden zuvor mit Fluoreszenz-Farbstoffen spezifisch markiert (z.B. über Antikörper-Konjugate). In der Messkammer treffen Anregungslaser definierter Wellenlängen auf die Fluoreszenzfarbstoffe und regen diese zur Emission von Licht an. Das emittierte Licht wird über Photo-Multiplier verstärkt und in elektrisches Signal umgewandelt. Über verschiedene Anregungs-Wellenlängen lassen sich gleichzeitig mehrere Farbstoffe in einer Probe verwenden. Wenn das Durchfluss-Zytometer über eine Zellsortierungsfunktion verfügt, können so Zellen, deren Fluoreszenzsignal über einem eingestellten Schwellenwert liegt, von den übrigen Zellen getrennt werden.

Für Zelloberflächenfärbungen wurden 2×10^6 adhärenente Zellen zunächst mechanisch vom Zellkulturflaschenboden gelöst, da der Einsatz von Trypsin sämtliche Oberflächenproteine enzymatisch entfernen würde. Die Zellen wurden vereinzelt und dreimal mit 30ml PBS gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die Zellen bei 300-500xg 10min pelletiert und der Überstand abgenommen und verworfen. Die gewaschenen Zellen wurden mit 30ml Blockierungspuffer für 30min inkubiert und in 10min-Intervallen aufgewirbelt. Die blockierten Zellen wurden bei 300-500xg 10min pelletiert und das Pellet wurde mit dem verdünnten Primärantikörper (je nach Antikörper 2-10µg/ml, Antiseren 1:100-1:2000) in Blockierungspuffer für 30min auf Eis inkubiert und in 10min-Intervallen aufgewirbelt. Die Zellen wurden dreimal mit 30ml eiskaltem PBS gewaschen und mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörpern, verdünnt in Blockierungspuffer (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, siehe Kapitel 2.2), 30min auf Eis bei Dunkelheit inkubiert. Die Zellen wurden fünfmal mit 30ml eiskaltem PBS gewaschen. Das Pellet wurde im Anschluss in 2% v/v Formaldehydlösung aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellen wurden direkt im Zytometer (FACSCalibur, BD) analysiert. Die Auswertung der Fluoreszenzmessung erfolgte über die mitgelieferte BD-Software.

Waschpuffer: PBS

Blockierungspuffer: Waschpuffer mit 10% FKS

2.5.9.4 Präparation von Zellen für die Raster- und Transmissionselektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) bietet im Vergleich zur Lichtmikroskopie eine höhere Bildauflösung (100-200Å) und wird überwiegend zur topographischen Analyse eines Präparates eingesetzt. Dazu wird dieses mit Metall bedampft (in der Regel mit Gold) und mit einem fokussierten Elektronenstrahl (50kV Beschleunigungsspannung) beschossen. Durch diesen Beschuss lösen sich Elektronen (Sekundärelektronen) aus der Goldschicht und können detektiert werden. Die Menge und der Abstrahlwinkel der herausgeschossenen Elektronen bestimmen über die Farbdichte des aufgenommenen Bildes. Bei der Raster-Elektronenmikroskopie können so größere Objekte hoch auflösend auf ihre Oberflächenstruktur untersucht werden. Bei der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) werden Ultradünnschnitte von eingebetteten Präparaten mit einem fokussierten Elektronenstrahl durchstrahlt. Elektronendichteres Material hält die Elektronen zurück und reflektiert sie (Rückstreuelektronen), so dass ein sehr kontrastreiches Bild der präparierten Schnittebene entsteht und z.B. Einblicke ins Innere von Zellen und Viren ermöglicht.

Immuno-Gold-Präparation

2×10^6 Zellen wurden zweimal mit 10ml Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 5min bei 500xg pelletiert. Das gewaschene Pellet wurde in 10ml Waschpuffer resuspendiert und 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 5min bei 500xg pelletiert und mit $10 \mu\text{g/ml}$ Primärantikörper (2F5) 1h inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 10ml Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 5min bei 500xg pelletiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und mit Gold-konjugiertem $200 \mu\text{l}$ Sekundärantikörper ($0,5\text{-}1 \mu\text{g/ml}$ Ziegen-IgG-anti-Human-IgG, 5nm- und 10nm-Goldkonjugate, British Biocell, Cardiff, GB) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Die konjugierten Goldpartikel blockieren in der TEM viele eingestrahelte Elektronen, so dass sie deutlich dunkler als der Hintergrund erscheinen.

Die Zellen wurden zweimal mit 10ml Waschpuffer gewaschen und nach jedem Waschschrift für 5min bei 500xg pelletiert. Das Pellet wurde einmal mit 10ml PBS gewaschen und 2ml der Suspension wurden abgetrennt. Die Zellen wurden bei 500xg pelletiert. Das Pellet aus der 8ml-Suspension wurde in 2,5% Glutaraldehyd fixiert und für die TEM-Aufnahmen nach der Fixierung in Epoxid-Harz (Epon, Resolution, Hoogvliet, Niederlande) eingebettet. Von den eingebetteten Proben wurden 60nm dünne Schnitte angefertigt.

Das Pellet aus der 2ml-Suspension wurde in $500 \mu\text{l}$ PBS resuspendiert und auf Alzian-Blau-beschichtete Deckgläschen aufgebracht. Durch elektrostatische Wechselwirkungen mit dem Alzian-Blau adsorbieren die Zellen nach 30min bis 1h an den Deckgläschen. Nicht adsorbierte Zellen wurden abgesaugt und die Zellen wurden in 2,5% Glutaraldehyd fixiert. Die elektronenmikroskopische Auswertung erfolgte durch Dr. Muhesin Özel, Robert Koch Institut.

Waschpuffer: PBS
 10%FKS
 pH 7,4

2.5.10 Ballistische Immunisierung von Ratten mit der Helios Gene Gun™

Für die ballistische Immunisierung von Ratten wurden zunächst Tefzel-Schläuche mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschichtet. Bei der Auswahl von Goldpartikelgröße und DNA-Gold-Verhältnis wurde das Biorad Biolistic Protokoll von Dr. C. Pierce (Seattle Biomedical Research Institute) zugrunde gelegt. Der Tefzel-Schlauch wurde vor der Beladung mit 100% Ethanol gespült und mit Stickstoff für 1h getrocknet. 25mg Goldpartikel ($\text{\O} 1\mu\text{m}$) wurden in 100 μl 0,05M Spermidin (in ddH₂O) aufgenommen und 5s gevortext. Übriggebliebene Aggregate von Goldpartikeln wurde durch 3-5s Beschallung im Ultraschallbad (Bandelin) aufgeschlossen. 100 μg Plasmid-DNA in 100 μl ddH₂O wurden zugegeben und die Suspension wurde erneut 5s gevortext. Bei vorsichtiger Durchmischung wurde tropfenweise 1M CaCl₂-Lösung zugegeben, um die DNA zu präzipitieren. Nach zehnminütiger Präzipitation wurden die DNA-beladenen Goldpartikel dreimal mit 100% Ethanol gewaschen und im Anschluss in 3ml 0,025mg/ml PVP (Polyvinylpyrrolidon) (in 100% Ethanol) aufgenommen. Die PVP-Gold-Suspension wurde für 3-5s im Ultraschallbad inkubiert, um Aggregate aufzuschließen und im Anschluss mit einer 10ml-Spritze in den Tefzel-Schlauch gesaugt. Der Schlauch wurde in die Biorad Tubing Prep Station® gespannt und für 30min bei Raumtemperatur rotiert. Die Rotation wurde für 5min unterbrochen, so dass die Gold-DNA-Partikel zu Boden sanken. Mit einer Schlauchpumpe (Amersham-Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde der Ethanol-Überstand abgezogen. Der Schlauch wurde unter Begasung mit Stickstoff erneut für 15min rotiert, so dass sich eine gleichmäßige Verteilung der Goldpartikel über die inner Oberfläche des Schlauches ergab (siehe Abb.8 A).

Der beschichtete Schlauch wurde mit einem Biorad *Tubing Cutter* in 1cm lange Fragmente geschnitten, die unter trockenen Bedingungen bei 4°C bis zur Applikation gelagert wurden.

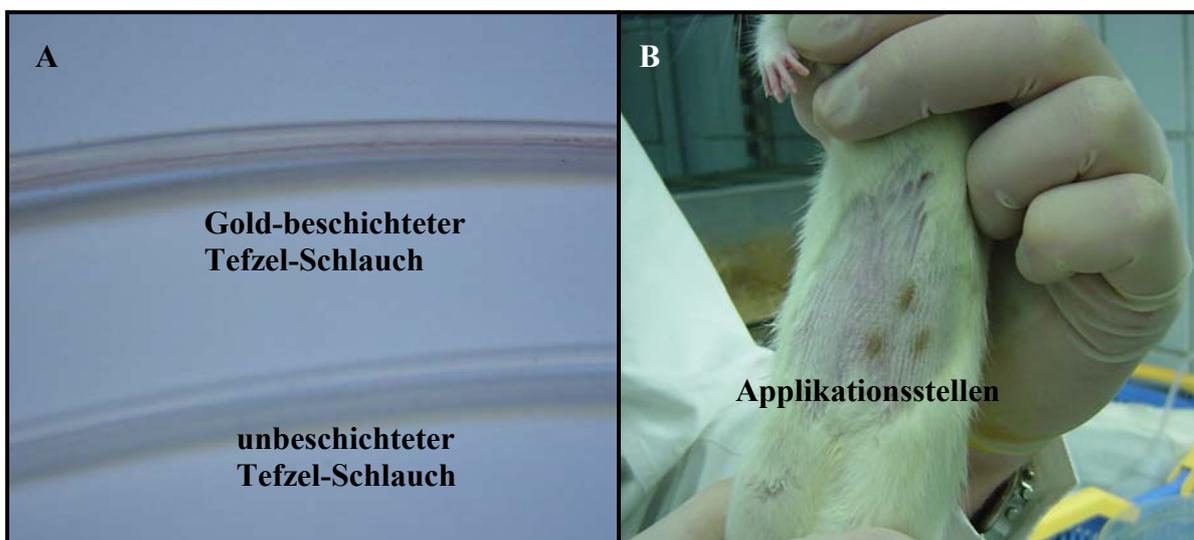


Abb.9: Vorbereitung und Durchführung der DNA-Immunisierung mit einer Biorad Gene Gun™:
 A) Beschichtung der Tefzelschläuche mit DNA-beladenen Goldpartikeln. Die gleichmäßige Verteilung des Goldes auf der inneren Oberfläche des Schlauches gewährleistet bessere Immunisierungsergebnisse und geringere Gewebeschädigung. B) Applikation der Goldpartikel. Die epidermalen Applikationsstellen sind durch die eingebrachten Goldpartikel braun gefärbt.

Die DNA-beladenen Goldpartikel wurden mit der Helios Gene Gun™ (Biorad, Hercules, USA) in die obere Epidermis der Wistar-Ratten geschossen. Dazu wurde den Tieren zunächst das Fell am Bauch vollständig entfernt. Die Helios Gene Gun™ wurde nach Angaben des Herstellers an eine Helium-Flasche angeschlossen und ein Druck von 400-450psi wurde angelegt. Die Trommel der Gene Gun™ wurde mit den 1cm langen, Gold-beschichteten Schlauchfragmenten geladen. Für die Applikation wurde der mitgelieferte Abstandhalter vor

die Mündung der Gene Gun™ geschraubt und auf den Bauch des fixierten Tieres gehalten. Pro Tier wurden 3-4 Schüsse auf die rasierte Stelle des Bauches abgegeben (Abb. 9B). Die Applikation wurde nach zwei und vier Wochen nach dem gleichen Schema wiederholt.

2.5.11 Epitop-Kartierung mit einer Pepsot™-Membran

Die Pepsot-Membran (Jerini, Berlin, Deutschland) ermöglicht die schnelle Eingrenzung von antikörper- und serumspezifischen Epitopen auf einem bekannten Antigen. Dazu wurde eine Peptidbank aus 15 Aminosäuren langen Peptiden hergestellt, die je um 13 Aminosäuren, d.h. die Aminosäuresequenz der Peptide verschiebt von Peptid zu Peptid zwei Aminosäuren Richtung C-Terminus. Die Peptide wurden kovalent über den C-Terminus an eine Nitrozellulose-Membran gekoppelt. Die verwendete Membran umfasste die Aminosäuresequenz der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteines gp41 von HIV-1 IIIB. Die Inkubation mit dem zu testenden Antikörper oder Serum erfolgte nach Angaben der Herstellerfirma, wobei die Verdünnung von Primär- und Sekundäntikörpern optimiert werden musste. Das Epitop des Antikörpers oder die Epitope des Serums entsprechen der in allen positiv reagierenden, aufeinander folgenden Peptid-Spots auftretenden Sequenz.

2.5.12 *In vitro* Virus-Neutralisationstest

Der *in vitro* Virus-Neutralisationstest wurde genutzt, um virusneutralisierende Seren der immunisierten Ziegen und Ratten *in vitro* zu messen.

5×10^6 C8166 in 100 μ l wurden pro Well in einer sterilen 96-Well-Rundboden-Platte (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät. Zu den Zellen wurde 50 μ l HIV-1 IIIB-Virusstock gegeben ($TCID_{50}$: 5×10^2 - 2×10^3) und 50 μ l 1:2 - 1:16 vorverdünntes, dekomplementiertes Ratten- oder Ziegenserum. Die 96-Well-Platte wurde für 12-96h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte inkubiert. Alle Seren wurden in drei oder vier Replikaten getestet. Als Kontrolle wurde der HIV-1-neutralisierende, monoklonale Antikörper 2F5 (NIH) in einer Konzentration von 0,1 μ g/ml-25 μ g/ml mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände abgenommen und verworfen. Die verbleibenden Zellen wurden durch dreimaliges Einfrieren (-80°C) und Auftauen (56°C) aufgeschlossen. Durch Zugabe von 200mg/ml Proteinase K (Invitrogen, Leek, Niederlande) in 1xPCR-Puffer (Roche, Mannheim, Deutschland) und dreistündiger Inkubation bei 56°C wurden die Histone enzymatisch von der genomischen DNA gelöst. Die Proteinase K wurde durch anschließende Inkubation bei 95°C für 30min deaktiviert. Die Zellysate wurden bei -20°C gelagert oder direkt als *Template* im Realtime-PCR-Nachweis eingesetzt.

Für die *in vitro* Neutralisation von PERV/5° wurde ein analoges Testsystem verwendet (Fiebig et al., 2003). Dazu wurden 1×10^4 293-Zellen/well 24h vor der Infektion in 96well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden mit 1×10^4 $TCID_{50}$ PERV/5° infiziert und neun Tage in Gegenwart von Serum (1:16) kultiviert. Dabei wurden die Zellen jeden dritten Tag passagiert. Die Lyse erfolgte analog zur Lyse von HIV-Infizierten C8166-Zellen.

2.5.13 *Realtime*-PCR

Die *Realtime*-PCR ist eine Methode zur gleichzeitigen, spezifischen Amplifikation und Detektion von DNA (Higuchi, et al., 1992). Anfangs wurde der DNA-Interkalator Ethidiumbromid (siehe Kapitel 2.5.3.4) in den PCR-Ansatz integriert. Nach jedem Zyklus

bildeten sich zusätzliche DNA-Ethidiumbromid-Komplexe, die durch Anregung mit UV-Licht fluoreszierten. Später wurde Ethidiumbromid durch das weniger giftige und sensitivere *Sybr-Green* ersetzt. Moderne *Realtime-PCR*-Verfahren verwenden Amplifikat-spezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden. So wird zum einen die Spezifität erhöht, weil das Signal sowohl von der Bindung von zwei spezifischen Primern, als auch von der Bindung der spezifischen Sonde abhängt. Zum anderen steigert der Einsatz von Sonden die Sensitivität der *Realtime-PCR*. Eine solche Sonde bindet an eine Sequenz, die zwischen den komplementären Sequenzen der Primer liegt. Die Sonde ist ein Oligonucleotid an dessen 5'-Ende ein Reporter-Fluoreszenz-Farbstoff und an dessen 3'-Ende ein *Quencher*-Farbstoff konjugiert sind. Bei einer intakten Sonde wird durch den geringen Abstand (Förster-Radius) zwischen *Quencher* und Reporter die Fluoreszenz des Reporters durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) unterdrückt. Während der Elongationphase der PCR trifft die Taq-DNA-Polymerase auf das 5'-Ende der Sonde. Über die 5'-3'-Exonuclease der Polymerase wird der Reporter von der Sonde gespalten, der Abstand von *Quencher* und Reporter wird zu groß um die UV-Anregung des Reporters zu unterdrücken und detektierbares Licht wird vom Reporter emittiert (Lee, et al., 1993). Die *Realtime-PCR* ermöglicht im Gegensatz zur Standard-PCR einen quantitativen Vergleich der Amplifikate aus zwei Proben und hat einen weiteren, dynamischen Messbereich (der Faktor zwischen Proben- und Normwert bei gleicher Sensitivität/Spezifität liegt bei maximal 10^7 im Vergleich zu 10^3 bei der Standard PCR). Die verwendete *Realtime-Lyse-PCR* nutzte Proteinase K-behandeltes Zelllysate als Template für die PCR-Reaktion. Es wurden *env*-spezifische Primer (Annealing bei 55°C) verwendet, die ein möglichst großes Spektrum von Subtypen detektieren (Ou, et al., 1988, Cassol, et al., 1991, Schweiger, et al., 1997). Die verwendete Sonde ist ein *env*-spezifisches 25mer mit einem 5'-FAM-Reporter und einem 3'-Dabcyl-*Quencher* (die Sondensequenz wurde zur Verfügung gestellt von Dr. Heinz Ellerbrok, Robert Koch-Institut, Berlin). Für die Reaktion wurde Taqman-Universal Mastermix verwendet. Die Messung erfolgte mit dem MX4000-Cycler von Stratagene. Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden aufgeführt.

2µl *Template* (Proteinase K behandeltes Zelllysate)
12,5µl Taqman-Universal Mastermix (Applied Biosystems)
9µl ddH₂O
0,5µl *Primer* 68i (entspricht 5pmol) (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
0,5µl *Primer* 69i (entspricht 5pmol) (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)
0,5µl Sonde (entspricht 5pmol) (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland)

(Für die *Realtime-PCR* zum Nachweis einer PERV-Infektion wurden die Primer 36 und 37 (siehe Anhang II) verwendet.)

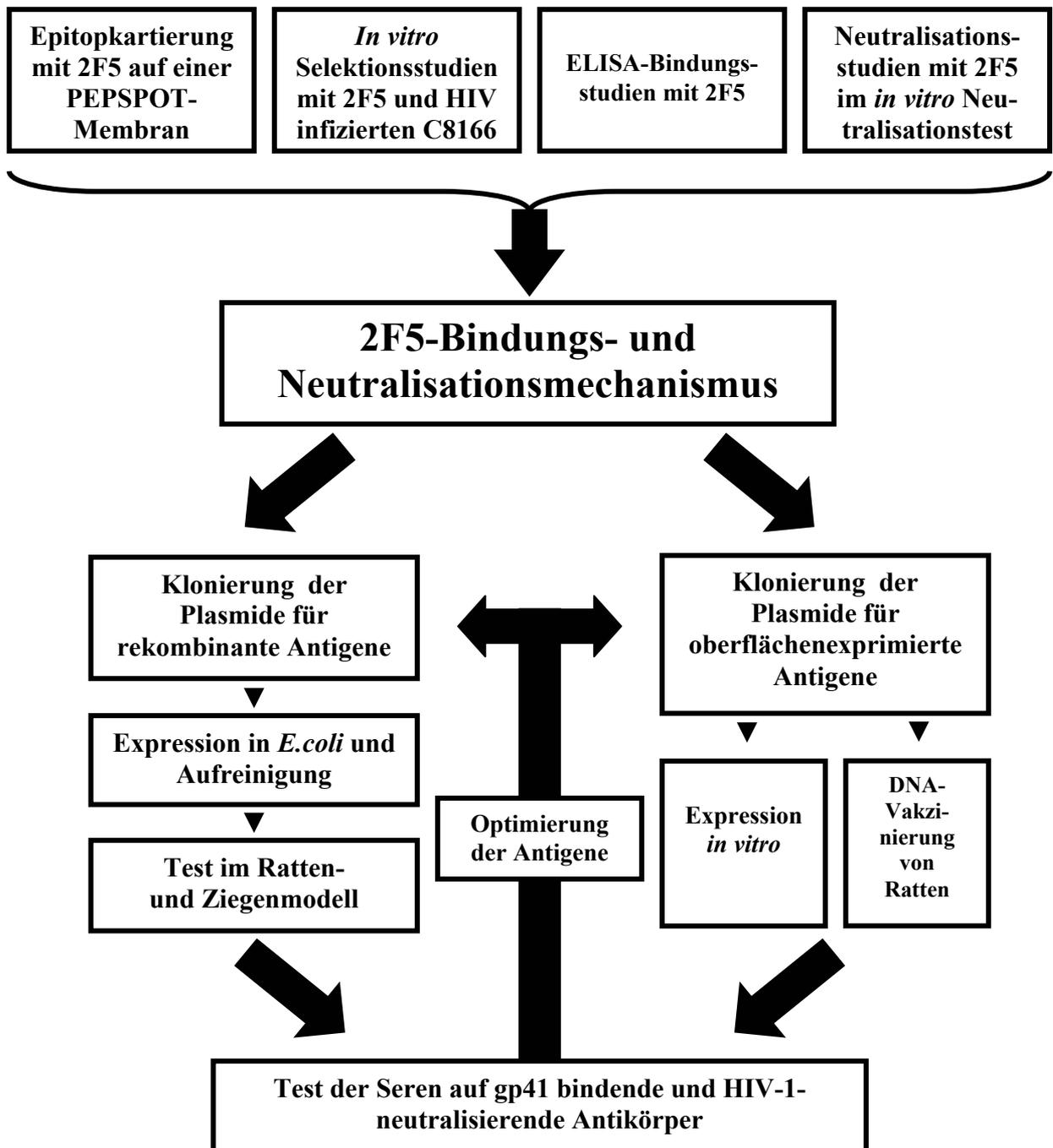
Alle Ansätze wurden in drei oder vier Replikaten gemessen. Mittelwerte und Standardabweichungen der Replikate wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Microsoft Excel berechnet. Um die Differenz der neutralisierenden Wirkung eines Immunserums im Vergleich zu der des entsprechenden Präimmunserums darzustellen, wurden die ct-Werte (Zahl des PCR-Zyklus, bei der das Fluoreszenz-Signal einer Probe über einen definierten Schwellenwert steigt) dieser wir folgt umgerechnet.

$$\text{Hemmung der Virusreplikation [\%]} = 100 - 100/2^{\text{Act} \times X}$$

Mit X = Test-abhängiger Korrekturfaktor, der mittels der Verdünnung eines Standard-*Templates* berechnet wurde. Dieser Faktor hat für die eingesetzten Primer und Sonde eine Größe von 1,08.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollte der Bindungs- und Neutralisationsmechanismus des HIV-neutralisierenden, monoklonalen Antikörpers 2F5 untersucht werden. Auf der Grundlage der Wirkungsweise dieses Antikörpers sollten im Anschluss rekombinante Antigene entwickelt und produziert werden, die im Versuchstiermodell virusneutralisierende Seren induzieren sollten. Parallel zu den freien, rekombinanten Antigenen wurde ein System zur Präsentation von gp41-abgeleiteten Antigenen auf der Oberfläche von Zellmembranen etabliert. Das folgende Fließschema fasst die geplanten Versuchsabläufe zusammen.



3.1.2 2F5 bindet besser an die vollständige Ektodomäne von gp41 als an DP178

Aus verschiedenen Veröffentlichungen geht hervor, dass die Bindungsstärke des monoklonalen Antikörpers 2F5 an die Sequenz ELDKWA davon abhängt, in welcher Konformation und Aminosäure-Umgebung diese vorliegt (Muster et al., 1993, Schibli et al., 2001, Biron et al., 2002, Tian et al., 2002, Barbato et al., 2003).

Für das transmembrane Hüllprotein p15E des γ -Retrovirus PERV wurde ein Modell aufgestellt, dem zufolge es in der Ektodomäne ein Konformationsepitop gibt, an das neutralisierende Antiseren binden. Dieses Konformationsepitop besteht aus zwei Sequenzabschnitten, die im linearisierten p15E räumlich getrennt vorliegen und durch die Faltung der Ektodomäne in eine Haarnadelstruktur in räumliche Nähe gerückt werden. In ELISA-Bindungsstudien wurde gezeigt, dass die Bindung eines PERV-neutralisierenden Ziegenserums an Peptide, die von diesen Sequenzabschnitten abgeleitet wurden, stärker ist, als die addierte Bindung an die Einzelpeptide (Fiebig et al., 2003). Die C-terminal gelegene Sequenz weist Homologien zum Epitop des HIV-neutralisierenden Antikörpers 4E10 auf, das drei Aminosäuren C-terminal vom 2F5-Epitop liegt (siehe Kapitel 1.5.4.2).

Um zu überprüfen, ob es Sequenzabschnitte innerhalb der Ektodomäne von gp41 gibt, die die Bindung von 2F5 an die Sequenz ELDKWA steigern, wurde ein Peptid, das von der C-terminalen Helix von gp41 abgeleitet wurde (DP178, AS 643-678) und je ein rekombinantes Protein (CBP-rgp41 AS 530-683) im Western Blot und ELISA (β -Gal-gp41(AS 466-753)) auf die Bindung an 2F5 getestet (Abb. 11).

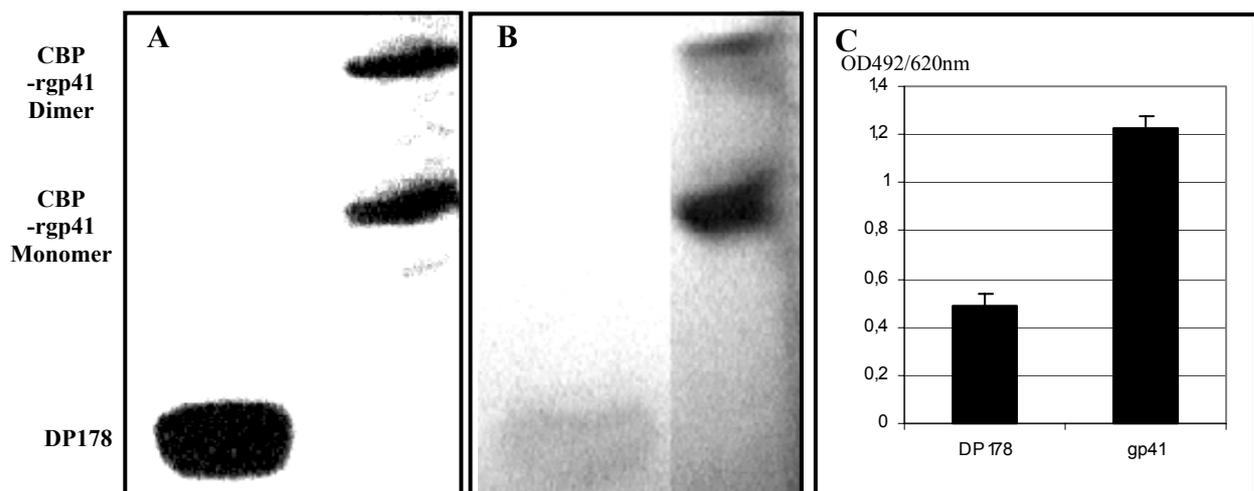


Abb.11: Bindung von 2F5 an Dp178 und gp41 im Western Blot und ELISA. A) SDS-PAGE, Coomassie-Blue gefärbt: 25µg DP178 wurden in der linken Spur aufgetragen, 10µg in *E.coli* produziertes und gereinigtes CBP-rgp41 in der rechten Spur. Das rekombinante rgp41 bildet Dimere und ist verunreinigt mit *E.coli* Proteinen. B) Western Blot: Es wurden dieselben Proteinmengen aufgetragen wie in der unter A) abgebildeten SDS-PAGE. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,5µg/ml eingesetzt. C) Im ELISA bindet 2F5 [0,2µg/ml] besser an β -Gal-gp41 als an DP178. Es wurden äquimolare Mengen Protein aufgetragen (DP178: 0,5µg; β -Gal-gp41: 17,5µg). Die Werte wurden als Triplikate gemessen.

Im Western Blot bindet 2F5 bei einer Konzentration von 0,5µg/ml deutlich besser an die vollständige Ektodomäne von gp41 als an das Peptid, das von der C-terminalen Helix abgeleitet wurde. Die Präsentation der Sequenz ELDKWA führt in der kompletten Ektodomäne also zu einer besseren Bindung durch 2F5. Im ELISA konnte dieser Befund bestätigt werden (Abb. 11C). Hier bindet 2F5 etwa dreimal besser an β -Gal-gp41, als an DP178. Im Folgenden sollte geklärt werden, welche Strukturen für diese bessere Präsentation des 2F5-Epitops verantwortlich sind.

3.1.3 *In vitro* Selektion einer 2F5-resistenten HIV-1 IIIB-Mutante

Der Oberflächen-Transmembran-Komplex von HIV-1 enthält mehrere Regionen, die unter im HIV-positiven Patienten unter Selektionsdruck stehen (Yang et al., 2000, Gaschen et al., 2002), d.h. durch diese Regionen bieten Angriffspunkte für das Immunsystem des Patienten oder verabreichte, antivirale Medikamente. HIV reagiert auf diesen Selektionsdruck mit der Bildung von Fluchtmutanten.

Um zu zeigen, auf welche Bereiche des transmembranen Hüllproteins gp41 2F5 einen Selektionsdruck ausübt, wurde eine humane T-Zelllinie (C8166) in Gegenwart von 2F5 mit dem 2F5-sensiblen Virusisolat HIV-1 IIIB infiziert. Ziel der *in vitro* Selektion war es zu analysieren, ob Mutationen in der ELDKWA-Sequenz und möglicherweise in Bereichen außerhalb auftreten. Dadurch sollten Sequenzen neben dem bereits bekannten 2F5-Epitop ELDKWA identifiziert werden, auf die 2F5 einen Selektionsdruck ausübt und die folglich für die Neutralisation von HIV durch 2F5 von Bedeutung sind. Die Konzentration von 2F5 (0,3 µg/ml) wurde dabei so gewählt, dass neue Infektionen in geringem Umfang immer noch möglich waren. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die Titration von 2F5 auf HIV-1 IIIB-infizierten C8166-Zellen zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentration an neutralisierendem Antikörper und den zeitlichen Verlauf des *in vitro* Selektionsversuchs.

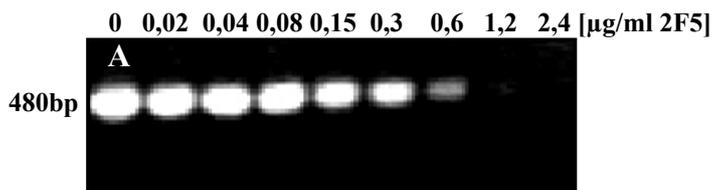


Abb.12: A) Titration von 2F5 auf HIV-1 IIIB infizierten C8166-Zellen. Die Integration der proviralen DNA wurde mittels *pol*-spezifischer PCR (Primer 23 und 24, siehe Anhang II) nachgewiesen. Das PCR-Amplifikat besitzt eine Größe von 480bp. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen, wobei nur je eine Amplifikatbande abgebildet ist.

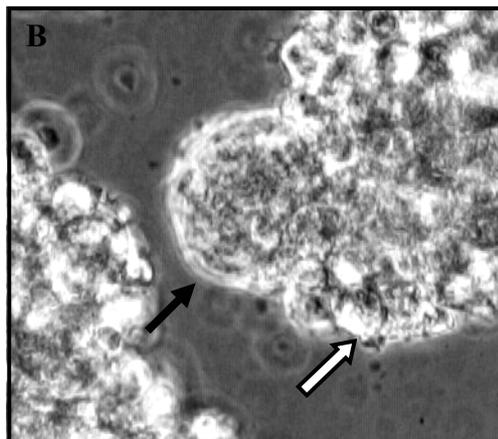


Abb.12: B) Syncytiumbildung Die Syncytien (schwarzer Pfeil) entstehen in einer HIV-1-IIIB- infizierten C8166-Kultur durch Verschmelzung von infizierten mit angrenzenden C8166-Zellen (weißer Pfeil).

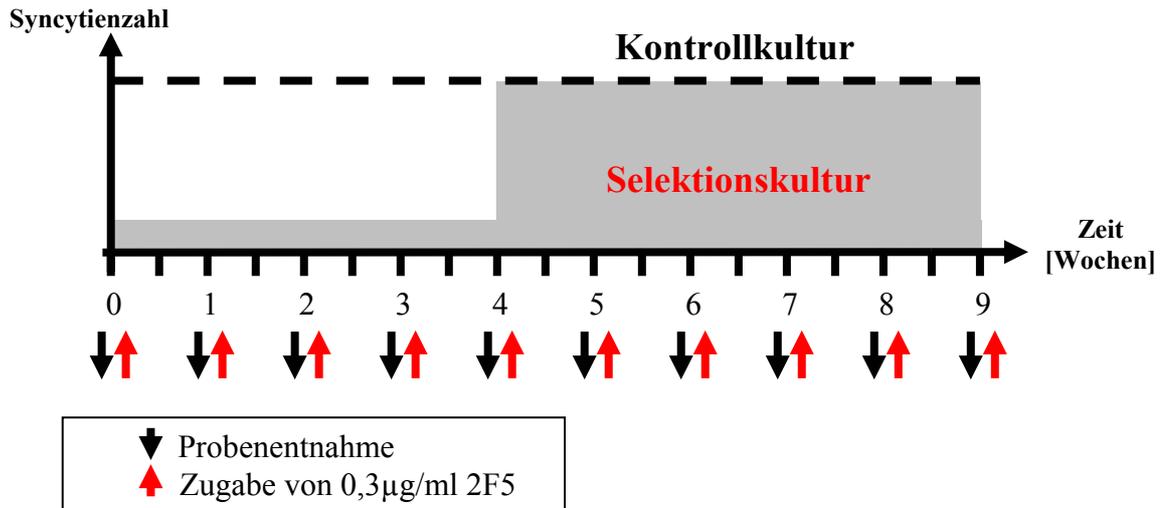


Abb.13: Schema des zeitlichen Verlaufs des *in vitro* Selektionsversuchs: Die HIV-1 IIIB infizierte Kultur wurde im Abstand von einer Woche mit neuem 2F5 versetzt. Gleichzeitig wurden Zellproben zur Gewinnung genomischer DNA entnommen. Die Zeit ist gegen die Zahl der Syncytien aufgetragen. Die Syncytienzahl der Selektionskultur ist grau hinterlegt, die Syncytienzahl der Kontrollkultur ist als gestrichelte Linie gezeigt.

Bis zur vierten Selektionswoche waren 90% weniger Syncytien in der 2F5-Selektionskultur als in einer HIV-IIIB-infizierten Kontrollkultur ohne Zugabe neutralisierende Antikörper. In der Kontrollkultur replizierten die Viren also schneller als in der Selektionskultur. Ab der vierten Woche war die Syncytiendichte in beiden Kulturen wieder gleich hoch, was auf eine Anpassung der Viruspopulation an den Selektionsdruck hinwies.

3.1.3.1 Das gp41 der *in vitro* selektionierten HIV-IIIB Mutante wurde nicht durch 2F5 gebunden

Um zu testen, ob das gp41 der selektionierten Quasispezies (HIV-1 IIIB 2F5mut) im Western Blot durch 2F5 gebunden wird, wurden Zellen aus der Kontrollkultur und der Selektionskultur (9. Woche) pelletiert und das Lysat auf virale Proteine getestet. Um auszuschließen, dass in Folge der Selektion unterschiedliche Mengen Virus oder gp41 in den Zellen vorlagen, wurde zusätzlich ein Western Blot mit einem murinen anti-Gag-Antikörper (AG3, Abb. 14B) und einem gp41-spezifischen Rattenserum (Rattenserum F1, Abb. 14C) durchgeführt. 2F5 bindet im Western Blot nicht an das gp41 aus dem Zelllysate der Selektionskultur (Abb. 14A). Das Ergebnis zeigt, dass gleiche Virusmengen (Abb. 14B) aufgetragen wurden und dass das selektionierte HIV-1 IIIB 2F5mut die gleichen Mengen gp41 aufweist wie der Wildtyp (Abb. 14C).

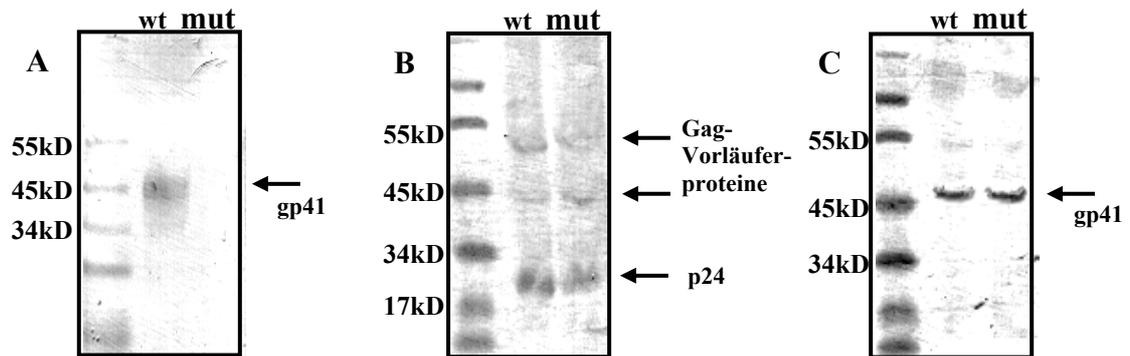


Abb.14: Western Blot der Zellysate aus der 2F5-Selektions- (rechte Spur) und der Kontrollkultur (linke Spur). A) Der Western Blot wurde mit 0,5µg/ml 2F5 inkubiert. Es wurden je 30µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. B) Der Western Blot wurde mit dem murinen Antikörper AG3 inkubiert. Dieser Antikörper bindet an das prozessierte p24 Gag und die höhermolekularen Vorläuferproteine. Es wurden je 30µg Gesamtproteinmenge aufgetragen. C) Der Western Blot wurde mit dem Rattenserum F1 (bindet an die ISU-Domäne von gp41, AS 581-599, HXB2-Referenzgenom) in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Unspezifische Nebenbanden entstehen durch Kreuzreaktion mit zellulären Proteinen oder Serumanteilen. Es wurde je 30µg Gesamtproteinmenge aufgetragen.

In Gegenwart von 2F5 werden *in vitro* also Viruspartikel selektioniert, deren transmembranen Hüllprotein gp41 nicht durch 2F5 gebunden wird.

3.1.3.2 HIV-1 IIIB 2F5mut wurde nicht durch 2F5 neutralisiert

Im *in vitro* Neutralisationstest wurde überprüft, in wie weit die *in vitro* Selektion Einfluss auf die Infektiösität und die Sensitivität der selektionierten Viren gegenüber 2F5 und einem Fusionshemmer (Dp178) hat (Abb. 15). Im Neutralisationversuch wurden gleiche TCID₅₀ von HIV-1 IIIBwt und IIIB 2F5mut in Gegenwart verschiedener Mengen 2F5 eingesetzt (Abb. 15A). Die HIV-1 IIIBwt Viren aus der Kontrollkultur werden durch 2F5 bereits bei relativ niedrigen Konzentrationen (1,6µg/ml) gehemmt. HIV-1 IIIB 2F5mut aus der Selektionkultur wird dagegen auch durch hohe Konzentrationen 2F5 (50µg/ml) nicht in der Replikation gehemmt. In Abwesenheit von 2F5 infizieren beide Virustypen gleich gut, d.h. die Infektiösität der Viruspartikel wird durch die *in vitro* Selektion nicht beeinflusst (Abb. 15A und B, rechte Säule).

In einem zweiten Ansatz wurde die Sensitivität von HIV-1 IIIBwt und HIV-1 IIIB 2F5mut gegenüber dem Fusionshemmer DP178 getestet (Abb. 15B). Die 2F5 selektionierte HIV-IIIB-Quasispezies zeigt gegenüber dem Fusionshemmer DP178 die gleiche Sensitivität wie das Wildtyp-Virus. Die *in vitro* Selektion bewirkt also nur eine spezifische Veränderung in der Neutralisierbarkeit der Viren durch 2F5. Um zu untersuchen, ob diese Veränderung auf eine oder mehrere Mutationen im *env*-Gen zurückzuführen ist, wurde die gereinigte, genomische DNA der wöchentlich entnommenen Zellproben mit *env*-spezifischen Primern (siehe Anhang II) sequenziert.

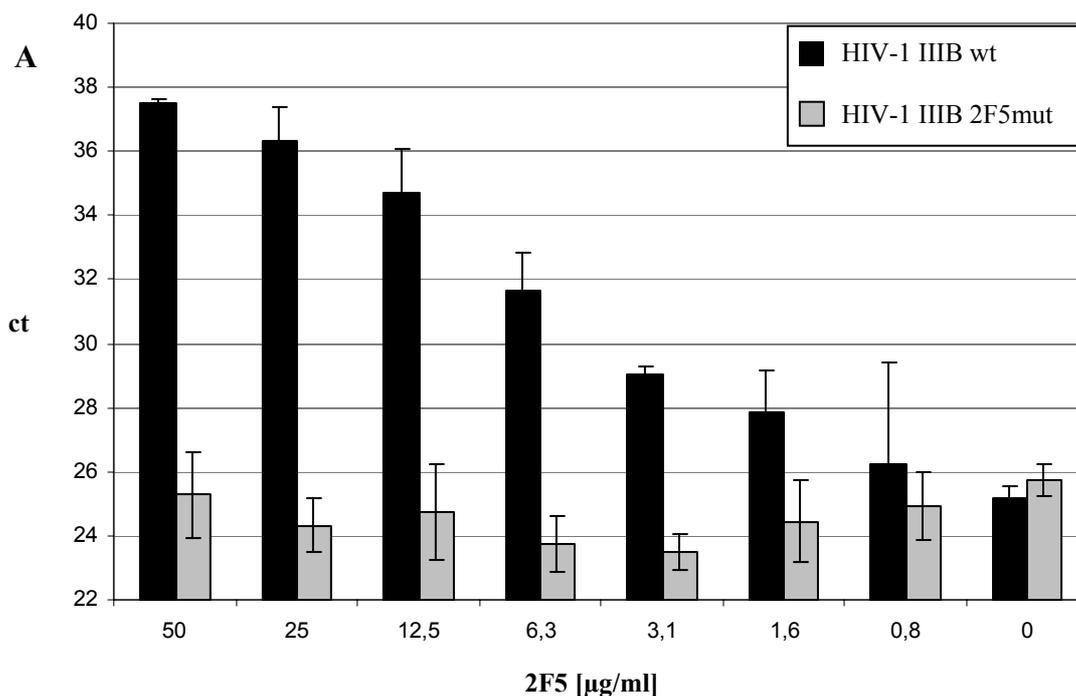


Abb.15A: Wirkung von 2F5 auf die Infektion von C8166 durch HIV-1 IIBwt und HIV-1 IIB 2F5mut. Titration von 2F5 auf HIV-1 IIBwt (schwarze Säule) und HIV-1 IIB 2F5mut (graue Säule) infizierten C8166. Es wurden 5×10^6 Zellen/well ausgesät und mit $2,5 \times 10^2$ TCID₅₀ Virus/well infiziert. Die Zellen wurden 65h inkubiert. Die Verdünnungsstufen von 2F5 sind gegen die ct-Werte aus der Realtime-PCR aufgetragen. Der ct-Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei der das Fluoreszenzsignal der eingesetzten Sonde über einen festgelegten Schwellenwert steigt. Ein hoher ct-Wert zeigt also eine geringe Provirusmenge an. Alle Werte sind als Triplikate gemessen worden.

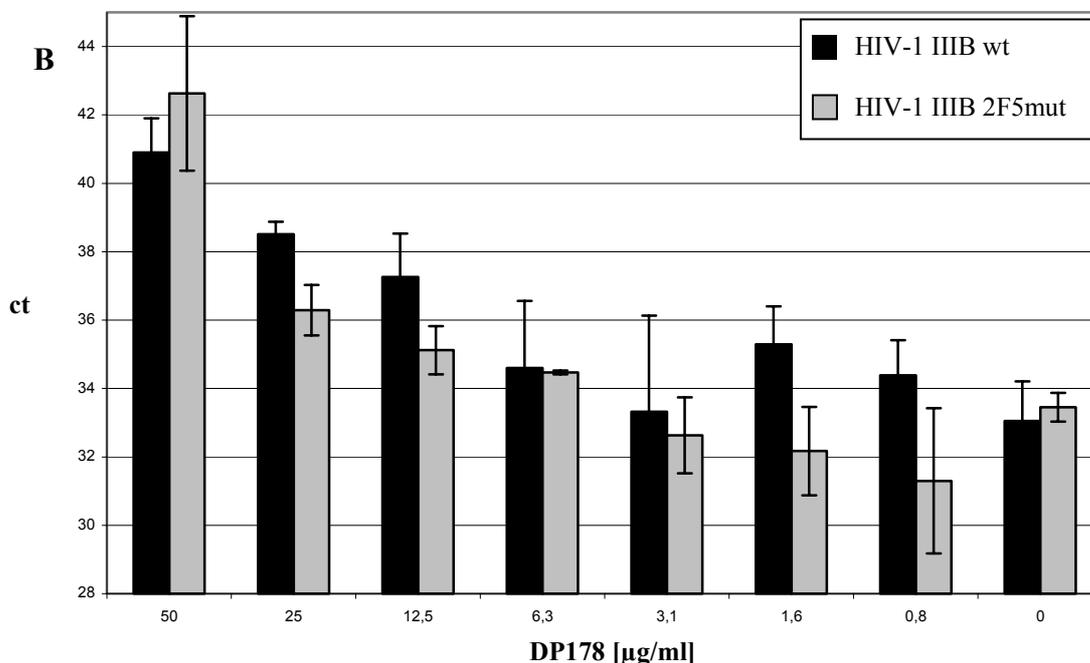


Abb.15B: Wirkung von DP178 auf die Infektion von C8166 durch HIV-1 IIBwt und HIV-1 IIB 2F5mut. Titration von DP178 auf HIV-1 IIBwt (schwarze Säule) und HIV-1 IIB 2F5mut (graue Säule) infizierten C8166. Es wurden 5×10^6 Zellen/well ausgesät und mit $2,5 \times 10^2$ TCID₅₀ Virus/well infiziert. Die Zellen wurden 48h inkubiert. Die Verdünnungsstufen von DP178 sind gegen die ct-Werte aus der Realtime-PCR aufgetragen. Ein hoher ct-Wert zeigt eine geringe Provirusmenge an. Alle Werte sind als Triplikate gemessen worden.

3.1.3.3 2F5 induzierte *in vitro* Aminosäuresubstitutionen in der Sequenz ELDKWA durch Punktmutationen

In den ersten vier Wochen der *in vitro* Selektion mit 2F5 wurden in der Selektionskultur deutlich weniger Syncytien beobachtet als in der mitgeführten Kontrollkultur ohne 2F5. In der Selektionskultur fanden also in Gegenwart von 0,3µg/ml 2F5 weniger neue Infektionen statt als in der 2F5-freien Kontrollkultur, weil die Bildung der Syncytien mit der Replikation von X4-tropen Viren *in vitro* korreliert. In den folgenden Wochen waren mikroskopisch keine Unterschiede zwischen Selektions- und Kontrollkultur auszumachen. Um zu überprüfen, ob es Mutationen gegeben hatte, die zur Bildung einer 2F5 Resistenz führen, wurden die wöchentlich entnommenen Zellproben lysiert und das gesamte provirale gp41 sequenziert (Abb. 16).

AS 649	723
Selektionswoche:	
Woche 0: SQNQOEKNEQELLE ELDKWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS V VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 1 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDKWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS V VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 2 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDKWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS V VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 3 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDKWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLS V VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 4 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 5 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 6 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 7 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 8 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	
Woche 9 (+2F5): SQNQOEKNEQELLE ELDEWA SLWNWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAILS I VNRVRQGYSPFSFQTHLPI	

Abb.16: Sequenzvergleich eines Teils des translatierten, proviralen *env*-Gens von HIV-1 IIIB zu verschiedenen Zeitpunkten der *in vitro* Selektion mit 2F5. Gezeigt sind die AS 649-723 des HIV-1 HXB2 Referenzgenoms. Die Sequenzierungs-PCR wurde mit den Primern 31 und 32 (siehe Anhang II) durchgeführt. Auf Basis jeder Zellprobe wurden fünf Sequenzierungs-PCRs durchgeführt, die jeweils die gleiche Sequenz ergaben

Der Aminosäureaustausch an Position 665 (Lysin zu Glutaminsäure) ist neben dem konservativen Austausch an Position 704 (im Transmembrandurchgang) die einzige Veränderung im gesamten gp41 im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Diese Substitution ist also hinreichend zur Bildung einer Resistenz gegenüber dem neutralisierenden Antikörper 2F5 (Abb. 15A), der diese Sequenz nicht mehr binden kann (Abb. 14A). Die selektionierte Quasispezies HIV-1 IIIB 2F5mut ist in ihrer Replikation und ihre Sensitivität gegenüber DP178 infolge des Aminosäureaustausches nicht beeinträchtigt (Abb. 14 und 15). In einem zweiten Selektionsversuch mit den gleichen Versuchsbedingungen wurde nach vier Wochen ein Aminosäureaustausch an Position 664 induziert (Asparaginsäure zu Asparagin). Bei diesem Selektionsversuch traten keine weiteren Aminosäureaustausche in der gp41-Sequenz auf. Der positive Selektionsdruck durch 2F5 wirkt also nur auf die zentralen zwei Aminosäuren (D (656) und K (657)) des 2F5-Epitops, also auf den Bereich, der für die Neutralisation des Virus durch 2F5 entscheidend ist (Parren et al., 1998). Für natürlich

vorkommende Primärisolate der HIV-1 Gruppe O sind die hier durch Mutation induzierten Sequenzen (ELDKWA zu ELDEWA bzw. ELNKWA) bereits beschrieben worden. Die Viren dieser Gruppe sind durch den monoklonalen Antikörper 2F5 nicht oder nur mit hohen Dosen neutralisierbar (Parren et al., 1998).

Um zu testen, wie sich höhere Konzentrationen 2F5 im *in vitro* Selektionsversuch auswirken, wurden HIV-1 IIIB infizierte C8166 in Gegenwart von 300µg/ml 2F5 über neun Wochen kultiviert. Die Zellen bildeten keine Syncytien aus und die Sequenz des proviralen gp41 wies auch nach neun Wochen keine Mutationen auf, die zu Aminosäureaustauschen geführt hätten. Bei diesen Konzentrationen von 2F5 werden vermutlich alle freien Viruspartikel neutralisiert, so dass nur die zu Beginn der Selektion bereits vorhandene Proviren aus proliferierenden C8166-Zellen sequenziert wurden.

Auf der Grundlage der *in vitro* Selektionsversuche lassen sich keine Aussagen bezüglich weiterer Sequenzen treffen, die zur verstärkten Bindung von 2F5 an ELDKWA beitragen, die in der Western Blot Analyse und im ELISA gezeigt wurde (Abb. 11), da neben den Punktmutationen im 2F5-Epitop keine weiteren Aminosäuren der Ektodomäne von gp41 infolge des ausgeübten Selektionsdruckes ausgetauscht wurden.

3.1.4 Identifizierung einer Sequenz innerhalb der Ektodomäne von gp41, die die Bindung von 2F5 an ELDKWA unterstützt

Der in Abbildung 11 gezeigte Western Blot lässt vermuten, dass es in der Ektodomäne von gp41 Sequenzen gibt, die die Bindung von 2F5 an ELDKWA steigern, und dass diese Sequenzen außerhalb des DP178 im N-terminalen Bereich der Ektodomäne liegen.

Mit einer überlappenden Peptidbibliothek, die die gesamte Aminosäuresequenz von gp160 umfasst, wurden ELISA-Bindungsstudien mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 durchgeführt (Abb. 17, 18 und 19). In Abbildung 17 sind nur die Bindungsstudien mit den Peptiden P6336 bis P6355 gezeigt, die den gesamten N-terminalen Bereich (AS 507-598) überspannen. In der Western Blot Analyse und im ELISA war bereits gezeigt worden, dass eine mögliche stabilisierende Sequenz, die zur gesteigerten Bindung von 2F5 an die Sequenz ELDKWA führt, außerhalb des DP178 (AS 638-673), also vermutlich im N-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41 liegen muss.

Die Peptidbibliothek wurde vom laboradaptierten HIV-1 Isolat MN abgeleitet und besteht aus 15meren Peptiden, die von Peptid zu Peptid um elf Aminosäuren überlappen. Dabei wurden die einzelnen Peptide in Kombination mit DP178 als Antigen eingesetzt. 2F5 wurde in verschiedenen Konzentrationen Harnstoff verdünnt, wobei die DP178-Konzentration mit 50ng/well so gewählt wurde, dass eine vollständige Absättigung des Antikörpers durch Bindung an DP178 allein ausgeschlossen war (Abb. 17 und 19). Nur das Peptid P6342 (AS 532-546, AASVTLTVQARQLLS) führte bei allen gewählten Harnstoffkonzentrationen zur Steigerung der Bindung von 2F5 an DP178 (etwa um Faktor 2, Abb. 17), während kein anderes Peptid aus dem gesamten gp160-Peptidset eine solche steigernde Wirkung zeigt.

Um auszuschließen, dass der Effekt durch direkte Wechselwirkung von 2F5 mit P6342 oder durch Kooperation von P6342 mit anderen Sequenzen des DP178 außer ELDKWA entsteht, wurde ein zweiter ELISA durchgeführt (Abb. 18). Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass P6342 die Bindung von 2F5 an ein Peptid (P6373, AS 656-670), das die Sequenz ELDKWA beinhaltet, spezifisch steigert. Weder P6342 noch das ELDKWA-deletierte DP178 Δ reagieren mit 2F5 im ELISA.

OD 492/620nm

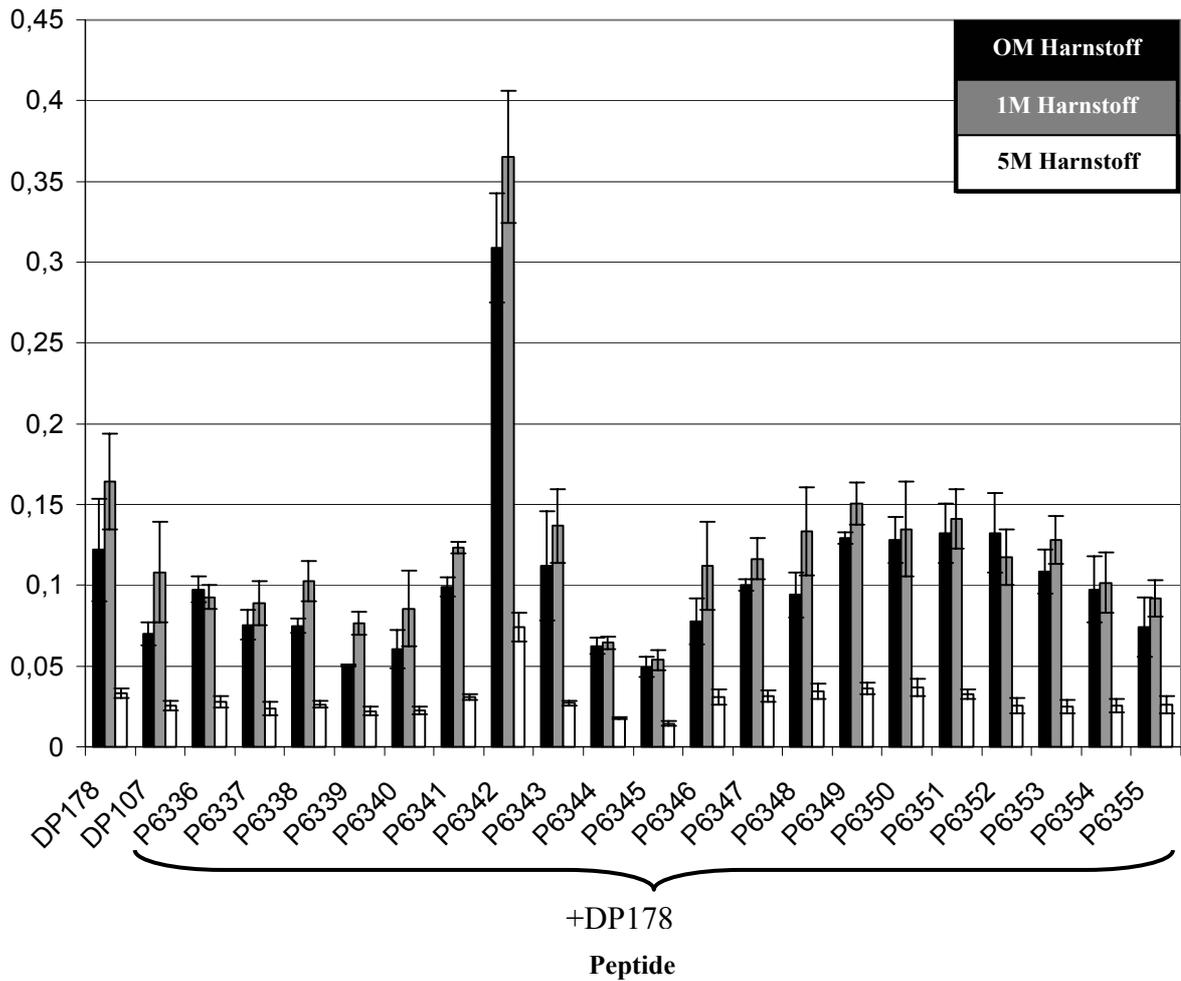


Abb.17 Steigerung der Bindung von 2F5 an DP178 im ELISA durch ein Peptid aus der N-terminalen Region der Ecotodomäne von gp41. Es wurden je 50ng DP178 und 50µg Peptid/well bzw. 50ng DP107 adsorbiert. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2µg/ml (Reaktion in 0M, 1M und 5M Harnstoff) eingesetzt. Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 492nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm gemessen. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Aus den gemessenen Extinktionen (Abb. 18) lässt sich der Aviditätsindex (Hedman und Rousseau, 1989) für die Bindung von 2F5 an P6373 und an P6373 in Kombination mit P6342 nach folgender Formel errechnen:

$$(\text{Extinktion bei 1M Harnstoff}/\text{Extinktion bei 0M Harnstoff}) \times 100 = \text{Aviditätsindex [\%]}$$

Der Aviditätsindex für die Bindung von 2F5 an P6373 beträgt 27,2%, der für die Bindung von 2F5 an P6373 und P6342 86,94%. Es liegt also eine Steigerung des Aviditätsindex von fast 60% vor.

OD 492/620nm

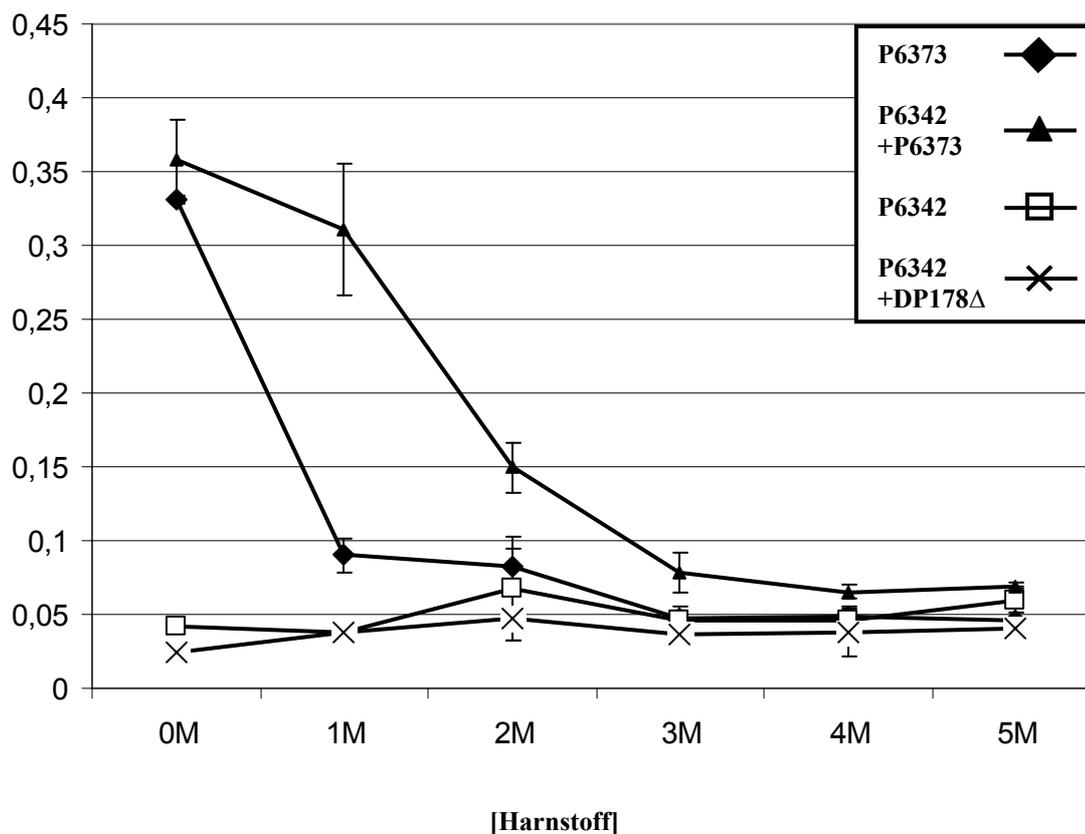
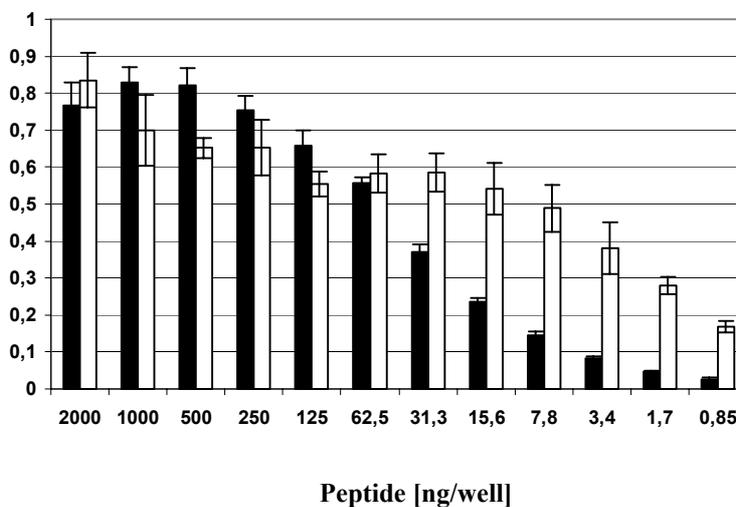


Abb.18: Bindung von 2F5 an P6342, P6373 und DP178Δ im ELISA unter verschiedenen Harnstoffkonzentrationen. 2F5 [0,2μg/ml] bindet bei einer Konzentration von 1M Harnstoff nicht an P6342 und DP178Δ (AS 643-661). DP178Δ fehlt die Sequenz ELDKWA und die C-terminal davon gelegenen Aminosäuren. Die Bindung von 2F5 an P6373 (enthält ELDKWA) wird durch das Peptid P6342 deutlich gesteigert. Dieser Effekt ist bei 4M Harnstoff noch zu beobachten. Die Peptide wurden je in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt (100ng P6342 bzw. P6373, 250ng DP178Δ). Alle Mittelwerte wurden aus den Triplikaten von zwei Versuchen berechnet.

OD 492/620nm

Abb.19: Titration von DP178 und P6373. DP178 (schwarze Säule) und P6373 (weiße Säule) wurden ausgehend von 2μg/well in 1:2 Verdünnungen auf einer ELISA-Platte adsorbiert. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2μg/ml eingesetzt. Aufgetragen ist die Peptidmenge-Menge pro well gegen die Absorption. Die Mittelwerte wurden aus je vier Einzelwerten berechnet.



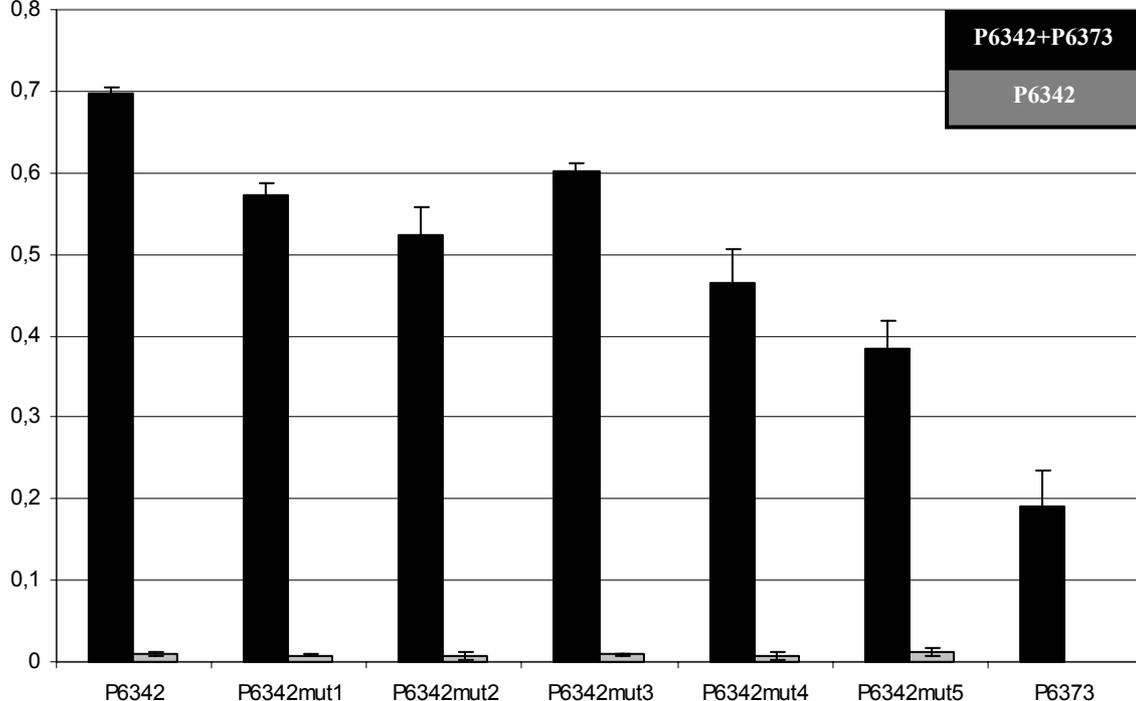
3.1.5 Einfluss von Aminosäureaustauschen im P6342 auf die Steigerung der Bindungsstärke von 2F5 an ELDKWA

Das Peptid P6342 bewirkte eine synergistische Steigerung der Bindung von 2F5 an ELDKWA. Die flankierenden Peptide zeigen diesen steigernden Effekt nicht, obwohl sie je elf Aminosäuren mit dem Peptide P6342 gemeinsam haben.

Um zu zeigen, welche Aminosäuren von P6342 für die Steigerung der Bindung verantwortlich sind, wurden Peptide verwendet, in denen je zwei aufeinanderfolgende Aminosäuren durch Alanin substituiert wurden. Da die flankierenden Peptide P6341 und P6343 keine steigernde Wirkung auf die Bindung von 2F5 an das Peptid P6373 gezeigt haben, wurden nur Substitutionen im zentralen Bereich von P6342 durchgeführt. Der ELISA wurde analog zu den vorangegangenen Bindungsstudien durchgeführt (Abb. 20).

A

Absorption
492/560nm
0,8



B

Peptide	Sequenz	Wirkung
P6342:	AASVTLTVQARLLLS	100 %
P6342mut1:	AA AA TLTVQARLLLS	75,6 %
P6342mut2:	AASV AA TVQARLLLS	66,2 %
P6342mut3:	AASVTL AA QARLLLS	81,6 %
P6342mut4:	AASVTLTV AA RLLLS	54,3 %
P6342mut5:	AASVTLTVQA AA LLS	38,5 %

Abb.20: Einfluß von Alanindoppelsubstitutionen in P6342 auf die Bindungsstärke von 2F5 an P6373 im ELISA. A) Es wurden je 100ng P6342 (bzw. die davon abgeleiteten, mutierten Peptide) und 50ng P6373 pro well adsorbiert. 2F5 wurde in 1M Harnstoff in einer Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen. B) Sequenz der eingesetzten P6342-Mutanten. Die eingebrachten Alanine sind rot markiert. In der dritten Spalte ist der Effekt auf die 2F5-Bindungsstärke (in %, relativ zur Wirkung des Wildtyp-P6342) nach Abzug des Effekts von P6373 aufgetragen.

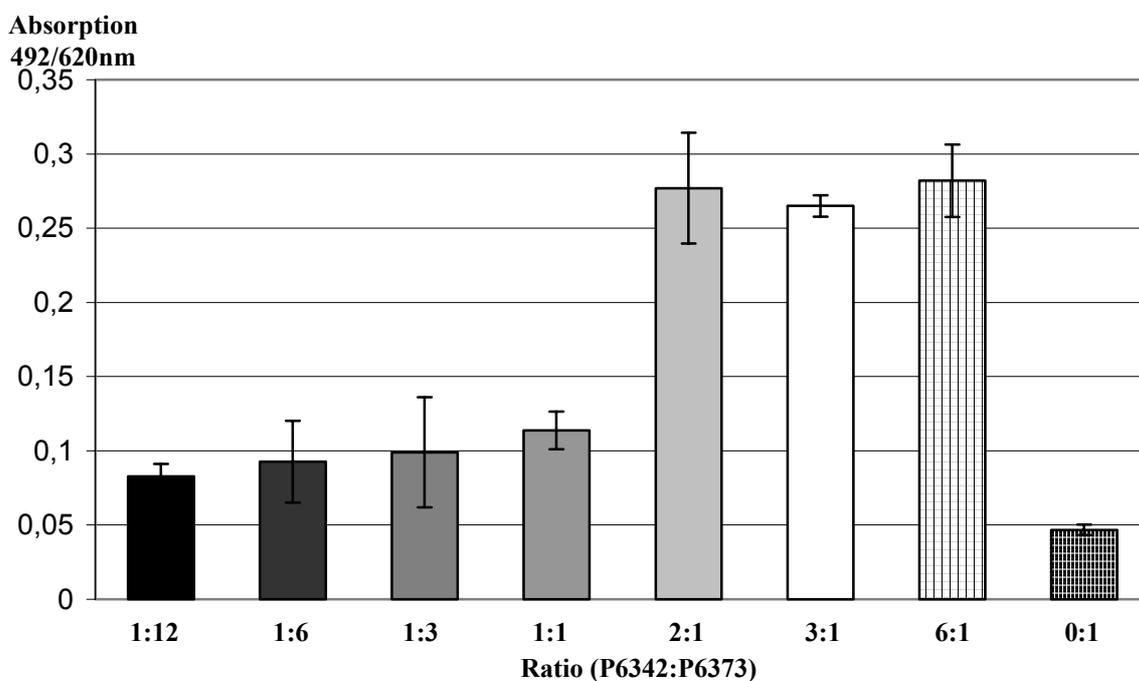
Bei allen mutierten P6342-Peptiden lässt sich im ELISA eine Abschwächung der Bindungsstärke von 2F5 an P6373 feststellen. Die Austausch an den Positionen 542 und 543

(P6342mut5) zeigen den stärksten Effekt auf die Wirkung des P6342 im ELISA. Diese Mutante besitzt nur noch 38,5% der Wirkung des Wildtyp P6342. Die gesteigerte Bindung von 2F5 an das Peptid P6373 in Gegenwart von P6342 beruht also auf mehreren Aminosäuren, die über das Peptid verteilt sind.

3.1.6 Auswirkungen des stöchiometrischen Verhältnisses von P6342 und P6373 auf die Bindung von 2F5 an ELDKWA

Im Oberflächen-Transmembran-Komplex von HIV-1 liegt gp41 als Trimer vor, bestehend aus drei zentral angeordneten N-terminale Helices, um die sich drei C-terminale Helices gruppieren (siehe Kapitel 1.4.3.2). Um zu überprüfen, inwieweit diese multimeren Strukturen eine Bedeutung für die optimale Präsentation der Sequenz ELDKWA bei der Bindung durch 2F5 haben, wurden unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse von P6342 und P6373 im ELISA getestet.

Im ELISA wurden nur ganzzahlige, molare Verhältnisse, von einem Überschuß an P6373 bis zu einem Überschuß an P6342, verwendet (Abb. 21).



Legende	P6342 : P6373 Ratio	Peptidmengen P6342 : P6373 [ng/well]
●	1:12	8 : 100
●	1:3	33,3 : 100
●	1:2	50 : 100
●	1:1	100 : 100
●	2:1	200 : 100
○	3:1	300 : 100
⊕	6:1	600 : 100
⊕	0:1	0 : 100

Abb. 21: Auswirkungen des stöchiometrischen Verhältnisses von P6342 und P6373 auf die Bindung von 2F5 an ELDKWA. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2µg/ml (Reaktion in 1M Harnstoff) eingesetzt. P6373 wurde in einer Konzentration von 100ng/well eingesetzt, die Menge von P6342 wurde im gewünschten Verhältnis dazugegeben. Die Legende zeigt die eingesetzten Peptidmengen pro well. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Bis zu einem P6342:P6373-Verhältnis von 1:1 ist keine deutliche Steigerung der Bindung von 2F5 an ELDKWA im Vergleich zum 1:12 Verhältnis auszumachen. Ab einem Verhältnis von 2:1 steigt die Bindung sprunghaft an und lässt sich durch weitere Zugabe von P6342 nicht steigern. 2F5 bindet also in diesem System mit der stärksten Avidität an eine Sequenz ELDKWA, deren Konformation durch zwei Peptide P6342 stabilisiert wird.

3.1.7 Hemmung der virusneutralisierenden Aktivität von 2F5 durch die Peptide P6342 und P6373

Die Avidität eines Antikörpers an sein Epitop ist mitbestimmend für sein neutralisierendes Potential. Im ELISA konnte unter stringenten Bedingungen gezeigt werden, dass die Avidität von 2F5 an ELDKWA durch eine zweite Sequenz deutlich gesteigert werden kann (Abb. 18). Durch einen *in vitro* Neutralisierungstest sollte überprüft werden, ob die im ELISA beobachtete verstärkte Bindung von 2F5 an die Sequenz ELDKWA durch das Peptid P6342 auch zu einer gesteigerten Neutralisationshemmung führt.

Dazu wurden C8166-Zellen mit HIV-1 IIIB in Gegenwart von 2F5, P6342 und P6373 infiziert. Mit einer *env*-Gen-spezifischen Realtime-PCR wurde die Integration von HIV-1 IIIB Provirus in die genomische DNA der C8166-Zellen gemessen (Abb. 22).

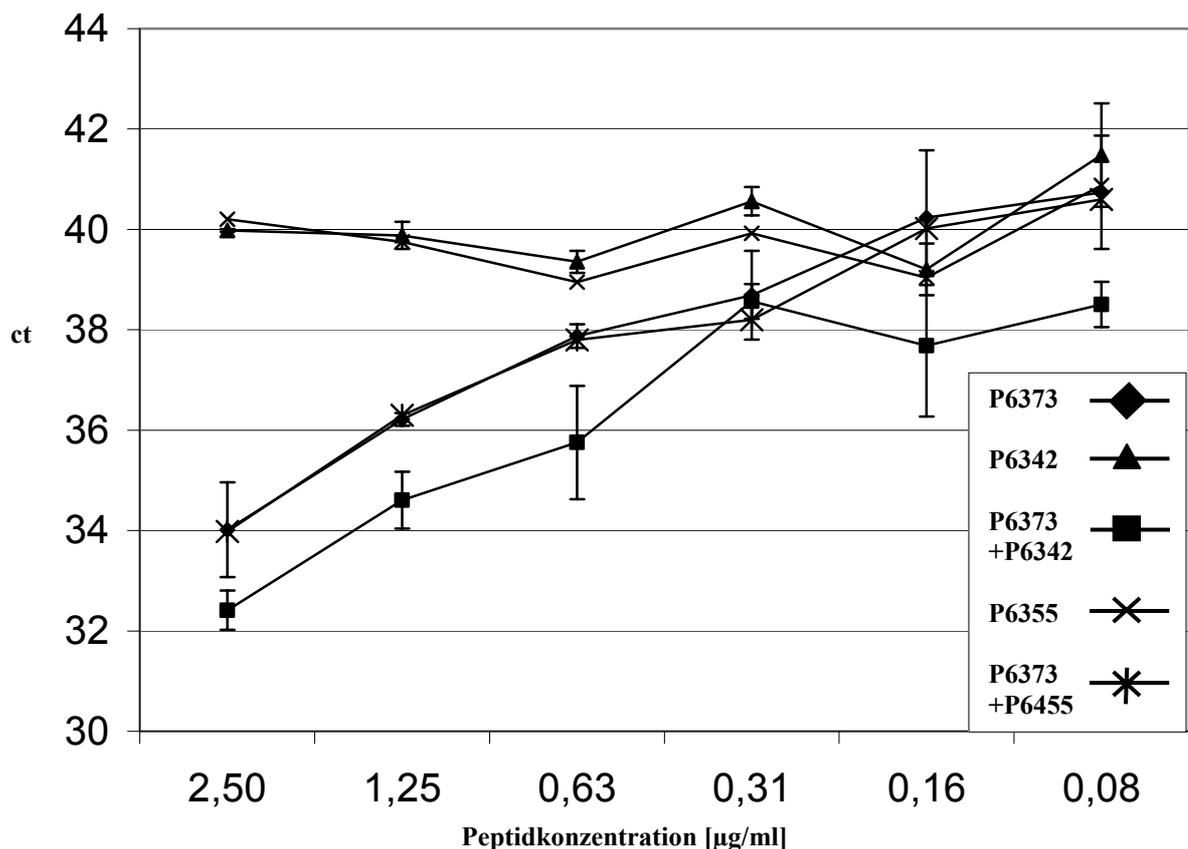


Abb.22: Hemmung der Neutralisation der HIV-1 IIIB Replikation auf C8166-Zellen durch 2F5 mit den Peptiden P6342 und P6373. Es wurden 5×10^4 C8166 pro well ausgesät und mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB infiziert. Die Peptide P6342 (Dreieck), P6373 (Raute), P6342+P6373 (Quadrat), P6355 (X) und P6373+P6355 (Stern) wurden in Gegenwart von 5µg/ml 2F5 titriert, Peptid 6355 wurde als Kontrolle einzeln und in Kombination mit P6373 mitgeführt. Die C8166-Zellen wurden nach 65h Inkubation lysiert. Die Peptidkonzentration wurde gegen den ct-Wert aufgetragen. Auf Basis des Lysats wurde eine Realtime-PCR durchgeführt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

P6342 beeinflusste die neutralisierende Wirkung von 2F5 nicht. Durch 2,5 µg/ml P6373 ergibt sich ein Δ ct von 6 im Vergleich zur Probe ohne Peptid, was einer Reduktion der Provirusmenge um den Faktor 64 entspricht. Durch die Kombination von P6342 und P6373 lässt sich der Δ ct um weitere ein bis zwei Einheiten erhöhen, was einer zusätzlichen Reduktion der Provirusmenge von 50-75% entspricht. Da hier der Einsatz von denaturierenden Agenzien wie Harnstoff wie in den ELISA-Bindungsstudien nicht möglich war, war die Steigerung der Bindungsstärke von 2F5 an P6373 und die daraus resultierende, gesteigerte Neutralisationswirkung weniger deutlich.

3.1.8 Gesteigerte Virusneutralisation durch Vorinkubation von 2F5 und HIV-1 IIB im *in vitro* Neutralisationsversuch

Um zu zeigen, zu welchem Zeitpunkt der Infektion der virusneutralisierende Antikörper 2F5 an das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 bindet, wurden HIV-1 IIB und 2F5 vorinkubiert. Die Neutralisationswirkung von 2F5 wurde dazu in Abhängigkeit von der Vorinkubationszeit im *in vitro* Neutralisationstest gemessen. Damit sollte gezeigt werden, ob auf den freien Viruspartikeln das 2F5-Epitop für die Bindung durch den Antikörper zugänglich ist und damit eine zeitabhängige Steigerung der Neutralisationswirkung zu beobachten ist.

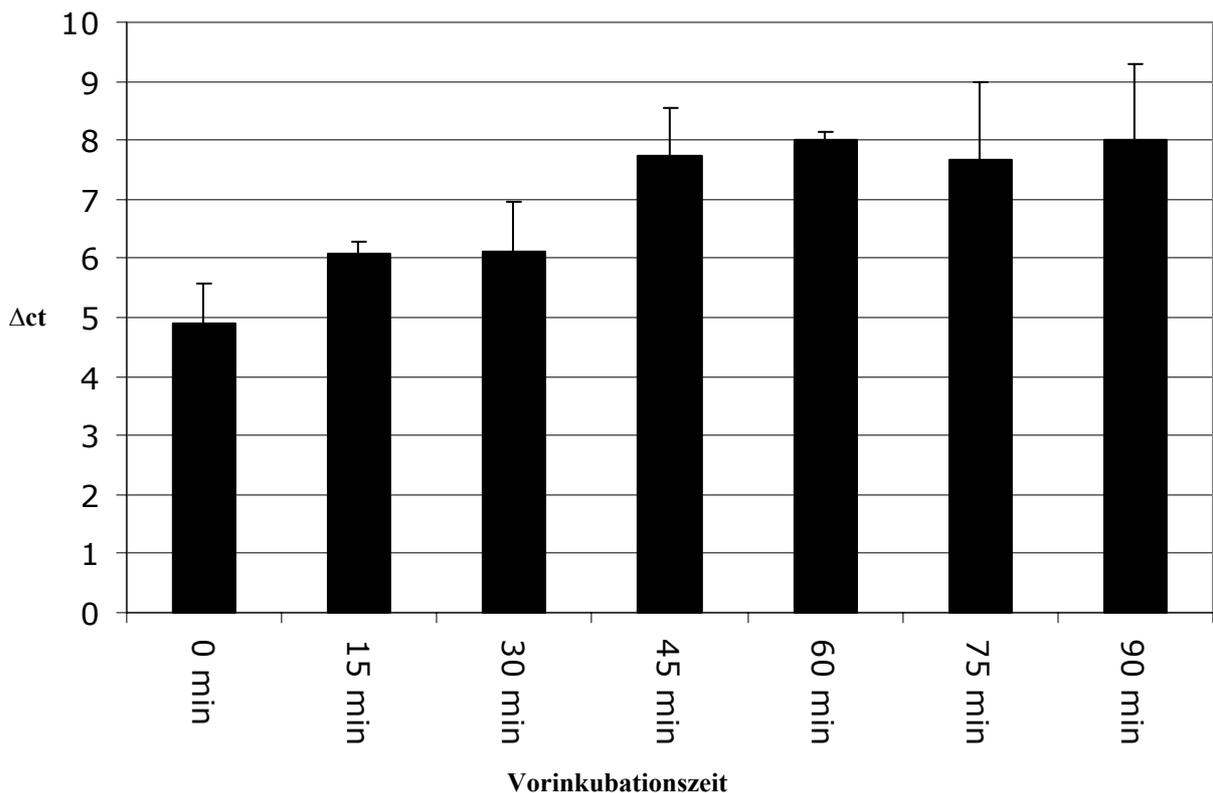


Abb.23: Vorinkubation von HIV-1 IIB und 2F5 im *in vitro* Neutralisationsversuch. 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIB wurden mit und ohne 20 µg/ml 2F5 bei 37°C inkubiert. In Abständen von 15 min wurde das Virus-Antikörpergemisch bzw. der Antikörper-freie Virus-Kontrollansatz auf C8166-Zellen (5×10^5 pro well) übertragen. Das Balkendiagramm zeigt die Δ ct-Werte, die sich durch Subtraktion der ct-Werte der Proben ohne 2F5 von den Proben mit 2F5 des jeweiligen Abnahmzeitpunktes ergeben. Alle Mittelwerte wurden aus je vier Einzelwerten von zwei getrennten Versuchen berechnet.

Die HIV-neutralisierende Wirkung von 2F5 nimmt in Abhängigkeit von der Länge der Vorinkubation von Virus und Antikörper deutlich zu (Abb. 23). Dabei steigt der Δ ct-Wert in der Realtime-PCR zwischen den Proben ohne 2F5 und denen mit 2F5 von 4,5 (ohne Vorinkubation) auf 8-Einheiten (45-90min Vorinkubation), was einer zusätzlichen Reduktion der Virusmenge um Faktor 16-64 bedeutet. Ab einer Vorinkubationszeit von 45min steigt der Δ ct-Wert nicht mehr an. Das bedeutet, alle Bindungsstellen für 2F5 sind ab diesem Zeitpunkt gesättigt. Das Epitop des HIV-neutralisierenden Antikörpers 2F5 ist also auf dem nativen HIV-1 IIIB-Partikel bedingt zugänglich und erlaubt eine Bindung des Antikörpers vor der Anlagerung des Virus an die Zielzelle, wobei die Sättigung dieser Vorinkubationswirkung mit 45min einen relativ langen Zeitraum in Anspruch nimmt.

3.1.9 Gp41 auf der Oberfläche HIV-1 infizierter Zellen und Syncytien wurde durch 2F5 gebunden

Das Epitop von 2F5 ist im intakten Oberflächen-Transmembrankomplex nur bedingt zugänglich für den Antikörper. Das hat der *in vitro* Neutralisationstests mit 2F5-vorinkubierten HIV-1 IIIB gezeigt, bei denen die vollständige Absättigung des Epitops mit Antikörper erst nach 45min erfolgt (Abb. 23).

Um zu zeigen ob 2F5 an das gp41 auf der Oberfläche von infizierten C8166-Zellen binden kann, wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abb. 24). 2F5 bindet auf der Oberfläche von Syncytien und infizierten nicht permeabilisierten Zellen (Abb. 24A und B). Das 2F5-Epitop liegt also im gp41, das in die Membran infizierter Lymphozyten eingelagert ist, für den Antikörper zugänglich vor.

Um zu zeigen, ob 2F5 auch gp41 auf Oberfläche von freien Viruspartikeln erkennt wurden zusätzlich Immuno-Gold-Färbungen von HIV-1 IIIB infizierten C8166 durchgeführt. Von diesen wurden hoch auflösende raster- und transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt (Abb. 25 und 26).

In den rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich durch Detektion der Rückstreuungselektronen eine deutlich stärkere Anlagerung der Goldpartikel auf den HIV-1-IIIB infizierten C8166-Zellen und den Viruspartikeln zeigen (Abb. 25A und B), als auf den nicht infizierten C8166-Zellen (Abb. 25C und D). Es sind jedoch nicht alle Viruspartikel mit Gold beladen.

In der TEM-Aufnahme zeigt sich die schwache Beladung der Viruspartikel mit Gold aufgrund der geringen Schnittdicke des Präparats (60nm) noch deutlicher (Abb. 26). 2F5 bindet folglich relativ schwach auf der Oberfläche der HIV-1 IIIB-Partikel und der infizierten C8166.

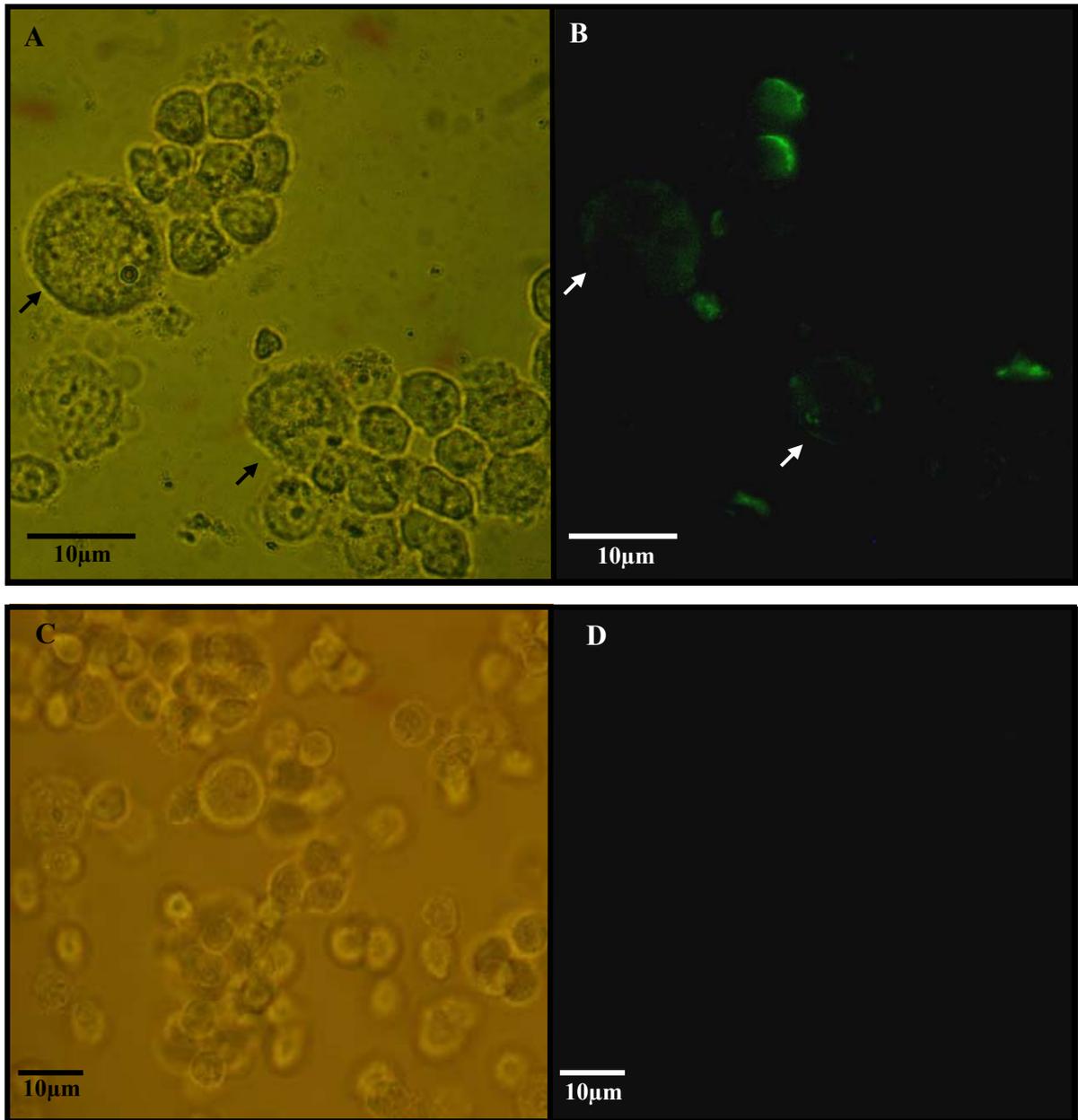


Abb.24 A und B: Durchlicht- und Immunfluoreszenzaufnahmen von HIV-1 III B-infizierten C8166. A und B) 2×10^6 C8166 wurden mit 4×10^6 TCID₅₀ HIV-1 III B infiziert und 96h inkubiert. 2F5 wurde in einer Konzentration von 1 μg/ml eingesetzt, der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 0,5 μg/ml eingesetzt. Die Durchlichtaufnahme (A) wurde 1/100s belichtet die Fluoreszenzaufnahme (B) 2s. Die Pfeile markieren Syncytien. **C und D: Durchlicht- und Immunfluoreszenzaufnahmen von uninfizierten C8166.** C und D) 2×10^6 C8166-Zellen wurden mit 1 μg/ml 2F5 inkubiert, der Sekundärantikörper wurde in einer Konzentration von 0,5 μg/ml eingesetzt. Die Durchlichtaufnahme (C) wurde 1/100s belichtet die Fluoreszenzaufnahme (D) 2s.

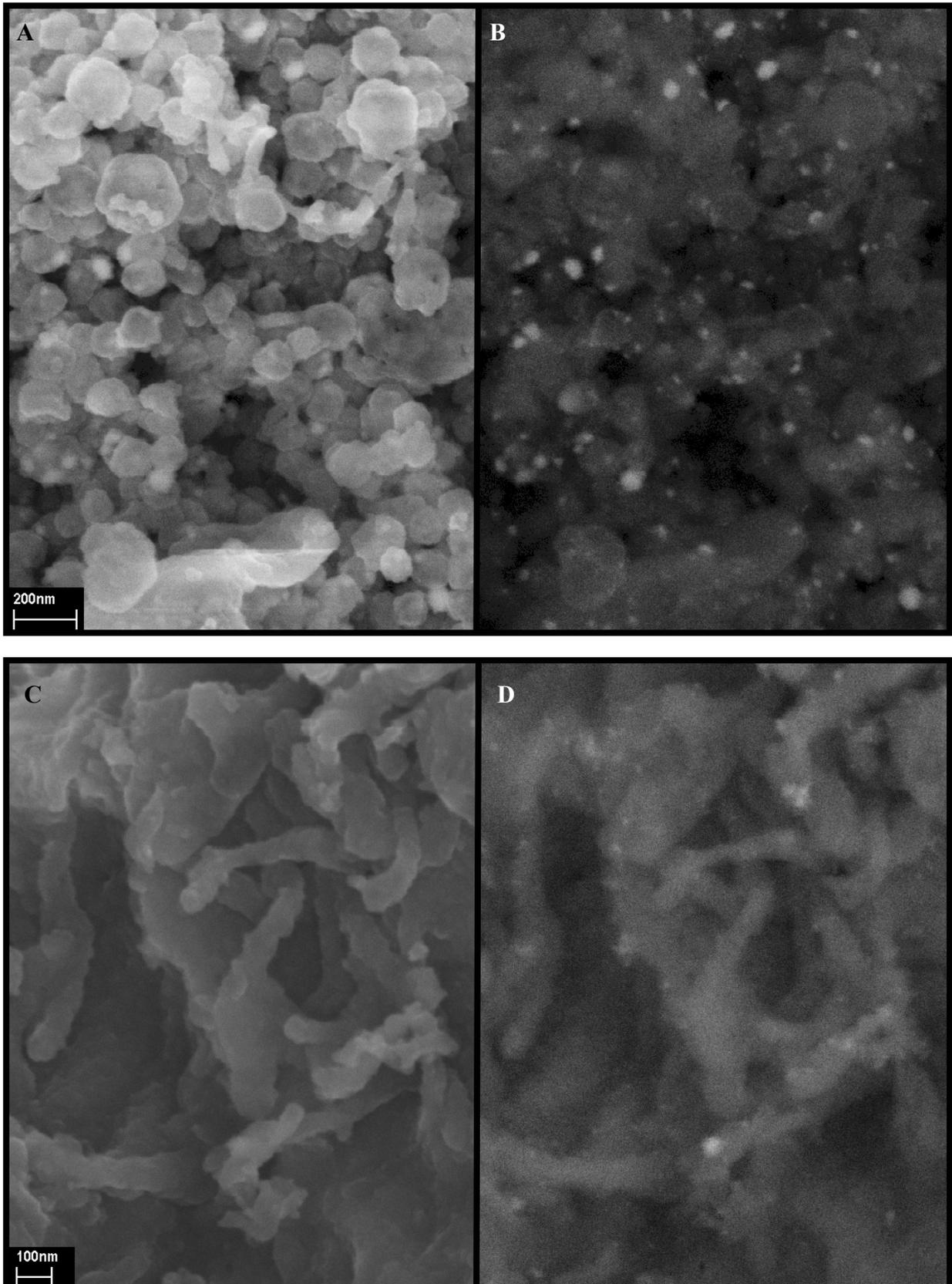


Abb. 25: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von HIV-1-IIIB infizierten und uninfizierten C8166 nach Immuno-Gold-Färbung: A) Topographische Aufnahme (Detektion von Sekundärelektronen) von HIV-1-IIIB infizierten C8166-Zellen nach Immuno-Gold-Färbung mit 10 μ g/ml 2F5 und 0,5 μ g/ml Anti-Human-IgG-10nm-Goldkonjugat. B) Durch die Detektion von Rückstreuelektronen des gleichen Präparats wie unter (A) abgebildet werden die Goldpartikel kontrastreicher dargestellt. C) Uninfizierte C8166-Zellen nach Immunogoldfärbung mit 10 μ g/ml 2F5 und 0,5 μ g/ml Anti-Human-IgG-10nm-Goldkonjugat. D) Durch die Detektion von Rückstreuelektronen des gleichen Präparats wie unter (C) abgebildet werden die Goldpartikel kontrastreicher dargestellt. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Gruppe von Dr. M. Özel, RKI angefertigt.

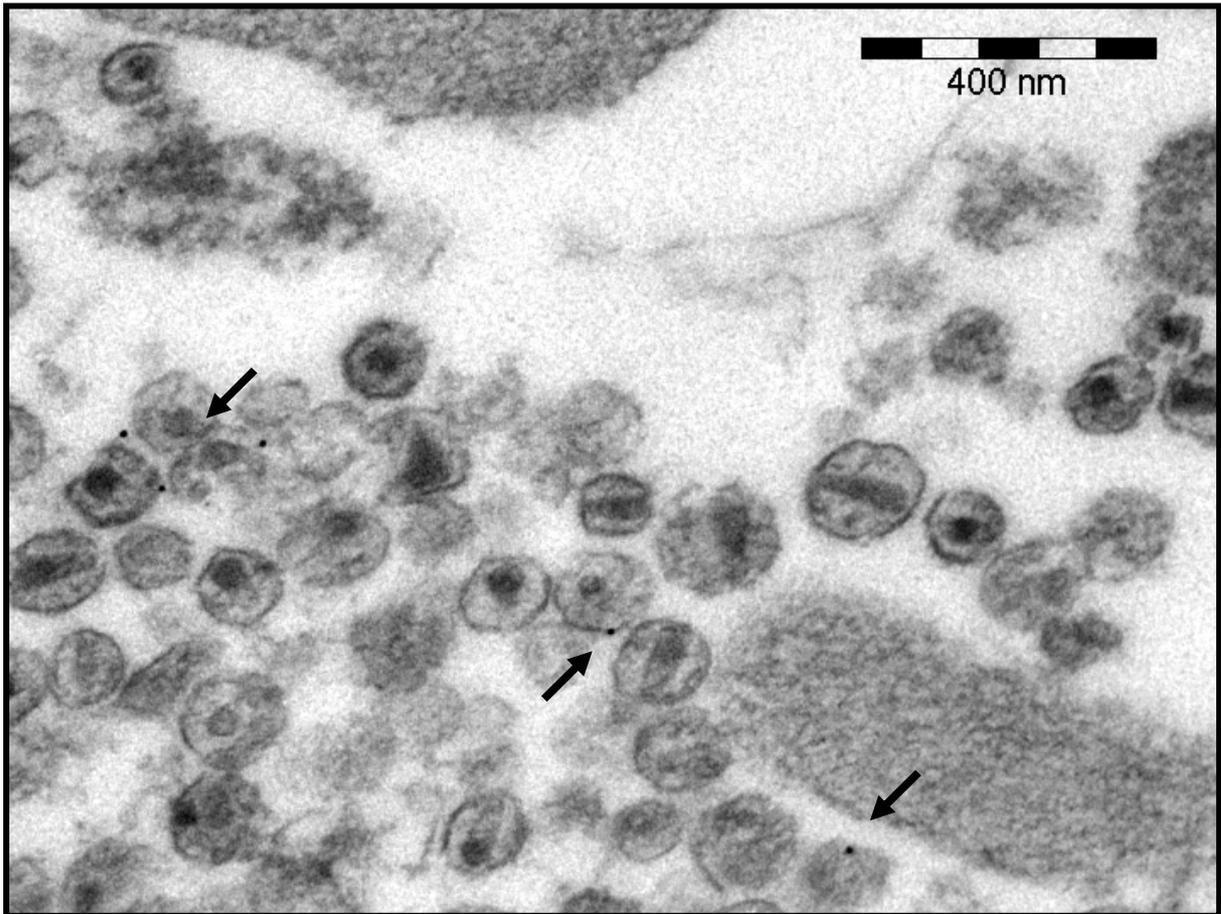


Abb.26: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes von HIV-1-IIIB infizierten C8166 nach Immuno-Gold-Färbung: Die Pfeile markieren die elektronendichten 10nm-Goldpartikel, die über 2F5 und Anti-Human-IgG an das gp41 auf der Oberfläche der Viren gebunden sind. Die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Gruppe von Dr. M. Özel, RKI angefertigt.

Zusammenfassend zeigen die Bindungsstudien mit dem virusneutralisierenden Antikörper 2F5, dass es neben dem bereits veröffentlichten linearen Epitop ELDKWA eine stabilisierende Sequenz im N-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41 gibt, die zu einer gesteigerten Bindung von 2F5 an das lineare Epitop führt, wobei ein durch 2F5 ausgeübter Selektionsdruck nur auf die Sequenz ELDKWA wirkt.

Diese Steigerung zeigt sich im ELISA besonders deutlich bei einem zweifachen stöchiometrischen Überschuss der stabilisierenden Peptide.

Im *in vitro* Neutralisationstest konnte gezeigt werden, dass die kompetitive Hemmung der Neutralisationswirkung von 2F5 durch ein Peptid, das das lineare Epitop ELDKWA enthält, in Anwesenheit von Peptiden, die von der stabilisierenden Sequenz abgeleitet wurden, gesteigert ist. Durch die Vorinkubation von Virus und 2F5 im *in vitro* Neutralisationstest und in immunfluoreszenz- und elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass 2F5 auf freien Viruspartikeln und auf der Oberfläche von infizierten Zellen bindet.

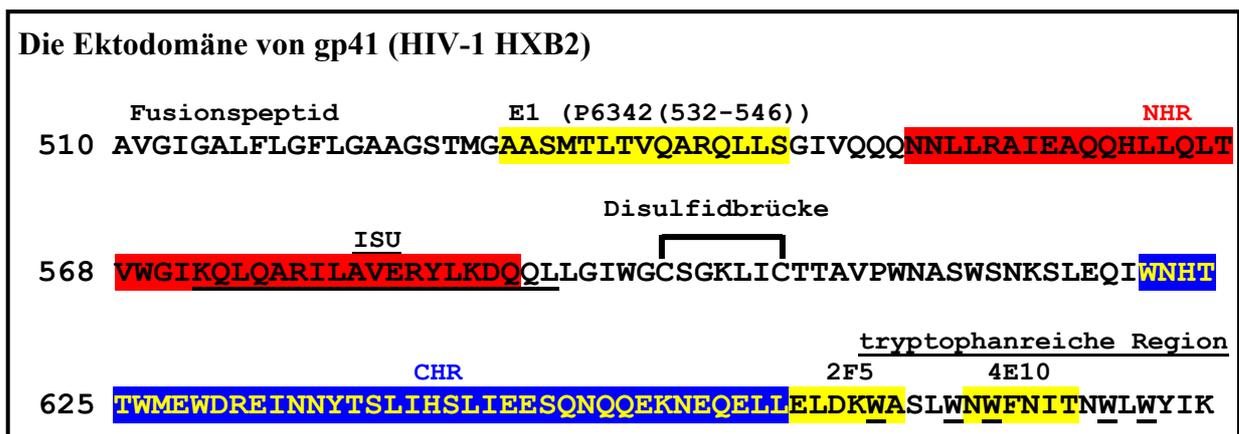
3.2 Entwicklung und Produktion von rekombinanten Antigenkonstrukten zur Induktion von gp41-spezifischen, virusneutralisierenden Antikörpern im Versuchstiermodell

Auf Basis der Ergebnisse aus den Bindungsstudien mit 2F5 sollten rekombinante Antigenkonstrukte entwickelt und im Ratten- und Ziegenmodell auf die Induktion von HIV-1 gp41 spezifischen, virusneutralisierenden Seren getestet werden.

3.2.1 Rekombinante Antigene

3.2.1.1 Gp41-Antigene

Um die hier identifizierte stabilisierende Sequenz und das bereits beschriebene lineare Epitop in räumlicher Nähe zueinander in einem Antigen zu präsentieren, wurden zwei rekombinante Proteine entwickelt, die von der Ektodomäne des Molekularklons HIV-1 pNL4-3 abgeleitet waren, CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS. Beide enthalten die gleichen HIV-1 Sequenzen (AS 528-681, HXB2 Referenzgenom) und wurden wie beschrieben kloniert, exprimiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.5.5 und Anhang III) (Abb. 27 und 28). Abbildung 27 zeigt ein Schema von gp41 und die davon abgeleiteten rekombinanten Antigene CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS. Im Folgenden werden die zu P6342 analogen Sequenzen mit E1 bezeichnet.



CBP-rgp41 (AS 528-681):



rgp41-6xHIS (AS 528-681):



Abb.27: Schema der Ektodomäne von HIV-1 gp41 und der davon abgeleiteten rekombinanten Antigene CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS. Die funktionellen Domänen sind beschriftet und/oder farbig hervorgehoben, Fusionpeptid (FP), E1-Sequenz (gelb), N-terminale Helixregion (NHR, rot), immunsuppressive Domäne (ISU), immundominante Domäne (IDO), C-terminale Helixregion (CHR, blau). Die Epitope der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 sind gelb hervorgehoben. In den rekombinanten Antigenen sind die E1-Sequenz und die Epitope von 2F5 und 4E10 ebenfalls gelb unterlegt. Die Fusionsanteile (CBP bzw. His-tag) sind hellblau dargestellt. Die Aminosäuresequenz aller rekombinanten Antigene ist im Anhang III aufgeführt. Sequenzabweichungen zum Referenzisolat HXB2 entstehen, weil die Antigene vom HIV-1 Molekularklon pNL-4-3 abgeleitet wurden.

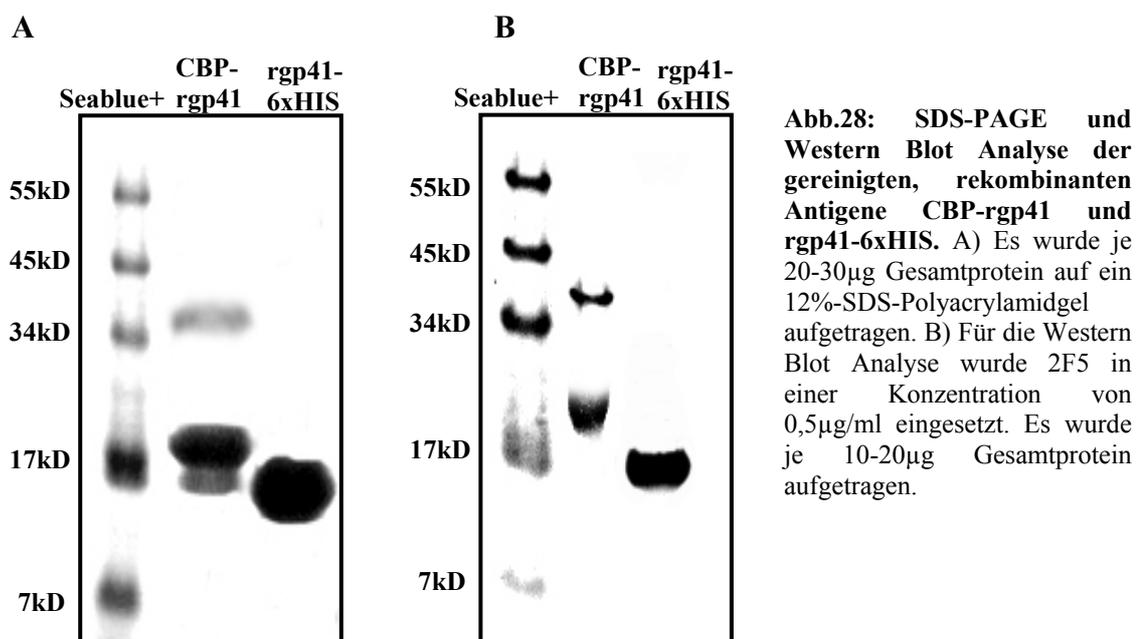


Abb.28: SDS-PAGE und Western Blot Analyse der gereinigten, rekombinanten Antigene CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS. A) Es wurde je 20-30 μ g Gesamtprotein auf ein 12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. B) Für die Western Blot Analyse wurde 2F5 in einer Konzentration von 0,5 μ g/ml eingesetzt. Es wurde je 10-20 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

Das gereinigte CBP-rgp41 dimerisiert und ist verunreinigt mit einem Zerfallsprodukt oder einem bakteriellen Protein aus der Expression, das in der Western Blot Analyse nicht mit 2F5 reagiert. Das affinitätschromatographisch gereinigte rgp41-6xHIS dimerisiert nicht und zeigt keine Zerfallsprodukte.

Als Versuchstiermodell wurden sowohl Ratten als auch Ziegen gewählt. Die Ratten bieten den Vorteil der einfachen Haltung großer Gruppen, wobei die gewonnene Blutmenge einer Blutung für mehrere Tests ausreicht. Aus den immunisierten Ziegen sollten größere Volumina Serum zur affinitätschromatographischen Reinigung spezifischer Antikörper gewonnen werden. Die Verwendung von zwei Spezies erhöht im Erfolgsfall zudem die Chancen einer Übertragbarkeit der Daten auf ein Primatenmodell und klinische Tests im Menschen.

Die Tiere wurden nach einem Standard-Schema immunisiert (Abb. 31). Die Tabelle 3 zeigt eine Übersicht der durchgeführten Immunsierungen von Ratten mit CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS. Den Tieren wurde pro Immunsierung 0,5-1mg Antigen appliziert. Alle nachfolgenden Immunsierungen mit rekombinanten Antigenen erfolgten nach dem gleichen Schema.

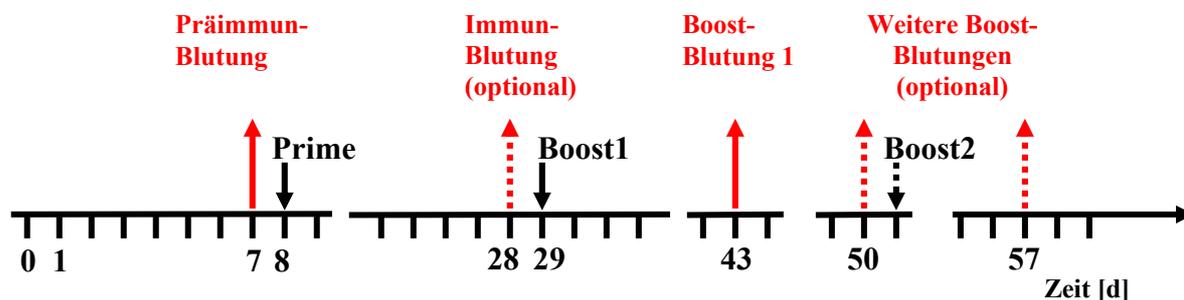


Abb.29: Schematische Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Immunisierung. Den Tieren wurde nach einer Eingewöhnungszeit von einer Woche Präimmunblut abgenommen. 24h nach der Präimmunblutung erfolgte die erste Immunisierung (Prime). Nach drei Wochen wurde optional Immunblut abgenommen und 24h später die zweite Immunisierung mit dem gleichen Antigen verabreicht (Boost1). 14 Tage nach dem Boost wurde Blut abgenommen (Boost-Blutung). Weitere Immunisierungen und Blutungen wurden optional durchgeführt.

Die vier Ratten der Gruppe 1 wurden dreimal mit CBP-rgp41 immunisiert, die drei der Gruppe 2 zweimal mit rgp41-6xHIS.

Um zu testen, ob die Boost-Seren der Gruppen 1 und 2 Antikörper gegen die hier identifizierte E1-Sequenz oder das 2F5-Epitop enthalten, wurden sie in einer Verdünnung von 1:100 im ELISA gegen die Peptide PE1 und PE2 getestet (Abb. 30). 2F5 wurde in einer Verdünnung von 1:25000 als Standard mitgeführt wobei die OD_{492/620nm} auf 1,0 normiert wurde, um einen Vergleich mit den Seren nachfolgender Immunisierungen zu ermöglichen.

Tabelle 2: Übersicht der durchgeführten Immunisierungen von Versuchstieren mit CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS

Gruppe	Antigen	Ratten	Anzahl der Tiere	Anzahl der Immunisierungen
1	CBP-rgp41	N2- M2	4	3
2	Rgp41-6xHIS	O1-O3	3	2

Die Seren der Ratten, die dreimal mit CBP-rgp41 immunisiert wurden zeigen gleichmäßig hohe Absorptionen zwischen 0,74 und 0,92, während die der Ratten, die zweimal mit rgp41-6xHIS immunisiert wurden deutlich stärkeren Schwankungen unterliegen (0,45-1,01).

Um zu untersuchen, an welche Epitope die Antikörper aus den Seren der immunisierten Tiere binden, wurden ein Serum aus jeder Gruppe, das bereits im ELISA auf die Bindung gegen PE1 und PE2 getestet wurde, in einer Epitopkartierung mit Hilfe einer Pepsot-Membran analysiert (Abb. 31). Die Sequenz der kartierten Epitope wurden in die Sequenz der gp41 Ektodomäne von HIV-1-HXB2 eingeordnet. Um auszuschließen, dass die Seren der Tiere vor der Immunisierung kreuzreagierende Antikörper gegen die Ektodomäne von gp41 enthielten, wurden die entsprechenden Präimmunseren ebenfalls kartiert. Diese Epitope wurden in der Abbildung 31 nicht aufgeführt.

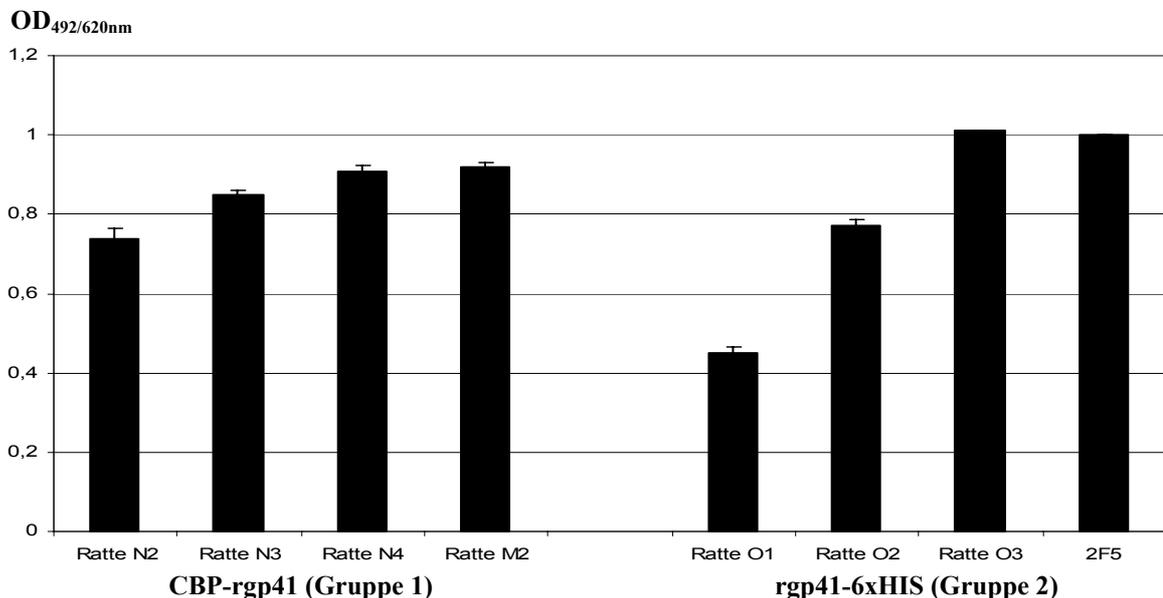


Abb.30: Detektion von bindenden Antikörpern gegen die Peptide PE1 und PE2 im ELISA. Von den Peptiden PE1 und PE2 wurden je 50ng/well in Kombination adsorbiert. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt und auf eine Absorption von 1,0 normiert. Die Immunisierungsgruppen sind getrennt dargestellt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Sowohl das Serum des Tieres N2 (CBP-rgp41) als auch das des Tieres O2 (rgp41-6xHIS) enthält Antikörper, die gegen die E1-Sequenz reagieren. Zusätzlich werden Epitope im Bereich der immundominanten Schleife und der C-terminalen Helixregion erkannt. Gegen den membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41, wo die Epitope der

monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 lokalisiert sind, wurden keine Antikörper mit CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS induziert.

Im *in vitro* Neutralisationstest wurde die Hemmwirkung der Seren auf die Replikation von HIV-1 IIIB in C8166-Zellen getestet. Als neutralisierend wurden nur solche Seren eingestuft, deren virushemmende Wirkung in der *Realtime*-PCR Analyse zu einer ct-Differenz von mehr als zwei ($\Delta ct > 2$) zwischen Präimmenserum und Boostserum führte. Keines der Tiere, die mit CBP-rgp41 oder rgp41-6xHIS immunisiert wurden, produzierte Seren, die eine virusneutralisierende Wirkung gegen HIV-1 IIIB zeigten.



Abb.31: Epitopkartierung der Rattenserum N2 (CBP-rgp41) und O2 (rgp41-6xHIS) mit einer Pepsot-Membran. Die Seren wurden 1:500 bzw. 1:1000 verdünnt. Alle kartierten Epitope wurden in die Sequenz der gp41 Ektodomäne von HIV-1 HXB2 eingeordnet und schwarz hinterlegt. Die strukturellen Untereinheiten der Ektodomäne sind in der jeweils ersten Zeile farbig hervorgehoben bzw. beschriftet. Die Epitope der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 und die der stabilisierenden Sequenz E1 sind gelb hervorgehoben.

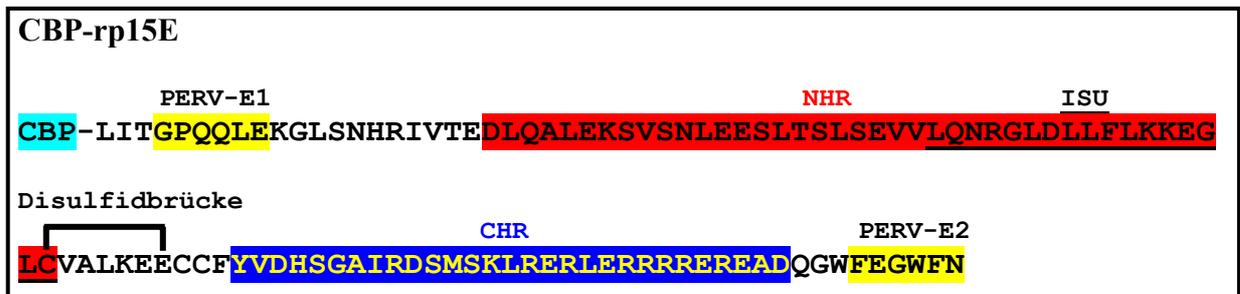
Die Induktion von bindenden und neutralisierenden Seren gegen dem membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 ist mit den rekombinanten Antigenen CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS nicht gelungen. Die hier identifizierte E1-Sequenz liegt allerdings in beiden Antigenen exponiert vor und beide Antigene induzieren Antikörper gegen diese.

Tabelle 3: Test der Seren nach Immunisierung mit rekombinanten gp41-Antigenen im *in vitro* Neutralisationstest. 5×10^4 C8166-Zellen wurden mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB infiziert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 im *in vitro* Neutralisationstest eingesetzt. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

Gruppe	Neutralisation von HIV-1 IIIB mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)
1	-
2	-

3.2.1.2 Hybrid-Antigene

Alternativ zu den rekombinanten gp41-Antigenen wurden gp41-p15E-Hybrid-Antigene kloniert. Über eine Mutagenese-PCR wurden im CBP-p15E PERV-Sequenzen durch HIV-1-Sequenzen substituiert. Fiebig et al. haben gezeigt, dass mit der rekombinant exprimierten Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E von PERV neutralisierende Antiseren *in vivo* induzierbar sind, die ein Konformationsepitop, bestehend aus einer Sequenz C-terminal des Fusionspeptids und einer N-terminal des Transmembrandurchgangs, binden. Die Sequenz im C-terminalen Teil der Ektodomäne enthält Sequenzhomologien zum Epitop des HIV-neutralisierenden Antikörpers 4E10 (Fiebig et al., 2003). Die Ektodomänen von gp41 und p15E weisen große, strukturelle Gemeinsamkeiten auf. Daher wurde die rekombinante Ektodomäne von p15E (rp15E, Abb.32) als Trägermolekül für die hier identifizierte HIV-E1-Sequenz und Sequenzen aus dem membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 verwendet. Die von Fiebig et al. identifizierten Teilepitope PERV E1 und PERV E2 wurden dazu mittels Mutagenese-PCR durch unterschiedlich lange HIV-1 pNL4-3 Sequenzen substituiert (Abb. 32) Die so klonierten Antigene wurde als Hybrid I, II und III bezeichnet. Der zwischen den HIV-Sequenzsubstitutionen liegende p15E-Anteil ist in allen drei Hybrid-Antigenen identisch.



Hybrid I



Hybrid II



Hybrid III

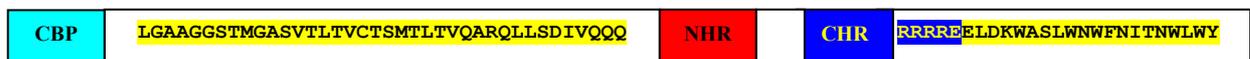


Abb.32: Schematische Darstellung des rekombinanten p15E (rp15E) und der Hybride I-III. Die funktionellen Domänen sind beschriftet und/oder farbig hervorgehoben, PERV E1-Sequenz (gelb), N-terminale Helixregion (NHR, rot), C-terminale Helixregion (CHR, blau). In den Schemata der Hybride sind die substituierten HIV-Sequenzen gelb unterlegt. Die Fusionsanteile (CBP) sind hellblau dargestellt. Die Aminosäuresequenz aller rekombinanten Antigene ist im Anhang III aufgeführt.

Die drei Hybrid-Antigene wurden wie beschrieben kloniert, exprimiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.5.5 und Anhang III). Im Hybrid I wurden die substituierten Aminosäure in Anlehnung an die von Fiebig et al., 2003 identifizierten, analogen p15E-Sequenzen (PERV E1 und E2), die von dem PERV-neutralisierenden Serum gebunden werden, gewählt. In den Hybride II und III wurde diese Aminosäuresubstitutionen terminal verlängert (siehe Anhang

III), um das Epitop des HIV-neutralisierenden, monoklonalen Antikörpers 4E10 (NWF/D/NIT) im E2-Bereich und mögliche stabilisierende Anteile im E1-Bereich einzuschließen (Zwick et al., 2001b). Alle drei Antigene wurden in Bakterien exprimiert und wie beschrieben aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.5.5) (Abb. 33).

Während die Hybride I und II nach der Aufreinigung relativ frei von Nebenprodukten sind, enthält das gereinigte Hybrid III mehrere bakterielle Proteinkontaminationen und bildet in diesem Proteingemisch nicht den größten Mengenanteil.

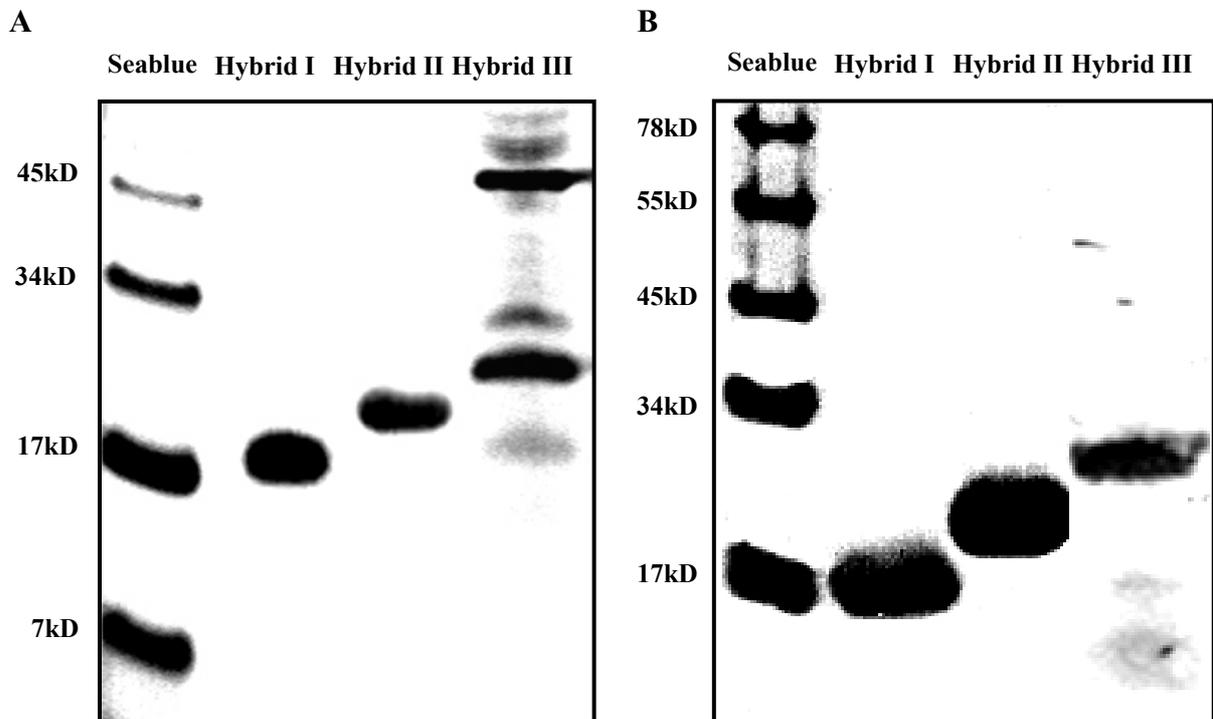


Abb.33: SDS-PAGE und Western Blot der gereinigten Hybride I-III. A) Es wurden je 20-30µg Gesamtprotein auf ein 12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. B) 2F5 wurde in der Western Blot Analyse in einer Konzentration von 0,5µg/ml eingesetzt. Es wurden je 15µg Gesamtprotein aufgetragen.

Mit den gereinigten Hybrid-Antigenen wurden sechs Rattengruppen und eine Ziege nach dem unter Abb.29 aufgeführten Schema immunisiert (Tabelle 4). Jedem Tier wurde pro Immunisierung 0,5-1mg Protein appliziert.

Tabelle 4: Übersicht der durchgeführten Immunisierungen von Versuchstieren mit den Hybrid-Antigenen

Gruppe	Antigen	Ratten	Anzahl der Tiere	Anzahl der Immunisierungen
3	Hybrid I	U2- U4	3	2
4	Hybrid I	6.3-8.4	10	3
5	Hybrid II	O4-Q1	6	2
6	Hybrid II	9.1-11.2	10	3
7	Hybrid II	32.3- 34.4	10	2
8	Hybrid III	46.1- 47.2	6	2
12	Hybrid II	23	1	3

Um zu untersuchen, ob bindende Antikörper gegen die E1-Sequenz und den membranproximalen Abschnitt der Ektodomäne von gp41 durch die Immunisierung mit den Hybrid-Antigenen induziert wurden, wurden die Seren der Ratten der Gruppen 3-8 und das

Serum der Ziege 23 analog zu den Seren der Tiere, die mit gp41-Antigenen immunisiert wurden im ELISA auf die Bindung an die Peptide PE1 und PE2 getestet (Abb. 34 A-D).

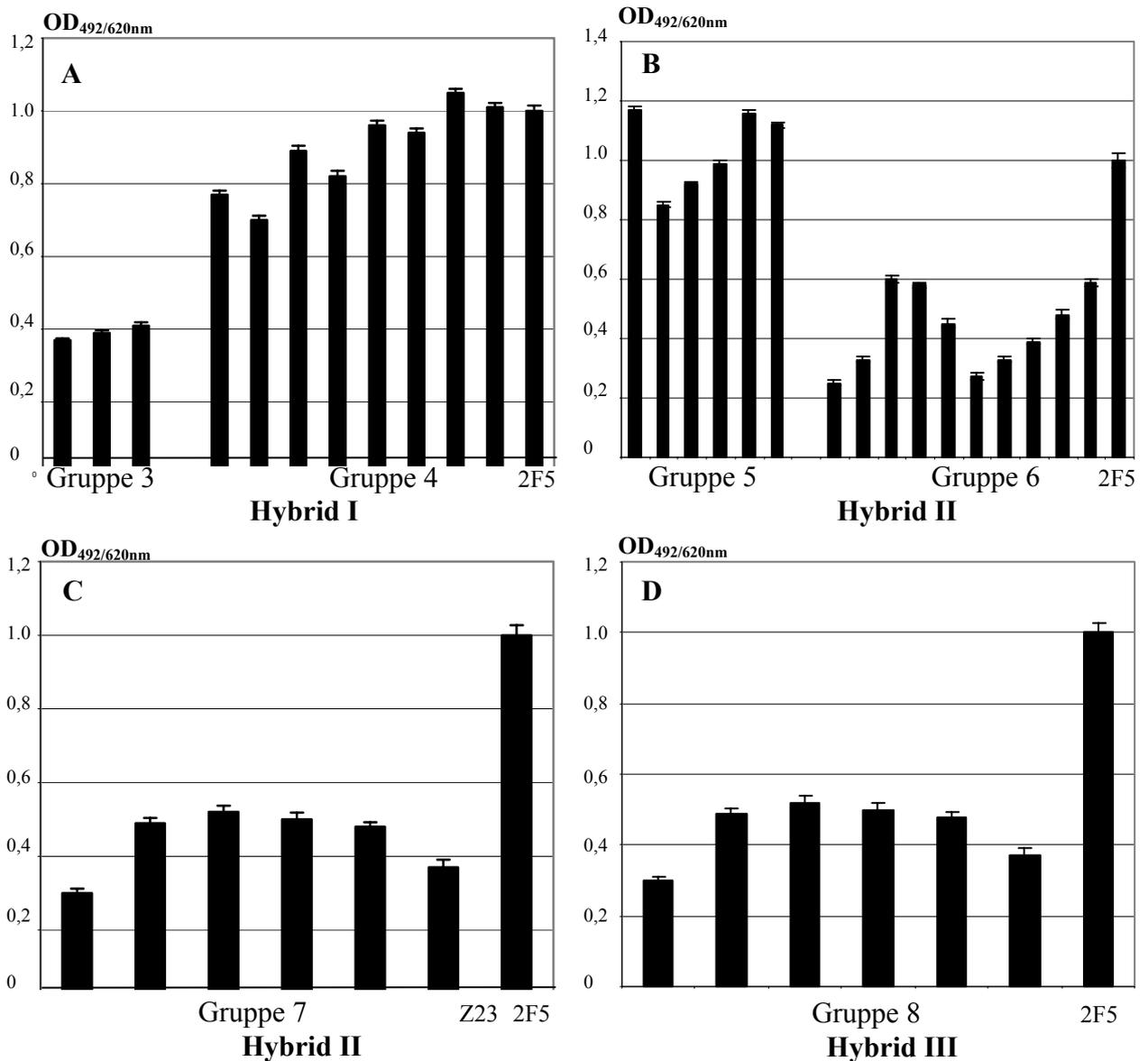


Abb.34: Detektion von bindenden Antikörpern gegen die Peptide PE1 und PE2 im ELISA. Von den Peptiden PE1 und PE2 wurden je 50ng/well in Kombination adsorbiert. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt und auf eine Absorption von 1,0 normiert. A) ELISA der Seren aus Gruppe 3 und 4 (Hybrid I). B) ELISA der Seren aus Gruppe 5 und 6 (Hybrid II). C) ELISA der Seren aus Gruppe 7 und der Ziege 23 (Z23) (Hybrid II). D) ELISA der Seren aus Gruppe 8 (Hybrid III). Die Immunisierungsgruppen sind getrennt dargestellt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Die Seren der Immunisierungsgruppen 4 (Hybrid I) und 5 (Hybrid II) zeigen durchgängig hohe Antikörpertiter gegen die Peptide PE1 und PE2 im ELISA, wobei nicht zu differenzieren ist, ob nur PE1, nur PE2 oder beide Peptide gebunden werden.

Obwohl die Tiere der Gruppen 3 (Hybrid I) sowie 6 und 7 (Hybrid II) mit demselben Antigenen wie die Gruppen 4 bzw. 5 immunisiert wurden, haben sie nur etwa die Hälfte der PE1/PE2-spezifischen Antikörper gebildet. Möglicherweise beeinflusst die verwendete Expressionscharge das Immunisierungsergebnis. Die Tiere der Gruppe 8, die mit Hybrid III immunisiert wurden, haben genau wie die Tiere der Gruppen 3, 6 und 7 einen relativ niedrigen Antikörpertiter gegen die Peptide PE1 und PE2 gebildet.

Das Serum der Ziege 23 hat bereits im ELISA keine bindenden Antikörper gegen die Peptide PE1 und PE2 gezeigt und hat demzufolge in der Epitopkartierung keine Peptide gebunden (nicht aufgeführt in Abb.35).

Die kartierten Seren der Ratten aus Gruppe 3-8 binden alle an die E1 Sequenz. Dabei zeigen die Seren der mit Hybrid II immunisierten Tiere in Abhängigkeit von der Immunisierungsgruppe leichte Verschiebungen in der detektierten Sequenz im N-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41. Die Tiere, die mit Hybrid I immunisiert wurden, haben keine Antikörper gegen den membranproximalen Bereich gebildet. Möglicherweise wurden hier, ähnlich wie bei den gp41-Antigenen, Antikörper gegen Bereiche außerhalb der substituierten HIV-Sequenzen (also gegen PERV p15E-Sequenzen) gebildet, die mit der verwendeten HIV-Peptomembran nicht detektiert wurden. Die Seren der Tiere der Gruppen 5-8 (Hybrid II) binden genau wie im N-terminalen Bereich der Ektodomäne in Abhängigkeit von der Immunisierungsgruppe auch im membranproximalen Abschnitt an unterschiedlich Epitop im Bereich des 2F5 Epitops. Nur das Serum von Tier 9.1 (Gruppe 4) erkennt hier kein Epitop.

Die Seren der Tiere, die mit Hybrid III (Gruppe 9) immunisiert wurden binden neben der als E1''-bezeichneten Sequenz im C-terminalen Bereich an ein Epitop N-terminal des 2F5-Epitops in der C-terminalen Helix-Region.

Im *in vitro* Neutralisationstest wurde die Hemmwirkung der Seren auf die Replikation von HIV-1 IIIB (Gruppe 3-8) und HIV-1 MN (4 und 6-8) in C8166-Zellen getestet. Als neutralisierend wurden nur solche Seren eingestuft, deren virushemmende Wirkung in der *Realtime*-PCR Analyse zu einer ct-Differenz von mehr als zwei ($\Delta ct > 2$) zwischen Präimmenserum und Boostserum führte. Die Seren der Tiere aus Gruppe 4 und 6-8 wurden zusätzlich in einem *in vitro* Neutralisationstest der mit einem p24-Capture-ELISA detektiert wurde, auf eine mögliche virusneutralisierende Wirkung gegenüber HIV-1 IIIB getestet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Neutralisierende Seren nach Immunisierung mit rekombinanten Impfstoff-Konstrukten. 5×10^4 C8166-Zellen wurden mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB bzw. HIV-1 MN infiziert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 im *in vitro* Neutralisationstest eingesetzt. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die Boost-Seren gewertet, die im Vergleich zum jeweiligen Präimmenserum eine Erhöhung des ct-Wertes um mehr als zwei Einheiten bewirkten ($\Delta ct > 2$). Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet. Für den Capture-ELISA wurden 5×10^3 C8166-Zellen mit 2×10^2 TCID₅₀ HIV-1 IIIB infiziert und nach sieben Tagen lysiert. Als Capture-Antikörper wurde der monoklonale Maus-Antikörper AG3 in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Gebundenes Gag wurde mit einem polyklonalen anti-HIV-Serum (1:1000) und einem POD-konjugiertem, polyklonalen Anti-Human-Ziegenserum (1:2000) detektiert. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die Boost-Seren gewertet, die im Neutralisationsassay, detektiert mittels p24-Capture-ELISA, eine OD_{493/620nm} über einem Wert von 0,1 aufwiesen. Der Capture-ELISA wurde in der Gruppe von Dr. Stephen Norley, Robert Koch-Institut, durchgeführt. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

Gruppe	Neutralisation von HIV-1 IIIB mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)	Neutralisation von HIV-1 IIIB mittels p24-Capture-ELISA (OD _{493/620nm} > 0,1)	Neutralisation von HIV-1 MN mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)
3	-	nicht getestet	nicht getestet
4	-	-	-
5	3/6	nicht getestet	nicht getestet
6	-	-	-
7	-	-	-
8	-	-	-

Nur in drei von sechs Tieren der Gruppe 5 (Hybrid II) wurden virusneutralisierende Antiseren induziert. Es ist weder gelungen mit einer erneuten Immunisierung mit Hybrid II in weiteren Tieren HIV-neutralisierende Seren zu induzieren (Gruppe 6 und 7), noch wurden nach

Immunisierung mit dem Hybrid I und III neutralisierende Antiseren in den Tieren produziert (Gruppe 3, 4 und 8). Die Epitopkartierung hat ergeben, dass die Seren der Gruppe 5 Epitope im N- und C-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41 binden, die im Vergleich zu den Seren der übrigen mit Hybrid-Antigenen immunisierten Tiere zum C-Terminus verschoben sind.

Die Δ ct-Werte aus der *Realtime*-PCR der drei als neutralisierend eingestuften Seren wurde mit der Formel aus Kapitel 2.5.13 in eine prozentuale Hemmung der Virusreplikation umgerechnet (Abb36).

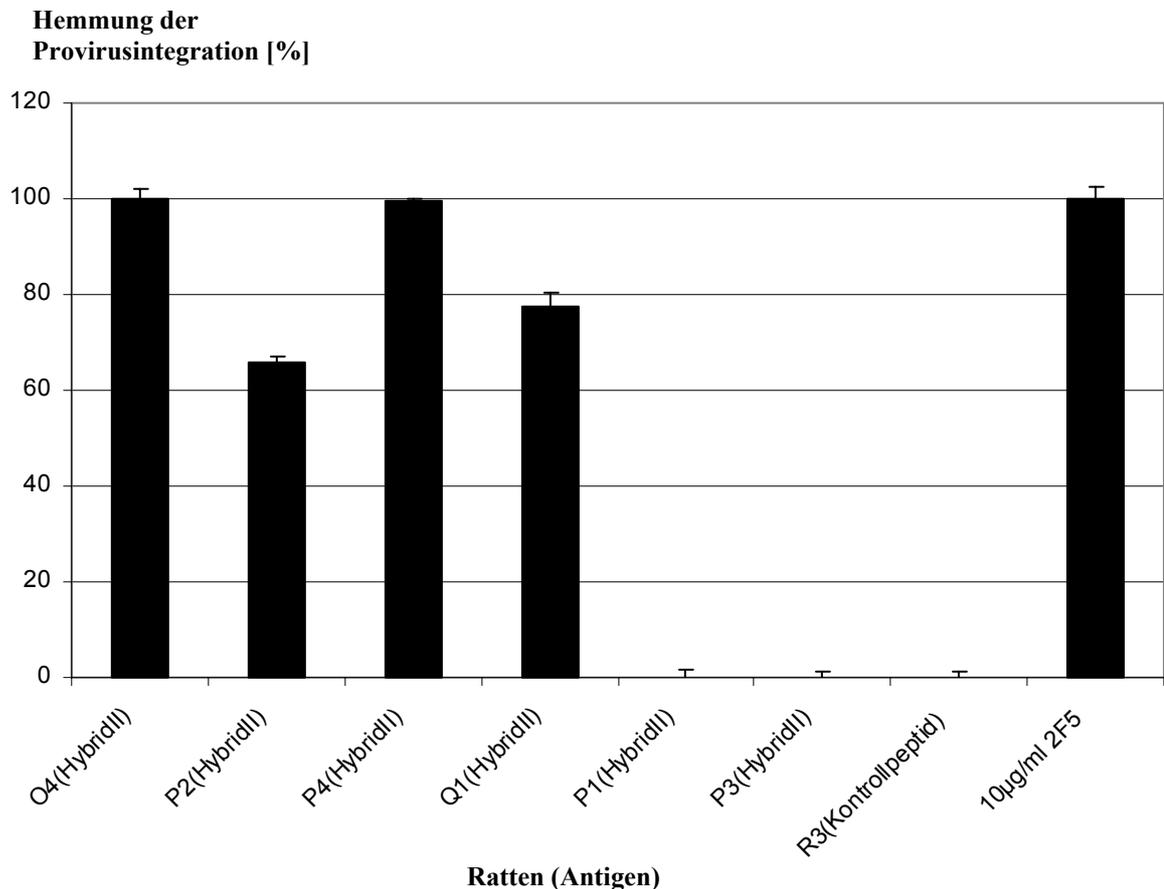


Abb.36: Quantifizierung der neutralisierenden Wirkung der Rattenserum aus der Immunisierungsgruppe 5 (Hybrid II). Es wurden 5×10^4 C8166 pro well ausgesät und mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB in Gegenwart der angegebenen Seren (Serumverdünnung 1:16) infiziert. Die neutralisierende Wirkung ist als prozentuale Hemmung der Provirusintegration aufgetragen. Die Umrechnung der logarithmischen Δ ct-Werte in eine lineare Hemmung erfolgte wie in Kapitel 2.4.1.5 beschrieben. Als Kontrollserum wurde das Serum der Ratte R3 mitgeführt, die mit Peptiden (PERV E1 und E2) immunisiert wurde, die von p15E abgeleitet wurden. Als Standard wurde im Neutralisationstest 2F5 in einer Konzentration von 10µg/ml mitgeführt. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

Die Seren der Tiere O4 (Δ ct = 8,57), P4 (Δ ct = 6,86) und Q1 (Δ ct = 2,01) bewirkten *in vitro* bei einer Verdünnung von 1:16 eine Hemmung der Provirusintegration von 78-99% (Umrechnung siehe Kapitel 2.4.13). Bei der eingesetzten TCID₅₀ von 3×10^4 /well werden also mindestens $2,25 \times 10^4$ TCID₅₀ durch diese Seren inhibiert. Das Serum P2 zeigt zwar einen deutlichen Unterschied in der Virushemmung zwischen Präimmun- und *Boost*-Serum (>60% Hemmung), wurde aber aufgrund des Δ ct < 2 nicht als virusneutralisierend eingestuft (Abb. 36). Keines der übrigen Seren hemmte die Replikation von HIV-1 IIIB oder MN.

Um zu zeigen, dass es sich bei der Hemmung der Provirusintegration durch die Seren der Gruppe 5 um einen HIV-spezifischen Effekt handelt, wurden die Seren der Tiere, mit der

stärksten virusneutralisierenden Wirkung (O4 und P4) in Gegenwart der Peptide PE1 und PE2 im Neutralisationstest untersucht. Die Peptide sollten im Fall einer HIV-spezifischen Wirkung der Seren eine kompetitive Hemmung der Neutralisation zur Folge haben (Abb. 37).

Hemmung der Provirusintegration [%]

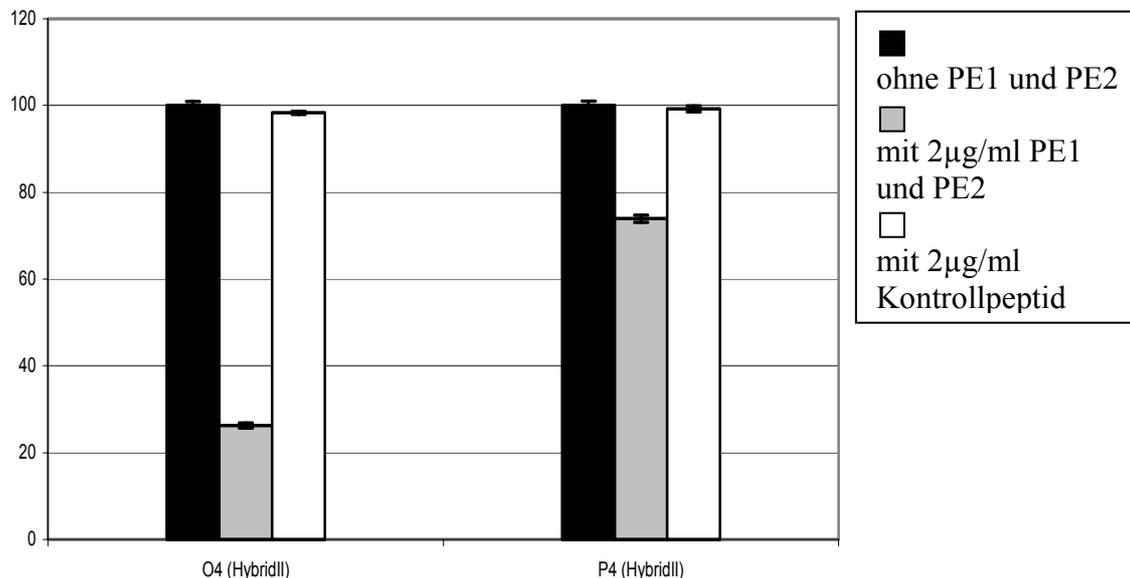


Abb.37 Hemmung der neutralisierenden Rattenserum durch Peptide. Im Neutralisationstest wurden 5×10^4 C8166 mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB infiziert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Die Peptide PE1 und PE2 wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt. Als Kontrolle wurde das Peptid PERV-E2 in einer Konzentration von 2 µg/ml mitgeführt. Die Zellen wurden 72h inkubiert. Die Provirusintegration wurde mittels *env*-spezifischer *Realtime*-PCR nachgewiesen. Alle Werte wurden als Vierfach-Werte bestimmt. Die Umrechnung der Δ ct-Werte in eine prozentuale Hemmung der Provirusintegration erfolgte wie beschrieben (siehe Kapitel 2.4.15).

Die virusneutralisierende Wirkung des Serums O4 lässt sich durch die Peptide PE1 und PE2 um fast 76% reduzieren, die des Serums P4 nur um etwa 28%. Durch das mitgeführte Kontrollpeptid wird die hemmende Wirkung der beiden Seren nicht beeinflusst.

In einem *in vitro* Neutralisationstest sollte gezeigt werden, dass die Seren O4, P4 und Q1 keine hemmende Wirkung auf die Replikation eines anderen Retrovirus (PERV) ausüben. Dazu wurden die 293-Zellen in Gegenwart der Seren mit PERV/5° infiziert. Mit einer PERV-*gag*-Gen spezifischen *Realtime*-PCR wurde die Integration von Provirus gemessen. Als Positivserum wurde das PERV-neutralisierende Ziegen Serum 20 mitgeführt (Fiebig et al., 2003). Die Ergebnisse des *in vitro* Neutralisationstests sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle6: *In vitro* Neutralisationstest mit PERV/5° in Gegenwart der Seren O4, P4 und Q1. 1×10^4 293 Zellen/well wurden 24h vor der Infektion ausgesät und mit 1×10^4 TCID₅₀ PERV/5° infiziert. Nach neun Tagen wurden die Zellen lysiert und auf Basis diese Lysats eine *Realtime*-PCR mit einer *gag*-spezifischen Sonde und *gag*-spezifischen Primern (Primer 36 und 37, siehe Anhang II) durchgeführt. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 eingesetzt. Als neutralisierend wurden nur solche Seren gewertet, die im Vergleich zum Präimmunserum einen Δ ct > 2 aufwiesen. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

	O4	P4	Q1	ZS20	Ohne Serum
Infektionshemmung (Δct > 2)	-	-	-	+ (Δ ct = 4,1)	-

Die neutralisierende Wirkung der Seren O4, P4 und Q1 ist also HIV-spezifisch und gegen den Bereich der Ektodomäne von gp41 gerichtet aus dem die Peptide PE1 und PE2 abgeleitet wurden (gezeigt für die Seren O4 und P4).

3.2.1.3 Syngene-Antigene

Aus den ELISA-Bindungsstudien (siehe Kapitel 3.1.6) ist hervorgegangen, dass die Bindung von 2F5 an ELDKWA durch einen zweifachen stöchiometrischen Überschuss von P6342 stärker gesteigert wird als durch ein 1:1 Verhältnis. Um dieser Beobachtung Rechnung zu tragen wurden die rekombinanten Antigene Syngene1, CBP-Syngene1 und CBP-Syngene2 entwickelt (Abb. 38). Syngene1 enthält zwei E1-Sequenzen, die über eine E2-Sequenz verbunden sind. Zwischen diesen Sequenzen liegen je fünf Aminosäuren lange Spacer, die aus alternierend angeordneten Glycinen und Serinen bestehen (siehe Anhang III).

Syngene1 ist mit 9,8kD ein relativ kleines Protein und wird daher schlecht in Bakterien exprimiert (Abb. 39). Auf Basis des pET30A-Syngene1 wurden die Antigene CBP-Syngene1 und 2 kloniert. CBP-Syngene1 unterscheidet sich von Syngene 1 durch einen zusätzlichen N-terminalen CBP-Fusionsanteil, der die Löslichkeit erhöhen sollte und die Gesamtmasse des Antigens auf über 10kD erhöht, was eine Expression in den verwendeten Bakterien begünstigt. CBP-Syngene 2 besteht aus zwei fusionierten Syngene1 mit einem N-terminalen CBP-Fusionsanteil. So sollte über eine Quervernetzung von B-Zellrezeptoren die thymusunabhängige Induktion einer humoralen Immunantwort ermöglicht werden (Abb. 38).

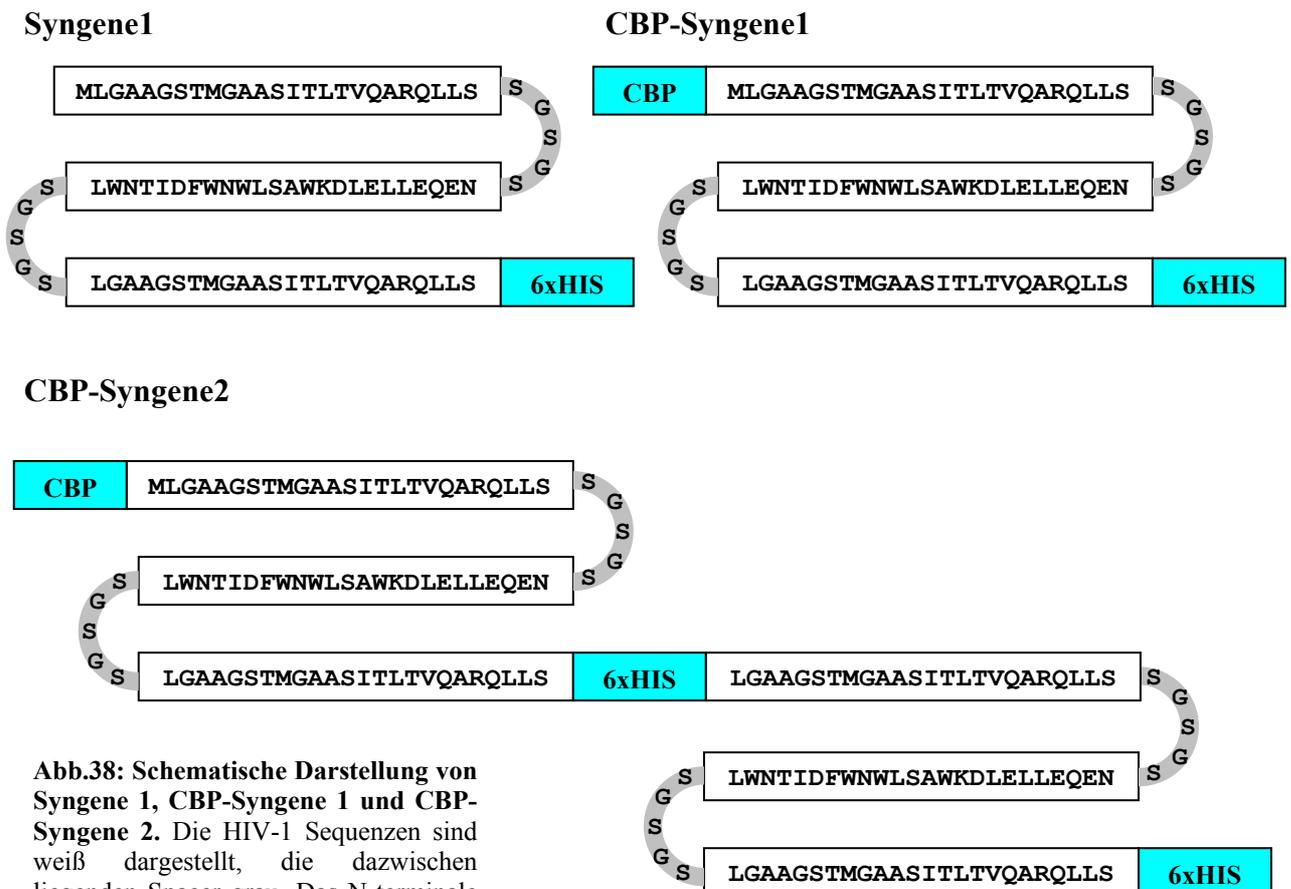


Abb.38: Schematische Darstellung von Syngene 1, CBP-Syngene 1 und CBP-Syngene 2. Die HIV-1 Sequenzen sind weiß dargestellt, die dazwischen liegenden Spacer grau. Das N-terminale CBP, der C-terminale und der eingeschobene HIS-tag sind hellblau dargestellt.

Die drei Syngene-Antigene wurden wie beschrieben kloniert, exprimiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.5.4, 2.5.5.5 und Anhang III).

Die rekombinanten Syngene-Antigene sind trotz affinitätschromatographischer Aufreinigung über eine NiNTA-Säule deutlich stärker mit bakteriellen Proteinen kontaminiert als die gp41- und Hybrid-Antigene. Möglicherweise interagieren die stark hydrophoben Anteile, die von der E1-Sequenz abgeleitet wurden mit diesen bakteriellen Proteinen. Das Syngene1 wurde deutlich schlechter exprimiert als die mit CBP-fusionierten Syngene-Antigene, reagiert aber in der Western Blot Analyse trotz der geringeren spezifischen Proteienmenge gut mit 2F5.

Mit den „gereinigten“ Syngene-Antigenen wurden drei Rattengruppen nach dem unter Abbildung 29 aufgeführten Schema immunisiert (Tabelle 7). Jedem Tier wurden pro Immunisierung 0,5-1mg Antigen appliziert.

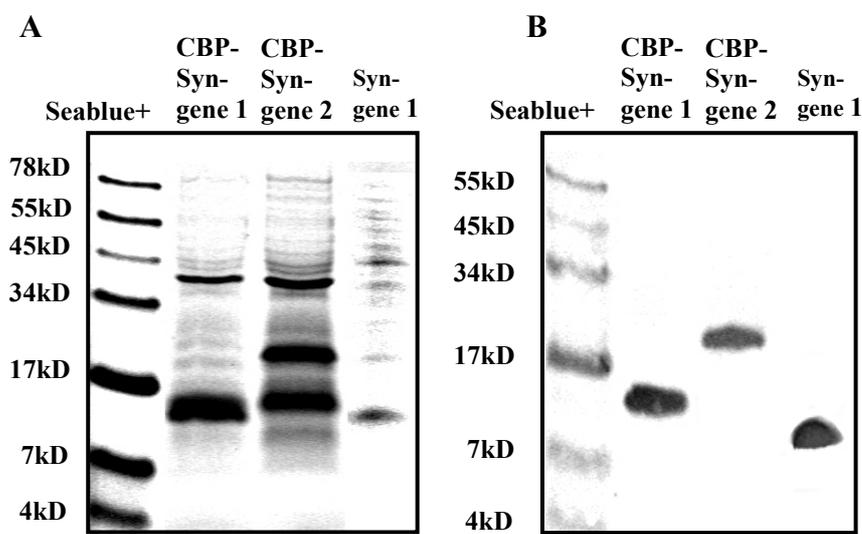


Abb.39: SDS-PAGE und Western Blot der Syngene-Antigene. A) Es wurde je 20-30µg Gesamtprotein auf ein 12%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. B) 2F5 wurde in der Western Blot Analyse in einer Konzentration von 0,5µg/ml eingesetzt. Es wurden je 15µg Gesamtprotein aufgetragen.

Tabelle 7: Übersicht der Immunisierungen von Versuchstieren mit Syngene-Antigenen

Gruppe	Antigen	Ratten	Anzahl der Tiere	Anzahl der Immunisierungen
9	Syngene1	16.2-17.4	7	2
10	CBP-Syngene1	43.1-44.2	6	2
11	CBP-Syngene2	44.3-45.4	6	2

Um zu untersuchen, ob bindende Antikörper gegen die E1-Sequenz und den membranproximalen Abschnitt der Ektodomäne von gp41 durch die Immunisierung mit den Hybrid-Antigenen induziert wurden, sind die Seren der Ratten der Gruppen 9-11 analog zu den Seren der Tiere, die mit gp41- und Hybrid-Antigenen immunisiert wurden, im ELISA auf die Bindung an die Peptide PE1 und PE2 getestet worden (Abb. 40).

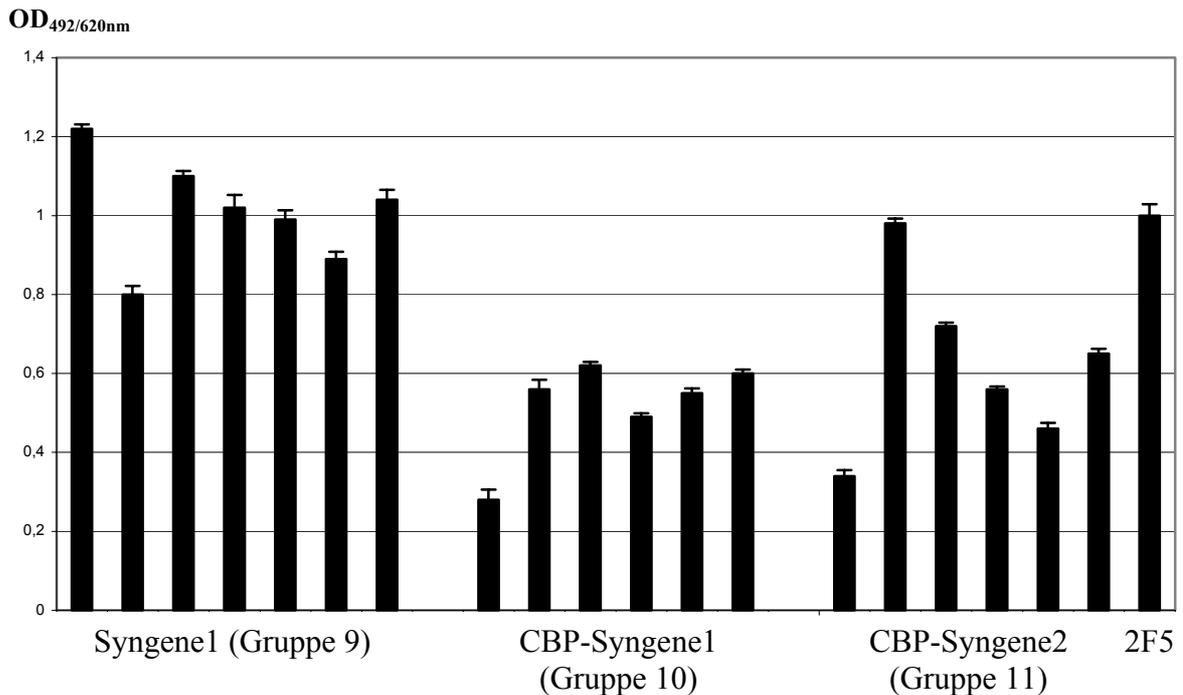


Abb.40: Detektion von bindenden Antikörpern gegen die Peptide PE1 und PE2 im ELISA. Von den Peptiden PE1 und PE2 wurden je 50ng/well in Kombination adsorbiert. Die Seren wurden 1:100 verdünnt. 2F5 wurde in einer Konzentration von 0,2µg/ml eingesetzt und auf eine Absorption von 1,0 normiert. Die Immunisierungsgruppen sind getrennt dargestellt. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Besonders die Seren der Tiere aus der Gruppe 9 (Syngene1) reagieren durchgängig sehr stark mit den Peptiden PE1 und PE2 im ELISA, während die Seren der Gruppe 10 (CBP-Syngene1) deutlich weniger Antikörper gegen diese Peptide aufweisen. Das dimere CBP-Syngene2 hat nur in einem Tier (44.4) einen ähnlich hohen Antikörpertiter gegen die Peptide PE1 und PE2 induziert. Die der übrigen Tiere dieser Gruppe liegen im gleichen Bereich, wie die der Gruppe 10. Möglicherweise bewirkt das angefügte CBP eine schlechtere Präsentation der HIV-Sequenzen im Tier.

Um zu testen, gegen welche Epitope die Seren der Tiere aus den Gruppen 9-11 reagieren wurde exemplarisch ein Serum aus jeder Gruppe mit einer Epitopkartierung analysiert (Abb. 41). Alle mit Syngene-Antigenen immunisierten Tiere haben Antikörper produziert, die gegen Epitope in der hier identifizierten E1-Sequenz binden. Im membranproximalen Teil bindet das Serum der Ratte 16.2 (Syngene1) an das 2F5-Epitop. Das Serum der Ratte 16.2 bindet also sowohl das 2F5-Epitop als auch die hier identifiziert E1-Sequenz. Die Seren der Ratten 43.3 und 45.1 binden in der C-terminalen Helixregion ein Epitop, das an das 2F5-Epitop angrenzt. Die Immunisierung mit CBP-Syngene1 und CBP-Syngene2 hat Seren induziert die identische Epitope binden. Da CBP-Syngene2 nur eine dimerisierte Variante von CBP-Syngene1 ist, war das zu erwarten.

Im *in vitro* Neutralisationstest wurde überprüft, ob die Seren der Ratten die mit den Syngene-Antigenen immunisiert wurden, auf die Replikation der HIV-Isolate IIIB und MN in C8166-Zellen hemmend wirken (Tabelle 8). Für das HIV-1-Isolat wurde zusätzlich zum Nachweis der Provirusintegration durch *Realtime*-PCR ein p24-Capture-ELISA durchgeführt.

In keiner Ratte wurden durch die Immunisierung mit Syngene-Antigenen virusneutralisierende Seren gegen HIV-1 IIIB oder MN induziert.

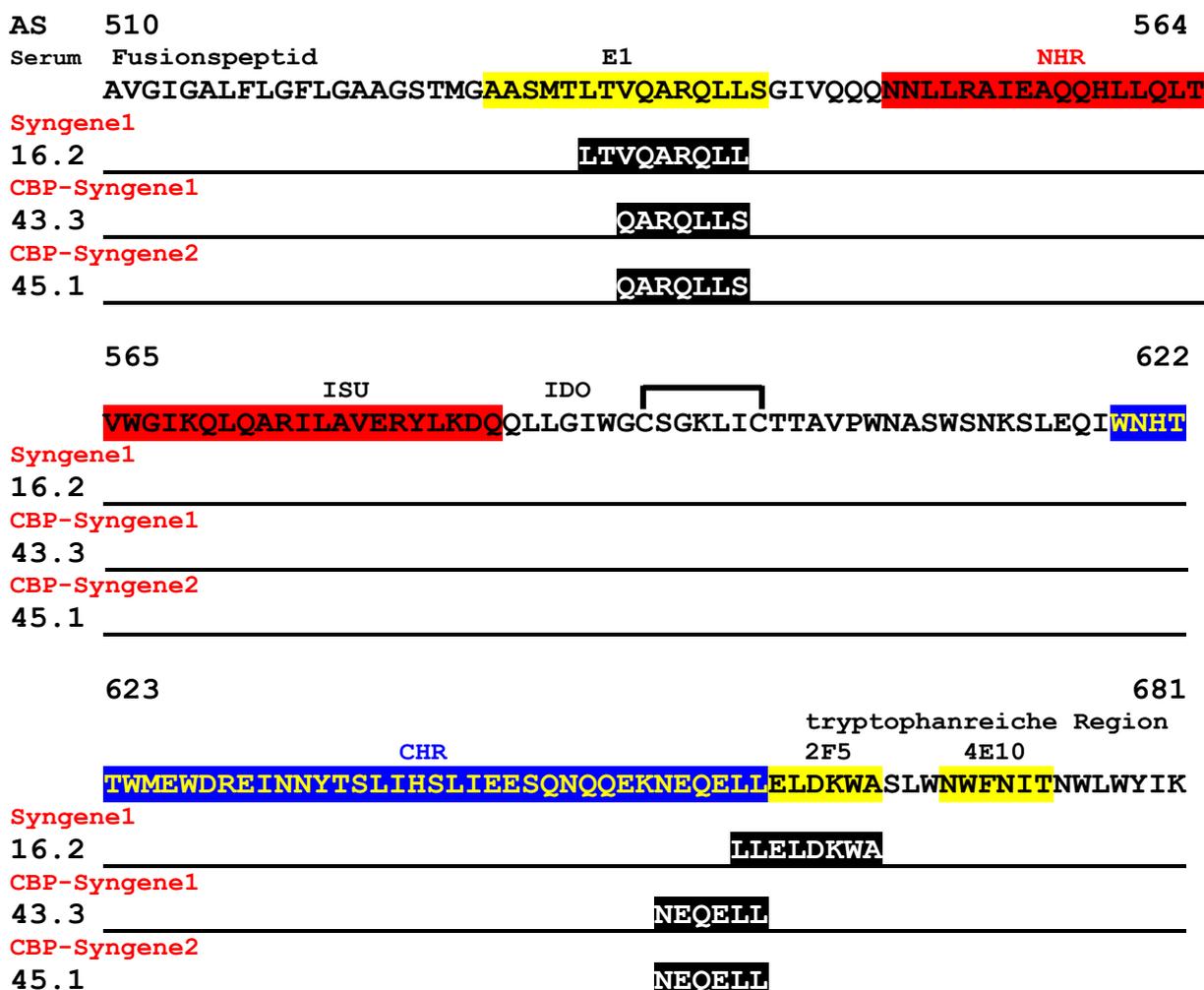


Abb.41: Epitopkartierung ausgesuchter Seren von Ratten, die mit Syngene-Antigenen immunisiert wurden. Die Seren wurden 1:500-1:1000 verdünnt. Die Sequenz aller kartierten Epitope wurden in die Sequenz der gp41 Ektodomäne von HIV-1 HXB2 eingeordnet und schwarz hinterlegt. Die strukturellen Untereinheiten der Ektodomäne sind in der jeweils ersten Zeile farbig hervorgehoben bzw. beschriftet. Die Epitope der monoklonalen Antikörper 2F5 und 4E10 und die der stabilisierenden Sequenz E1 sind gelb hervorgehoben.

Tabelle 8: Test der Seren nach Immunisierung mit rekombinanten Syngene-Antigenen im *in vitro* Neutralisationstest. 5×10^4 C8166-Zellen wurden mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIIB bzw. HIV-1 MN infiziert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 im *in vitro* Neutralisationstest eingesetzt. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die *Boost*-Seren gewertet, die im Vergleich zum jeweiligen Präimmenserum eine Erhöhung des ct-Wertes um mehr als zwei Einheiten bewirkten ($\Delta ct > 2$). Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet. Für den *Capture*-ELISA wurden 5×10^3 C8166-Zellen mit 2×10^2 TCID₅₀ HIV-1 IIIB infiziert und nach sieben Tagen lysiert. Als *Capture*-Antikörper wurde der monoklonale Maus-Antikörper AG3 in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Gebundenes Gag wurde mit einem polyklonalen anti-HIV-Serum (1:1000) und einem POD-konjugiertem, polyklonalen Anti-Human-Ziegen Serum (1:2000) detektiert. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die *Boost*-Seren gewertet, die im Neutralisationsassay, detektiert mittels p24-*Capture*-ELISA (durchgeführt in der Gruppe von Dr. Stephen Norley, Robert Koch-Institut), eine OD_{492/620nm} über einem Wert von 0,1 aufwiesen. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

Gruppe	Neutralisation von HIV-1 IIIB mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)	Neutralisation von HIV-1 IIIB mittels p24- <i>Capture</i> -ELISA ($OD_{492/620nm} > 0,1$)	Neutralisation von HIV-1 MN mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)
9	-	-	-
10	-	-	-
11	-	-	-
12	-	-	-

Vergleich der Bindung von 2F5 an die rekombinanten Antigene

Um zeigen zu können ob die Bindung von 2F5 an die unterschiedlichen Antigene variiert, wurden annähernd gleiche Proteinmengen auf ein 12% SDS-Gel aufgetragen und mittels Western Blot Analyse miteinander verglichen (Abb. 42). Aufgrund von bakteriellen Rückständen aus der Expression konnte keine präzise Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Antigene vorgenommen werden.

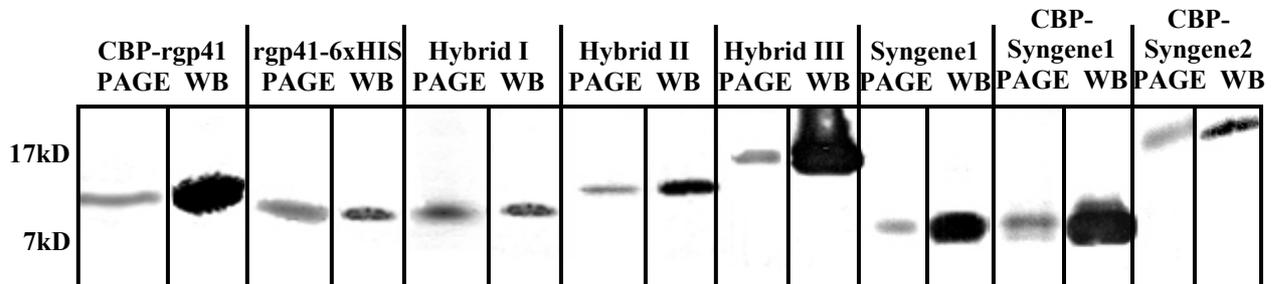


Abb.42: Vergleich der Bindung von 2F5 an die rekombinanten Antigene. Von allen rekombinanten Antigenen wurden etwa die gleiche Proteinmenge auf ein 12%-SDS-PAGE aufgetragen (jeweils die linke Spalte). In der Western Blot Analyse wurden die Bindung von 2F5 bei einer Konzentration von 0,2 μ g/ml an die Antigene getestet (jeweils rechte Spalte).

Obwohl annähernd gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden, lassen sich in der Western Blot Analyse deutliche Unterschiede in der Reaktivität der verschiedenen Antigene mit 2F5 aufzeigen. Besonders bei den Antigenen CBP-rgp41, die Hybride II und III und Syngene1 sowie CBP-Syngene1 werden relativ geringe Proteinmengen sehr gut durch 2F5 gebunden. Die übrigen Antigene weisen eine deutlich schlechtere Reaktivität mit 2F5 auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in allen Tieren Antikörper induziert wurden, die Epitope binden, die mit der hier identifizierten stabilisierenden Sequenz E1 überlappen (Tabelle 4 und Abb.32). Dagegen enthalten nur die Seren der Tiere, die mit den Antigenen Hybrid II (nur Gruppe 5) und III sowie Syngene1, CBP-Syngene1 und CBP-Syngene2 immunisiert wurden, Antikörper die Epitope binden, die in der membranproximalen Region um das 2F5-Epitop liegen.

Sowohl die Spezifität der Seren, als auch der Titer an bindenden Antikörpern gegen die membranproximale Region und den E1-Bereich schwanken also in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen, aber auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Immunisierung mit einem Antigen (siehe Gruppen 5-7). Die Affinität des monoklonalen Antikörpers 2F5 zu den verschiedenen rekombinanten Antigenen und die Höhe des Titers gp41-spezifischer Antikörper im Serum korreliert nicht mit der Induktion von neutralisierenden Antikörpern. Lediglich in der Immunisierungsgruppe 5 konnten durch Applikation von Hybrid II in drei von sechs Tieren (O4, P4 und Q1) HIV-spezifische neutralisierende Seren induziert werden. Diese Seren binden allerdings nicht an das 2F5-Epitop sondern C-terminal davon, überlappend mit dem 4E10-Epitop. Dagegen bindet das Serum der Ratte 16.2 sowohl an das 2F5-Epitop als auch an die Sequenz E1 und ist dennoch nicht neutralisierend.

3.2.2 Expression von rekombinanten Antigenen auf der Oberfläche von Zellen zur Induktion einer antiviralen Immunantwort

Die Immunisierung mit rekombinanten gp41-Konstrukten hat gezeigt, dass die Präsentation der Zielepitope vom Protein abhängig ist, in das sie eingebettet sind.

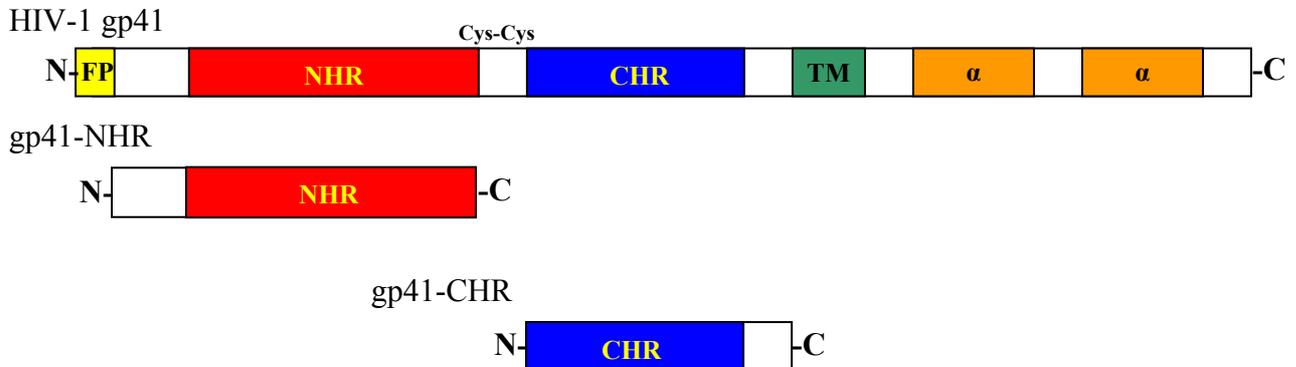


Abb.43: Schema der gp41-Konstrukte für die Oberflächenexpression auf eukaryoten Zellen. Die funktionalen Untereinheiten von gp41 sind farblich hervorgehoben: Fusionspeptid (FP, gelb), N-terminale Helixregion (NHR, rot), C-terminale Helixregion (CHR, blau), Transmembrandomäne (TM, grün) und die aliphatischen α -Helices (α , orange). (Klonierungsschema und die Vektordaten siehe Anhang III.)

Um gp41 in einer möglichst natürlichen Umgebung zu präsentieren, wurde eine alternative Expressionsstrategie gewählt. Dabei sollten die gp41-abgeleiteten Antigene auf einer Zellmembran präsentiert werden, d.h. so wie sie auf einem Viruspartikel oder einer HIV-infizierten Zellen vorliegen. Das vollständige gp41 und verkürzte Varianten davon wurden auf der Oberfläche von Rattenzellen (CCL47) exprimiert. Die codierende Sequenz für das jeweilige gp41 Konstrukt wurde in den pDisplay-Vektor (Invitrogen) eingebracht, der ein I κ -Leitsignal vor der MCS codiert. Dieses leitet das exprimierte Protein auf die Zelloberfläche. Die gp41-Konstrukte wurden entweder über die gp41-eigene (pDisplay-gp41) oder über eine Vektor-codierte Transmembrandomäne (pDisplay-gp41-NHR und -CHR) in der Zellmembran verankert. In Abbildung 43 sind schematisch die gp41-Konstrukte, die auf der Oberfläche von eukaryoten Zellen exprimiert wurden, dargestellt.

3.2.2.1 Expression von gp41-Antigenen auf der Oberfläche von Rattenzellen

Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern nach Immunisierung mit DNA-Vakzinen, die für Proteinanteile des Oberflächen-Transmembran-Komplexes codieren, konnte sowohl für HIV/SIV (DNA-*Prime*/Protein-*Boost*-Strategie gegen gp120) als auch für das Pferde Arteritisvirus (EAV, DNA-*Prime*/DNA-*Boost*-Strategie, gegen das transmembrane Hüllprotein) gezeigt werden (Tobiasch et al., 2001, Rasmussen et al., 2002). Hier sollte mit Antigenen, die vom transmembranen Hüllprotein gp41 von HIV abgeleitet wurden, Antikörper gegen den membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 im Rattenmodell induziert werden.

Dazu musste zunächst sichergestellt sein, dass die Expression dieser Antigene auf der Oberfläche von Rattenzellen, also in Zellen der gleichen Spezies, in der im Anschluss die DNA-Vakzinierung erfolgen sollte, nach einer transienten Transfektion ohne nachfolgende Selektion mit spezifischen Antibiotika in ausreichendem Umfang stattfindet. Eine solche Selektion würde in der Ratte ebenfalls nicht stattfinden.

Die CCL47-Rattenzellen wurden mit pDisplay-gp41, pDisplay-gp41-NHR und pDisplay-gp41-CHR (siehe Anhang III) transient transfiziert und im Immunfluoreszenzmikroskop auf die Oberflächenexpression von gp41-Antigenen untersucht. Die Transfektionen mit allen Vektoren führten zur Präsentation der codierten Antigene auf der Zelloberfläche (Abb. 44). Da das gp41-NHR-Antigen nicht das 2F5 Epitop beinhaltet, wurde hier für den Nachweis aller Antigene als Primäntikörper ein anti-HA-Antikörper, der ein pDisplay-codiertes, N-terminales Hämagglutinin-Epitop bindet, verwendet.

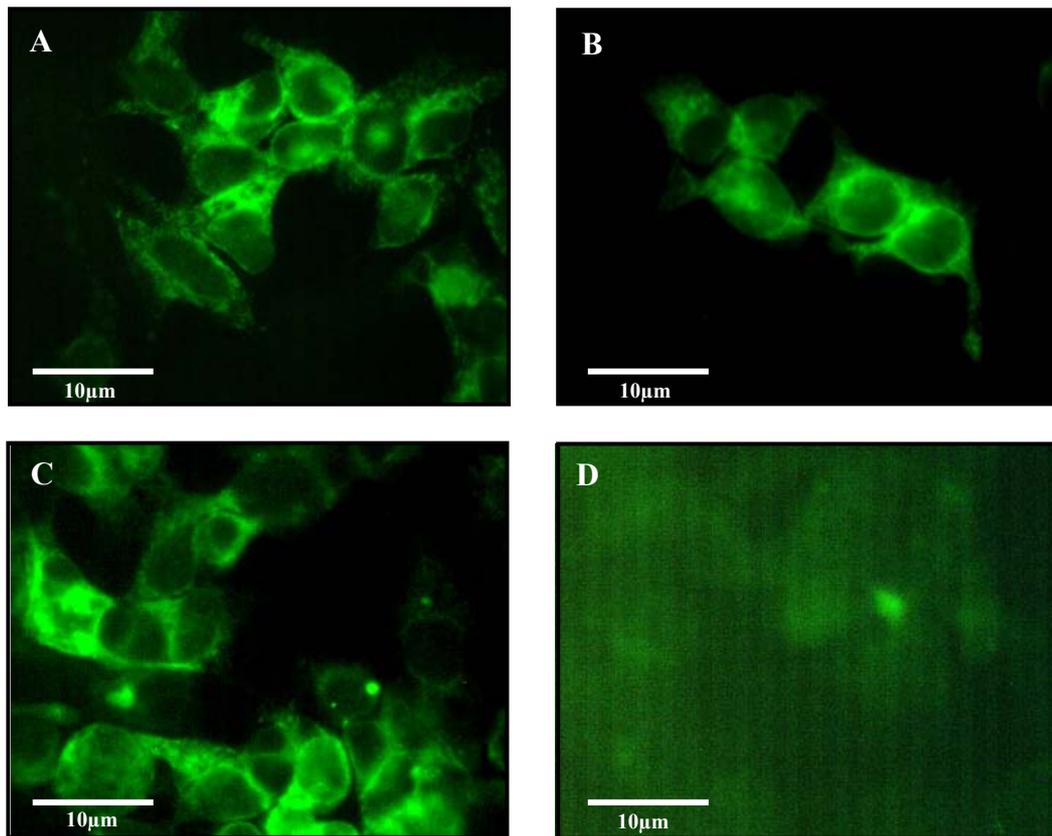


Abb.44: Oberflächenexpression von gp41, gp41-NHR und gp41-CHR auf CCL47-Zellen. A-D) Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Ratten-Sarkomzellen (CCL47), die transient mit pDisplay gp41 (A), pDisplay gp41-NHR (B), pDisplay gp41-CHR (C) und pDisplay (D) transfiziert wurden. Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion präpariert, mit 1µg/ml Anti-HA-Antikörper inkubiert und mit 0,5µg/ml Anti-Maus-FITC detektiert. Die Aufnahmen A-C wurden 1s belichtet, die Aufnahme D wurde 4s belichtet.

Die immunfluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Expression von gp41 (Abb. 44A), gp41NHR (Abb. 44B) und gp41-CHR (Abb. 44C) auf der Oberfläche von nicht permeabilisierten CCL-47 Zellen. Die mit dem pDisplay-Leervektor transfizierten CCL-47 Zellen werden nicht durch den anti-HA-Antikörper gebunden (Abb. 44D).

Um die Expressionsrate der rekombinanten Antigene auf der Oberfläche der CCL-47 Zellen zu quantifizieren, wurden die transfizierten Zellen zusätzlich in der Durchflusszytometrie untersucht (Abb. 45). Bis zu 77% der mit pDisplay-gp41 transient transfizierten CCL47-Rattensarkomzellen exprimierten die rekombinanten Antigene auf der Zelloberfläche.

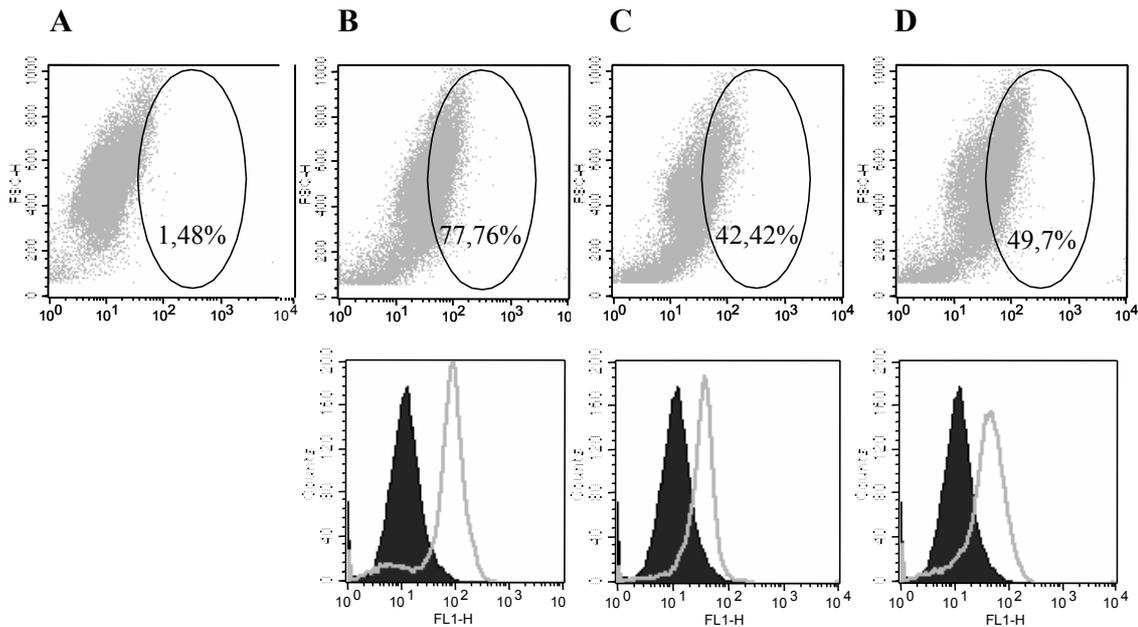


Abb.45: Durchflusscytometrie von pDisplay-transfizierten (A), pDisplay-gp41-transfizierten (B), pDisplay-gp41-NHR-transfizierten (C) und pDisplay-gp41-NHR-transfizierten (D) CCL47-Zellen. Die Zellen wurden 72h nach der Transfektion präpariert, mit $1\mu\text{g/ml}$ Anti-HA-Antikörper inkubiert und mit $0,5\mu\text{g/ml}$ Ziege-anti-Human-FITC detektiert. Es wurden je 5×10^4 Zellen gezählt. Die Fluoreszenzintensität ist gegen die Granularität (*Forwardscatter*, FSC-H) aufgetragen. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtmenge an gezählten Zellen. Die Histogramm-Darstellungen in der unteren Zeile zeigen die entsprechende Fluoreszenzintensität aufgetragen gegen die Zellzahl. Die hellgraue Kurve zeigt die pDisplay-gp41-, pDisplay-gp41-NHR-bzw. pDisplay-gp41-CHR-transfizierten CCL47-Zellen gegenüber den pDisplay-transfizierten CCL47-Zellen (dunkelgrau).

3.2.2.2 Ballistische DNA-Immunsierung von Ratten mit pDisplay-gp41, pDisplay-gp41-NHR und pDisplay-gp41-CHR

Es wurde eine *DNA-Prime/DNA-Boost*-Strategie gewählt, bei der die Vektor-DNA (pDisplay-gp41, pDisplay-NHR und pDisplay-CHR) mit Hilfe einer Biorad Gene Gun appliziert wurde, da diese im Vergleich zur Immunsierung über eine intramuskuläre Injektion, konstantere und stärkere Immunantworten erzielt (Trimble et al., 2003). Es wurden sieben Wistar-Ratten mit unterschiedlichen *Prime/Boost*-Kombinationen von pDisplay-gp41-, pDisplay-gp41-NHR-bzw. pDisplay-gp41-CHR dreimal im Abstand von je 14 Tagen immunisiert (Tabelle.9). Die Vektoren pDisplay-gp41-NHR und -CHR, wurden immer in Kombination auf die Goldpartikel adsorbiert. Pro Schuss mit der Gene Gun wurden $2\mu\text{g}$ DNA appliziert.

Die *Boost2*-Serum wurden zwei Wochen nach der letzten Immunsierung abgenommen und im ELISA auf ihre Reaktivität gegenüber PE1 und PE2 getestet (Abb. 46). Als Kontrolle wurde ein Tier mitgeführt, das Goldpartikeln immunisiert wurde, die mit pDisplay-Leervektor beschichtet waren (Ratte 21.3).

Tabelle 9: Immunisierung von Wistar-Ratten mit pDisplay-gp41 (gp41), pDisplay-gp41-NHR (NHR)/pDisplay-gp41-CHR (CHR) oder pDisplay (Kontrolle). In Klammern sind die applizierten DNA-Mengen angegeben.

Ratte	Prime-Vektor	Boost1-Vektor	Boost2-Vektor
11.4	NHR/CHR (6µg)	NHR/CHR (6µg)	NHR/CHR (6µg)
12.1	gp41(8µg)	NHR/CHR (6µg)	NHR/CHR (6µg)
12.2	gp41(8µg)	NHR/CHR (6µg)	NHR/CHR (6µg)
12.3	gp41(8µg)	gp41(8µg)	gp41(8µg)
12.4	gp41(8µg)	gp41(8µg)	gp41(8µg)
13.1	NHR/CHR (6µg)	gp41(8µg)	NHR/CHR (6µg)
13.2	NHR/CHR (6µg)	gp41(8µg)	NHR/CHR (6µg)
21.3	Kontrolle (8µg)	Kontrolle (8µg)	Kontrolle (8µg)

Nur die Seren der Tiere 12.1 und 12.2 reagieren im ELISA (im Vergleich mit dem Serum des Kontrolltieres 21.3) mit den Peptiden PE1 und PE2. Das Serum der Ratte 12.3 zeigt im ELISA die höchste Absorption, reagiert aber nur gegen PE2 (Abb. 47). Diese Tiere wurden alle in der primären Immunisierung mit pDisplay-gp41-beladenen Goldpartikeln beschossen (Tabelle 6). Keines der DNA-immunisierten Tiere produzierte Antikörper, die im *in vitro* Neutralisationstest (getestet mittels *Realtime*-PCR für HIV-1 IIB/-MN und *Capture*-ELISA für HIV-1 IIB) die Replikation von HIV-1 IIB oder -MN bei einer Verdünnung von 1:16 inhibierte (Tabelle 7).

**Absorption
492/620nm**

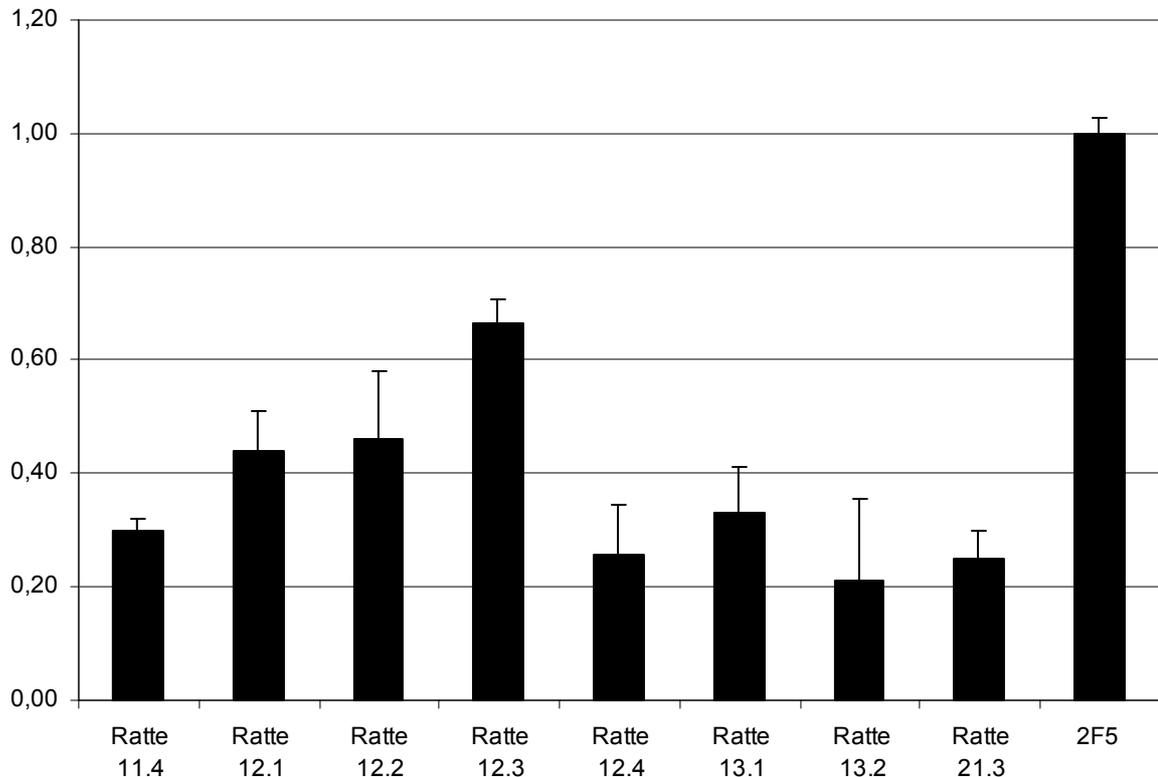


Abb.46: ELISA auf PE1/PE2 mit Rattenserum nach DNA-Immunisierung. Je 25ng PE1 und PE2 wurden auf einer ELISA-Platte absorbiert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Als Standard wurde 2F5 in einer Konzentration von 0,4µg/ml mitgeführt und auf eine Absorption von 1,0 normiert. Alle Werte wurden als Triplikate gemessen.

Ratten neutralisierende Antikörper enthielten, die an Epitope binden, die außerhalb der PE1 und PE2-Sequenz liegen.

Tabelle 10: Neutralisierende Seren nach Immunisierung mit rekombinanten Impfstoff-Konstrukten. 5×10^4 C8166-Zellen wurden mit 3×10^4 TCID₅₀ HIV-1 IIB bzw. HIV-1 MN infiziert. Die Seren wurden in einer Verdünnung von 1:16 im *in vitro* Neutralisationstest eingesetzt. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die *Boost*-Seren gewertet, die im Vergleich zum jeweiligen Präimmunsersum eine Erhöhung des ct-Wertes um mehr als zwei Einheiten bewirkten ($\Delta ct > 2$). Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet. Für den *Capture*-ELISA wurden 5×10^3 C8166-Zellen mit 2×10^2 TCID₅₀ HIV-1 IIB infiziert und nach sieben Tagen lysiert. Als *Capture*-Antikörper wurde der monoklonale Maus-Antikörper AG3 in einer Verdünnung von 1:3000 verwendet. Gebundenes Gag wurde mit einem polyklonalen anti-HIV-Serum (1:1000) und einem POD-konjugiertem, polyklonalen anti-Human-Ziegen Serum (1:2000) detektiert. Als „virus-neutralisierend“ wurden nur die *Boost*-Seren gewertet, die im Neutralisationsassay, detektiert mittels p24-*Capture*-ELISA, eine OD_{493/620nm} über einem Wert von 0,1 aufwiesen. Alle Werte wurden aus vier Einzelwerten berechnet.

Serum	Neutralisation von HIV-1 IIB mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)	Neutralisation von HIV-1 IIB mittels p24- <i>Capture</i> -ELISA (OD _{492/620nm} > 0,1)	Neutralisation von HIV-1 MN mittels <i>Realtime</i> -PCR ($\Delta ct > 2$)
11.4	-	-	-
12.1	-	-	-
12.2	-	-	-
12.3	-	-	-
12.4	-	-	-
13.1	-	-	-
13.2	-	-	-
21.3	-	-	-

Weder die Seren, die im ELISA positiv gegen die Peptide PE1/PE2 (Ratte 12.1 und 12.2) bzw. nur gegen PE2 (Ratte 12.3) reagieren, noch die der anderen Ratten hemmten die Virusreplikation der HIV-1 Isolate IIB und MN im *in vitro* Neutralisationstest.

Die Präsentation von gp41-Antigenen stellt somit zwar eine Möglichkeit zur Induktion von bindenden Antikörpern im Rattenmodell dar. Allerdings waren die hier induzierten Antikörpertiter gegen die Peptide PE1 und PE2 deutlich niedriger, als die durch die Applikation von nicht membranassoziierten rekombinanten Antigenen. Möglicherweise würden mehrere Applikationen mit einheitlichen Antigenen einen höheren Antikörpertiter im Tier induzieren. Es bleibt festzuhalten, dass die Präsentation von gp41-Antigenen im Membrankontext zu einer anderen Epitopverteilung der Seren führt als die durch freie Antigene.

4. Diskussion

Die Notwendigkeit eines HIV-Impfstoffes

Die HIV-1 Pandemie ist, wie bereits einleitend aufgezeigt (siehe Kapitel 1), mit derzeit mehr als 15000 Neuinfektionen und mehr als 8000 Toten pro Tag eine der gefährlichsten Infektionskrankheiten und die vierthäufigste Todesursache weltweit (*World Health Report 2002*, UNAIDS *Facts Sheet*, 2002, www.unaids.org). Die Folgen für die soziale und ökonomische Infrastruktur vieler betroffener Entwicklungsländer, speziell in Afrika südlich der Sahara sind verheerend. In Zentral- und Südafrika, wo mindestens 20% der erwachsenen Bevölkerung HIV-infiziert sind, stirbt eine ganze Generation und lässt eine steigende Zahl von Waisen zurück (14 Millionen im Jahr 2001 (UNAIDS, WHO, *AIDS epidemic update 2001*, Silbanda et al., 2003)). Obwohl Aufklärungskampagnen und eine Verbesserung des öffentlichen Gesundheitssystems in diesen Regionen teilweise zu beachtlichen Rückgängen in den HIV-1 Neuinfektionszahlen geführt haben, ruhen die Hoffnungen, die Pandemie weltweit effektiv zu kontrollieren, auf einem präventiven Impfstoff.

Welche Eigenschaften sollte ein HIV-Impfstoff haben?

Ein Impfstoff sollte folgende Eigenschaften besitzen: (1) Der Impfstoff vermittelt nahezu 100% Schutz vor der Infektion mit einem breiten Spektrum von Erregervarianten. (2) Der vermittelte Schutz ist dauerhaft (mehrere Jahre). (3) Der Impfstoff selbst ist apathogen und erzeugt nach der Applikation keine oder nur wenige Nebenwirkungen. (4) Der Impfstoff muss nur wenige Male (im Idealfall nur einmal) appliziert werden. (5) Der Impfstoff ist kostengünstig zu produzieren, einfach zu transportieren und zu lagern. (6) Der Impfstoff ist einfach applizierbar (modifiziert nach Janeway et al., 2002, Seite 621). Wie bereits unter Kapitel 1.7 ausgeführt, werden derzeit aus Sicherheitsgründen Untereinheiten-Vakzine und DNA-Vakzine gegen HIV favorisiert.

Um einen effektiven Impfschutz zu gewährleisten, müssen die induzierten Antikörper das Virus am Eindringen die Zielzelle hindern, d.h. sie müssen das Oberflächenprotein gp120 oder die Ektodomäne des Transmembranproteins gp41 binden. Praktisch alle in klinischen Phasen eingesetzte Antigene enthalten das Oberflächenprotein gp120, zum Teil fusioniert an das vollständige Transmembranprotein (gp160) oder an die Ektodomäne von gp41 (gp140) (siehe Tabelle 11).

Gp120 ist genetisch sehr variabel und exponiert durch seine stark glykosylierte Oberfläche nur wenige Bindungsstellen für neutralisierende Antikörper. Innerhalb eines Subtyps kann die Sequenz um bis zu 20% variieren, subtypübergreifend bis zu 35% (Gaschen et al., 2002). *In vivo* können stabile Fluchtmutanten sowohl gegenüber neutralisierenden Antikörpern, als auch gegenüber CTLs, beobachtet werden (Langedijk et al., 1995, Goulder et al., 2001). Phylogenetische Vergleichsstudien zeigten, dass es Bereiche im Oberflächen-Transmembran-Komplexes gibt, die unter erhöhtem Selektionsdruck stehen (Yang et al., 2000, Gaschen et al., 2002), was die immunologische Relevanz dieser Regionen untermauert. Durch Wettbewerbstudien konnte gezeigt werden, dass der Großteil der neutralisierenden Antikörper im Serum von HIV-positiven Patienten gegen die V3-Region von gp120 gerichtet sind (Vogel et al., 1994). Diese Antikörper verhindern jedoch nicht die Ausbreitung des Virus im Patienten (Wei et al., 2003).

Tabelle 11: Auflistung von verschiedenen rekombinanten Env-Antigenen, die in klinischen Studien eingesetzt werden. Die Tabelle zeigt nur einige der in klinischen Test befindlichen Antigene (siehe www.iavi.org).

Antigen (Hersteller)	Beschreibung	Klinische Phase
AIDSVAX B/E (VaxGen)	Bivalente gp120-Kombination abgeleitet von MN (Subtyp B) und CM244 (Subtyp E), produziert in CHO-Zellen	Phase III
AIDSVAX B/B (VaxGen)	Bivalente gp120-Kombination abgeleitet von MN (Subtyp B) und GNE8 (Subtyp B), produziert in CHO-Zellen	Phase III
gp160 THO23/LAI-DID (Aventis Pasteur)	gp160 aus einem Subtyp E Isolat	Phase I/II (in Kombination mit anderen Antigenen)
rgp120/HIV-1 SF-2 (Chiron/Biocine)	gp120 abgeleitet von SF-2 (Subtyp B)	Phase II (in Kombination mit anderen Antigenen)
EnvPro (St.Jude Children Research Hospital, Memphis, TN, USA)	gp140 aus einem Subtyp D	Phase I

Das transmembrane Hüllprotein gp41 ist deutlich konservierter als das Oberflächenhüllprotein gp120 und zeigt maximal 15% Sequenzvariationen zwischen verschiedenen Subtypen der Gruppe M (Gaschen et al., 2002, und Tabelle AI, Anhang I). Wie unter Kapitel 1.3.3.2 ausgeführt, ist die geringere Variabilität in der für die Fusion notwendigen Struktur begründet, die nur wenige Aminosäureaustausche ohne Verlust der Funktionalität toleriert. Aufgrund der stärkeren Konservierung der Sequenz von gp41 bei der Infektion einer Zielzelle durch HIV ist das transmembrane Hüllprotein ein besseres Ziel für neutralisierende Antikörper als das Oberflächenprotein gp120.

Das 2F5-Epitop

Der monoklonale Antikörper 2F5 wurde aus einem HIV-positiven Patienten isoliert, bindet das transmembrane Hüllprotein gp41 im membranproximalen Abschnitt der Ektodomäne und inhibiert so subtyp-übergreifend bei sehr geringen Konzentrationen die Replikation von HIV. Bei HIV-positiven Patienten sind Antikörper gegen das 2F5-Epitop ELDKWA (AS 662-667) selten (Calarota et al., 1996, Geffin et al., 1998). Patienten, deren Seren gegen die Sequenz ELDKWA reagieren, zeigten in einer Studie höhere Neutralisationstiter als die Seren von Patienten, die die Sequenz ELDKWA nicht erkennen (Calarota et al., 1996, Geffin et al., 1998). Trotz langjähriger, intensiver Bemühungen (siehe Tabelle 1) ist es bisher nicht gelungen, Antigene zu entwickeln, die das Epitop von 2F5 in der für die Neutralisation relevanten Konformation präsentieren und somit *in vivo* neutralisierende Antikörper induzieren.

Hier konnte das bereits beschriebene, lineare 2F5-Epitop ELDKWA (Muster et al., 1993) mit einer alternativen Kartierungsmethode bestätigt werden (Abb. 10). In zwei anderen Studien wurde das 2F5-Epitop dagegen auf einen weitaus größeren Aminosäure-Bereich definiert (NEQEELLELDKWASLWN, Parker et al., 2001, Hager-Braun et al., 2004). In diesen

Studien wurden längere Peptide, die vom membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 abgeleitet wurden, mit 2F5 inkubiert und die nicht durch den Antikörper abgedeckten Peptidanteile durch eine Protease abgespalten. Das verbliebene Peptid, das durch die sterische Blockade in Folge der Antikörperbindung nicht proteolytisch verdaut wurde, wurde als Epitop definiert. Üblicherweise werden Epitope aufgrund der Größe der Antigenbindungsstelle der IgGs mit einer Länge von fünf bis sieben Aminosäuren beschrieben (Davies et al., 1990), so dass fraglich bleibt, ob diese langen „Epitope“ lediglich aufgrund der verwendeten Kartierungsmethode als minimale Bindungssequenz für 2F5 definiert wurden.

2F5 übt *in vitro* positiven Selektionsdruck auf die Sequenz ELDKWA aus

Es konnte gezeigt werden, dass der in passiven Immuntransfers recht erfolgreich verwendete Antikörper 2F5 *in vitro* innerhalb von vier Wochen zur Bildung von neutralisationsresistenten Quasispezies führt (Abb. 12-15). Diese weisen im Vergleich zum Wildtyp-Virus nur einen Aminosäureaustausch innerhalb der ELDKWA-Sequenz auf, der die Bindung von 2F5 verhindert (Abb. 14) und damit eine Neutralisation unmöglich macht (Abb. 15A). Das mutierte Virus zeigt aber die gleiche Sensitivität gegenüber einem Fusionshemmer (DP178) und ist durch den Aminosäureaustausch nicht in seiner Replikationsfähigkeit beeinträchtigt (Abb. 15). Primärisolate, deren gp41 in den zentralen Positionen des 2F5-Epitops (D und K der ELDKWA-Sequenz) andere Aminosäuren enthält, lassen sich nicht oder nur durch hohe Konzentrationen von 2F5 hemmen (Purtscher et al., 1996). Dagegen sind Sequenzabweichungen in den terminalen Aminosäuren des 2F5-Epitops für die Neutralisation des Isolats durch 2F5 irrelevant (DSouza et al., 1997). Mit dem gp120 bindenden, HIV-neutralisierenden Antikörper IgG1b12 konnten in einem *in vitro* Selektionsversuch ebenfalls neutralisationsresistente Fluchtmutanten induziert werden (Mo et al., 1997). Der Befund, dass ein monoklonaler Antikörper bereits *in vitro* zur Bildung von neutralisationsresistenten Fluchtmutanten führt, unterstreicht, dass ein effektiver Impfstoff ein Spektrum von verschiedenen neutralisierenden Antikörpern, gegen verschiedene Epitope induzieren muss (2F5-resistente Isolate lassen sich durch 4E10 hemmen und 4E10-resistente durch 2F5 (Stiegler et al., 2001)). Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern, die an mehrere Epitope binden, verringert die Wahrscheinlichkeit der Bildung von neutralisationsresistenten Fluchtmutanten. Diese Strategie wird bei der Kombinationstherapie (HAART) und passiven Immuntransfers gegen HIV ausgenutzt.

Die Konformation des 2F5-Epitops

In der Western Blot-Analyse und im ELISA bindet 2F5 an eine größere Menge DP178 schlechter als an eine geringere Menge gp41 (Abb. 11). Damit konnte gezeigt werden, dass die Konformation des Epitops in der vollständigen Ektodomäne zu einer stärkeren Bindung durch 2F5 führt als im linearen Peptid DP178. Neutralisationstests mit verschiedenen HIV-1-Primärisolaten haben gezeigt, dass die Stärke der Replikationshemmung durch 2F5 direkt korreliert mit dessen Affinität zum gp160 des jeweiligen Isolats (Schutten et al., 1997).

In verschiedenen Studien ist bereits gezeigt worden, dass die angrenzenden Aminosäuren der linearen Sequenz ELDKWA für die Stärke der Bindung durch 2F5 entscheidend sind (Ernst et al., 1998, Coëffier et al., 2001, Tian et al., 2002, Barbato et al., 2003). Sie üben aufgrund von intramolekularen Wechselwirkungen Einfluss auf die Konformation des Epitops und damit auf die Affinität von 2F5 für die Sequenz ELDKWA bzw. ELDKWAS aus (Ernst et al., 1998, Coëffier et al., 2001). Dabei schwanken die Assoziations- und Dissoziationskonstanten von

2F5 in Abhängigkeit vom jeweiligen Peptid in Biacore-Bindungsstudien zwischen k_A : 1×10^4 und $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. k_D : 0,0007 und $0,0041 \text{ s}^{-1}$ (Coëffier et al., 2001).

Aufgrund spektroskopischer Analysen werden verschiedene Konformationen, die das 2F5-Epitop und die umgebenden Aminosäuren in der Ektodomäne von gp41 im Zuge der Faltungsvorgänge vor den Membranfusion einnehmen können, postuliert (Schibli et al., 2001, Biron et al., 2002, Tian et al., 2002a/b, Barbato et al., 2003). Barbato et al. (2003) gehen davon aus, dass die Anlagen für diese Konformationen in der linearen Sequenz codiert sind, wobei nicht auszuschließen ist, dass andere Teile des Oberflächen-Transmembran-Komplex Einfluss auf die Struktur des membranproximalen Teils der Ektodomäne von gp41 nehmen (Barbato et al., 2003). In der offenen Konformation von gp41, wenn das Fusionspeptid in die Zielzellmembran eingedrungen ist, liegt es gestreckt vor und nach der Bildung des Sechshelix-Bündel nimmt es eine α -helicale Konformation ein (Biron et al., 2002, Barbato et al., 2003, Saez-Cirion et al., 2003). Durch Röntgen-Kristallstruktur-Analysen von 2F5 mit einem gebundenen Heptamer (ELDKWAS) wurde für das Peptid einen leicht verdrehten Typ I- β -Turn-Konformation postuliert (Pai et al., 2000). Diese Vermutung wird untermauert, durch die Beobachtung, dass 2F5-resistente Isolate Sequenzsubstitutionen an den Positionen im 2F5-Epitop tragen, die die Bildung eines β -Turns unterstützen (Gunasekaran et al., 1997). NMR-Studien bestätigen ebenfalls die Vermutung, dass das 2F5-Epitop zum Zeitpunkt der Neutralisation eine β -Turn-Konformation einnimmt (Barbato et al., 2003). Dabei bilden die zentralen Aminosäuren DKW die Hauptinteraktionsfläche zur Antigenbindungsstelle von 2F5. Der Typ I- β -Turn wird durch Wasserstoffbrücken zwischen Aspartat-Rückgrat und Aspartatseitenkette, sowie den Alanin- und Tryptophan-Amiden stabilisiert. In der dreidimensionalen Struktur liegen die Tryptophan- und die Lysinseitenkette parallel gestapelt vor (Pai et al., 2000).

In verschiedenen Bindungsexperimenten wurde hier erstmals gezeigt, dass eine zweite Sequenz in der gp41-Ektodomäne, die nicht in direkter Nachbarschaft zum 2F5-Epitop angeordnet ist, (AASVTLTVQARQLLS AS532-546) die Bindung von 2F5 an sein lineares Epitop ELDKWA deutlich steigert, ohne im ELISA durch 2F5 gebunden zu werden (Abb. 17 und 18). Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass das Peptid P6342 (AS532-546) die Konformation des 2F5-Epitops dahingehend beeinflusst, dass es zu einer besseren Präsentation des Antigens für den Antikörper kommt.

Durch einen stöchiometrischen 2:1-Überschuß von P6342 gegenüber P6373 konnte dieser Effekt weiter gesteigert werden, wobei ein größerer Überschuß keine weitere Steigerung der Affinität von 2F5 zum Peptid P6373 bewirkte (Abb. 21). Die trimere Struktur von gp41 im Oberflächen-Transmembrankomplex von HIV bietet eine plausible Erklärung für diese Beobachtung. In der energiegünstigen Sechshelix-Konformation des gp41 bilden drei N-terminale Helices eine zentrale, trimere *Coiled-Coil*-Struktur aus. In die außen verlaufenden Furchen zwischen zwei N-terminalen Helices lagern sich die C-terminalen Helices der Ektodomäne ein (Abb. 6). Eine C-terminale Helix interagiert in dieser Konformation also mit zwei N-terminalen Helices. Darüber hinaus ist gezeigt, dass sich die trimere *Coiled-Coil* der N-terminalen Helices in wässrigen Lösungen automatisch bildet (Chan et al., 1997, Lu et al., 1997, Weissenhorn et al., 1997), während Peptide, die von den C-terminalen Helices abgeleitet wurden, nicht multimerisieren. Mischt man diese Peptide, so bilden sich automatisch Sechshelix-Bündel (Lu et al., 1997), was darauf schließen lässt, dass die Konformation der C-terminalen Helices im Sechshelix-Bündel abhängig ist von den durch die Wechselwirkungen mit den je zwei benachbarten, N-terminalen Helices ausgehenden inter- und intramolekularen Einflüssen. Ohne weiterführende Strukturanalysen (IR-, CD- und NMR-Spektroskopie) bleibt dabei unklar, welche Konformation das 2F5-Epitop durch die Interaktion mit dem Peptid P6342 einnimmt.

Alaninsubstitutionen im P6342 führen zu einer Verringerung des steigernden Effekts auf die Affinität von 2F5 gegenüber ELDKWA (Abb. 20). Besonders stark wirkt sich die Doppelsubstitution an den Positionen 542 (R zu A) und 543 (L zu A) aus. Möglicherweise ist die positive Ladung des Arginin542 für die Interaktion mit dem ELDKWA von Bedeutung. Es ist auffällig, dass keiner der Doppelaustausche zu einer vollständigen Reduktion der steigernden Wirkung von P6342 auf die Bindung von 2F5 an ELDKWA führt und dass die Austausche der zentralen Aminosäuren fast keinen Effekt auf die Bindungssteigerung von 2F5 an ELDKWA haben. Es sind also mehrere Aminosäuren, die über das Peptid verteilt vorliegen, an dem Effekt beteiligt. Eine helikale Struktur des Peptides P6342 würde erklären wie mehrere getrennte Aminosäurereste die Interaktionsfläche zum ELDKWA bilden, während die dazwischen liegenden Aminosäuren nicht an der Wechselwirkung beteiligt sind.

Im *in vitro* Neutralisationstest konnte gezeigt werden, dass sich die durch P6342 gesteigerte Affinität von 2F5 an die Sequenz ELDKWA auch auf die neutralisierenden Eigenschaften von 2F5 auswirkt (Abb. 22). Die Kombination der Peptide P6342 und P6373 bewirkte eine zusätzliche Hemmung der HIV-Neutralisation durch 2F5 im Gegensatz zur Hemmung von 2F5 durch P6373 allein. Damit ist gezeigt, dass die Affinität zum Epitop und die neutralisierenden Eigenschaften von 2F5 korrelieren.

Zu welchem Zeitpunkt des Infektionszyklus neutralisiert 2F5 die HIV-Replikation?

Das transmembrane Hüllprotein gp41 von HIV-1 durchläuft während des Anlagerungs- und Fusionsprozesses mehrere Konformationsänderungen (siehe Kapitel 1.4.3.2 und Abb.7). Dabei erfüllt es mehrere Funktionen:

1. Einbringen des Fusionspeptides in die Zielzellmembran
2. Annäherung von Zielzellmembran und Virusmembran
3. Initiation und Stabilisierung einer Fusionspore

Mit Farbstoff-Transfer-Tests konnte eine Zeitkinetik des Anlagerungs- und Fusionsprozesses erstellt werden (Gallo et al., 2003). Die initialen Fusionsprozesse beginnen bei 37°C nach einer Verzögerung von 10-15min. In diesem Zeitraum findet die Anlagerung des Oberflächenproteins gp120 an den primären Rezeptor CD4 und den Korezeptor CCR5 oder CXCR4 statt (Weiss et al., 1996, Munoz-Barroso et al., 1998, Kliger et al., 2001). In den Farbstoff-Transfer-Tests wird eine Sättigung des anschließenden Fusionsprozesses nach 50-100min beobachtet (Gallo et al., 2001). Dabei hat die Dichte der Oberflächen-Transmembran-Komplexe auf der Farbstoff-Donor-Membranseite keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Reaktion, sondern nur auf die Höhe der Sättigung (Lineberger et al., 2002). Die Formierung des Sechs-Helix-Bündels findet vermutlich zeitgleich mit der Initiation einer Fusionspore und deren Ausdehnung statt (Melikyan et al., 2000). Bei der Bildung und Stabilisierung der Fusionspore ist der dem 2F5-Epitop direkt benachbarte, tryptophanreiche Abschnitt unerlässlich (Munoz-Barroso et al., 1999, Salzwedel et al., 1999, Schibli et al., 2001).

Da das 2F5 Epitop zwischen der C-terminalen Helix und dem Transmembrandurchgang lokalisiert ist, also einem Bereich der Ektodomäne des gp41, die während des Fusionsprozesses mehreren Konformationsänderungen unterliegt, ist bisher nicht klar, wann 2F5 an gp41 bindet und welche Schritte des Fusionsprozesses damit unterbunden werden.

Fest steht, dass 2F5 den Anlagerungsprozess an CD4-positive Zellen nicht blockiert (Ugolini et al., 1997). Darüber hinaus gibt es Bindungsstudien, die zeigen, dass 2F5 schwach an intakte, primäre Virusisolate bindet (Nyambi et al., 2000) aber gut an transfizierte gp160-

exprimierende (Finnegan et al., 2002) und infizierte H9-Zellen (Kunert et al., 2000), obwohl zu erwarten wäre, dass der Oberflächen-Transmembran-Komplex auf Viren und Zellen die gleiche Konformation einnehmen sollte. Möglicherweise sind diese Unterschiede durch Wechselwirkungen des cytoplasmatischen Teils von gp41 mit Matrixproteinen im reifen Virus zu erklären, die zu Konformationsänderungen führen und in der Zellmembran nicht vorhanden sind (Wyma et al., 2000). In Anwesenheit von löslichem CD4 kann 2F5 nicht binden, was dafür spricht, dass das Epitop durch Faltungsvorgänge im gp120 zumindest temporär maskiert wird (Sattentau et al., 1995b).

Hier konnte gezeigt werden, dass 2F5 in Immunfluoreszenzstudien und in der Durchflusszytometrie sowohl an gp41 auf der Oberfläche von HIV-infizierte T-Zellen bindet, (Abb. 24) als auch an rekombinant exprimiertes gp41 auf der Oberfläche von Rattensarkomzellen (CCL-47) (Abb. 44 und 45). Letzteres bestätigen die Daten von Finnegan et al. (2002). Die Analyse von raster- und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte, dass 2F5 auch gp41 auf der Oberfläche von Viruspartikeln bindet, wobei die Anzahl der markierten Viren relativ gering war (Abb. 25 und 26). Bei keiner dieser Nachweissysteme kann ausgeschlossen werden, dass das von 2F5 gebundene gp41 frei vorlag, also nicht durch das Oberflächenhüllprotein gp120 abgeschirmt wurde.

Vor dem Hintergrund der ELISA-Bindungsstudien, die gezeigt haben, dass eine zweite Sequenz zur Steigerung der Bindung von 2F5 an ELDKWA beiträgt, bleibt bei diesen Oberflächenfärbungen unklar, welche Konformation die gebundene Sequenz einnimmt und ob die hier identifizierte, stabilisierende Sequenz an der Bildung dieser Konformation beteiligt ist.

Im *in vitro* Neutralisationstest konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von 2F5 mit HIV-1 IIIB zu einer Steigerung der Replikationshemmung führt. Diese Daten bestätigen die These, dass 2F5 den Oberflächen-Transmembran-Komplex bereits im nativen Zustand vor der CD4-Anlagerung bindet (Nyambi et al., 2000, Barbato et al., 2003). Da nicht alle Primärisolate von HIV-1 durch 2F5 gleich gut neutralisierbar sind, obwohl sie keine Mutationen in der Sequenz ELDKWA tragen, kann spekuliert werden, ob diese Unterschiede in der Sensitivität gegenüber 2F5 auf die Zugänglichkeit des Epitops im nativen Zustand des Virus zurückzuführen sind oder möglicherweise auf Mutationen in der stabilisierenden Sequenz E1.

Fraglich bleibt, ob die hier identifizierte, stabilisierende Sequenz im nativen Zustand des Oberflächen-Transmembran-Komplex bereits in räumlicher Nähe zum 2F5-Epitop vorliegt, so dass das 2F5-Epitop bereits hier in der Konformation vorliegt, die hochaffin durch 2F5 gebunden werden kann und die Neutralisation ermöglicht (Barbato et al., 2003). Weissenhorn et al. (1997) postulieren eine metastabile Konformation für das native gp41, die vom darüber liegenden gp120 stabilisiert wird. In dieser nativen Konformation sollen das Fusionspeptid und damit die Sequenz, die die Bindung von 2F5 an ELDKWA unterstützt, in der Nähe des Transmembrandurchgangs, also in der Nähe des 2F5-Epitops liegen.

Modelle zur Beschreibung des Bindungs- und Neutralisationsmechanismus von 2F5

Zusammenfassend lassen sich aus den Bindungsstudien zwei mögliche Modelle ableiten: Im einstufigen Bindungsmodell liegt das 2F5-Epitop ELDKWA im nativen Zustand des Oberflächen-Transmembran-Komplexes frei zugänglich vor und wird durch zwei stabilisierende Sequenzen E1 (die zwei anderen gp41 sind nicht dargestellt) in seiner Faltung unterstützt (Abb. 47). 2F5 kann also bereits vor der Anlagerung des Virus mit hoher Affinität an das für die Neutralisation korrekt gefaltete Epitop binden. Das Oberflächenhüllprotein gp120 kann sowohl den primären Rezeptor CD4 (rot) als auch den Korezeptor binden, aber alle folgenden Faltungsvorgänge des transmembranen Hüllproteins sind blockiert. Das würde

bedeuten, dass das Fusionspeptid nicht in die Zielzellmembran eindringt, kein Klappmechanismus erfolgt und die C-terminale Helix (dunkelblau) nicht mehr entlang des zentralen N-terminalen Helix-Trimers (dunkelrot) ausbilden kann.

Im einstufigen Bindungsmodell erfolgt die Bindung von 2F5 an gp41, die zur Hemmung der Infektion führt, bereits an das native Virus, also vor der Anlagerung an die Zielzelle (in Anlehnung an Weissenhorn et al., 1997, Barbato et al., 2003, siehe Abb.47A). Bindung und Neutralisation erfolgen also gleichzeitig. Für diese metastabile gp41-Konformation gibt es derzeit noch keine Strukturdaten, die Aussagen über die Konformation des transmembranen Hüllproteins unterhalb des gp120 zulassen würden. Barbato et al. postulieren aufgrund von NMR-Analysen einen TypI- β -Turn für das 2F5-Epitop im nativen Zustand (Barbato et al., 2003), also die Sekundärstruktur, die auch die Röntgenkristallstruktur für das Peptid ELDKWAS in der Antigenbindungsstelle des Fab-Fragments von 2F5 voraussagte (Pai et al., 2000).

1. Einstufiges Bindungs- und Neutralisationsmodell für 2F5:

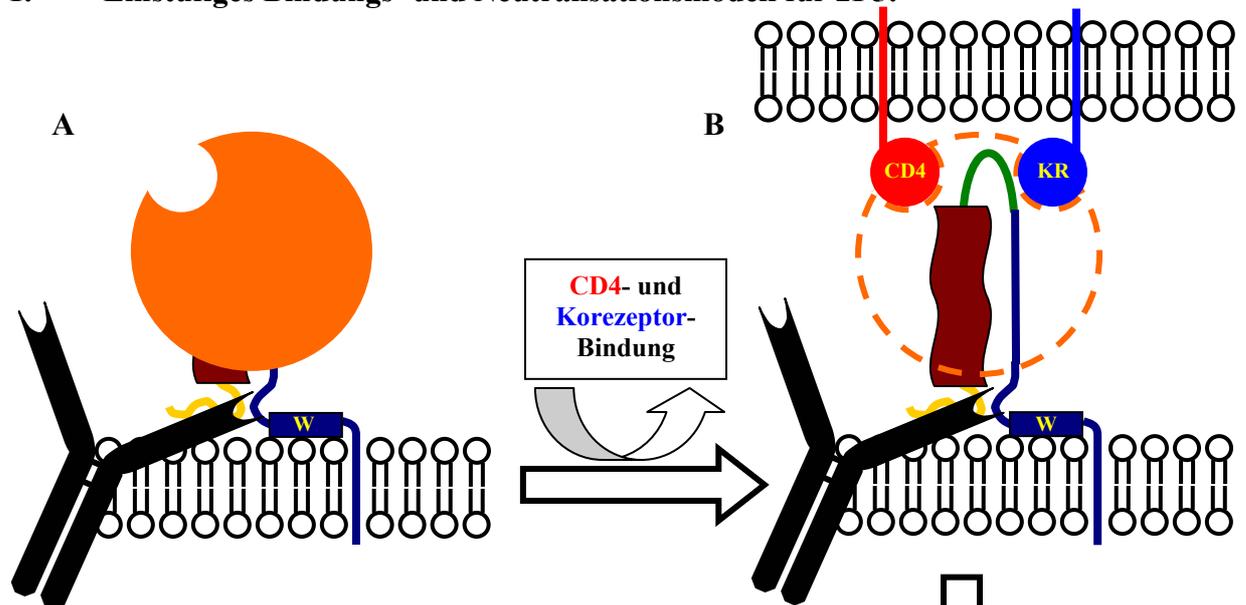


Abb.47: Einstufiges Bindungsmodell für den HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5: A) 2F5 bindet das native gp41 auf der Oberfläche des freien Viruspartikels. Die stabilisierende Sequenz E1 beeinflusst hier die Konformation des 2F5-Epitops ELDKWA so, dass eine hochaffine Bindung durch 2F5 möglich ist, die zur Neutralisation des Virus führt. B) Die Anlagerung von gp120 an den primären Rezeptor CD4 und den Korezeptor (KR) wird durch die Bindung von 2F5 nicht beeinträchtigt. C) Die sich anschließenden Konformationsänderungen im gp41 werden durch die 2F5 Anlagerung blockiert. Wegen der Übersichtlichkeit sind gp120 und gp41 als Monomere dargestellt

Das würde allerdings bedeuten, dass die für die Neutralisation notwendige Epitopkonformation im HIV-positiven Patienten auf jedem freien Viruspartikel exponiert ist, was die Frage aufwirft, warum es kaum neutralisierende Antikörper gegen dieses Epitop im Patienten gibt (Calarota et al., 1996). Darüber hinaus habe Golding et al. (2002) gezeigt, dass der Klappmechanismus der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins gp41 nicht durch die Bindung von 2F5 beeinträchtigt wird. Sollte das Epitop dennoch in irgendeiner Form maskiert sein und die Bindung durch 2F5 nur aufgrund der speziellen Struktur (verlängerte CDR3-Schleife, siehe Kapitel 1.6.4.2) des Antikörpers erfolgen (Kunert et al., 1998), ist

unklar, warum 2F5 auf intakten Viren nur schwach bindet (Nyambi et al., 2000, siehe Immuno-Gold-Färbung Abb.25 und 26).

Genau wie im einstufigen Bindungsmodell liegt die Sequenz ELDKWA auch im zweistufigen Bindungsmodell auf dem nativen Viruspartikel frei zugänglich vor (Abb. 48A).

2. Zweistufiges Bindungs- und Neutralisationsmodell für 2F5

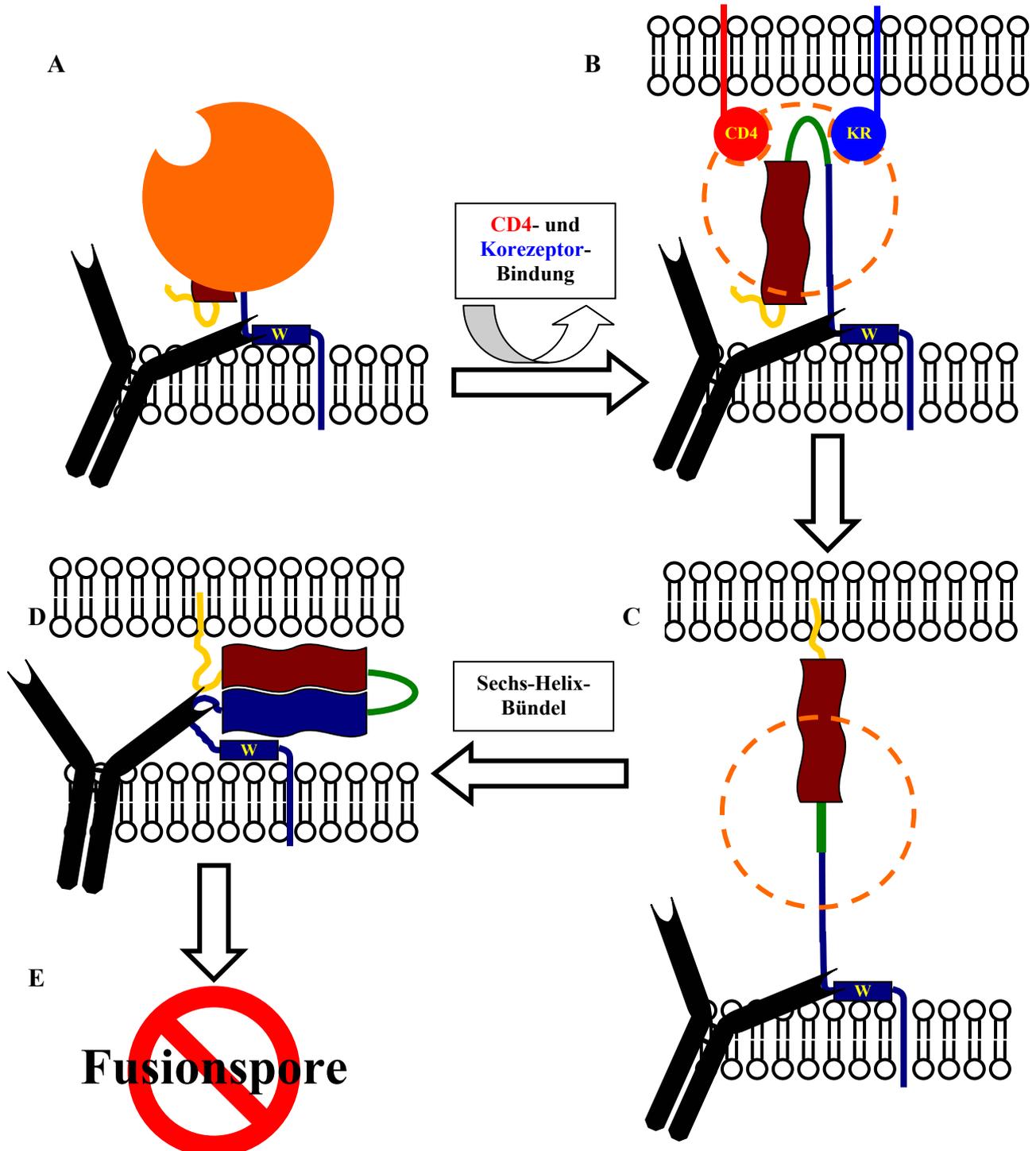


Abb.48: Zweistufiges Bindungsmodell für den HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5: A) 2F5 bindet an die Sequenz ELDKWA mit geringer Affinität bereits auf dem freien Viruspartikel. B) Die Anlagerung von gp120 an den primären Rezeptor CD4 und den Korezeptor wird durch die 2F5-gp41-Interaktion nicht behindert. C) Gp41 dringt mit dem N-terminalen Fusionspeptid in die Zielzellmembran. D) Durch die Annäherung der N- und C-terminalen Helixregionen, werden die Zielzellmembran und die Virusmembran einander angenähert. Die stabilisierende Sequenz E1 rückt in räumliche Nähe zum 2F5-Eptiop ELDKWA. Dadurch wird die Sequenz ELDKWA in eine Konformation gezwungen, die eine hochaffine Bindung von 2F5 ermöglicht. E) Die weiteren Konformationsänderungen, die zur Bildung und Stabilisierung einer Fusionspore führen würden, sind blockiert. Wegen der Übersichtlichkeit sind gp120 und gp41 als Monomere dargestellt. Alle Strukturen sind farblich analog zu Abbildung 47 markiert.

Hier sind das 2F5-Epitop und die stabilisierenden Sequenzen E1 allerdings räumlich so weit von einander getrennt, dass das 2F5-Epitop in einer Konformation vorliegt, die von 2F5 nur mit geringer Affinität gebunden wird (Abb. 48A).

Die Bindung des primären Rezeptors CD4 und des Korezeptors durch das Oberflächenhüllprotein gp120 (orange (Abb. 48B)) wird in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Ugolini et al. nicht durch die 2F5-Bindung blockiert (Ugolini et al., 1997, Golding et al., 2002). Im anschließenden Fusionsprozess dringt das N-terminale Fusionspeptid (gelb) in die Zielzellmembran ein (Abb. 48C). Durch die Bildung der Sechshelix-Konformation, bei der sich die C-terminale Helices (dunkelblau) entlang des N-terminalen Helix-Trimers (dunkelrot) ausbilden, werden die Zielzellmembran und die Virusmembran zueinander gezogen (Peisajovich et al., 2003).

Zu diesem Zeitpunkt sind das 2F5-Epitop und die stabilisierenden Sequenzen E1 räumlich sehr dicht beieinander. Das 2F5-Epitop nimmt eine Konformation ein, die durch 2F5 hochaffin gebunden wird (Abb. 48D). Nach Pai et al. handelt es sich dabei um einen verdrehten Typ-I β -Turn (Pai et al., 2000). Der Typ-I β -Turn könnte infolge des Zusammenklappens der N-terminalen und C-terminalen Helix und der daraus resultierenden Zugbewegung entstehen. Der α -helicale, membranproximale Bereich der dem 2F5-Epitop angeschlossen ist interagiert dabei über die Tryptophanreste mit der Virusmembran. Das 2F5-Epitop könnte also durch die N- und C-terminal liegenden Strukturen in den für die Neutralisation durch 2F5 notwendigen β -Turn gefaltet werden. Die von Pai et al. beschriebene Verdrehung des β -Turns könnte durch die Interaktion des 2F5-Epitops mit zwei E1-Sequenzen entstehen. In ELISA-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass 2F5 besser an ELDKWA bindet, wenn ein zweifacher stöchiometrischer Überschuss der Peptide, die von der E1-Sequenz abgeleitet wurden, vorliegt (im Vergleich zu einem 1:1 Verhältnis). Das 2F5-Epitop legt sich also vermutlich in die Furche, die aus zwei E1-Regionen geformt wird. Da diese an die N-terminale Helixregion angrenzen, kann davon ausgegangen werden, dass die Drehung der Furche der *Coiled-Coil* für die Verdrehung des β -Turns verantwortlich ist (Abb. 49).

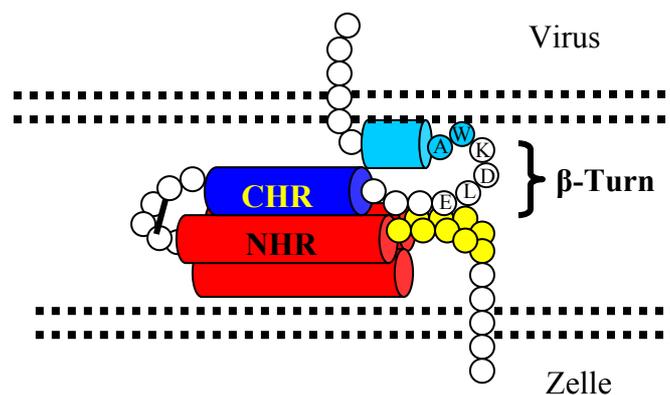


Abb.49: Schematische Darstellung der gp41-Ektodomäne in der Konformation, die zur Neutralisation durch 2F5 führt. Die N-terminale Helixregion (NHR, rot) und die C-terminale Helixregion (CHR, blau) liegen bereits zusammengeklappt als Sechshelix-Bündel vor und zwei E1-Sequenzen (gelb) stabilisieren das 2F5-Epitop ELDKWA (es ist der Übersicht wegen nur ein CHR und ein Fusionspeptid in der Zellmembran dargestellt). Der tryptophanreiche Bereich (hellblauer Zylinder) bildet eine α -Helix und interagiert über die Tryptophanseitenketten mit der Virusmembran. Die Fusionspore ist noch nicht gebildet. Das 2F5-Epitop wird C-terminal durch die an der Virusmembran fixierte tryptophanreiche Helix und N-terminal durch die aus zwei NHR / E1-Sequenzen gebildete Grube in einen leicht verdrehten Typ-I β -Turn gefaltet.

Durch die hochaffine Bindung von 2F5 wird die an den Klappmechanismus anschließende Bildung der Fusionspore unterbunden (Abb. 48E). Bindung von gp41 und Neutralisation finden also zu getrennten Zeitpunkten statt und die Blockierung des Infektionsprozesses erfolgt später als im einstufigen Bindungsmodell.

Das zweistufige Bindungsmodell wird durch aktuelle 2F5-Immunpräzipitationsstudien unterstützt, die zeigen, dass 2F5 sowohl an natives gp41 auf der Oberfläche von Viruspartikeln, als auch an gp41 in einer artifiziell erzeugten, Präfusionskonformation bindet (DeRosny et al., 2004). Die hier gezeigte Steigerung der Neutralisation von HIV-1 IIIB durch 2F5 in Abhängigkeit von der Zeit der Vorinkubation von Virus und Antikörper, deutet ebenfalls auf ein zugängliches Epitop auf der Oberfläche des nativen Viruspartikels hin, wobei diese Bindung relativ schwach ist, da erst ab einem Vorinkubationszeitraum von 45min ein Sättigungseffekt zu beobachten war (Abb. 23), was darauf hindeutet, dass das relativ bewegliche Oberflächenprotein gp120 das 2F5-Epitop zeitweise partiell oder vollständig abdeckt.

Das zweistufige Bindungsmodell postuliert eine Konformation für die Sequenz ELDKWA auf den nativen Viren, die nur schwach durch 2F5 gebunden wird. Die Bindungsstudien auf intakten Viruspartikeln (u.a. auch durchgeführt mit dem hier verwendeten HIV-1 IIIB (Nyambi et al., 2000) und die hier gezeigten Immunogoldfärbungen (Abb. 25 und 26) unterstützen diese Annahme. In diesem Modell wird der Fusionsprozess erst während oder kurz nach der Bildung der Sechs-Helix-Konformation durch 2F5 blockiert. Diese Konformation ist vermutlich nicht die energiegünstigste Konformation von gp41. Die durch den Klappmechanismus der Ektodomäne freigesetzte Energie wird zur Induktion und Stabilisierung der Fusionspore aufgewendet. Sobald das gp41-Trimer die energiegünstige Sechs-Helix-Konformation einnimmt, ist der Fusionprozess also abgeschlossen (Munoz-Barroso et al., 1999, Melikyan et al., 2000). Zudem wäre die energiegünstigste Konformation im HIV-positiven Patienten vermutlich auch als Antigen verfügbar, so dass virusneutralisierende Antikörper gegen diese vermehrt anwesend sein müssten.

Dem zweistufigen Bindungsmodell zu folge kann auf eine intermediäre, kurzlebige Konformation geschlossen werden, die bei der Bindung durch 2F5 zur Neutralisation der Infektion der Zielzelle durch HIV führt und die im HIV-positiven Patienten nur zeitlich sehr kurz exponiert ist, so dass die Wahrscheinlichkeit zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen eine solche Konformation sehr gering ist.

Vor dem Hintergrund der hier durchgeführten Bindungsstudien und im Einklang mit den Strukturdaten aus anderen Studien, erscheint das zweistufige Bindungsmodell plausibler.

Vergleich des Bindungsmechanismus von 2F5 mit dem von neutralisierenden Antikörpern gegen andere Retroviren

Die Ektodomänen vieler Transmembranprotein von umhüllten Viren, darunter auch die der Retroviren, bilden im energetisch günstigsten Zustand eine Sechs-Helix-Konformation, bestehend aus drei zentral zur *Coiled-Coil* gelagerten, N-terminalen Helices und drei außen angelagerten C-terminalen Helices (Gallagher et al., 1989, Weissenhorn et al., 1997). Bei allen Viren, die dieses Motiv aufweisen, erfüllt das transmembrane Hüllprotein die gleichen Funktionen: (1) Einbringen des Fusionspeptides in die Zielzellmembran nach Rezeptorbindung durch das Oberflächenprotein, (2) Annäherung und Fusion von Zielzellmembran und Virusmembran durch Annäherung der N- und C-terminalen Helixregion und (3) Initiation und Stabilisierung der Fusionspore, um dem Partikel Eintritt in die Zielzelle zu verschaffen. Der gleiche Mechanismus wurde sogar bei präsynaptischen Vesikeln beobachtet, die sich zur Fusion mit der präsynaptischen Neuronenmembran eines sehr ähnlich aufgebauten Transmembranproteins bedienen (Skehel und Wiley, 1998).

Neutralisierende Antikörper gegen das Katzen-Immundefizienz-Virus (FIV) binden genau wie der neutralisierende Antikörper 4E10 an den tryptophanreichen, membranproximalen Bereich der Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins von FIV und konnten mit Peptiden, die von dieser Region abgeleitet wurden, induziert werden (Richardson et al., 1998). Für das transmembrane Hüllprotein p15E des porzinen endogenen Retrovirus (PERV) konnte gezeigt werden, dass nach Immunisierung einer Ziege mit einer rekombinant hergestellten Ektodomäne ein virusneutralisierendes Serum induziert wurde, das Epitope im tryptophanreichen, membranproximalen Bereich der Ektodomäne und im Bereich C-terminal des Fusionspeptids bindet (Fiebig et al., 2003). Das Epitop im tryptophanreichen, membranproximalen Bereich der Ektodomäne zeigt trotz des geringen Verwandtschaftsgrades der beiden Viren (PERV ist ein γ -Retrovirus, HIV-1 ein Lentivirus) Sequenzhomologien zum Epitop des HIV-neutralisierenden Antikörpers 4E10 (Fiebig et al., 2003). Genau wie 2F5 zeigt auch dieses Serum eine synergistisch gesteigerte Bindung an Peptide, die vom membranproximalen Epitop (PERV-E2) abgeleitet wurden, in Anwesenheit von Peptiden, die vom N-terminalen Epitop (PERV-E1) abgeleitet wurden (Fiebig et al., 2003). Während 2F5 im ELISA nur die Sequenz ELDKWA binden kann und Peptide die von der E1-Sequenz abgeleitet wurden nicht erkannt, werden sowohl das PERV-E1, als auch das PERV-E2 Epitop durch das neutralisierende Ziegenserum gebunden (Fiebig et al., 2003).

Gegen ein weiteres γ -Retrovirus, das Katzen-Leukämie-Virus, FeLV, konnten nach Immunisierung einer Ziege mit der rekombinant exprimierten Ektodomäne des transmembranen Hüllproteins p15E ebenfalls virusneutralisierende Antikörper induziert werden, die Epitope im tryptophanreichen, membranproximalen Bereich der Ektodomäne und im Bereich C-terminal des Fusionspeptids binden (Langhammer et al., persönliche Mitteilung). Um sicherzugehen, dass es sich hier um Epitope handelt, die bei allen Retroviren exponiert vorliegen und nach Bindung durch Antikörper zur Inhibierung der Infektion führen, sind weitere Vergleichsstudien notwendig. Es besteht aber die Möglichkeit, dass es aufgrund der gemeinsamen Funktion der transmembranen Hüllproteine dieser Viren, konservierte Strukturen gibt, die bei hochaffiner Bindung durch Antikörper zur Neutralisation des Virus führen.

Entwicklung von rekombinanten Antigenen zur Induktion einer HIV-neutralisierenden Immunantwort

Mehrere Gruppen haben aufgrund der unterschiedlichen Strukturmodelle für die Konformation des 2F5-Epitops Antigene konstruiert, die die Sequenz ELDKWA in unterschiedliche Faltungen zwingen. Durch N-terminale Extension von DP178 konnte die Affinität von 2F5 zu dem Peptid moderat gesteigert werden. Die angefügten Sequenzen führten in NMR- und CD-spektroskopischen-Analysen zu einer gesteigerten α -Helikalität (Joyce et al., 2002). Gleichzeitig konnte mit diesen Modifikationen die Wirkung von DP178 als Fusionshemmer gesteigert werden. Trotz der gesteigerten Affinität von 2F5 zu dem modifizierten DP178 induzierte dieses im Tiermodell keine neutralisierenden Antikörper (Tabelle 1). Auch Antigene, die die Sequenz ELDKWA in einer Typ-I β -Turn-Konformation präsentieren, wie es nach den Kristallstrukturdaten von Pai et al., 2000 im Paratop von 2F5 vorliegen soll, induzieren keine neutralisierenden Antikörper im Tiermodell (Ho et al., 2002, McGaughey et al., 2003).

Erstmals konnte hier neben dem bereits beschriebenen 2F5-Epitop (ELDKWA) eine zweite, stabilisierende Sequenz identifiziert werden, die für die Faltung des 2F5-Epitops entscheidend ist und in deren Gegenwart 2F5 hochaffin an die Sequenz ELDKWA bindet. Alle vorangegangenen, in der Literatur beschriebenen Versuche einen neutralisierenden Antikörper gegen den membranproximalen Anteil der Ektodomäne von gp41 zu induzieren, basierten auf

dem ausschließlichen Einsatz der Sequenz ELDKWA als Antigen in unterschiedlichen Aminosäurekontexten (Tabelle 1). Die Bedeutung der „korrekten“ Konformation dieses Epitops für die Induktion von neutralisierenden Antikörpern stand dabei außer Frage, konnte aber aufgrund mangelnder Strukturdaten nicht in die Konstruktion der Antigene einfließen. Durch die Identifizierung einer stabilisierenden, zweiten Sequenz E1, die deutlich zur Bindungsstärke von 2F5 an die Sequenz ELDKWA beiträgt, besteht erstmals eine neue Option zur Konstruktion von Antigenen, die metastabile Konformationsepitope der gp41-Ektodomäne nachahmen, welche im Zuge der Infektion kurzzeitig auftreten.

Die Herausforderung dieses Projektes bestand also in der Konstruktion von rekombinanten Untereinheitenvakzinen, die sowohl das lineare 2F5-Epitop ELDKWA, als auch die stabilisierende Sequenz E1, bzw. davon abgeleitete Sequenzen (siehe Kapitel 3.2.1) enthalten. Durch die korrekte Ausrichtung der beiden Sequenzen zueinander und ein geeignetes Trägermolekül sollten so Antigene produziert werden, die im Ratten- und Ziegenmodell HIV-neutralisierende Seren induzieren.

Zunächst wurden rekombinate Antigene mit einem „natürlichen“ gp41-Aminosäurekontext (CBP-rgp41, rgp41-6xHIS) konstruiert (Abb. 27). Diese wurden analog zum rekombinanten PERV-p15E kloniert und exprimiert, von dem bekannt war, dass es im Ratten- und Ziegenmodell PERV-neutralisierende Antiseren induziert, die an Sequenzen im Bereich C-terminal des Fusionspeptides und N-terminal des Membrandurchganges binden, welche vermutlich ein Konformationsepitop bilden (Fiebig et al., 2003, Fiebig et al., in Vorbereitung). In der Western Blot Analyse wird besonders das CBP-rgp41 gut durch 2F5 gebunden (Abb. 42).

Um das 2F5-Epitop und die hier identifizierte, stabilisierende Region E1 in räumlicher Nähe zueinander in einem rekombinanten Antigen zu präsentieren, wurde als Trägermolekül die rekombinante Ektodomäne des transmembranen Hüllprotein p15E von PERV gewählt (rp15E). Diese Hybrid-Antigene (I-III) enthielten unterschiedlich lange HIV-Sequenzen, die von der E1-Sequenz und dem membranproximalen Abschnitt der Ektodomäne von gp41 abgeleitet wurden (Abb. 32). Das Hybrid I reagiert in der Western Blot Analyse schlechter mit 2F5 als die Hybride II und III, was an der N-terminal verkürzten E1-Sequenz liegen kann (Abb. 42). Eine Quantifizierung der Bindung von 2F5 an die verschiedenen Konstrukte war allerdings aufgrund des unterschiedlichen Reinheitsgrades der rekombinanten Antigene nicht möglich.

In einem dritten Ansatz wurden rekombinante Antigene konstruiert, die ausschließlich aus Sequenzen bestehen, die von der E1-Sequenz und dem membranproximalen Abschnitt der Ektodomäne von gp41 abgeleitet wurden. Diese Sequenzen sind durch fünf Aminosäuren lange Peptidlinker miteinander verbunden (Abb. 38).

Syngene1 und CBP-Syngene1 bestehen aus zwei E1-abgeleitete Aminosäuresequenzen und einer Sequenz, die vom 2F5- und 4E10-Epitop-abgeleitet wurde. Die zweite E1-Sequenz wurde eingefügt, da in ELISA-Bindungsstudien gezeigt werden konnte, dass 2F5 an ein stöchiometrisches Verhältnis von 2:1 (P6342:P6373) besser bindet als Peptide, die im Verhältnis von 1:1 präsentiert wurden (Abb. 21). Im CBP-Syngene2 wurden diese Strukturen dimerisiert (siehe Anhang III), um die Vernetzung von B-Zell-Rezeptoren zu fördern, was eine Kostimulus-unabhängige Immunantwort bewirken sollte (Janeway et al., 2002, Seite 369ff). Die Dimerisierung hatte jedoch eine deutlich verringerte Bindung des Antigens durch 2F5 in der Western Blot Analyse zur Folge (Abb. 42), was möglicherweise auf die Wechselwirkung der vom E1-Bereich abgeleiteten Sequenzen zurückzuführen ist, da bekannt ist, dass Peptide, die von der N-terminalen Helix, abgeleitet wurden, spontan in wässrigen Lösungen trimerisieren (Markosyan et al., 2002). Die folgen einer solchen Trimerisierung für die Präsentation des 2F5-Epitops wären gravierend.

Induktion von bindenden und neutralisierenden Antiseren

Die Seren aller immunisierten Ratten zeigten gp41 spezifische Antikörper, wobei der Titer (Abb. 30, 34 und 40) und die erkannten Epitope (Abb. 31, 35 und 41) in Abhängigkeit der applizierten Antigene und der jeweiligen Immunisierung variierten. Es lässt sich allerdings keine Korrelation zwischen der Reaktivität der Antigene mit 2F5 (Abb. 42) und der Induktion von Antikörpern gegen die Peptide PE1 und PE2 zeigen. Die Präsentation der Epitope in den jeweiligen Antigenen ist also abhängig vom verwendeten Trägermolekül. Demzufolge sollte auch die Induktion von neutralisierenden Seren nur mit einigen der erstellten Antigene gelingen, da die Ausrichtung der stabilisierenden Sequenz und des 2F5-Epitops für die Faltung des letzteren maßgeblich ist.

Die Spezifität der unterschiedlichen Seren bestätigt diese Vermutung. Nur die Ratten, die mit den Antigenen rgp41-6xHIS, Hybrid II und III und Syngene1, sowie CBP-Syngene1 und 2 immunisiert wurden, hatten Antikörper gegen den membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 gebildet (Abb. 31, 35 und 41). Diese Epitope liegen teilweise N-terminal des 2F5-Epitops (rgp41-6xHIS), überlappen mit dem 2F5-Epitop (Hybrid II (Gruppe 7), Syngene 1, CBP-Syngene1 und 2) oder liegen C-terminal davon (Hybrid II (Gruppe 5)). Die Ursache für die Verschiebung des C-terminalen Epitops in den Gruppen, die mit gp41-Antigenen immunisiert wurden, im Vergleich zu denen, die mit Hybrid-Antigenen immunisiert wurden, ist möglicherweise in der 40AS längeren Ektodomäne von gp41 (im Vergleich zum PERV-p15) zu suchen. CBP-rgp41 und rgp41-6xHIS haben zusätzlich Antikörper induziert, die Epitope in der immundominanten Schleife erkennen. Clerici et al. haben aus dem Serum von HEPS virusneutralisierende IgAs isoliert, die an diesen Bereich der Ektodomäne von gp41 binden (Clerici et al., 2002). Auch hier scheint die Konformation in der diese Epitope präsentiert werden, ausschlaggebend für die Induktion von neutralisierenden Seren zu sein.

In keinem der Tiere, die mit rekombinanten Antigenen immunisiert wurden, konnten Antiseren induziert werden, die wie 2F5 ausschließlich den membranproximalen Teil der Ektodomäne binden, wobei nicht auszuschließen ist, dass die polyklonalen Seren solche Antikörper enthalten.

Virusneutralisierende Antiseren konnten nur in einer Immunisierung mit Hybrid II (gegen HIV-1 IIIB) in drei von sechs Ratten induziert werden (Gruppe 5, siehe Tabelle 6). Von diesen drei Tieren zeigten lediglich die Tiere O4 ($\Delta_{ct} = 7,3$) und P4 ($\Delta_{ct} = 6,9$) eine deutlich oberhalb des Schwellenwerts von $\Delta_{ct} > 2$ liegende Virushemmung, vergleichbar mit der Hemmwirkung von $10\mu\text{g/ml}$ 2F5, im *in vitro* Neutralisationstest. Die prozentuale Virushemmung der Seren O4 und P4 (Verdünnung 1:16) liegt damit bei über 98%, d.h. von 30000 infektiösen Viruspartikeln wurden 29400 an der Infektion gehindert. Unklar ist, warum nicht alle Seren dieser Immunisierungsgruppe neutralisierend wirken zumal alle Seren in der Epitopkartierung mit dem Peptidset die gleichen Peptide erkennen und etwa den gleichen Titer an bindenden Antikörpern gegen die Peptide PE1 und PE2 aufweisen (Tabelle 4). Die Immunisierung weiterer Ratten und der Ziege 23 mit Hybrid II (Gruppe 6 und 7) nach dem gleichen Immunisierungsschema induzierte bei keinem der Tiere neutralisierende Antiseren, wobei hier auch die Titer der bindenden Antikörper gegen die Peptide PE1 und PE2 geringer ausfielen und die Epitope der Seren aus den Folgeimmunisierungen im Vergleich zu den Seren der Gruppe 5 unterschiedlich lokalisiert waren (Abb. 34 und 35). Die Ziege 23 produzierte weder bindende noch neutralisierende Antikörper (Abb. 34, Tabelle 5).

Die Seren der Tiere, die mit rgp41-6xHIS immunisiert wurden, binden ein Epitop innerhalb der C-terminalen Helixregion. Bisher sind keine neutralisierenden Antikörper beschrieben worden, die an die relativ kompakten, helikalen Strukturen der Ektodomäne von gp41 binden. Möglicherweise würde eine Deletion in der immundominanten Schleife dieses Antigens, zu

einer Verschiebung des C-terminalen Epitops führen, wobei die Auswirkung einer solchen Deletion auf die Konformation des gesamten Antigens nicht vorauszusagen wäre.

Alle Syngene-Konstrukte induzieren zwar Antikörper die mit dem 2F5-Epitop überlappen, aber keines dieser Seren zeigte virusneutralisierende Aktivität im *in vitro* Neutralisationstest. Möglicherweise verhindert der relativ kurze, fünf Aminosäuren lange Peptidlinker zwischen der E2-Sequenz und der zweiten E1-Sequenz (Abb. 38) die Ausbildung eines Typ-I β -Turns, der von Pai et al., als die Konformation definiert wurde, die das 2F5-Epitop im Paratop des Antikörpers einnimmt (Pai et al., 2000).

Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Präparation des Antigen-Adjuvant-Gemisches und die verwendeten Expressionen der rekombinanten Antigene (hier Hybrid II) einen gewichtigen Einfluss auf das Immunisierungsergebnis haben. Es gilt diese Variablen zu kontrollieren, um sichergehen zu können, dass einige der anderen rekombinanten Antigene nicht ebenfalls zur Induktion neutralisierender Seren geeignet sind.

Die virushemmende Wirkung der Rattenserum O4 und P4 hatte keinen Einfluss auf die Replikation eines γ -Retrovirus (PERV) und ließ sich durch Zugabe der Peptide PE1 und PE2 im *in vitro* Neutralisationstest um 76% (O4) bzw. 28% (P4) reduzieren (Abb. 37), was zeigt, dass die Neutralisationswirkung HIV-spezifisch ist und über Bindung an gp41 wirkt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass die Peptide PE1 und PE2 vom HIV-Isolat MN abgeleitet wurden, während die HIV-Sequenzen in den Hybriden vom HIV-Moleklarklon pNL4-3 stammen. Dadurch ergeben sich Sequenzabweichungen (3 Aminosäureaustausche), die erklären könnten, warum die beiden Seren in ihrer neutralisierenden Wirkung unterschiedlich stark hemmbar sind. Darüber hinaus werden die Peptide in wässriger Lösung nicht die gleichen Konformationen nachbilden wie die Hybride, so dass ein Teil der neutralisierenden Antikörper nicht kompetitiv gehemmt wird.

Welche Folgerungen lassen sich aus dem Immunisierungsstudien mit freien rekombinanten Antigenen ziehen?

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass die Induktion von neutralisierenden Seren, die gegen den membranproximalen Teil der Ektodomäne von gp41 gerichtet sind, möglich ist, auch wenn die große Zahl von Immunisierungsstudien (siehe Tabelle 1) und die hier gezeigten Daten dafür sprechen, dass eine Vielzahl von Faktoren Einfluss darauf nimmt, ob lediglich bindende oder hochaffine, neutralisierende Antiseren gegen die metastabilen Konformationsepitope des transmembranen Hüllproteins von HIV induziert werden. Darüber hinaus wurde aus den hier durchgeführten Studien klar, dass die Affinität von 2F5 zu einem der verwendeten Antigene nicht mit der Induktion von neutralisierenden Antikörper korreliert, da die Antigene, die in der Western Blot Analyse sehr stark mit 2F5 reagierten, keine neutralisierenden Seren im Rattenmodell induzieren (Abb. 42). Das völlige Fehlen von gp41-spezifischen Antikörpern im Serum der immunisierten Ziege 23 ist eher auf ein technisches Problem bei der Immunisierung, als auf ein Problem des verwendeten Tiermodells zurückzuführen, da zumindest bindende Antikörper induzierbar sein müssten.

Induktion von hochaffinen, neutralisierenden Antikörpern

Bis heute sind nur vier monoklonale Antikörper aus HIV-positiven Patienten isoliert worden, die ein breites Spektrum von HIV-Isolaten neutralisieren, 2G12, IgG1b12, 2F5 und 4E10. Drei dieser Antikörper weisen strukturelle Besonderheiten auf (siehe Kapitel 1.6.4). Die lange CDR3 Schleife von 2F5 (22 AS) weist auf eine Antikörperreifung im Patienten hin (Kunert et

al., 1998). Die mittlere Länge der CDR3-Schleife von humanen IgGs beträgt bei beim Menschen 13AS, wobei IgGs mit längeren CDR3-Schleifen nicht unüblich sind, bei Kaninchen 11-12 und bei Mäusen 9-10 (Wu et al., 1993). Ihre Bedeutung für die neutralisierende Wirkung wurde durch eine aktuelle Studie untermauert (Zwick et al., 2004). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Aminosäureaustausche in der CDR3-Schleife die Affinität von 2F5 zur Sequenz ELDKWA um bis zu 90% verringern können. Möglicherweise ist also im hier verwendeten Rattenmodell die Induktion von 2F5-ähnlichen IgGs durch die Applikation von Protein-Vakzinen nur bedingt möglich.

Die Antikörperreifung in Vertebraten unterliegt dem Massenwirkungsgesetz (Conn et al., 1967) und der klonalen Selektionstheorie (Burnet, 1969, Siskind et al., 1969). Die Höhe der Affinitätskonstante K_a eines Antigenrezeptors zu seinem Antigen ist entscheidend darüber, wie erfolgreich ein Lymphozyt diese Antigene über den B-Zellrezeptor bindet. Diese Lymphozyten werden somit vermehrt zur Proliferation und zur Produktion der entsprechenden hochaffinen Antikörper angeregt. Durch somatische Hypermutation kann die Affinität der Antikörper bei wiederkehrender Antigenpräsentation zudem sprunghaft ansteigen (Berek et al., 1985, Wsocki et al., 1986, Berek et al., 1987). Neben der Auswahl eines konservierten Epitops sind also auch die wiederholte Präsentation und die Faltung dieses Epitops entscheidend für die Induktion von hochaffinen Antikörpern. Vor diesem Hintergrund sollten alternative Immunisierungsstrategien angewendet werden, die den hier aufgeklärten Neutralisationsmechanismus von 2F5 einbeziehen.

Möglicherweise würde die Präsentation von Hybrid II, mit dem hier zumindest in drei Tieren HIV-neutralisierende Seren induziert werden konnten, auf der Oberfläche von replizierenden Kanarienviren zu einer vermehrten Bildung von hochaffinen, neutralisierenden Antikörpern führen. Alternativ würde eine Erhöhung der Antigenapplikationen womöglich im Zuge der klonalen Selektion von B-Zellen, zur Produktion solcher Antikörper beitragen. Dabei bleibt jedoch zu bedenken, dass für die Anwendung im Menschen die Zahl der aufeinander folgenden Applikation möglichst gering gehalten werden sollte.

Exposition von gp41-abgeleiteten Antigenen auf Zelloberflächen

DNA-Vakzine wurden deutlich später entwickelt als die klassischen Impfstoff-Formen und können sowohl eine humorale, als auch eine CTL-Antwort induzieren. Sie wurden in Nagern erfolgreich eingesetzt gegen Influenza (Ulmer et al., 1993), Malaria (Sedegah et al., 1994, Doolan et al., 1996), Tuberkulose (Tascon et al., 1996) und Ebola (Xu et al., 1998). Als Vektoren für DNA-Impfstoffe wurden verschiedene replikationsinkompetente, virale und nicht virale Vektorsysteme in Tiermodellen und klinischen Versuchen getestet (Tabelle 12). Virale Vektorsysteme weisen zwar eine höhere Transfektionseffizienz als nicht-virale Vektoren auf, beinhalten aber das Risiko von Insertionsmutagenesen, wenn sie in das Wirtsgenom integrieren.

Die hier eingesetzte Immunisierungsstrategie basierte zwar auf der Verwendung von Plasmid-DNA, hatte jedoch primär die Induktion einer humoralen, zusätzlich zu einer CTL-Immunantwort zum Ziel. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Ektodomäne mit mindestens drei Bereichen mit Lipidmembranen interagieren kann (Moreno et al., 2004), dem Fusionspeptid (Mobley et al., 2001), der immundominanten Schleife (Santos et al., 1998) und der membranproximalen, tryptophanreichen α -Helix (Munoz-Barroso et al., 1999). Es sollte daher ein System zur Präsentation von gp41-abgeleiteten Antigenen in einem „natürlichen“ Membrankontext erstellt werden.

Tabelle 12: Auflistung einiger viraler Vektorsysteme, die für klinische DNA-Immunsierung gegen HIV verwendet werden. Die Tabelle zeigt nur einige der in klinischen Tests befindlichen Vektoren (siehe www.iavi.org).

Virale Vektoren (Literatur)	Vakzine aus klinischen Tests
Kanarienvogelpockenvirus (Belshe et al., 1998)	ALVAC vCP205, HIV-1 SubtypB <i>env, gag, pol</i> (Aventis Pasteur) <i>Phase I</i>
Hühnerpockenvirus (Tartaglia et al., 1990)	rFPV-HIV-B, modifiziertes <i>gag, pol, rev tat, vpu</i> , trunkiertes <i>env</i> , Subtyp B (Australian Thai Vaccine Consortium) <i>Phase I/II</i>
Modifiziertes Vaccinia Ankara (Sutter et al., 1996)	PolyEnv1, 23 verschiedene <i>env</i> -Gene (gp140), Subtyp B und D (St. Jude Children Research Hospital, Memphis, TN, USA) <i>Phase I</i>
Adenovirus (Kuruta et al., 1999)	Ad5, codonoptimiertes <i>gag</i> , Subtyp B (Merck), <i>Phase I</i>
Lentivirus (Naldini et al., 1996, Zufferey et al., 1998)	-
Adenoassoziertes Virus (Monahan et al., 2000)	-
Sindbis Virus (Huang et al., 1996)	-
Venezuelanisches equines Enzephalitisvirus Alphavirus (Davis et al., 2000)	AVX 101, <i>gag</i> , Subtyp C (AlphaVax), <i>Phase I</i>

Dafür wurden die codierenden Bereiche für das vollständige gp41, sowie für zwei von der Ektodomäne abgeleitete Antigene (gp41-NHR und -CHR) in den pDisplay-Vektor eingebracht (Abb. 43). Dieser codiert für eine I γ k-Leitsequenz, welches das codierte Protein auf die Oberfläche der exprimierenden Zelle adressiert. Dort wird das vollständige gp41 über seine eigene Transmembrandomäne verankert. Die verkürzten Antigene gp41-NHR und -CHR wurden in Kombination auf der Oberfläche von Zellen exprimiert. Die vorab durchgeführte, transiente Transfektion von Rattenzellen (CCL47) hat gezeigt, dass die Expression der gp41-Antigene auch ohne Selektionsdruck in hohem Maße erfolgt (siehe Abb.44 und 45).

Immunsierung mit membranständigen Antigenen

Die ballistische Immunsierung von Ratten mit den hier klonierten pDisplay-gp41-Vektoren bietet im Gegensatz zur DNA-Immunsierung über intramuskuläre Injektion, den Vorteil einer höheren und konstanteren Transfektionseffizienz (Trimble et al., 2003). Es wurden verschiedene Immunsierungsstrategien verfolgt, in denen die pDisplay-gp41 und die kombinierten Vektoren pDisplay-gp41-NHR und pDisplay-gp41-CHR in verschiedenen Variationen in die Ratten eingebracht wurden (Tabelle 9). Aus früheren DNA-Immunsierungen war bekannt, dass die induzierten Antikörpertiter geringer ausfallen, als bei herkömmlichen Immunsierungen mit Protein- oder Peptidantigenen (Moelling et al., 1997). Nur die Seren von drei der sieben immunsierten Tiere zeigen bindende Antikörpertiter gegen die Peptide PE1 und PE2 (12.3 bindet nur PE2, Abb. 47) im ELISA (Abb. 46). Diese drei Tiere (12.1-3) haben in der primären Immunsierung pDisplay-gp41 erhalten, wobei die Tiere 12.1 und 12.2 in den folgenden Immunsierungen die Kombination aus den Vektoren pDisplay-gp41-NHR und pDisplay-gp41-CHR appliziert wurde. Die Seren der letzten beiden Tiere zeigen einen geringeren Antikörpertiter, als das Serum von Tier 12.3, das dreimal mit pDisplay-gp41 immunsiert wurde. Eine Tendenz lässt sich daraus nicht zwangsläufig

ableiten, da das Tier 12.4, das ebenfalls dreimal mit pDisplay-gp41 immunisiert wurde, keine gp41-spezifischen Antikörper gebildet hat. Die Immunisierung mit den Vektoren für die gp41-Untereinheiten NHR und CHR bewirkte nicht die Induktion von gp41-spezifischen Antisera, was möglicherweise auf die geringere Expressionsrate zurückzuführen ist, die bereits *in vitro* beobachtet wurde (Abb. 44 und 45), oder auf eine unvollständige oder inkorrekte Zusammenlagerung der beiden Konstrukte auf der Zelloberfläche. Um hier eine weitergehende Aussage treffen zu können, sind Immunisierungsstudien mit größeren Rattengruppen und eine höhere Anzahl von aufeinander folgenden Immunisierungen notwendig.

Ist ein HIV-Impfstoff prinzipiell möglich?

Die hier durchgeführten Immunisierungsstudien haben gezeigt, dass die Induktion von virusneutralisierenden Antikörpern möglich, wenn auch schwierig ist.

In einem Immunisierungsversuch (Gruppe 5) wurden bei 50% der Tiere Seren induziert, die eine HIV-spezifische, virusneutralisierende Aktivität besitzen (Abb. 36 und 37), allerdings ist es weder gelungen diese Immunisierung zu reproduzieren (Tabelle 5), noch wurde gezeigt, dass die Seren gegen ein breites Spektrum von HIV-Primärisolaten neutralisierend wirken, die im Regelfall einen geringere Sensitivität gegenüber neutralisierenden Antikörper aufweisen (Moore et al., 1995a, Moore et al., 1995b, Sullivan et al., 1995, Wrin et al., 1995).

Es bleibt dennoch festzuhalten, dass es hier erstmals gelungen ist auf Basis des Wirkungsmechanismus eines neutralisierenden Antikörpers, der aus einem HIV-positiven isoliert wurde, Antigene zu konstruieren, die neutralisierende Seren im Tiermodell induzieren.

Verschiedene Befunde geben jedoch Anlass zur Hoffnung, dass die präventive Induktion einer virusneutralisierenden Immunantwort gegen HIV möglich ist. Bei den Patienten, die ohne antiretrovirale Therapie stabile CD4⁺-Zellzahlen besitzen, lassen sich neben einer HIV-1-spezifischen CD8⁺ T-Zellaktivität auch neutralisierende Antikörper nachweisen, die vermutlich kooperativ zu einer deutlichen Abschwächung der Infektion im Körper führen (Pilgrim, et al, 1997, Wagner et al., 1999).

HIV weist eine relativ geringe, dosisabhängige sexuelle und perinatale Übertragungseffizienz auf (Garcia et al., 1999, Quinn, 2000, Gray et al., 2001) und die Menge an übertragenen, infektiösen Partikeln ist gering (50 freie Viruspartikel/ml und 5×10^4 infizierte Lymphozyten bei der sexuellen Übertragung (Levy et al., 1989). Neutralisierende Antikörper sind das einzige bekannte Werkzeug des adaptiven Immunsystems, das in der Lage ist, eine primäre Infektion zu verhindern, weil sie den Erreger außerhalb einer Wirtszelle erkennen und am Eintritt hindern. Sie können in genügend hohen Titern im Serum oder der Mucosa vorhanden sein, um einen neu auftretenden Erreger ohne Zeitverlust zu stoppen (Robbins et al., 1995). Alle lizenzierten Vakzine gegen Viruserkrankungen funktionieren über die Induktion von Antikörpern (Robbins et al., 1995, Krause et al., 1997, Parren et al., 2000). Der induzierte Impfschutz korreliert dabei am besten mit dem Titer an neutralisierenden Antikörpern im Serum des Patienten (Robbins et al., 1995) und für verschiedene tierische Lenti- und γ -Retroviren, (z.B. FIV und FeLV) konnten mit dem Oberflächenhüllprotein und dem transmembranen Hüllprotein bereits virusneutralisierende Seren induziert werden, die zumindest temporär einen Schutz vor der Virusinfektion vermitteln (Richardson et al., 1998, Uhl et al., 2002).

Die Effizienz einer HIV-spezifischen, humoralen Immunantwort lässt sich aus passiven Immunisierungsstudien im Tiermodell und im Menschen ableiten. In SCID-Mäusen (*severe combined immune deficiency*), deren Immunsystem durch humane PBMCs rekonstituiert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Infusion von monoklonalen, virusneutralisierenden

Antikörpern gegen eine Infektion mit HIV-1 schützt (Gauduin et al., 1997). Die Applikation von monoklonalen, neutralisierenden IgG1s gegen ein vaginal inokuliertes SHIV (rekombinantes SIV/HIV-Hybrid mit SIV-Core und HIV-Hüllproteinen) in weibliche Rhesus-Makaken schützte diese vor einer Infektion (Shibata et al., 1997). Ein Mutter-Kind-Transfer von SHIVs konnte in einer anderen Studie bei Rhesusaffen ebenfalls durch eine Dreifachkombination von monoklonalen, neutralisierenden Antikörpern verhindert werden. In SIV-Infektionsstudien konnten neutralisierende Seren, die 24h vor der Virusbelastung gespritzt wurden, zwar nicht die Infektion verhindern, allerdings war der Krankheitsverlauf in einigen Tieren deutlich abgeschwächt (Chen et al., 2001, Hofmann-Lehmann et al., 2001, Mascola et al., 2002, Xu et al., 2002, Ruprecht et al., 2003). In frühen Schimpansen-Studien konnten die Tiere durch die Applikation von polyklonalen HIV-Antigenen (HIVIG) oder anti-V3 monoklonalen Antikörpern vor einer Infektion durch HIV-1 (IIIB) geschützt werden (Eichberg et al., 1992, Emini et al., 1992). Diese Daten aus Tiermodellen konnten durch klinische Phase I Studien, bei denen HIV-positiven Patienten eine Kombination monoklonaler, neutralisierender Antikörper injiziert wurde, bestätigt werden. Hier führte die passive Immunisierung zu einer deutlichen Reduktion der Viruslast im Patienten, teilweise unter die Nachweisgrenze (Stiegler et al., 2002).

Bei allen diesen Studien bleibt festzuhalten, dass die applizierte Antikörperdosis und der daraus resultierende Serumtiter sehr hoch waren. Ob es gelingt, durch eine aktive Immunisierung derartig hohe Serumtiter an neutralisierenden Antikörpern zu induzieren, ist unklar. Aus den schützenden Antikörpertiter aus den passiven Immunisierungsstudien im Primatenmodell lassen sich nur bedingt Schlussfolgerungen ziehen, wie hoch der Titer an neutralisierenden Antikörpern nach einer präventiven aktiven Immunisierung im Menschen sein muss um einen 100% Schutz vor einer Infektion mit HIV zu gewährleisten, zumal in den zitierten Primatenstudien keine unterstützende CTL-Antwort vorhanden war. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die benötigte, durch einen Impfstoff induzierte Antikörperkonzentration im Serum, die zu einer sterilen Immunität führt, deutlich niedriger sein könnte, als die in den passiven Immunisierungsstudien notwendige, wo die Antikörperkonzentration zudem ohne weitere Applikationen konstant absinkt. Mascola et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass es eine deutliche Diskrepanz zwischen den zur Neutralisation notwendigen Titern im *in vitro* System und im passiven Immunisierungsversuch gibt. In letzterem wurde nur ein Fünftel der Antikörpermenge für eine Reduktion der TCID um 90% im Vergleich zum *in vitro* System benötigt (Mascola et al., 2000).

Präzise Aussagen über den benötigten Serumtiter an neutralisierenden Antikörpern, der zu einer sterilen Immunität gegenüber einer HIV-1-Infektion führt, werden erst nach den ersten erfolgreichen Impfstoffstudien im Primaten und Menschen möglich sein.

Ausblick

Mit der Aufklärung des Bindungsmechanismus von 2F5 ist die Basis für neue Impfstoffansätze gelegt. Die hier aufgeführten Bindungsstudien zeigen, dass der Wirkmechanismus des HIV-neutralisierenden Antikörpers 2F5 komplexer ist als bisher in der Literatur beschrieben. Weitergehende Strukturuntersuchungen sind notwendig, um die Interaktion des 2F5 Epitops (ELDKWA) mit der hier identifizierten, stabilisierenden Sequenz E1 zu charakterisieren. Geeignet für diese Untersuchungen sind NMR-, CD- und IR-spektroskopische Methoden, die einen detaillierten Einblick in die Sekundär- und Tertiärstruktur der beiden Peptide während der Interaktion geben würden. Über *Stopped-Flow*-kinetische Untersuchungen ließen sich weitergehende Aussagen über die gesteigerte Avidität von 2F5 an ELDKWA in Gegenwart der stabilisierenden Sequenz E1 aussagen.

Um den Einfluss der einzelnen Aminosäuren von E1 auf die gesteigerte Bindung von 2F5 an ELDKWA näher zu untersuchen, wurden hier bereits erste ELISA-Studien mit aminosäuresubstituierten E1 durchgeführt. Die physiologische Bedeutung der E1-Sequenz für die Neutralisation lässt sich besser durch Neutralisationstests mit E1-mutierten Moleklarklonen (z.B. pNL4-3) untersuchen. So könnte der Effekt von Einzelaminosäureaustauschen im E1 Bereich (ohne Veränderung des 2F5-Epitops) auf die Sensitivität gegenüber 2F5 untersucht werden.

Bei den hier verwendeten laboradaptierten HIV-Isolaten konnte gezeigt werden, dass das 2F5-Epitop bereits auf dem nativen Virus in geringem Umfang zugänglich ist. Für die Effizienz eines Impfstoffes und der damit induzierten, neutralisierenden Antikörper ist die Dauer der Exposition der Bindungsstellen essentiell. Um sicherzustellen, dass die Exposition des korrekt gefalteten 2F5-Epitops auch auf Primärisolaten gewährleistet ist, sollten weitere Neutralisationstest durchgeführt werden, bei denen 2F5 und das jeweilige Primärisolat miteinander vorinkubiert werden.

Um weitergehende Aussagen bezüglich eines generellen Neutralisationsmechanismus von Antikörpern, die den membranproximalen Bereich der Ektodomäne binden, zu treffen, wären ähnliche Bindungsstudien, wie sie hier für den monoklonalen Antikörper 2F5 durchgeführt wurden, mit dem monoklonalen, HIV-neutralisierenden Antikörper 4E10 notwendig. Dieser bindet in direkter Nachbarschaft zum 2F5-Epitop und weist, genau wie 2F5 ein breit wirksames Neutralisationsspektrum auf. Eine zusätzliche Aufklärung der Bindungsmechanismen von neutralisierenden Antikörpern gegen den membranproximalen Teil der Ektodomäne anderer Retroviren kann unter Umständen einen für alle Retroviren gültigen Neutralisationsmechanismus aufdecken. Es wurden darüber hinaus neutralisierende Antikörper gegen die ISU-Domäne beschrieben, die wie der membranproximale Teil der Ektodomäne von gp41 stark konserviert ist und damit möglicherweise ein weiteres Ziel für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes, der vom transmembranen Hüllprotein abgeleitet ist, darstellt.

Die hier entworfenen und getesteten Impfstoff-Konstrukte zeigen keine oder nur eine unbefriedigende Induktion neutralisierender Antikörper im Rattenmodell. Die korrekte Ausrichtung der stabilisierenden Sequenz E1 und des 2F5-Epitops zueinander stellte die eigentliche Herausforderung dieses Projektes dar. Bevor die notwendigen Vakzinierungsstudien im SHIV-Primatenmodell begonnen werden können ist es unerlässlich, Impfstoffkonstrukte zu erstellen, die eine verlässliche Induktion von subtypübergreifend wirksamen neutralisierenden Antikörpern bewirken. Diese müssen die Konformation des 2F5-Epitops so nachahmen, dass hochaffine neutralisierende Antikörper induziert werden. Die Verwendung von replizierenden Vektoren, wie Kanarienvpocken, für die nachhaltige Präsentation des Antigens *in vivo* könnte zu einer verbesserten Immunantwort beitragen. Darüber hinaus muss der Einfluss verschiedener Adjuvantien und die Wahl des verwendeten Tiermodells (unter Berücksichtigung der besonderen Struktur von 2F5) untersucht werden.

Weitergehende Strukturanalysen könnten die entscheidenden Hinweise erbringen, die zur Konstruktion eines wirksamen HIV-Impfstoffs auf Basis des Wirkmechanismus des virusneutralisierenden Antikörpers 2F5 führen.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung eines effektiven, subtypübergreifend wirksamen HIV-1-Impfstoff stellt auch mehr als 20 Jahre nach der Erstbeschreibung von AIDS eine der größten Herausforderungen der modernen Virologie und Immunologie dar. Konventionelle Impfstoffansätze zur Induktion einer humoralen Immunantwort unter Verwendung von attenuierten oder abgetöteten Viren, gereinigten, viralen Proteinen oder rekombinanten Untereinheitenvakzinen scheitern entweder an Sicherheitsbedenken oder induzieren lediglich bindende Antikörper.

In den letzten Jahren sind die Ursachen für dieses Scheitern durch immer detailliertere Strukturuntersuchungen des HI-Virus aufgedeckt worden. Seit einigen Jahren wird das Augenmerk vermehrt auf maskierte Strukturen gelegt, die erst während des Infektionsprozesses und der daraus resultierenden Konformationsänderungen im Oberflächen-Transmembran-Komplex offengelegt werden. Monoklonale Antikörper, die aus HIV-positiven Patienten isoliert wurden und gegen den Oberflächen-Transmembran-Komplex gerichtet sind, erkennen solche Strukturen und zeigen teilweise ein Neutralisationsspektrum, das praktisch alle Subtypen der Gruppe M umfasst. Der monoklonale Antikörper 2F5 gehört zur kleinen Gruppe dieser subtypübergreifend virusneutralisierenden Antikörper und wurde bereits erfolgreich in passiven Immunisierungsstudien im Primatenmodell und im Menschen getestet. Bisher ist es nicht gelungen, trotz Kenntnis des linearen 2F5-Epitops (ELDKWA) im membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41, den Wirkmechanismus von 2F5 vollständig zu verstehen und Antigene zu konstruieren, die *in vivo* virusneutralisierende Antiseren induzieren, die ein ähnlich breites Neutralisationsspektrum aufweisen wie 2F5.

Hier konnte erstmals gezeigt werden, dass 2F5 *in vitro* Selektionsdruck auf den membranproximalen Anteil der Ektodomäne von gp41 ausübt und so die Bildung von neutralisationsresistenten Fluchtmutanten durch Aminosäureaustausche im 2F5-Kernepitop (LDKW) induziert.

Durch Bindungsstudien wurde hier erstmals eine Sequenz aus dem N-terminalen Bereich der Ektodomäne von gp41 identifiziert (E1-Sequenz), die die Bindung von 2F5 an die Sequenz ELDKWA deutlich steigert ohne selbst durch den Antikörper gebunden zu werden. Dieser Effekt konnte sowohl im ELISA, als auch im *in vitro* Neutralisationstest beobachtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von 2F5 an ELDKWA bereits vor der Anlagerung des Virus an die Zielzelle erfolgt und eine Vorinkubation von Virus und 2F5 folglich zu einer gesteigerten Hemmung der Virusreplikation *in vitro* führt.

Auf Basis dieser Daten wurde ein neues, zweistufiges Bindungs- und Neutralisationsmodell erstellt, das sowohl die hier gewonnenen Erkenntnisse über den Wirkmechanismus von 2F5, als auch die bisher veröffentlichten Strukturanalysen vereinigt.

Ausgehend von diesem neuen Bindungs- und Neutralisationsmodell wurden rekombinante Antigene konstruiert, die Anteile aus dem membranproximalen Bereich der Ektodomäne von gp41 und die E1-Sequenz in unterschiedlichen Trägermolekülen beinhalten. Zusätzlich wurden Plasmide generiert, die nach DNA-Immunisierung zur Präsentation der codierten gp41-abgeleiteten Antigene auf der Zelloberfläche führen.

Eines der hier entwickelten Antigene (Hybrid II) induzierte HIV-spezifische neutralisierende Seren im Rattenmodell und bildet möglicherweise die Basis für die Entwicklung eines HIV-Vakzins.

6. Literatur

- Adachi A, Gendelman HE, Koenig S, Folks T, Willey R, Rabson A, Martin MA.
Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone.
J Virol. 1986 Aug;59(2):284-91
- Aids Alert. 2003 Apr;18(4):41, 43-5
VaxGen vaccine trial fails the test but may offer insights.
- Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA.
CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1.
Science. 1996 Jun 28;272(5270):1955-8
- Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.
Science. 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Erratum in: Science 1998 Jun 19;280(5371):1821
- Armbruster C, Stiegler GM, Vcelar BA, Jager W, Michael NL, Vetter N, Katinger HW.
A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1.
AIDS. 2002 Jan 25;16(2):227-33
- Baba TW, Jeong YS, Pennick D, Bronson R, Greene MF, Ruprecht RM.
Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques.
Science. 1995 Mar 24;267(5205):1820-5
- Barbato G, Bianchi E, Ingallinella P, Hurni WH, Miller MD, Ciliberto G, Cortese R, Bazzo R, Shiver JW, Pessi A.
Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion.
J Mol Biol. 2003 Jul 25;330(5):1101-15
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L
Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS).
Science. 1983 May 20;220(4599):868-71
- Belshe RB, Gorse GJ, Mulligan MJ, Evans TG, Keefer MC, Excler JL, Duliege AM, Tartaglia J, Cox WI, McNamara J, Hwang KL, Bradney A, Montefiori D, Weinhold KJ.
Induction of immune responses to HIV-1 by canarypox virus (ALVAC) HIV-1 and gp120 SF-2 recombinant vaccines in uninfected volunteers. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group.
AIDS. 1998 Dec 24;12(18):2407-15
- Beneduce F, Kusov Y, Klinger M, Gauss-Muller V, Morace G.
Chimeric hepatitis A virus particles presenting a foreign epitope (HIV gp41) at their surface.
Antiviral Res. 2002 Aug;55(2):369-77
- Benit L, Dessen P, Heidmann T.
Identification, phylogeny, and evolution of retroviral elements based on their envelope genes.
J Virol. 2001 Dec;75(23):11709-19
- Berger EA, Murphy PM, Farber JM.
Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.
Annu Rev Immunol. 1999;17:657-700
- Berek C, Griffiths GM, Milstein C.
Molecular events during maturation of the immune response to oxazolone.
Nature. 1985 Aug 1-7;316(6027):412-8

- Berek C, Milstein C.
Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response.
Immunol Rev. 1987 Apr;96:23-41
- Berman PW, Gregory TJ, Riddle L, Nakamura GR, Champe MA, Porter JP, Wurm FM, Hershberg RD, Cobb EK, Eichberg JW.
Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160.
Nature. 1990 Jun 14;345(6276):622-5
- Birch MR, Learmont JC, Dyer WB, Deacon NJ, Zaunders JJ, Saksena N, Cunningham AL, Mills J, Sullivan JS.
An examination of signs of disease progression in survivors of the Sydney Blood Bank Cohort (SBBC).
J Clin Virol. 2001 Oct;22(3):263-70
- Biron Z, Khare S, Samson AO, Hayek Y, Naider F, Anglister J.
A monomeric 3(10)-helix is formed in water by a 13-residue peptide representing the neutralizing determinant of HIV-1 on gp41.
Biochemistry. 2002 Oct 22;41(42):12687-96
- Bogdan C.
The function of type I interferons in antimicrobial immunity.
Curr Opin Immunol. 2000 Aug;12(4):419-24
- Brown F.
Human immunodeficiency virus.
Science. 1986 Jun 20;232(4757):1486
- 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 Apr;10(4):359-69
- Burnet FM, The clonal selection theory of immunity, *Vanderbilt University Press*, Nashville (1969)
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, Sawyer LS, Hendry RM, Dunlop N, Nara PL, et al.
Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody.
Science. 1994 Nov 11;266(5187):1024-7
- 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 Nov;75(22):10892-905
- Caffrey M.
Model for the structure of the HIV gp41 ectodomain: insight into the intermolecular interactions of the gp41 loop.
Biochim Biophys Acta. 2001 May 31;1536(2-3):116-22
- Calarese DA, Scanlan CN, Zwick MB, Deechongkit S, Mimura Y, Kunert R, Zhu P, Wormald MR, Stanfield RL, Roux KH, Kelly JW, Rudd PM, Dwek RA, Katinger H, Burton DR, Wilson IA.
Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition.
Science. 2003 Jun 27;300(5628):2065-71
- Calarota S, Jansson M, Levi M, Broliden K, Libonatti O, Wigzell H, Wahren B.
Immunodominant glycoprotein 41 epitope identified by seroreactivity in HIV type 1-infected individuals.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 May 20;12(8):705-13

Carpenter CC, Fischl MA, Hammer SM, Hirsch MS, Jacobsen DM, Katzenstein DA, Montaner JS, Richman DD, Saag MS, Schooley RT, Thompson MA, Vella S, Yeni PG, Volberding PA.
Antiretroviral therapy for HIV infection in 1998: updated recommendations of the International AIDS Society-USA Panel.

JAMA. 1998 Jul 1;280(1):78-86

Carr A, Cooper DA.

Images in clinical medicine. Lipodystrophy associated with an HIV-protease inhibitor.

N Engl J Med. 1998 Oct 29;339(18):1296

Carr A, Samaras K, Thorisdottir A, Kaufmann GR, Chisholm DJ, Cooper DA.

Diagnosis, prediction, and natural course of HIV-1 protease-inhibitor-associated lipodystrophy, hyperlipidaemia, and diabetes mellitus: a cohort study.

Lancet. 1999 Jun 19;353(9170):2093-9

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 Apr;5(2):157-60

Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS.

Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein.

Cell. 1997 Apr 18;89(2):263-73

Chen X, Scala G, Quinto I, Liu W, Chun TW, Justement JS, Cohen OJ, vanCott TC, Iwanicki M, Lewis MG, Greenhouse J, Barry T, Venzon D, Fauci AS.

Protection of rhesus macaques against disease progression from pathogenic SHIV-89.6PD by vaccination with phage-displayed HIV-1 epitopes.

Nat Med. 2001 Nov;7(11):1225-31

Clapham PR, McKnight A.

Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses.

J Gen Virol. 2002 Aug;83(Pt 8):1809-29

Clerici M, Barassi C, Devito C, Pastori C, Piconi S, Trabattoni D, Longhi R, Hinkula J, Broliden K, Lopalco L.
Serum IgA of HIV-exposed uninfected individuals inhibit HIV through recognition of a region within the alpha-helix of gp41.

AIDS. 2002 Sep 6;16(13):1731-41

Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P.

Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells.

Science. 1995 Dec 15;270(5243):1811-5

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 Nov 22;19(7-8):684-93

Cohen J.

Weakened SIV vaccine still kills.

Science. 1997 Oct 3;278(5335):24-5

Conley AJ, Kessler JA 2nd, Boots LJ, Tung JS, Arnold BA, Keller PM, Shaw AR, Emini EA.

Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr 12;91(8):3348-52

Conn EE, Stumpf PK, Chemistry of biological compounds, in Outlines of Biochemistry (2nd ed ed.), John Wiley and Sons, New York, 3-11 (1967)

Copeland KF, McKay PJ, Rosenthal KL.

Suppression of activation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat by CD8⁺ T cells is not lentivirus specific.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1995 Nov;11(11):1321-6

Daniel MD, Kirchhoff F, Czajak SC, Sehgal PK, Desrosiers RC.

Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene.

Science. 1992 Dec 18;258(5090):1938-41

Davies DR, Padlan EA, Sheriff S.

Antibody-antigen complexes.

Annu Rev Biochem. 1990;59:439-73

Davis NL, Caley IJ, Brown KW, Betts MR, Irlbeck DM, McGrath KM, Connell MJ, Montefiori DC, Frelinger JA, Swanstrom R, Johnson PR, Johnston RE.

Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles.

J Virol. 2000 Jan;74(1):371-8. Erratum in: J Virol 2000 Apr;74(7):3430

Deacon NJ, Tsykin A, Solomon A, Smith K, Ludford-Menting M, Hooker DJ, McPhee DA, Greenway AL, Ellett A, Chatfield C, et al.

Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients.

Science. 1995 Nov 10;270(5238):988-91

Decroix N, Quan CP, Pamonsinlapatham P, Bouvet JP.

Mucosal immunity induced by intramuscular administration of free peptides in-line with PADRE: IgA antibodies to the ELDKWA epitope of HIV gp41.

Scand J Immunol. 2002 Jul;56(1):59-6

Decroix N, Pamonsinlapatham P, Quan CP, Bouvet JP.

Impairment by mucosal adjuvants and cross-reactivity with variant peptides of the mucosal immunity induced by injection of the fusion peptide PADRE-ELDKWA.

Clin Diagn Lab Immunol. 2003 Nov;10(6):1103-8

De Rosny E, Vassell R, Jiang S, Kunert R, Weiss CD.

Binding of the 2F5 Monoclonal Antibody to Native and Fusion-Intermediate Forms of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41: Implications for Fusion-Inducing Conformational Changes.

J Virol. 2004 Mar 1;78(5):2627-2631

Denner J, Norley S, Kurth R.

The immunosuppressive peptide of HIV-1: functional domains and immune response in AIDS patients.

AIDS. 1994 Aug;8(8):1063-72

Denner J, Persin C, Vogel T, Hausteiner D, Norley S, Kurth R.

The immunosuppressive peptide of HIV-1 inhibits T and B lymphocyte stimulation.

J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 1996 Aug 15;12(5):442-50

Denner J.

Immunosuppression by retroviruses: implications for xenotransplantation.

Ann N Y Acad Sci. 1998 Dec 30;862:75-86

Denner J, Specke V, Thiesen U, Karlas A, Kurth R.

Genetic alterations of the long terminal repeat of an ecotropic porcine endogenous retrovirus during passage in human cells.

Virology. 2003 Sep 15;314(1):125-33

Dianzani F, Antonelli G, Riva E, Turriziani O, Antonelli L, Tyring S, Carrasco DA, Lee H, Nguyen D, Pan J, Poast J, Cloyd M, Baron S.

Is human immunodeficiency virus RNA load composed of neutralized immune complexes?

J Infect Dis. 2002 Apr 15;185(8):1051-4. Epub 2002 Apr 01

Dong XN, Xiao Y, Chen YH.

ELNKWA-epitope specific antibodies induced by epitope-vaccine recognize ELDKWA- and other two neutralizing-resistant mutated epitopes on HIV-1 gp41.

Immunol Lett. 2001 Jan 1;75(2):149-52

Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, Hobart P, Charoenvit Y, Hoffman SL.

Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ cell-, interferon gamma-, and nitric oxide-dependent immunity.

J Exp Med. 1996 Apr 1;183(4):1739-46

Dore GJ, Brown T, Tarantola D, Kaldor JM.

HIV and AIDS in the Asia-Pacific region: an epidemiological overview.

AIDS. 1998;12 Suppl B:S1-10

D'Souza MP, Livnat D, Bradac JA, Bridges SH.

Evaluation of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by neutralization assays: performance criteria for selecting candidate antibodies for clinical trials. AIDS Clinical Trials Group Antibody Selection Working Group.

J Infect Dis. 1997 May;175(5):1056-62

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

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

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

Eckhart L, Raffelsberger W, Ferko B, Klima A, Purtscher M, Katinger H, 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 Sep;77 (Pt 9):2001-8

Eichberg JW, Murthy KK, Ward RH, Prince AM.

Prevention of HIV infection by passive immunization with HIVIG or CD4-IgG.

AIDS Res Hum Retroviruses. 1992 Aug;8(8):1515

Emini EA, Schleif WA, Nunberg JH, Conley AJ, Eda Y, Tokiyoshi S, Putney SD, Matsushita S, Cobb KE, Jett CM, et al.

Prevention of HIV-1 infection in chimpanzees by gp120 V3 domain-specific monoclonal antibody.

Nature. 1992 Feb 20;355(6362):728-30

Engvall E, Perlman P.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.

Immunochemistry. 1971 Sep;8(9):871-4

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

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

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

Evans DT, Desrosiers RC.

Immune evasion strategies of the primate lentiviruses.

Immunol Rev. 2001 Oct;183:141-58

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

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

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

- 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 Nov;178(5):1359-68
- Fiebig U, Stephan O, Kurth R, Denner J.
Neutralizing antibodies against conserved domains of p15E of porcine endogenous retroviruses: basis for a vaccine for xenotransplantation?
Virology. 2003 Mar 15;307(2):406-13
- Finnegan CM, Berg W, Lewis GK, DeVico AL.
Antigenic properties of the human immunodeficiency virus transmembrane glycoprotein during cell-cell fusion.
J Virol. 2002 Dec;76(23):12123-34
- Freed EO, Myers DJ, Risser R.
Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Jun;87(12):4650-4
- Freed EO, Martin MA.
The role of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins in virus infection.
J Biol Chem. 1995 Oct 13;270(41):23883-6
- Furuta RA, Wild CT, Weng Y, Weiss CD.
Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41.
Nat Struct Biol. 1998 Apr;5(4):276-9. Erratum in: *Nat Struct Biol* 1998 Jul;5(7):612
- Gallaher WR, Ball JM, Garry RF, Griffin MC, Montelaro RC.
A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1989 Aug;5(4):431-40
- Gallo SA, Puri A, Blumenthal R.
HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process.
Biochemistry. 2001 Oct 16;40(41):12231-6
- Gallo SA, Finnegan CM, Viard M, Raviv Y, Dimitrov A, Rawat SS, Puri A, Durell S, Blumenthal R.
The HIV Env-mediated fusion reaction.
Biochim Biophys Acta. 2003 Jul 11;1614(1):36-50
- Gao F, Yue L, White AT, Pappas PG, Barchue J, Hanson AP, Greene BM, Sharp PM, Shaw GM, Hahn BH
Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa.
Nature. 1992 Aug 6;358(6386):495-9
- Garcia PM, Kalish LA, Pitt J, Minkoff H, Quinn TC, Burchett SK, Kornegay J, Jackson B, Moye J, Hanson C, Zorrilla C, Lew JF.
Maternal levels of plasma human immunodeficiency virus type 1 RNA and the risk of perinatal transmission.
Women and Infants Transmission Study Group.
N Engl J Med. 1999 Aug 5;341(6):394-402
- Garred P, Madsen HO, Balslev U, Hofmann B, Pedersen C, Gerstoft J, Svejgaard A.
Susceptibility to HIV infection and progression of AIDS in relation to variant alleles of mannose-binding lectin.
Lancet. 1997 Jan 25;349(9047):236-40
- Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, Novitsky V, Haynes B, Hahn BH, Bhattacharya T, Korber B.
Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection.
Science. 2002 Jun 28;296(5577):2354-60
- Gauduin MC, Parren PW, Weir R, Barbas CF, Burton DR, Koup RA.
Passive immunization with a human monoclonal antibody protects hu-PBL-SCID mice against challenge by primary isolates of HIV-1.
Nat Med. 1997 Dec;3(12):1389-93

- Geffin RB, Scott GB, Melenwick M, Hutto C, Lai S, Boots LJ, McKenna PM, Kessler JA 2nd, Conley AJ. ELDKWA, a glycoprotein 41 neutralization epitope, with disease progression in children perinatally infected with HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1998 May 1;14(7):579-90
- Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell*. 1989 Oct 6;59(1):103-12
- Goh WC, Markee J, Akridge RE, Meldorf M, Musey L, Karchmer T, Krone M, Collier A, Corey L, Emerman M, McElrath MJ. Protection against human immunodeficiency virus type 1 infection in persons with repeated exposure: evidence for T cell immunity in the absence of inherited CCR5 coreceptor defects
- Golding H, Zaitseva M, de Rosny E, King LR, Manischewitz J, Sidorov I, Gorny MK, Zolla-Pazner S, Dimitrov DS, Weiss CD. Dissection of human immunodeficiency virus type 1 entry with neutralizing antibodies to gp41 fusion intermediates. *J Virol*. 2002 Jul;76(13):6780-90
- Gonda MA. Molecular genetics and structure of the human immunodeficiency virus. *J Electron Microscop Tech*. 1988 Jan;8(1):17-40
- Gottlieb MS und Sandera W. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), US Centers for Disease Control (CDC), 1981, 30: 250-252
- Goulder PJ, Brander C, Tang Y, Tremblay C, Colbert RA, Addo MM, Rosenberg ES, Nguyen T, Allen R, Trocha A, Altfeld M, He S, Bunce M, Funkhouser R, Pelton SI, Burchett SK, McIntosh K, Korber BT, Walker BD. Evolution and transmission of stable CTL escape mutations in HIV infection. *Nature*. 2001 Jul 19;412(6844):334-8
- Gray RH, Wabwire-Mangen F, Kigozi G, Sewankambo NK, Serwadda D, Moulton LH, Quinn TC, O'Brien KL, Meehan M, Abramowsky C, Robb M, Wawer MJ. Randomized trial of presumptive sexually transmitted disease therapy during pregnancy in Rakai, Uganda. *Am J Obstet Gynecol*. 2001 Nov;185(5):1209-17
- Greenough TC, Brettler DB, Somasundaran M, Panicali DL, Sullivan JL. Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis*. 1997 Jul;176(1):118-25
- Gunasekaran K, Ramakrishnan C, Balaram P. Beta-hairpins in proteins revisited: lessons for de novo design. *Protein Eng*. 1997 Oct;10(10):1131-41
- Gunthard HF, Wong JK, Ignacio CC, Guatelli JC, Riggs NL, Havlir DV, Richman DD. Human immunodeficiency virus replication and genotypic resistance in blood and lymph nodes after a year of potent antiretroviral therapy. *J Virol*. 1998 Mar;72(3):2422-8
- Hager-Braun C, Tomer KB. Determination of epitopes by mass spectrometry. *Methods Mol Med*. 2004;94:109-20
- Hanna GJ. HIV-1 genotypic and phenotypic resistance. *Clin Lab Med*. 2002 Sep;22(3):637-49

- Harrer T, Harrer E, Kalams SA, Elbeik T, Staprans SI, Feinberg MB, Cao Y, Ho DD, Yilma T, Caliendo AM, Johnson RP, Buchbinder SP, Walker BD.
Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 May 1;12(7):585-92
- Hart TK, Kirsh R, Ellens H, Sweet RW, Lambert DM, Petteway SR Jr, Leary J, Bugelski PJ.
Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1991 Mar 15;88(6):2189-93
- Hartung S, Norley SG, Ennen J, Cichutek K, Plesker R, Kurth R.
Vaccine protection against SIVmac infection by high- but not low-dose whole inactivated virus immunogen.
J Acquir Immune Defic Syndr. 1992;5(5):461-8
- Hedman K, Rousseau SA.
Measurement of avidity of specific IgG for verification of recent primary rubella.
J Med Virol. 1989 Apr;27(4):288-92
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.
Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.
Biotechnology (N Y). 1992 Apr;10(4):413-7
- Ho J, MacDonald KS, Barber BH.
Construction of recombinant targeting immunogens incorporating an HIV-1 neutralizing epitope into sites of differing conformational constraint.
Vaccine. 2002 Jan 15;20(7-8):1169-80
- Hofmann-Lehmann R, Rasmussen RA, Vlasak J, Smith BA, Baba TW, Liska V, Montefiori DC, McClure HM, Anderson DC, Bernacky BJ, Rizvi TA, Schmidt R, Hill LR, Keeling ME, Katinger H, Stiegler G, Posner MR, Cavacini LA, Chou TC, Ruprecht RM.
Passive immunization against oral AIDS virus transmission: an approach to prevent mother-to-infant HIV-1 transmission?
J Med Primatol. 2001 Aug;30(4):190-6
- Hofmann-Lehmann R, Vlasak J, Rasmussen RA, Smith BA, Baba TW, Liska V, Ferrantelli F, Montefiori DC, McClure HM, Anderson DC, Bernacky BJ, Rizvi TA, Schmidt R, Hill LR, Keeling ME, Katinger H, Stiegler G, Cavacini LA, Posner MR, Chou TC, Andersen J, Ruprecht RM.
Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge.
J Virol. 2001 Aug;75(16):7470-80
- Huang HV.
Sindbis virus vectors for expression in animal cells.
Curr Opin Biotechnol. 1996 Oct;7(5):531-5
- Huang J, Dong X, Liu Z, Qin L, Chen YH.
A predefined epitope-specific monoclonal antibody recognizes ELDEWA-epitope just presenting on gp41 of HIV-1 O clade.
Immunol Lett. 2002 Dec 3;84(3):205-9
- Hunter E, 1997
gp41, A Multifunctional Protein Involved in HIV Entry and Pathogenesis
www.hiv.lanl.gov/content/hiv-db/REVIEWS/reviews.html
- Hwang SS, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR.
Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1.
Science. 1991 Jul 5;253(5015):71-4
- Janeway AC, Travers P, Walport M, Shlomchik M, Immunologie, 5.Auflage, Spektrum Verlag, Heidelberg, 2002

Jiang S, Zhao Q, Debnath AK.
Peptide and non-peptide HIV fusion inhibitors.
Curr Pharm Des. 2002;8(8):563-80

Jolles P.
Lysozymes: a chapter of molecular biology.
Angew Chem Int Ed Engl. 1969 Apr;8(4):227-39

Jones PL, Korte T, Blumenthal R.
Conformational changes in cell surface HIV-1 envelope glycoproteins are triggered by cooperation between cell surface CD4 and co-receptors.
J Biol Chem. 1998 Jan 2;273(1):404-9

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 Nov 29;277(48):45811-20. Epub 2002 Sep 16. Erratum in: J Biol Chem. 2003 Feb 14;278(7):5492

Kahn JO, Sinangil F, Baenziger J, Murcar N, Wynne D, Coleman RL, Steimer KS, Dekker CL, Chernoff D.
Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers.
J Infect Dis. 1994 Nov;170(5):1288-91

Kestler HW 3rd, Ringler DJ, Mori K, Panicali DL, Sehgal PK, Daniel MD, Desrosiers RC.
Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS.
Cell. 1991 May 17;65(4):651-62

Kijak GH, Simon V, Balfe P, Vanderhoeven J, Pampuro SE, Zala C, Ochoa C, Cahn P, Markowitz M, Salomon H.
Origin of human immunodeficiency virus type 1 quasispecies emerging after antiretroviral treatment interruption in patients with therapeutic failure.
J Virol. 2002 Jul;76(14):7000-9

Kitabwalla M, Ferrantelli F, Wang T, Chalmers A, Katinger H, Stiegler G, Cavacini LA, Chou TC, Ruprecht RM.
Primary African HIV clade A and D isolates: effective cross-clade neutralization with a quadruple combination of human monoclonal antibodies raised against clade B.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2003 Feb;19(2):125-31

Kliger Y, Gallo SA, Peisajovich SG, Munoz-Barroso I, Avkin S, Blumenthal R, Shai Y.
Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage.
J Biol Chem. 2001 Jan 12;276(2):1391-7

Koshiya T, Chan DC.
The prefusogenic intermediate of HIV-1 gp41 contains exposed C-peptide regions.
J Biol Chem. 2003 Feb 28;278(9):7573-9. Epub 2002 Dec 13

Krause RM, Dimmock NJ, Morens DM.
Summary of antibody workshop: The Role of Humoral Immunity in the Treatment and Prevention of Emerging and Extant Infectious Diseases.
J Infect Dis. 1997 Sep;176(3):549-59

Kunert R, Ruker F, Katinger H.
Molecular characterization of five neutralizing anti-HIV type 1 antibodies: identification of nonconventional D segments in the human monoclonal antibodies 2G12 and 2F5.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1998 Sep 1;14(13):1115-28

- Kunert R, Steinfellner W, Purtscher M, Assadian A, Katinger H.
Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells.
Biotechnol Bioeng. 2000 Jan 5;67(1):97-103
- Kunert RE, Weik R, Ferko B, Stiegler G, Katinger H.
Anti-idiotypic antibody Ab2/3H6 mimics the epitope of the neutralizing anti-HIV-1 monoclonal antibody 2F5.
AIDS. 2002 Mar 8;16(4):667-8
- Kurata H, Liu CB, Valkova J, Koch AE, Yssel H, Hirabayashi Y, Inoue T, Yokota T, Arai K.
Recombinant adenovirus vectors for cytokine gene therapy in mice.
J Allergy Clin Immunol. 1999 May;103(5 Pt 2):S471-84
- Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA
Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody.
Nature. 1998 Jun 18;393(6686):648-59
- Kwong PD, Wyatt R, Sattentau QJ, Sodroski J, Hendrickson WA.
Oligomeric modeling and electrostatic analysis of the gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus.
J Virol. 2000 Feb;74(4):1961-72
- Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, Cicala C, Leavitt SA, Majeed S, Steenbeke TD, Venturi M, Chaiken I, Fung M, Katinger H, Parren PW, Robinson J, Van Ryk D, Wang L, Burton DR, Freire E, Wyatt R, Sodroski J, Hendrickson WA, Arthos J.
HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites.
Nature. 2002 Dec 12;420(6916):678-82
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G.
A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation.
J Mol Biol. 1970 Jan 14;47(1):69-85
- Langedijk JP, Zwart G, Goudsmit J, Meloen RH.
Fine specificity of antibody recognition may predict amino acid substitution in the third variable region of gp120 during HIV type 1 infection.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1995 Oct;11(10):1153-62
- Lawrence DN.
The acquired immune deficiency syndrome (AIDS): of concern to us all.
J Fla Med Assoc. 1983 Feb;70(2):101-2
- Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, Dyer WB, McIntyre L, Oelrichs RB, Rhodes DI, Deacon NJ, Sullivan JS.
Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort.
N Engl J Med. 1999 Jun 3;340(22):1715-22
- Lee LG, Connell CR, Bloch W.
Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes.
Nucleic Acids Res. 1993 Aug 11;21(16):3761-6
- Lemieux P.
Technological advances to increase immunogenicity of DNA vaccines.
Expert Rev Vaccines. 2002 Jun;1(1):85-93
- Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ.
Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells.
J Biol Chem. 1990 Jun 25;265(18):10373-82

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

Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, Landis JA, Shimabukuro JM, Oshiro LS.
Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS.
Science. 1984 Aug 24;225(4664):840-2

Levy JA.
Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.
Ann N Y Acad Sci. 1989;567:58-68

Levy JA.
Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection.
Microbiol Rev. 1993 Mar;57(1):183-28

Levy JA, Mackewicz CE, Barker E.
Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8+ T cells.
Immunol Today. 1996 May;17(5):217-24

Levy JA, Scott I, Mackewicz C.
Protection from HIV/AIDS: the importance of innate immunity.
Clin Immunol. 2003a Sep;108(3):167-74

Levy JA.
The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF).
Trends Immunol. 2003b Dec;24(12):628-32

Li A, Baba TW, Sodroski J, Zolla-Pazner S, Gorny MK, Robinson J, Posner MR, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Chou TC, Ruprecht RM.
Synergistic neutralization of a chimeric SIV/HIV type 1 virus with combinations of human anti-HIV type 1 envelope monoclonal antibodies or hyperimmune globulins.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1997 May 20;13(8):647-56

Liao M, Lu Y, Xiao Y, Dierich MP, Chen Y.
Induction of high level of specific antibody response to the neutralizing epitope ELDKWA on HIV-1 gp41 by peptide-vaccine.
Peptides. 2000 Apr;21(4):463-8

Lineberger JE, Danzeisen R, Hazuda DJ, Simon AJ, Miller MD.
Altering expression levels of human immunodeficiency virus type 1 gp120-gp41 affects efficiency but not kinetics of cell-cell fusion.
J Virol. 2002 Apr;76(7):3522-33

Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, MacDonald ME, Stuhlmann H, Koup RA, Landau NR.
Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection.
Cell. 1996 Aug 9;86(3):367-77

Lopez C, Fitzgerald PA, Siegal FP.
Severe acquired immune deficiency syndrome in male homosexuals: diminished capacity to make interferon-alpha in vitro associated with severe opportunistic infections
J Infect Dis. 1983 Dec;148(6):962-6

Lu M, Kim PS.
A trimeric structural subdomain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein.
J Biomol Struct Dyn. 1997 Dec;15(3):465-71

Lu Y, Xiao Y, Ding J, Dierich MP, Chen YH.
Multiepitope vaccines intensively increased levels of antibodies recognizing three neutralizing epitopes on human immunodeficiency virus-1 envelope protein.
Scand J Immunol. 2000 May;51(5):497-501

- Mackewicz CE, Barker E, Levy JA.
Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication.
Science. 1996 Nov 22;274(5291):1393-5
- Mahler H.
Worldwide smallpox eradication: 1977.
Nord Med. 1977 Oct;92(10):236-240
- Markham PD, Sarngadharan MG, Salahuddin SZ, Popovic M, Gallo RC
Correlation between exposure to human T-cell leukemia-lymphoma virus-III and the development of AIDS.
Ann N Y Acad Sci. 1984;437:106-9
- Markosyan RM, Ma X, Lu M, Cohen FS, Melikyan GB.
The mechanism of inhibition of HIV-1 env-mediated cell-cell fusion by recombinant cores of gp41 ectodomain.
Virology. 2002 Oct 10;302(1):174-84
- Marusic C, Rizza P, Lattanzi L, Mancini C, Spada M, Belardelli F, Benvenuto E, Capone I.
Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 2001 Sep;75(18):8434-9
- Mascola JR, Louder MK, VanCott TC, Sapan CV, Lambert JS, Muenz LR, Bunow B, Birx DL, Robb ML.
Potent and synergistic neutralization of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 primary isolates by hyperimmune anti-HIV immunoglobulin combined with monoclonal antibodies 2F5 and 2G12.
J Virol. 1997 Oct;71(10):7198-206
- Mascola JR, Frankel SS, Brolden K.
HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection.
AIDS. 2000;14 Suppl 3:S167-74
- Mascola JR, Stiegler G, VanCott TC, Katinger H, Carpenter CB, Hanson CE, Beary H, Hayes D, Frankel SS, Birx DL, Lewis MG.
Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies.
Nat Med. 2000 Feb;6(2):207-10
- Mascola JR.
Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1.
Vaccine. 2002 May 6;20(15):1922-5
- McDougal JS, Maddon PJ, Dalgleish AG, Clapham PR, Littman DR, Godfrey M, Maddon DE, Chess L, Weiss RA, Axel R.
The T4 glycoprotein is a cell-surface receptor for the AIDS virus.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 2:703-11
- McGaughey GB, Citron M, Danzeisen RC, Freidinger RM, Garsky VM, Hurni WM, Joyce JG, Liang X, Miller M, Shiver J, Bogusky MJ.
HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb.
Biochemistry. 2003 Mar 25;42(11):3214-23
- Medzhitov R, Janeway CA Jr.
Innate immune induction of the adaptive immune response.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1999;64:429-35
- Mehle A, Strack B, Ancuta P, Zhang C, McPike M, Gabuzda D.
Vif overcomes the innate antiviral activity of APOBEC3G by promoting its degradation in the ubiquitin-proteasome pathway.
J Biol Chem. 2003 Dec 13

- Melikyan GB, Markosyan RM, Hemmati H, Delmedico MK, Lambert DM, Cohen FS.
Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion.
J Cell Biol. 2000 Oct 16;151(2):413-23
- MMWR 1982 Sep 24;31 (37):507-8, 513-4
- Mo H, Stamatatos L, Ip JE, Barbas CF, Parren PW, Burton DR, Moore JP, Ho DD.
Human immunodeficiency virus type 1 mutants that escape neutralization by human monoclonal antibody IgG1b12. off.
J Virol. 1997 Sep;71(9):6869-74
- Mobley PW, Pilpa R, Brown C, Waring AJ, Gordon LM.
Membrane-perturbing domains of HIV type 1 glycoprotein 41.
AIDS Res Hum Retroviruses. 2001 Mar 1;17(4):311-27
- Moelling K.
DNA for genetic vaccination and therapy.
Cytokines Cell Mol Ther. 1997 Jun;3(2):127-35
- Mocroft A, Devereux H, Kinloch-de-Loes S, Wilson D, Madge S, Youle M, Tyrer M, Loveday C, Phillips AN, Johnson MA.
Immunological, virological and clinical response to highly active antiretroviral therapy treatment regimens in a complete clinic population. Royal Free Centre for HIV Medicine.
AIDS. 2000 Jul 28;14(11):1545-52
- Monahan PE, Samulski RJ.
Adeno-associated virus vectors for gene therapy: more pros than cons?
Mol Med Today. 2000 Nov;6(11):433-4
- Moore JP, McKeating JA, Weiss RA, Sattentau QJ.
Dissociation of gp120 from HIV-1 virions induced by soluble CD4.
Science. 1990 Nov 23;250(4984):1139-42
- Moore JP, Sattentau QJ.
Detecting SIV gp120 and its interaction with soluble CD4 by ELISA.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1993 Dec;9(12):1297-9
- Moore JP, Cao Y, Qing L, Sattentau QJ, Pyati J, Koduri R, Robinson J, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD.
Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120.
J Virol. 1995 Jan;69(1):101-9
- Moore JP, Trkola A, Dragic T
Co-receptors for HIV-1 entry.
Curr Opin Immunol. 1997 Aug;9(4):551-62
- Moreno MR, Pascual R, Villalain J.
Identification of membrane-active regions of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 using a 15-mer gp41-peptide scan.
Biochim Biophys Acta. 2004 Feb 10;1661(1):97-105
- Moulard M, Phogat SK, Shu Y, Labrijn AF, Xiao X, Binley JM, Zhang MY, Sidorov IA, Broder CC, Robinson J, Parren PW, Burton DR, Dimitrov DS.
Broadly cross-reactive HIV-1-neutralizing human monoclonal Fab selected for binding to gp120-CD4-CCR5 complexes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 May 14;99(10):6913-8. Epub 2002 May 07
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986.
Biotechnology. 1992;24:17-27

- Munoz-Barroso I, Durell S, Sakaguchi K, Appella E, Blumenthal R.
Dilation of the human immunodeficiency virus-1 envelope glycoprotein fusion pore revealed by the inhibitory action of a synthetic peptide from gp41.
J Cell Biol. 1998 Jan 26;140(2):315-23
- Muster T, Steindl F, Purtscher M, Trkola A, Klima A, Himmler G, Rucker F, Katinger H.
A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1993 Nov;67(11):6642-7
- Muster T, Guinea R, Trkola A, Purtscher M, Klima A, Steindl F, Palese P, Katinger H.
Cross-neutralizing activity against divergent human immunodeficiency virus type 1 isolates induced by the gp41 sequence ELDKWAS.
J Virol. 1994 Jun;68(6):4031-4
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.
In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.
Science. 1996 Apr 12;272(5259):263-7
- Nara PL, Smit L, Dunlop N, Hatch W, Merges M, Waters D, Kelliher J, Gallo RC, Fischinger PJ, Goudsmit J.
Emergence of viruses resistant to neutralization by V3-specific antibodies in experimental human immunodeficiency virus type 1 IIIB infection of chimpanzees.
J Virol. 1990 Aug;64(8):3779-91
- Nermut MV, Hockley DJ, Jowett JB, Jones IM, Garreau M, Thomas D.
Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus.
Virology. 1994 Jan;198(1):288-96
- Norley S, Beer B, Binniger-Schinzel D, Vogel T, Siegel F, Cosma C, Konig H, Megede JZ, Kurth R.
Simian immunodeficiency virus live and inactivated experimental vaccines.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1996 Mar 20;12(5):447-9
- Norley S, Beer B, Binniger-Schinzel D, Cosma C, Kurth R.
Protection from pathogenic SIVmac challenge following short-term infection with a nef-deficient attenuated virus.
Virology. 1996b May 1;219(1):195-20
- Nyambi PN, Mbah HA, Burda S, Williams C, Gorny MK, Nadas A, Zolla-Pazner S.
Conserved and exposed epitopes on intact, native, primary human immunodeficiency virus type 1 virions of group M.
J Virol. 2000 Aug;74(15):7096-107
- O'Brien WA, Mao SH, Cao Y, Moore JP.
Macrophage-tropic and T-cell line-adapted chimeric strains of human immunodeficiency virus type 1 differ in their susceptibilities to neutralization by soluble CD4 at different temperatures.
J Virol. 1994 Aug;68(8):5264-9
- Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, Mack DH, Sninsky JJ, Krebs JW, Feorino P, Warfield D, Schochetman G.
DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells.
Science. 1988 Jan 15;239(4837):295-7
- Pai EF, Klein MH, Chong P, Pedyczak A,
World Intellectual Property Organization patent, WO 00/61618, 2000
- Pantophlet R, Burton DR.
Immunofocusing: antigen engineering to promote the induction of HIV-neutralizing antibodies.
Trends Mol Med. 2003 Nov;9(11):468-73
- Parker CE, Deterding LJ, Hager-Braun C, Binley JM, Schulke N, Katinger H, Moore JP, Tomer KB.
Fine definition of the epitope on the gp41 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 for the neutralizing monoclonal antibody 2F5.
J Virol. 2001 Nov;75(22):10906-11

- Parren PW, Moore JP, Burton DR, Sattentau QJ.
The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity.
AIDS. 1999;13 Suppl A:S137-62
- Parren PW, Wang M, Trkola A, Binley JM, Purtscher M, Katinger H, Moore JP, Burton DR.
Antibody neutralization-resistant primary isolates of human immunodeficiency virus type 1.
J Virol. 1998 Dec;72(12):10270-4
- Parren PW, Poignard P, Ditzel HJ, Williamson RA, Burton DR.
Antibodies in human infectious disease.
Immunol Res. 2000;21(2-3):265-78
- Peeters M, Sharp PM.
Genetic diversity of HIV-1: the moving target.
AIDS. 2000;14 Suppl 3:S129-40
- Peisajovich SG, Blank L, Epanand RF, Epanand RM, Shai Y.
On the interaction between gp41 and membranes: the immunodominant loop stabilizes gp41 helical hairpin conformation.
J Mol Biol. 2003 Mar 7;326(5):1489-50
- Pereira FB, Goni FM, Muga A, Nieva JL.
Permeabilization and fusion of uncharged lipid vesicles induced by the HIV-1 fusion peptide adopting an extended conformation: dose and sequence effects.
Biophys J. 1997 Oct;73(4):1977-86
- Pilgrim AK, Pantaleo G, Cohen OJ, Fink LM, Zhou JY, Zhou JT, Bolognesi DP, Fauci AS, Montefiori DC.
Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection.
J Infect Dis. 1997 Oct;176(4):924-32
- Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC
Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS.
Science. 1984 May 4;224(4648):497-500
- Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA.
Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase.
Science. 1988 Nov 25;242(4882):1168-71
- Purtscher M, Trkola A, Gruber G, Buchacher A, Predl R, Steindl F, Tauer C, Berger R, Barrett N, Jungbauer A, et al.
A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1.
AIDS Res Hum Retroviruses. 1994 Dec;10(12):1651-8
- Purtscher M, Trkola A, Grassauer A, Schulz PM, Klima A, Dopfer S, Gruber G, Buchacher A, Muster T, Katinger H.
Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5.
AIDS. 1996 Jun;10(6):587-93
- Qiagen Expressionist, Qiagen, 5.Auflage, 2002, S39f
- Quinn TC.
Viral load, circumcision and heterosexual transmission.
Hopkins HIV Rep. 2000 May;12(3):1, 5, 11
- Rasmussen RA, Hofmann-Lehman R, Montefiori DC, Li PL, Liska V, Vlasak J, Baba TW, Schmitz JE, Kuroda MJ, Robinson HL, McClure HM, Lu S, Hu SL, Rizvi TA, Ruprecht RM.
DNA prime/protein boost vaccine strategy in neonatal macaques against simian human immunodeficiency virus.
J Med Primatol. 2002 Feb;31(1):40-60

Ratner,L., Haseltine,W., Patarca,R., Livak,K.J., Starcich,B. Josephs,S.F., Doran,E.R., Rafalski,J.A., Whitehorn,E.A, Baumeister,K., Ivanoff,L., Petteway,S.R. Jr., Pearson,M.L., Lautenberger,J.A., Papas,T.S., Ghayeb,J., Chang,N.T., Gallo,R.C. and Wong-Staal,F.
Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III
Nature 313 (6000), 277-284 (1985)

Raviv Y, Viard M, Bess J Jr, Blumenthal R.
Quantitative measurement of fusion of HIV-1 and SIV with cultured cells using photosensitized labeling.
Virology. 2002 Feb 15;293(2):243-51

Reading SA, Heap CJ, Dimmock NJ.
A novel monoclonal antibody specific to the C-terminal tail of the gp41 envelope transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 that preferentially neutralizes virus after it has attached to the target cell and inhibits the production of infectious progeny.
Virology. 2003 Oct 25;315(2):362-7

Reitz MS Jr, Wilson C, Naugle C, Gallo RC, Robert-Guroff M.
Generation of a neutralization-resistant variant of HIV-1 is due to selection for a point mutation in the envelope gene.
Cell. 1988 Jul 1;54(1):57-63

Reitz,M., Hall,L., Robert-Guroff,M., Lautenberger,J., Hahn,B.Shaw,G., Kong,L., Weiss,S., Waters,D., Gallo,R. and Blattner,W.
Viral variability and serum antibody response in a laboratory worker infected with HIV type 1 (HTLV type IIIB)
AIDS Res. Hum. Retroviruses 10 (9), 1143-1155 (1994)

Richman DD.
New strategies to combat HIV drug resistance.
Hosp Pract (Off Ed). 1996 Aug 15;31(8):47-50, 53-8

Richardson J, Moraillon A, Crespeau F, Baud S, Sonigo P, Pancino G.
Delayed infection after immunization with a peptide from the transmembrane glycoprotein of the feline immunodeficiency virus.
J Virol. 1998 Mar;72(3):2406-15

Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, Cottrill M, et al.
High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors.
J Virol. 1995 Sep;69(9):5838-42

Robbins JB, Schneerson R, Szu SC.
Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum.
J Infect Dis. 1995 Jun;171(6):1387-98

Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA.
The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1.
Science. 1988 Nov 25;242(4882):1171-3

Ruppach H, Nara P, Raudonat I, Elanjikal Z, Rubsamen-Waigmann H, Dietrich U.
Human immunodeficiency virus (HIV)-positive sera obtained shortly after seroconversion neutralize autologous HIV type 1 isolates on primary macrophages but not on lymphocytes.
J Virol. 2000 Jun;74(12):5403-11

Ruprecht RM, Ferrantelli F, Kitabwalla M, Xu W, McClure HM.
Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge.
Vaccine. 2003 Jul 28;21(24):3370-3

Sackett K, Shai Y.
How structure correlates to function for membrane associated HIV-1 gp41 constructs corresponding to the N-terminal half of the ectodomain.
J Mol Biol. 2003 Oct 10;333(1):47-58

- Saez-Cirion A, Arrondo JL, Gomara MJ, Lorizate M, Iloro I, Melikyan G, Nieva JL.
Structural and functional roles of HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence segmentation.
Biophys J. 2003 Dec;85(6):3769-80
- Salahuddin SZ, Markham PD, Wong-Staal F, Franchini G, Kalyanaraman VS, Gallo RC.
Restricted expression of human T-cell leukemia--lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes.
Virology. 1983 Aug;129(1):51-64
- Santos NC, Prieto M, Castanho MA.
Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectroscopy study.
Biochemistry. 1998 Jun 16;37(24):8674-82
- Salzwedel K, West JT, Hunter E.
A conserved tryptophan-rich motif in the membrane-proximal region of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 ectodomain is important for Env-mediated fusion and virus infectivity
J Virol. 1999 Mar;73(3):2469-80
- Salzwedel K, Berger EA.
Cooperative subunit interactions within the oligomeric envelope glycoprotein of HIV-1: functional complementation of specific defects in gp120 and gp41.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7;97(23):12794-9
- Sarngadharan MG, DeVico AL, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC.
HTLV-III: the etiologic agent of AIDS.
Princess Takamatsu Symp. 1984;15:301-8
- Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, Saragosti S, Lapoumeroulie C, Cognaux J, Forceille C, Muyldermans G, Verhofstede C, Burtonboy G, Georges M, Imai T, Rana S, Yi Y, Smyth RJ, Collman RG, Doms RW, Vassart G, Parmentier M.
Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.
Nature. 1996 Aug 22;382(6593):722
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74(12):5463-7
- Sattentau QJ, Moore JP.
Conformational changes induced in the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein by soluble CD4 binding.
J Exp Med. 1991 Aug 1;174(2):407-15
- Sattentau QJ, Zolla-Pazner S, Poignard P.
Epitope exposure on functional, oligomeric HIV-1 gp41 molecules.
Virology. 1995a Jan 10;206(1):713-7
- Sattentau QJ, Moore JP.
Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer.
J Exp Med. 1995b Jul 1;182(1):185-96
- Scanlan CN, Pantophlet R, Wormald MR, Ollmann Saphire E, Stanfield R, Wilson IA, Katinger H, Dwek RA, Rudd PM, Burton DR.
The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 recognizes a cluster of alpha1-->2 mannose residues on the outer face of gp120.
J Virol. 2002 Jul;76(14):7306-21
- Schagger H, Aquila H, Von Jagow G.
Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.
Anal Biochem. 1988 Aug 15;173(1):201-5

- Schibli DJ, Montelaro RC, Vogel HJ.
The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles.
Biochemistry. 2001 Aug 14;40(32):9570-8
- Schutten M, Andeweg AC, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD.
Modulation of primary human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated entry by human antibodies.
J Gen Virol. 1997 May;78 (Pt 5):999-1006
- Schwartz DH, Gorse G, Clements ML, Belshe R, Izu A, Duliege AM, Berman P, Twaddell T, Stablein D, Sposto R, et al.
Induction of HIV-1-neutralising and syncytium-inhibiting antibodies in uninfected recipients of HIV-1III B rgp120 subunit vaccine.
Lancet. 1993 Jul 10;342(8863):69-73
- Schweiger B, Pauli G, Zeichhardt H, Kucherer C.
A multicentre quality assessment study to monitor the performance of HIV-1 PCR.
J Virol Methods. 1997 Aug;67(1):45-55
- Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL.
Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 11;91(21):9866-70
- Siskind GW, Benacerraf B.
Cell selection by antigen in the immune response.
Adv Immunol. 1969;10:1-50
- Siegel FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR, et al.
Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions.
N Engl J Med. 1981 Dec 10;305(24):1439-44
- Siegel FP, Lopez C, Fitzgerald PA, Shah K, Baron P, Leiderman IZ, Imperato D, Landesman S.
Opportunistic infections in acquired immune deficiency syndrome result from synergistic defects of both the natural and adaptive components of cellular immunity.
J Clin Invest. 1986 Jul;78(1):115-23
- Skehel JJ, Wiley DC.
Coiled coils in both intracellular vesicle and viral membrane fusion.
Cell. 1998 Dec 23;95(7):871-4
- Smith M, Brown NL, Air GM, Barrell BG, Coulson AR, Hutchison CA 3rd, Sanger F.
DNA sequence at the C termini of the overlapping genes A and B in bacteriophage phi X174.
Nature. 1977 Feb 24;265(5596):702-5
- Specke V, Rubant S, Denner J.
Productive infection of human primary cells and cell lines with porcine endogenous retroviruses.
Virology. 2001 Jul 5;285(2):177-80.
- Spenger A, Grabherr R, Tollner L, Katinger H, Ernst W.
Altering the surface properties of baculovirus *Autographa californica* NPV by insertional mutagenesis of the envelope protein gp64.
Eur J Biochem. 2002 Sep;269(18):4458-67
- Stiegler G, Armbruster C, Vcelar B, Stoiber H, Kunert R, Michael NL, Jagodzinski LL, Ammann C, Jager W, Jacobson J, Vetter N, Katinger H.
Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation.
AIDS. 2002 Oct 18;16(15):2019-25

- Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG.
AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding.
Cell. 2003 Sep 19;114(6):689-99
- Stranford SA, Skurnick J, Louria D, Osmond D, Chang SY, Sninsky J, Ferrari G, Weinhold K, Lindquist C, Levy JA.
Lack of infection in HIV-exposed individuals is associated with a strong CD8(+) cell noncytotoxic anti-HIV response.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Feb 2;96(3):1030-5
- Sullivan BL, Knopoff EJ, Saifuddin M, Takefman DM, Saarloos MN, Sha BE, Spear GT.
Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo.
J Immunol. 1996 Aug 15;157(4):1791-8
- Sutter G, Wyatt LS, Foley PL, Bennink JR, Moss B.
A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus.
Vaccine. 1994 Aug;12(11):1032-4
- Tartaglia J, Pincus S, Paoletti E.
Poxvirus-based vectors as vaccine candidates.
Crit Rev Immunol. 1990;10(1):13-30
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB.
Vaccination against tuberculosis by DNA injection.
Nat Med. 1996 Aug;2(8):888-92
- Thali M, Moore JP, Furman C, Charles M, Ho DD, Robinson J, Sodroski J.
Characterization of conserved human immunodeficiency virus type 1 gp120 neutralization epitopes exposed upon gp120-CD4 binding.
J Virol. 1993 Jul;67(7):3978-88
- Tian H, Xiao Y, Zhu M, Chen YH.
HIV epitope-peptides in aluminum adjuvant induced high levels of epitope-specific antibodies.
Int Immunopharmacol. 2001a Apr;1(4):763-8
- Tian H, Xiao Y, Qin L, Chen YH.
Antigenicity and predefined specificities of the multi-epitope vaccine in candidate consisting of neutralizing epitope and mutated epitopes suggested a new way against HIV-1 mutation.
Immunobiology. 2001b Dec;204(4):434-41
- Timmis K, Cabello F, Cohen SN.
Cloning, isolation, and characterization of replication regions of complex plasmid genomes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Jun;72(6):2242-6
- Titti F, Sernicola L, Geraci A, Panzini G, Di Fabio S, Belli R, Monardo F, Borsetti A, Maggiorella MT, Koanga-Mogtomo M, Corrias F, Zamarchi R, Amadori A, Chieco-Bianchi L, Verani P.
Live attenuated simian immunodeficiency virus prevents super-infection by cloned SIVmac251 in cynomolgus monkeys.
J Gen Virol. 1997 Oct;78 (Pt 10):2529-39
- Tobiasch E, Kehm R, Bahr U, Tidona CA, Jakob NJ, Handermann M, Darai G, Giese M.
Large envelope glycoprotein and nucleocapsid protein of equine arteritis virus (EAV) induce an immune response in Balb/c mice by DNA vaccination; strategy for developing a DNA-vaccine against EAV-infection.
Virus Genes. 2001 Mar;22(2):187-99.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.
Immunoblotting in the clinical laboratory.
J Clin Chem Clin Biochem. 1989 Aug;27(8):495-501

- Trimble C, Lin CT, Hung CF, Pai S, Juang J, He L, Gillison M, Pardoll D, Wu L, Wu TC.
Comparison of the CD8+ T cell responses and antitumor effects generated by DNA vaccine administered through gene gun, biojector, and syringe.
Vaccine. 2003 Sep 8;21(25-26):4036-42
- Trkola A, Pomales AB, Yuan H, Korber B, Maddon PJ, Allaway GP, Katinger H, Barbas CF 3rd, Burton DR, Ho DD, et al.
Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG.
J Virol. 1995 Nov;69(11):6609-17
- Turner BG, Summers MF
Structural biology of HIV.
J Mol Biol. 1999 Jan 8;285(1):1-32
- Ugolini S, Mondor I, Parren PW, Burton DR, Tilley SA, Klasse PJ, Sattentau QJ.
Inhibition of virus attachment to CD4+ target cells is a major mechanism of T cell line-adapted HIV-1 neutralization.
J Exp Med. 1997 Oct 20;186(8):1287-98
- Uhl EW, Heaton-Jones TG, Pu R, Yamamoto JK.
FIV vaccine development and its importance to veterinary and human medicine: a review FIV vaccine 2002 update and review.
Vet Immunol Immunopathol. 2002 Dec;90(3-4):113-32
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, et al.
Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein.
Science. 1993 Mar 19;259(5102):1745-9
- Van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J.
Virus nomenclature: consensus versus chaos.
Arch Virol. 2000;145(10):2227-32
- Vogel T, Kurth R, Norley S.
The majority of neutralizing Abs in HIV-1-infected patients recognize linear V3 loop sequences. Studies using HIV-1MN multiple antigenic peptides.
J Immunol. 1994 Aug 15;153(4):1895-904
- Wagner R, Shao Y, Wolf H.
Correlates of protection, antigen delivery and molecular epidemiology: basics for designing an HIV vaccine.
Vaccine. 1999 Mar 26;17(13-14):1706-10
- Walker CM.
How do CD8+ T lymphocytes control HIV replication in vivo?
Res Immunol. 1989 Jan;140(1):115-8; discussion 122-3
- Wang LH.
The mechanism of transduction of proto-oncogene c-src by avian retroviruses.
Mutat Res. 1987 Sep;186(2):135-47
- Watkins BA, Buge S, Aldrich K, Davis AE, Robinson J, Reitz MS Jr, Robert-Guroff M.
Resistance of human immunodeficiency virus type 1 to neutralization by natural antisera occurs through single amino acid substitutions that cause changes in antibody binding at multiple sites.
J Virol. 1996 Dec;70(12):8431-7
- Weber J.
The pathogenesis of HIV-1 infection.
Br Med Bull. 2001;58:61-72

- Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Kilby JM, Saag MS, Komarova NL, Nowak MA, Hahn BH, Kwong PD, Shaw GM.
Antibody neutralization and escape by HIV-1.
Nature. 2003 Mar 20;422(6929):307-12
- Weiss CD, Barnett SW, Cacalano N, Killeen N, Littman DR, White JM.
Studies of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion using a simple fluorescence assay.
AIDS. 1996 Mar;10(3):241-6
- Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, Wiley DC.
Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41.
Nature. 1997 May 22;387(6631):426-30
- Weissenhorn W, Calder LJ, Dessen A, Laue T, Skehel JJ, Wiley DC.
Assembly of a rod-shaped chimera of a trimeric GCN4 zipper and the HIV-1 gp41 ectodomain expressed in *Escherichia coli*.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jun 10;94(12):6065-9
- West JT, Weldon SK, Wyss S, Lin X, Yu Q, Thali M, Hunter E.
Mutation of the dominant endocytosis motif in human immunodeficiency virus type 1 gp41 can complement matrix mutations without increasing Env incorporation.
J Virol. 2002 Apr;76(7):3338-49
- Wieggers K, Rutter G, Kottler H, Tessmer U, Hohenberg H, Krausslich HG.
Sequential steps in human immunodeficiency virus particle maturation revealed by alterations of individual Gag polyprotein cleavage sites.
J Virol. 1998 Apr;72(4):2846-54
- Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, Matthews T.
A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Nov 1;89(21):10537-41
- Wild CT, Shugars DC, Greenwell TK, McDanal CB, Matthews TJ.
Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Oct 11;91(21):9770-4
- Williamson K, Reboli AC, Manders SM.
Protease inhibitor-induced lipodystrophy.
J Am Acad Dermatol. 1999 Apr;40(4):635-6
- Wolbank S, Kunert R, Stiegler G, Katinger H.
Characterization of human class-switched polymeric (immunoglobulin M [IgM] and IgA) anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies 2F5 and 2G12.
J Virol. 2003 Apr;77(7):4095-103
- Wong JK, Gunthard HF, Havlir DV, Zhang ZQ, Haase AT, Ignacio CC, Kwok S, Emini E, Richman DD.
Reduction of HIV-1 in blood and lymph nodes following potent antiretroviral therapy and the virologic correlates of treatment failure.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 11;94(23):12574-9
- Wrin T, Loh TP, Vennari JC, Schuitemaker H, Nunberg JH.
Adaptation to persistent growth in the H9 cell line renders a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 sensitive to neutralization by vaccine sera.
J Virol. 1995 Jan;69(1):39-48
- Wu TT, Johnson G, Kabat EA.
Length distribution of CDRH3 in antibodies.
Proteins. 1993 May;16(1):1-7

- Wyma DJ, Kotov A, Aiken C.
Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles.
J Virol. 2000 Oct;74(20):9381-7
- Wyatt R, Moore J, Accola M, Desjardin E, Robinson J, Sodroski J.
Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding.
J Virol. 1995 Sep;69(9):5723-33
- 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 Jun 18;393(6686):705-11
- Wysocki L, Manser T, Gefter ML.
Somatic evolution of variable region structures during an immune response.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Mar;83(6):1847-51
- Xiao Y, Liao M, Lu Y, Dierich MP, Chen YH.
Epitope-vaccines: a new strategy to induce high levels of neutralizing antibodies against HIV-1.
Immunobiology. 2000a Jan;201(3-4):323-31
- Xiao Y, Zhao Y, Lu Y, Chen YH.
Epitope-vaccine induces high levels of ELDKWA-epitope-specific neutralizing antibody.
Immunol Invest. 2000b Feb;29(1):41-50
- Xiao Y, Dong XN, Chen YH.
Induction of monoclonal antibody with predefined ELNKA epitope specificity by epitope vaccine.
Hybridoma. 2000c Aug;19(4):347-50
- Xiao Y, Dong X, Chen Y.
Induction of high levels of antibodies recognizing the neutralizing epitope ELDKWA and the D- or K-position-mutated epitopes by candidate epitope vaccines against HIV-1.
Int Arch Allergy Immunol. 2000d Aug;122(4):287-9
- Xu L, Sanchez A, Yang Z, Zaki SR, Nabel EG, Nichol ST, Nabel GJ.
Immunization for Ebola virus infection.
Nat Med. 1998 Jan;4(1):37-42
- Xu W, Hofmann-Lehmann R, McClure HM, Ruprecht RM.
Passive immunization with human neutralizing monoclonal antibodies: correlates of protective immunity against HIV.
Vaccine. 2002 May 6;20(15):1956-60
- Yang G, D'Souza MP, Vyas GN
Neutralizing antibodies against HIV determined by amplification of viral long terminal repeat sequences from cells infected in vitro by nonneutralized virions
J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 17:27-34, 1998
- Zhang,P.F., Bouma,P., Park,E.J., Margolick,J.B., Robinson,J.E.,Zolla-Pazner,S., Flora,M.N. and Quinnan,G.V.
A variable region 3 (V3) mutation determines a global neutralization phenotype and CD4-independent infectivity of a human immunodeficiency virus type 1 envelope associated with a broadly cross-reactive, primary virus-neutralizing antibody response
J. Virol. 76 (2), 644-655 (2002)
- Zhu X, Borchers C, Bienstock RJ, Tomer KB.
spectrometric characterization of the glycosylation pattern of HIV-gp120 expressed in CHO cells.
Biochemistry. 2000 Sep 19;39(37):11194-204
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D.
Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.
J Virol. 1998 Dec;72(12):9873-8

- Zwick MB, Wang M, Pognard P, Stiegler G, Katinger H, Burton DR, Parren PW.
Neutralization synergy of human immunodeficiency virus type 1 primary isolates by cocktails of broadly neutralizing antibodies.
J Virol. 2001a Dec;75(24):12198-208
- Zwick MB, Labrijn AF, Wang M, Spenlehauer 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. 2001b Nov;75(22):10892-905
- Zwick MB, Kelleher R, Jensen R, Labrijn AF, Wang M, Quinnan GV Jr, Parren PW, Burton DR.
A novel human antibody against human immunodeficiency virus type 1 gp120 is V1, V2, and V3 loop dependent and helps delimit the epitope of the broadly neutralizing antibody immunoglobulin G1 b12
Virol. 2003 Jun;77(12):6965-78
- Zwick MB, Komori HK, Stanfield RL, Church S, Wang M, Parren PW, Kunert R, Katinger H, Wilson IA, Burton DR.
The Long Third Complementarity-Determining Region of the Heavy Chain Is Important in the Activity of the Broadly Neutralizing Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody 2F5.
J Virol. 2004 Mar 15;78(6):3155-3161

6. Anhang

I. Vergleich der Aminosäuresequenzen in den Regionen um die Epitop-Abschnitte E1 und E2

Tabelle A1: Sequenzvergleich der Consensus-Sequenzen aller Subtypen der Gruppe M und der Gruppe O in den Regionen AS 519-546 und AS 656-683 (HXB2-HIV-Referenzgenom) der HIV-1 Ectodomäne (Los Alamos Database, 2002, www.hiv.lanl.gov/content/index). Die Consensus-Sequenz aller Isolate ist in der ersten Zeile aufgeführt. Konservierte Aminosäuren sind dunkelgrau unterlegt. Ein „?“ zeigt an, dass an dieser Position mehrere Aminosäuren innerhalb der analysierten Gruppe möglich sind.

CONSENSUS:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQDLLALDKWASLWNWFDITNWLWYIK
A:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQDLLALDKWANLWNWFDISNWLWYIK
A2:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQDLLALDKWA?LWNWF?IT?WLWYIR
B:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK
C:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEKDLLALDSWQNLWNWFDITNWLWYIK
D:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQELLELDKWASLWNWFSITQWLWYIK
F:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQELLALDKWASLWNWFDISNWLWYIK
F2:	LLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQ?LLALDKWDNLWSWFSITNWLWYIK
G:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQVRQLLS	NEQDLLALDKWASLW?WFDITKWLWYIK
H:	FLGFLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS	NEQDLLALDKWASLWNWFSITNWLWYIK
Gr.O:	FLGVLSAAGSTMGAAATAL?VQTHLTK	NEKKLLELDEWASLWNWLDITKWLWYIK

II. Primer und Sonden

Primer (Sigma-Genosys, Steinheim, Deutschland):

1. Rgp41 BamH I fw
5'cgcggatccatgggctgcacgtcaatgacgctg'3
2. Rgp41 Xho I rev
5'cacccgatactcgagataccacagccaatttggtatg'3
3. Rgp41 Eam1104 fw
5'ggctcttcgatgggctgcacgtcaatgacgctgacgggtacaggcc'3
4. Rgp41 Eam1104 rev
5'ggctcttccaagctagtggtggtggtggtggtgttttatataccacagccaatttg
ttatgttaaaccaattcc'3
5. Hybrid I BamH I fw
5'cgcggatccctaatacacacaagcgagacagctg'3
6. Hybrid I Xho I rev
5'cacccgatactcgagtcagttgaaccagttccaag'3
7. Hybrid I E1 mut fw
5'caagcgagacagctgcrtgagtgatattgttcagcaacaacgaattgtaacggaag
atctccaagccc'3
8. Hybrid I E1 mut rev
5'ttggtgctgaacaatatcactcagcagctgtctcgcttggtgattagggatccac
gagg'3
9. Hybrid I E2 mut fw
5'gaactggataagtgggctcgctttggaactggttcaactgagaattcagactcca
ggggtcgactcgagc'3
10. Hybrid I E2 mut rev
5'gttccaaagccagcccacttatccagttcttcccttcgacgcctcttaaccttt
ctc'3
11. Hybrid II BamH I fw
5'cgggatccggagcatcagtaacgctgacgggtacaggccagacaattattgtctgat
atag'3
12. Hybrid II Xho I rev
5'cgctcgagctaataccacagccaatttggtatgttaaaccaattccacaaacttgc
ccatt'3
13. Hybrid III BamH I fw
5'cgggatccctgggtgctgctggttctaccatgggagcagcatcagtaacgctgacg
gtacaggccagacaattattgtctgatatag'3
14. Syngene 1 BamH I fw
5'cggaattcctagtggtggtggtggtggtgagagagtagttgtcgtgcttgacc'3

15. Syngene 1 EcoR I rev
5'cggaattcctagtggtgggtgggtgggtgagagagtagttgtcgtgcttgcacc'3
16. Syngene 2 link fw
5'gggtgcaagcagcacaactactctctcatcatcatcatcatctgggtgctgctg
gttctaccatgg'3
17. Syngene 2 link rev
5'ccatggtagaaccagcagcaccagatgatgatgatgatgatgagagagtagttgt
cgtgcttgcacc'3
18. Gp41 Bgl II fw
5'ccagatctgcagtggggaataggagctttgttccttggg'3
19. Gp41 Pst I rev
5'ggctcttccaagctagtggtgggtgggtgggtgtagcaaaatcctttccaagcct
gtcttattcttctagg'3
20. Gp41deltaFP BglIII fw
5'ccagatctatgggctgcacgtcaatgacgctg'3
21. NHR Bgl II fw
5'ccagatctggctgcacgtcaatgacgctgacggtacaggcc'3
22. NHR Pst I rev
5'cctgagctgcagaccccaaatcccagagctgttgatc'3
23. CHR Bgl II fw
5'gaagatctatggagtgggacagagaaattaac'3
24. CHR Pst I rev
5'cctgagctgcagataccacagccaatttgttatg'3
25. Seq gp41
5'cgatatgagggacaattg'3
26. intF1
5'agtgctgcagttaaggcagcctgttgggtg'3
27. int R1
5'ctacctgccacacaatcatcacctgccatc'3
28. T7
5'taatacgactcactataggg'3
29. T7 Terminator
5'ttatagcaaaatcctttc'3
30. pDisplay Seq fw
5'caccatggagacagacacactcctgctatgg'3

31. pDisplay Seq rev
5'caaaccgcgaggagcccaccgcatccc'3
32. SK68i M:
5'ggarcagciggaagcaciattgg'3
33. SK69i M:
5'ccccagacigtgagiticaaca'3
34. gp41 Seq fw:
5'cgatatgagggacaattg'3
35. gp41 Seq rev:
5'gctaagatctacagctgcctt'3
36. PERV Realtime-PCR fw:
5'tccagggctcataatttgtc'3
37. PERV Realtime-PCR rev:
5'tgatggccatccaacatcga'3

Sonden (TIB Molbiol, Berlin, Deutschland):

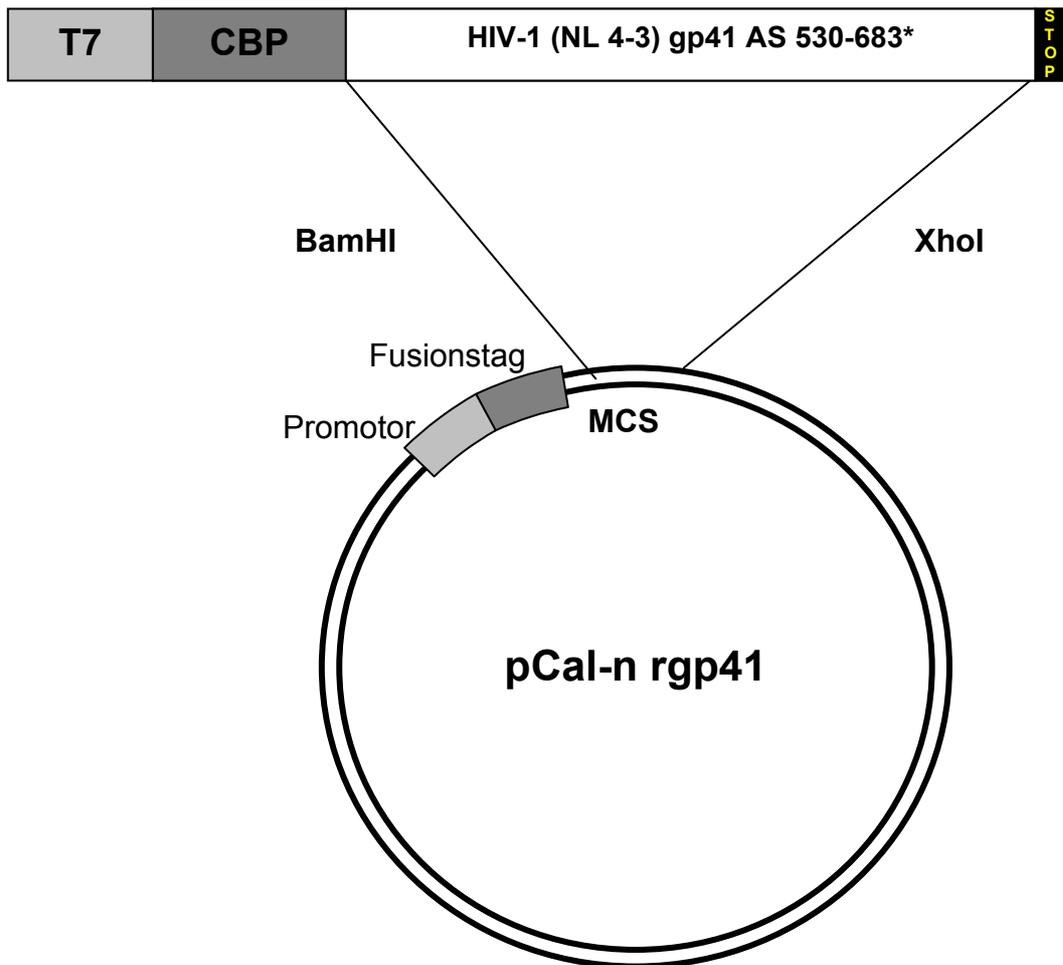
HIV-Sonde:

5' - 6Fam-TgACgCTgACggTACAggCCagAC-Dabcyl-'3 (TIB-Molbiol)

PERV-Sonde:

5' - 6Fam-AgAAgggACCTTggCAgACTTTCT-Dabcyl-'3 (TIB-Molbiol)

III. Plasmidkarten:



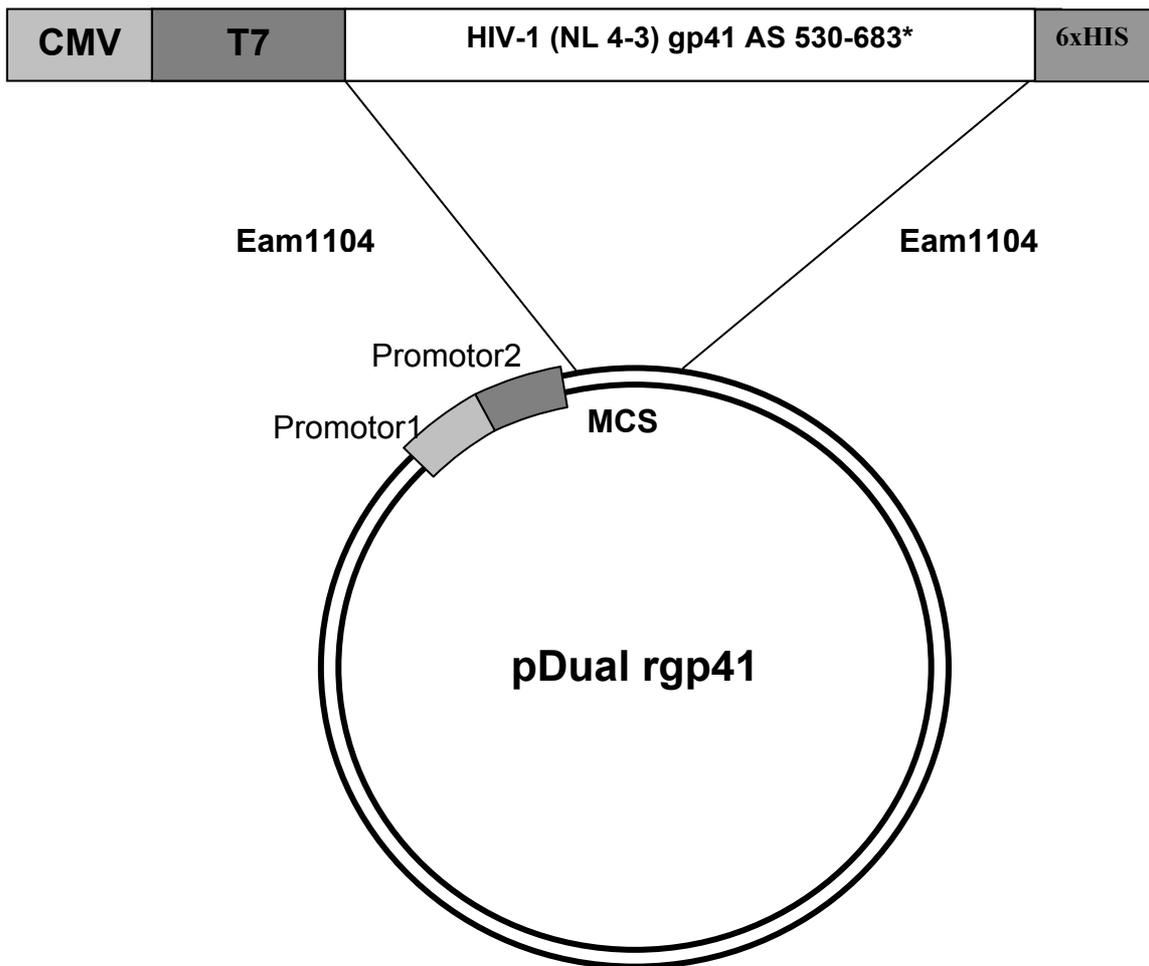
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

NH₂-MGCTSMTLTVQARQLLSDIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARI
 LAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDRE
 INNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK WASLWNWFNITNWLWYIK-COOH

Klonierung:

Das Insert wurde auf Basis des Moleklarklons pNL 4-3 (NIH, Adachi, et al., 1986) mit den Primern 1 und 2 (siehe Anhang II) amplifiziert und über die Schnittstellen für Bam HI und XhoI in den pCal-n Vektor (Stratagene) kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

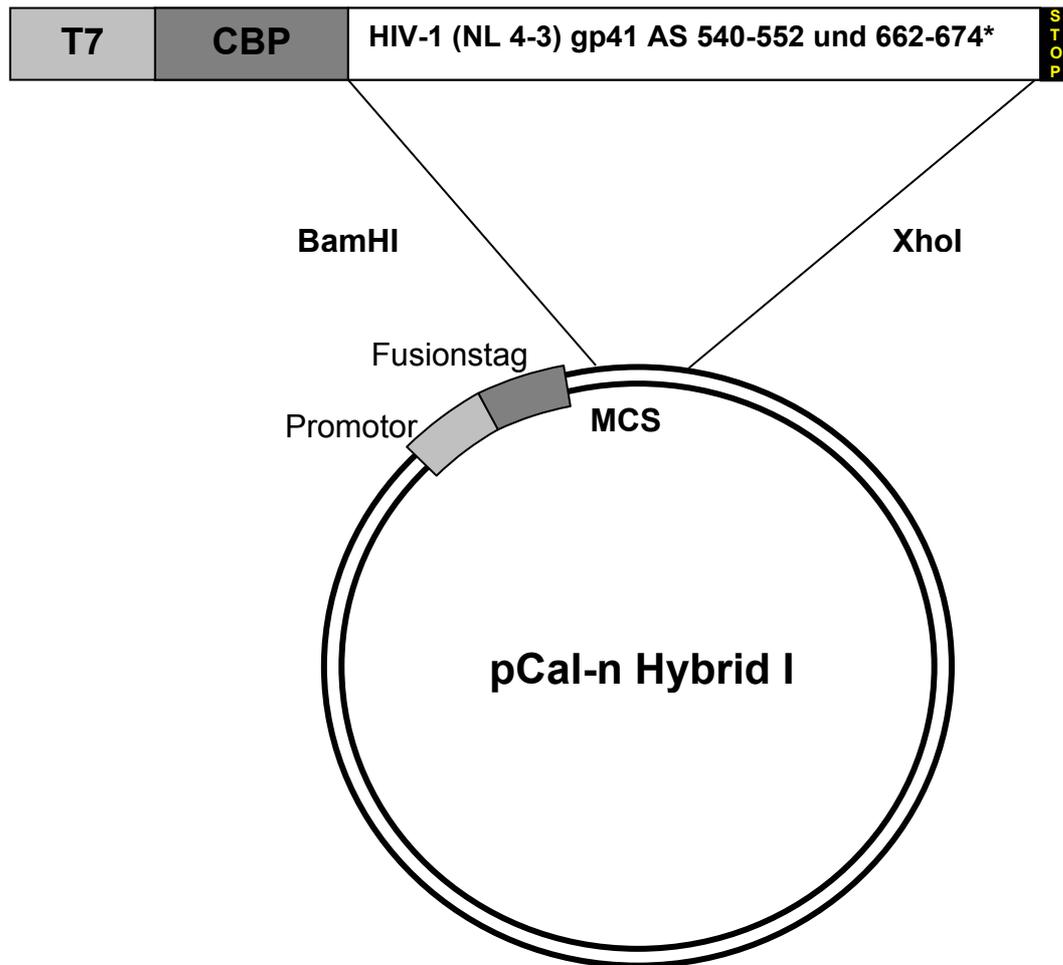
NH₂-

MGCTSMTLTVQARQLLS DIVQQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARI
 LAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDRE
 INNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIKHHHHH
 H-COOH

Klonierung:

Das Insert wurde auf Basis des Moleklarklons pNL 4-3 (NIH, Adachi, et al., 1986) mit den Primern 3 und 4 (siehe Anhang II) amplifiziert und über die Schnittstellen für Eam1104 in den pDualVektor (Stratagene) kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



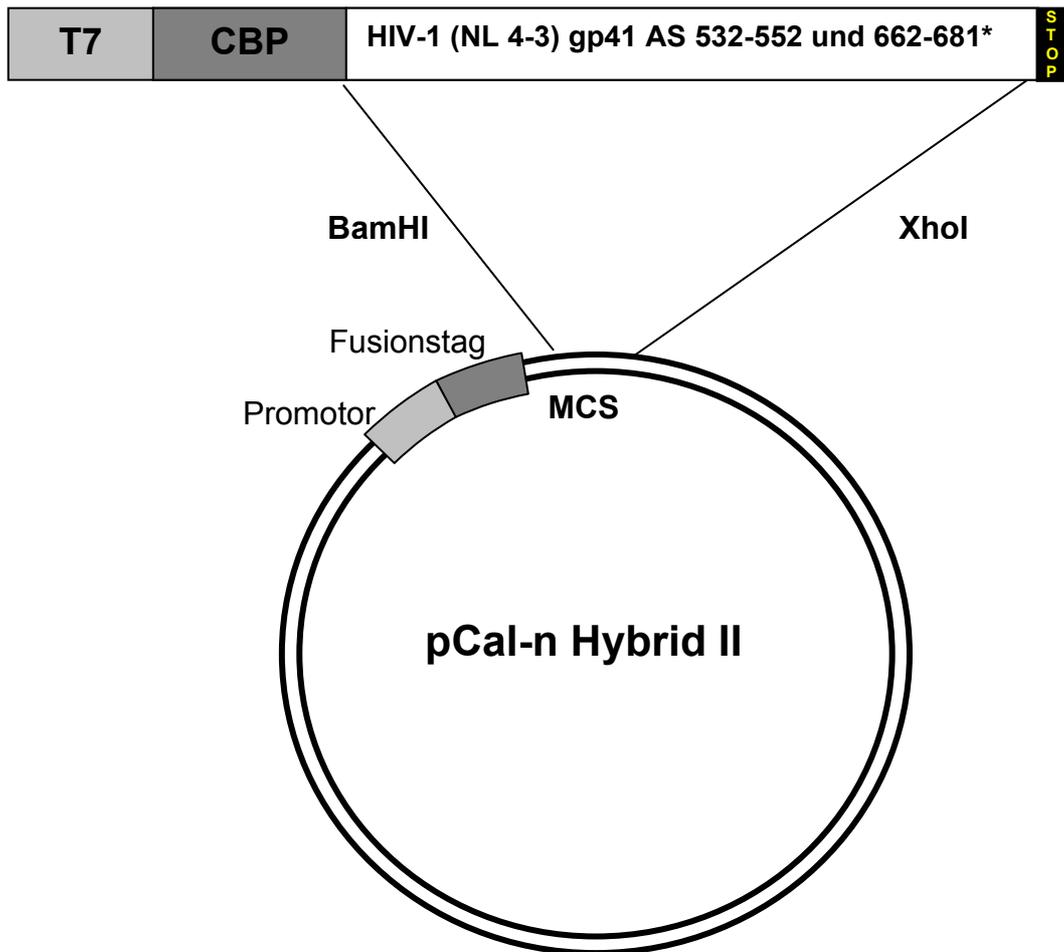
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

**NH₂-LITQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLTSLSSEVVLQ
NRGLDLLFLKKEGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLERRRREELDKW
ASLWNWFN-COOH**

Klonierung:

Über die Primer 5 und 6 wurde die N-terminale Sequenzsubstitution, über die Primer 7 und 8 die C-terminale Sequenzsubstitution in pCaln-p15E (Fiebig, et al., 2002) eingefügt. Als Außenprimer für die Mutagenese-PCR wurden die Primer 9 und 10 verwendet. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen für Bam HI und Xho I in den pCaln-Vektor kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



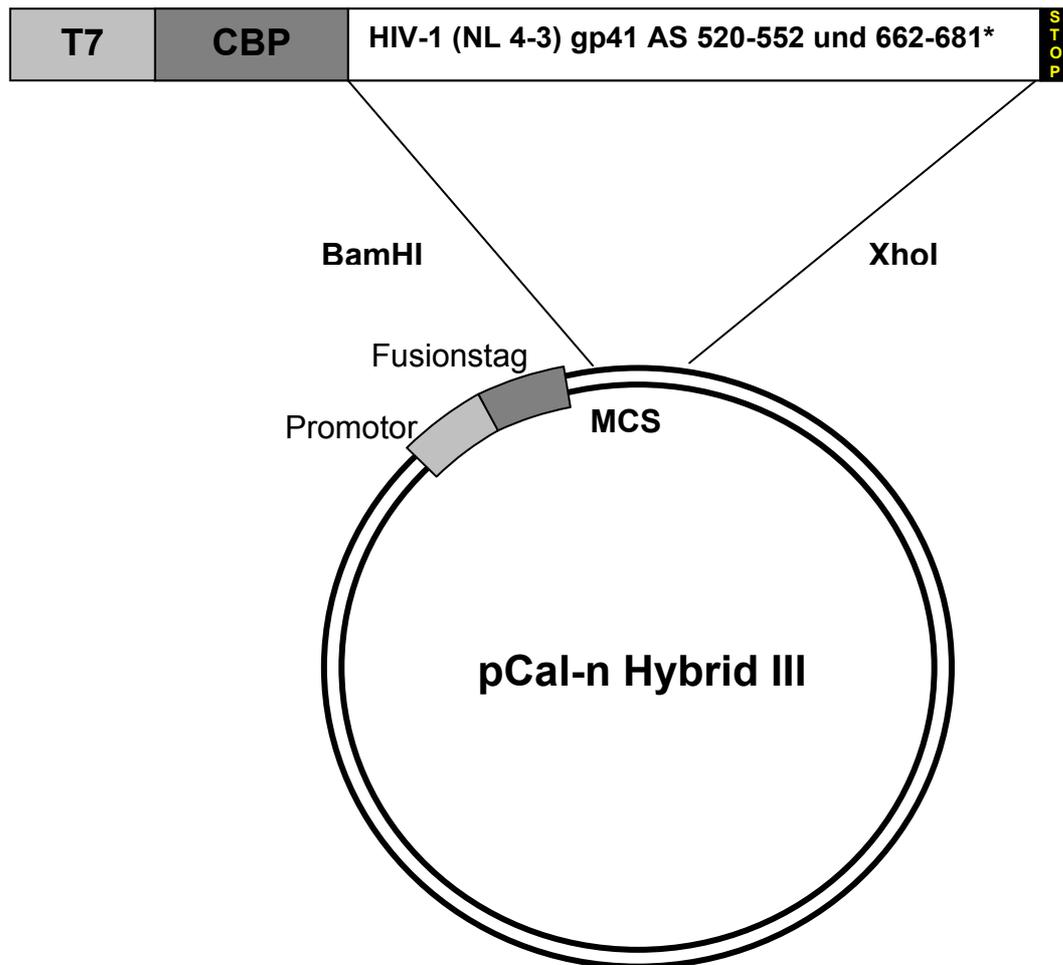
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

NH₂-LITGASVTLTVQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEESLT
 SLSEVVLQNRRLDLDLFLKKEGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERLER
 RRREELDKWASLWNWFNITNWLWY-COOH

Klonierung:

Über die Primer 11 und 12 wurde auf Basis von pCaln-HybridI das Insert für HybridII amplifiziert. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen für Bam HI und Xho I in den pCaln-Vektor kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)

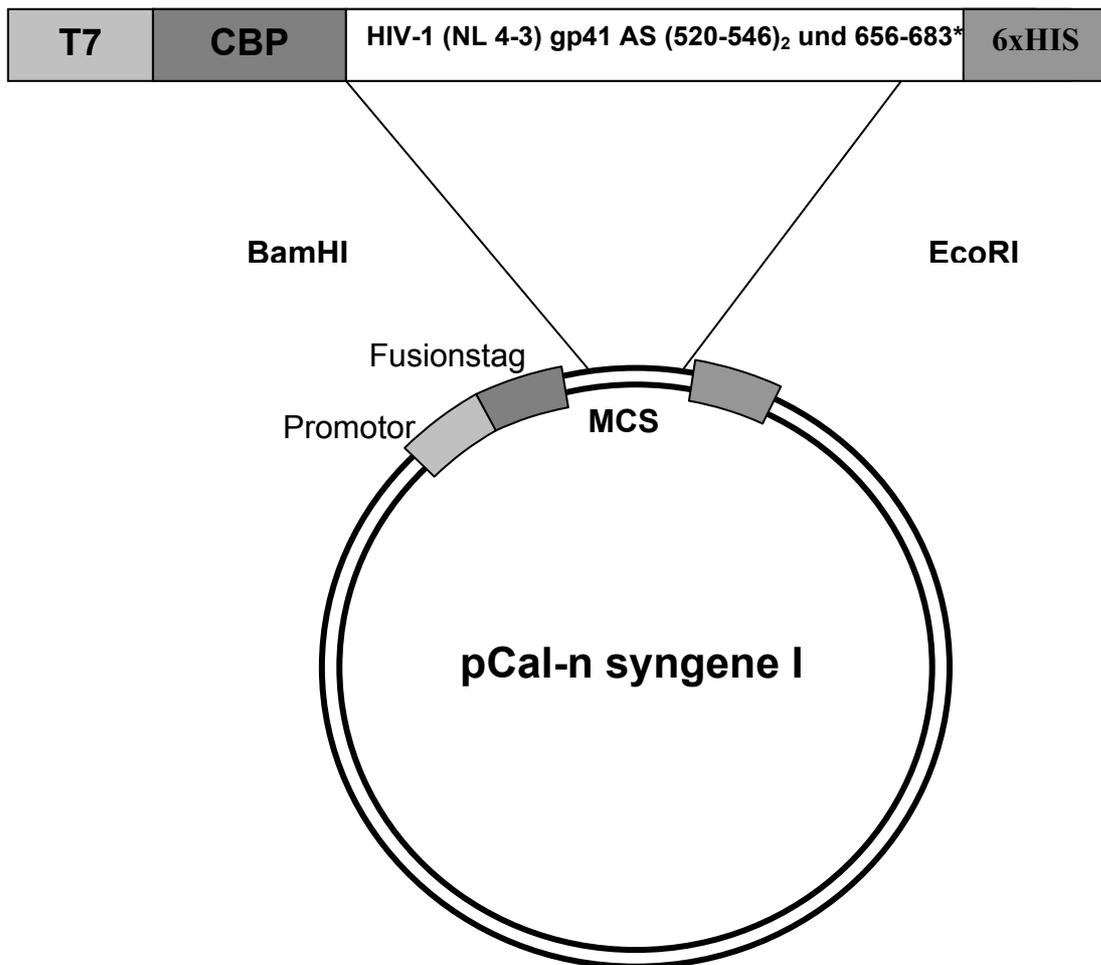


Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:
 NH₂-LGAAGGSTMGASVTLTVQARQLLSDIVQQQRIVTEDLQALEKSVSNLEES
 LTSLSEVVLQNRRLDLLFLKKEGLCVALKEECCFYVDHSGAIRDSMSKLRERL
 ERRRRELDKWASLWNWFNITNWLWY-COOH

Klonierung:

Über die Primer 12 und 13 wurde auf Basis von pCaln-HybridII das Insert für HybridIII amplifiziert. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen für Bam HI und Xho I in den pCaln-Vektor kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al.,1985)



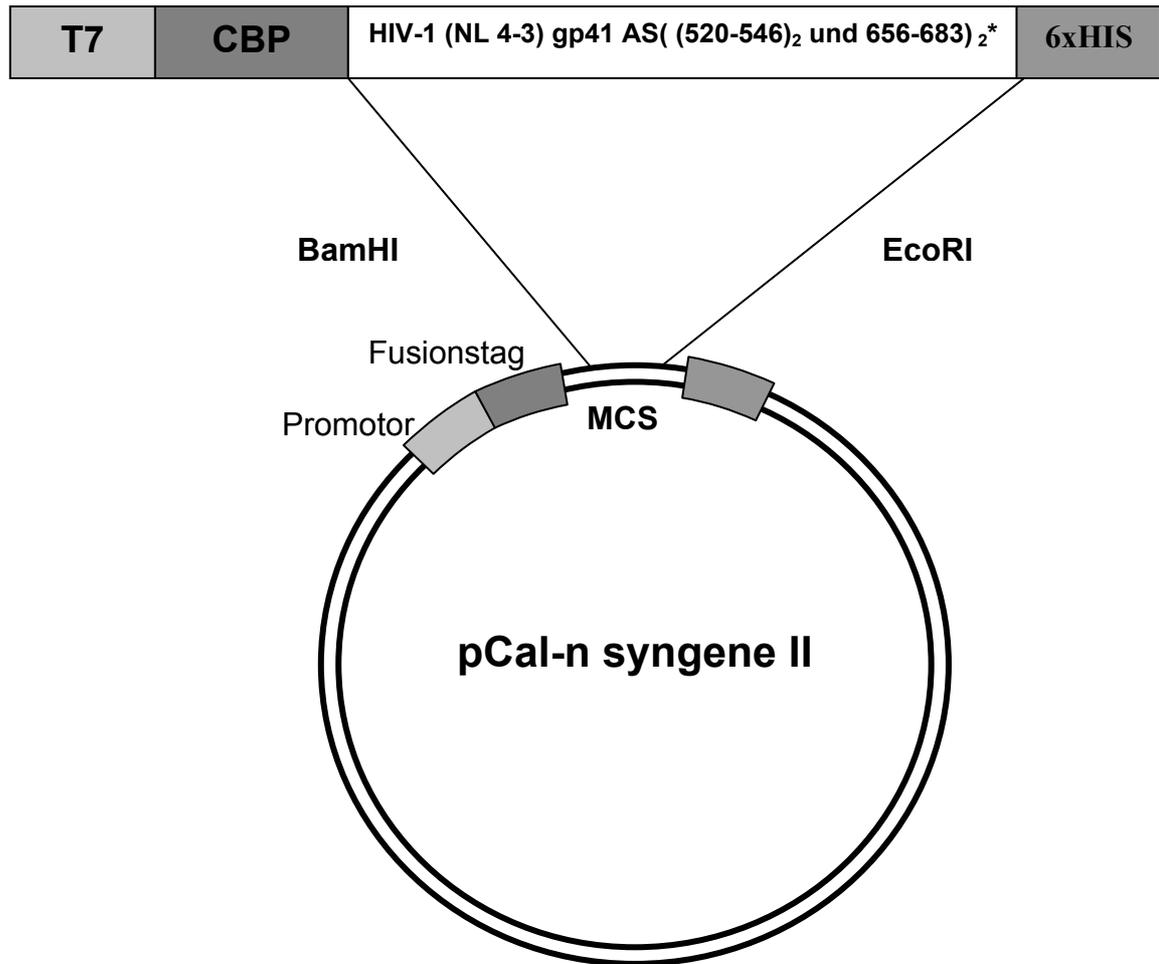
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

**NH₂-LGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSSGSGSNEQELLELDKWASLWNWFEDITN
WLSGSGSLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSHHHHH-COOH**

Klonierung:

Über die Primer 14 und 15 wurde auf Basis von pET30A syngene1 das Insert für CBP-SyngeneI amplifiziert. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen für Bam HI und Eco RI in den pCaln-Vektor kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al.,1985)



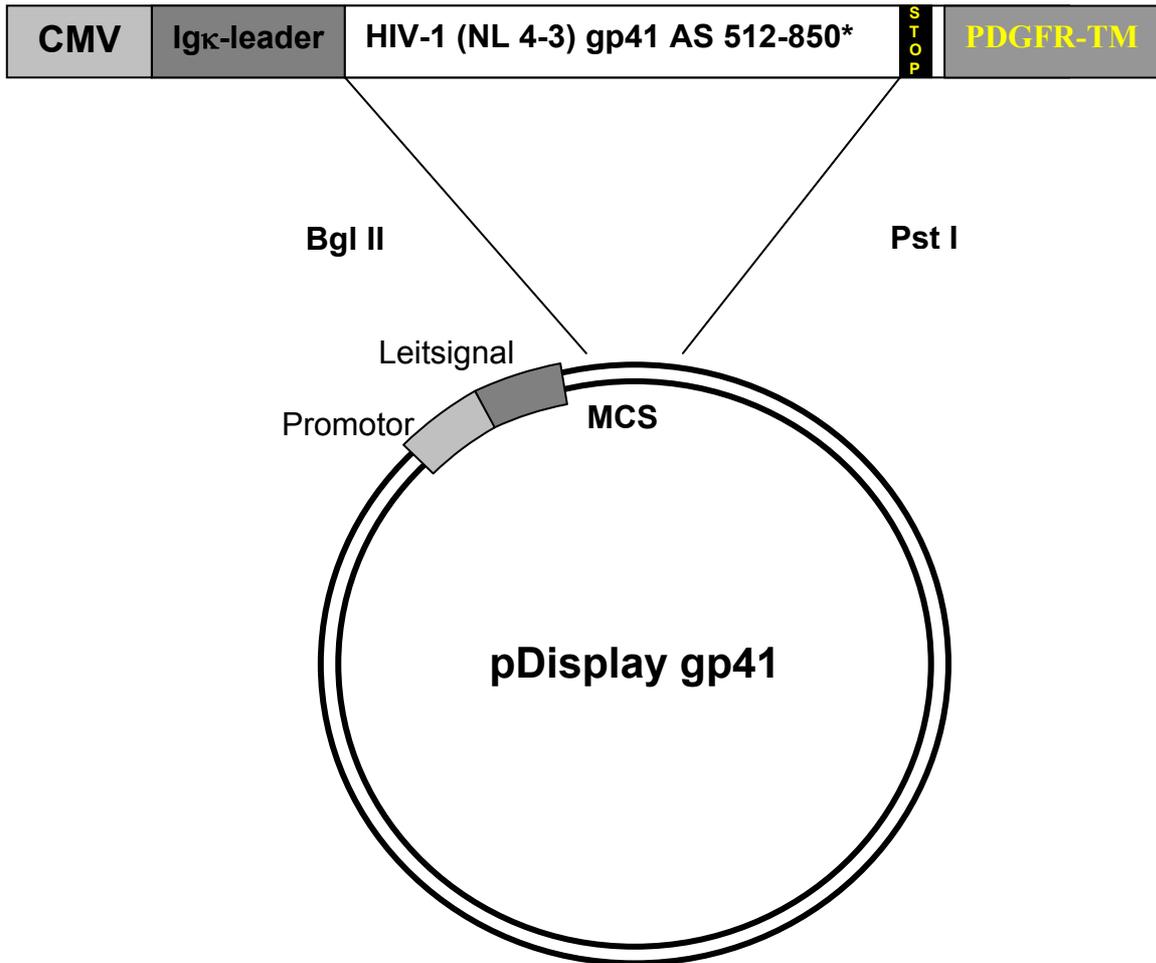
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

NH₂LGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSSGSGSNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLSGSGSLGA
 AGSTMGAASITLTVQARQLLSHHHHHLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSSGSGSNEQELLEL
 DKWASLWNWFDITNWLSGSGSLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSHHHHH-COOH

Klonierung:

Über die Außenprimer 14 und 15 wurde auf Basis von pET30A syngene1 das Insert für CBP-SyngeneII amplifiziert. Der Linker wurde über die Primer 16 und 17 generiert. Das Amplifikat wurde über die Schnittstellen für Bam HI und Eco RI in den pCaln-Vektor

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al.,1985)



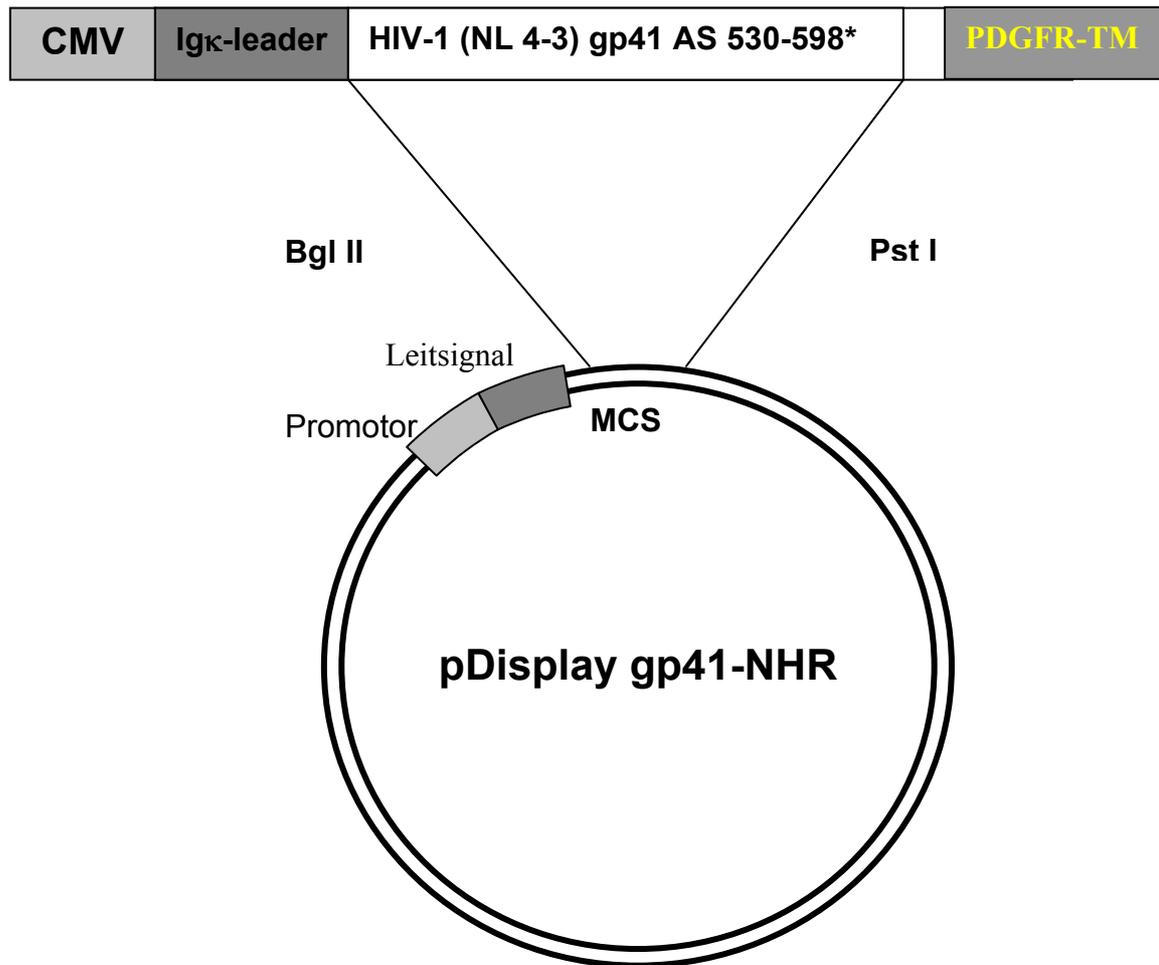
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

NH₂-AVGIGALFLGLGFLGAAGSTMGCTSMTLTVQARQLLSDIVQQQNNLLRAIEAQ
 QHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWGC SGKLICTTAVPWNASWSN
 KSLEQIWNNTWMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKASLW
 NWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIVNRVRQGYSPLSFQTHLPIP
 RGPDRPEGIEEEGGERDRDRSIRLVNGSLALIWDDLRSCLFSYHRLRDLILLIV
 TRIVELLGRRGWEALKYWWNLLQYWSQELKNSAVNLLNATAIAVAEGTDRVIEV
 LQAAYRAIRHIPRRIRQGLERILL-COOH

Klonierung:

Das Insert wurde auf Basis des Moleklarklons pNL 4-3 (NIH, Adachi, et al., 1986) mit den Primern 18 und 19 amplifiziert und über die Schnittstellen für Bgl II und Pst I in den pDisplay Vektor (Invitrogen) kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



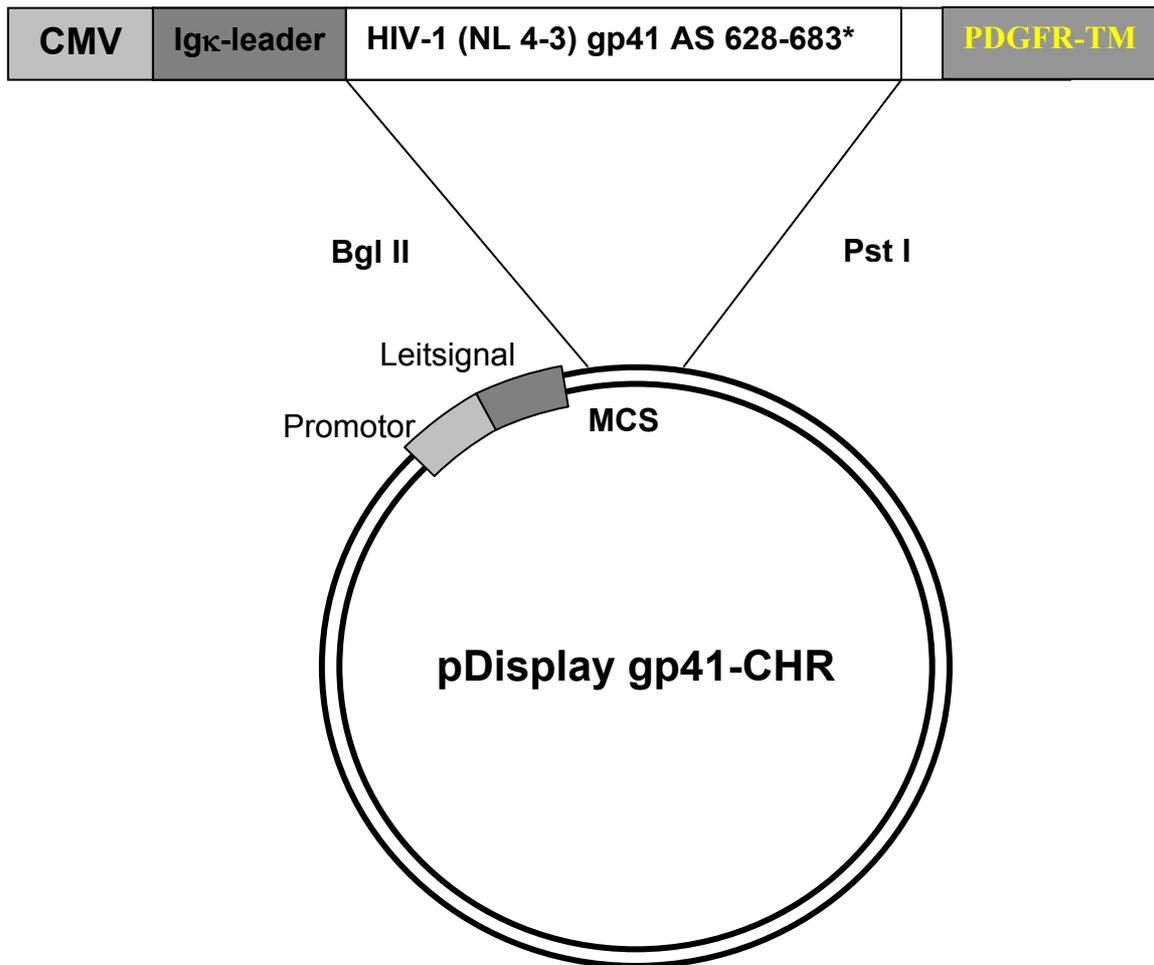
Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

NH₂-MGCTSM~~T~~LT~~V~~QARQL~~L~~SDIVQQ~~Q~~NNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARI
LAVERYLKDQQL~~L~~GIWG-COOH

Klonierung:

Das Insert wurde auf Basis des Moleklarklons pNL 4-3 (NIH, Adachi, et al., 1986) mit den Primern 21 und 22 amplifiziert und über die Schnittstellen für Bgl II und Pst I in den pDisplay Vektor (Invitrogen) kloniert.

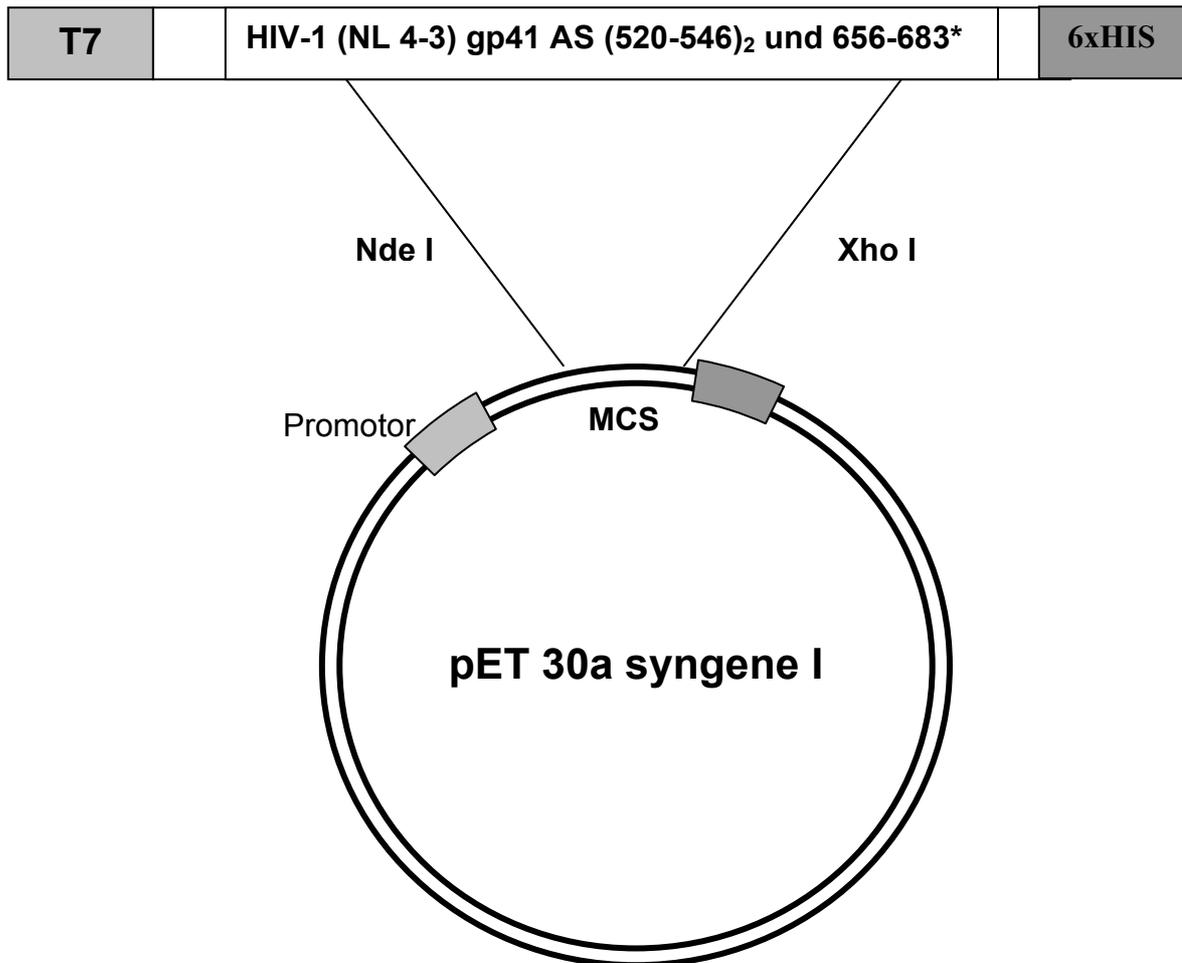
* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:
 NH₂-MEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQOEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWL
 WYIK-COOH

Klonierung:
 Das Insert wurde auf Basis des Moleklarklons pNL 4-3 (NIH, Adachi, et al., 1986) mit den Primern 23 und 24 amplifiziert und über die Schnittstellen für Bgl II und Pst I in den pDisplay Vektor (Invitrogen) kloniert.

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al., 1985)



Aminosäuresequenz des translatierten Inserts:

**NH₂- LGAAGSTMGAASITLTVQARQLLSGSGSNEQELLELDKWASLWNWFDITN
WLSGSGSLGAAGSTMGAASITLTVQARQLLS-COOH**

Klonierung:

Die folgende Sequenz wurde mittels PerfectGene® Gensynthese von der Firma Entelechon, Regensburg, Deutschland, generiert und über die Schnittstellen für Nde I und Xho I in den pET30A Vektor kloniert.

```
CTGGGTGCTGCTGGTTCTACCATGGGTGCTGCTTCTATCACCTGACCGTTCAGGCTCGTCAGC
TGCTGTCTTCTGGTTCTGGTTCTAACGAACAGGAAGTCTGGAAGTGGACAAATGGGCTTCTCT
GTGGAAGTGGTTCGACATCACCAACTGGCTGTCTGGTTCTGGTTCTCTAGGGGCAGCCGGATCG
ACAATGGGCGCAGCCTCGATAACGCTAACGGTGAAGCACGACAACACTACTCT
```

* bezogen auf das HIV-1 Referenzgenom, HXB2, NCBI K03455, Ratner, et al.,1985)

Publikationsliste

Denner, J., Seibold, E., Schmolke, M., Kurth, R.,
The Immunosuppressive domain of the transmembrane Glycoprotein GP41 of
HIV-1: Homology with the receptor binding site of interferon and modulation
of cytokine production
6th European Conference on Experimental AIDS Research, Edinburgh, 23.-26
Juni 2001, p56-P18

Denner J, Rademacher N, Grashoff C, Schmolke M, Fiebig U, Kurth R.
Immunosuppression by HIV and other retroviruses: Different strategies or a
common mechanism?
ECEAR 2002, 7th European Conference on Experimental AIDS Research, Genoa,
Italy 08.11.06.2002, AB53

Denner J., Rademacher N., Grasshoff C., Schmolke M., Fiebig U., Kurth R
Immunosuppressive properties of the transmembrane envelope protein of HIV
and other retroviruses
XIIth International Congress of Virology, Paris, 27. 7. - 1. 8. 2002, V-1165

Denner, J., Grashoff, C., Rademacher, N., Schmolke, M., Fiebig, U.,
Kurth, R.
Comparison of the immunosuppressive properties of HIV and other retroviruses
International Meeting of the Institute of Human Virology, Baltimore,
09.09.-13.09.2002

Schmolke M., Chamanara E., Kurth R., Denner J.
Emergence of resistant HIV-1 quasi species after treatment with a
neutralising antibody (2F5) in vitro
Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.-29.3.2003, 290

Schmolke, M., Chamanara, E., Kurth, R., Denner, J.
Hemmung der HIV-Replikation durch inhibitorische Peptide und
neutralisierende Antikörper: Neue Optionen für die Therapie.
9. Deutscher AIDS-Kongress, Hamburg, 14.-17.5.2003
Europ. J. Med. Res., 8, Suppl. 1, 90 (2003)

Denner, J., Schmolke, M., Fiebig, U., Kurth, R.
Die immunsuppressive Wirkung von HIV: Vergleich mit anderen Retroviren
9. Deutscher AIDS-Kongress, Hamburg, 14.-17.5.2003
Europ. J. Med. Res., 8, Suppl. 1, 92 (2003)

Fiebig, U., Schmolke, M., Karlas A., Denner J., Kurth, R.
Induktion neutralisierender Antikörper gegen transmembrane Hüllproteine von Retroviren
DPMA, Aktenzeichen 103 39 966.6-43
in der Prüfphase März 2004

Danksagung

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die fachliche Unterstützung danke ich Prof. Dr. Reinhardt Kurth.

Ich danke Frau Prof. Dr. Angelika Barnekow für die externe Betreuung der Dissertationsarbeit.

Für die Betreuung der Arbeit und die stetige Diskussionsbereitschaft danke ich Dr. Joachim Denner.

Für Unterstützung bei den Capture-ELISA-Studien danke ich Dr. Stephen und Nicky Norley. Darüber hinaus danke ich Dr. Stephen Norley und Dr. Norbert Bannert für die stetige Diskussionsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe P23 des Robert Koch-Instituts, dabei möchte ich speziell Uwe Fiebig und Alexander Karlas für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken.

Ich danke Sandra Klein für die Unterstützung bei den Epitopkartierungen.

Für die Versorgung der Ratten danke ich Frau Dietrich und ihrem Team.

Ich danke meinen Eltern und meiner Familie für die finanzielle und moralische Unterstützung während des gesamten Studiums und speziell der letzten drei Jahre.

Dank gilt folgenden Kooperationspartnern:

Dr. Claudia Kücherer, Robert Koch-Institut, Berlin, für die Bereitstellung der Virusisolate HIV-1 IIIB und -MN.

Dr. Heinz Ellerbrock und Dr. Claudia Kücherer, Robert Koch-Institut, Berlin, für die Bereitstellung der Primer- und Sondensequenzen für die *Realtime*-PCR.

Dr. Muhesin Özel und Frau Gudrun Holland für die Unterstützung bei Auswertung der REM- und TEM-Aufnahmen.

Die folgenden Reagenzien wurden zur Verfügung gestellt durch das NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH:

- HIV-1 gp41 monoklonaler Antikörper (2F5) von Dr. Hermann Katinger
- HIV-1 Moleklarklon (pNL4-3) von Dr. Malcolm Martin
- C8166-Zellen von Dr. Robert Gallo
- HIV-1 MN Env (15-mer) Peptidset

