

**Entwicklung und Erprobung eines Impfkonstrukts für das
Humane Immundefektvirus (HIV) auf der Basis eines
replikationsinkompetenten HIV-Vektors**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tomáš Racek

aus

Hodonín, Tschechische Republik

Würzburg 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Christian Jassoy

2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 HIV	1
1.1.1 Struktur von HIV	1
1.1.2 Der Replikationszyklus von HIV	5
1.1.3 HIV Pathogenese	6
1.1.4 Zelluläre und humorale Immunantwort bei der HIV-Infektion	7
1.1.4.1 HIV-spezifische CTL-Antwort	7
1.1.4.2 HIV-spezifische T-Helferzell-Immunantwort	9
1.1.4.3 Humorale Immunantwort	10
1.2 HIV-Impfstoffentwicklung	11
1.2.1. Ziele der HIV-Impfung	11
1.2.2 HIV-Impfstoffkandidaten	12
1.2.2.1 Proteinvakzine	13
1.2.2.2 HIV-Lebend- und Totimpfstoffe	13
1.2.2.3 DNA-Vakzine	14
1.2.2.4 Rekombinante Virusvektoren	15
1.2.2.5 Kombinierte Immunisierungen	16
1.2.2.6 Andere HIV-Impfstoffkandidaten	17
1.3 Virale Vektoren und Gentherapie	17
1.3.1 Lentivirale Vektoren	19
1.3.2 Pockenviren und pockenvirale Vektoren	21
1.3.2.1 Aufbau der Pockenviren	21
1.3.2.2 Replikationszyklus der Pockenviren	22
1.3.2.3 Pockenvirale Vektoren	23
1.3.2.4 Hybridvektoren	24
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Materialien	27
2.1 Geräte	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3 Chemikalien	29
2.4 Reagenzien	30
2.4.1 Reagenzien für die Zellkultur	30
2.4.2 Peptide und Proteine	30
2.4.3 Radiochemikalien	30
2.4.4 Enzyme	31
2.4.5 Größen-/Längenstandards	31
2.4.6 Antibiotika und Substanzen zum Expressionsnachweis	31
2.4.7 Kits	32
2.4.8 Plasmide	32
2.4.9 Oligonukleotide	33
2.4.10 Antikörper	33
2.4.11 Bakterienstämme	34
2.4.12 Zelllinien	34
2.4.13 Mäuse	35
2.4.14 Viren	35
2.5 Puffer und Lösungen	35
2.5.1 Bakterienkultur	35

2.5.2 Zellkultur	36
2.5.3 Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA	37
2.5.4 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden.....	40
2.5.5 Puffer und Lösungen für die DNA-Transfektion.....	41
2.5.6 Puffer und Lösungen für Durchflußzytometrie	42
2.4.7 Puffer und Lösungen für ELISA und ELISpot.....	43
2.4.8 Puffer und Lösungen zum Nachweis der Luciferase-Aktivität.....	44
2.4.9 Standardlösungen und Puffer	45
3 Methoden	46
3.1 Zellbiologische Methoden	46
3.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen	46
3.1.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen	46
3.1.3 Kultivierung von PBMC	46
3.1.4 Kultivierung von Maus-Milzzellen.....	47
3.1.5 Isolierung von PBMC durch Ficoll-Gradient	47
3.1.6 Zelldichtebestimmung	48
3.1.7 Kryokonservierung.....	48
3.1.8 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomzelllinien.....	49
3.1.9 Kalziumphosphat-Transfektion	49
3.2 Virologische Methoden.....	50
3.2.1 Methoden zur Arbeit mit lentiviralen Vektoren	50
3.2.1.1 Herstellung infektiöser Lentivirus-Überstände	50
3.2.1.2 Titerbestimmung der Lentivirus-Überstände.....	51
3.2.1.3 Konzentrierung viraler Partikel	52
3.2.2 Methoden zur Arbeit mit Vacciniavirus	53
3.2.2.1 Anzucht von Vacciniaviren.....	53
3.2.2.2 Titerbestimmung von Vacciniaviren.....	54
3.2.2.3 Infektion von Suspensionszellen mit Vacciniavirus.....	54
3.2.2.4 Vacciniavirusreinigung in Saccharosegradient.....	55
3.2.2.5 Präparation von Vacciniavirus-DNA	56
3.2.2.6 Vacciniavirus-Rescue	56
3.3 Analyse und Klonierung von DNA	57
3.3.1 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	57
3.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	58
3.3.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	58
3.3.4 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	59
3.3.5 Restriktionsverdau von DNA.....	59
3.3.6 Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment	60
3.3.7 Entfernung von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase	60
3.3.8 Dephosphorylierung von DNA	61
3.3.9 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	61
3.3.10 Präzipitation von DNA.....	61
3.3.11 Ligation von linearen DNA-Fragmenten.....	62
3.3.12 Herstellung der kompetenten Bakterien.....	62
3.3.13 Transformation der kompetenten Bakterien.....	63
3.3.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)	63
3.3.15 Sequenzierung von DNA.....	65
3.3.16 Southern Blot.....	66
3.4 Analyse der Proteinexpression	67
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten zur Proteingelelektrophorese und Proteinbestimmung nach Bradford	67

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	67
3.4.3 Western Blot	68
3.4.4 Nachweis der Luciferase-Expression	69
3.5 Tierexperimente	70
3.5.1 Immunisierung	70
3.5.2 Milzentnahme	70
3.5.3 Blutentnahme und Serumgewinnung	70
3.5.4 Präparation von Milzzellen	71
3.6 Immunologische Methoden	71
3.6.1 ELISpot	71
3.6.2 Neutralisationstest	72
3.6.3 ELISA	73
3.7 Durchflusszytometrie	74
3.7.1 Messung der EGFP-Expression	74
3.7.2 Intrazelluläre Färbung	74
3.7.3 Probenaufnahme am FACScan	75
4 Ergebnisse	76
4.1 Die Herstellung und In-Vitro-Infektionsanalyse von HIV-1-Vakzine-Vektoren ..	76
4.1.1 Die Herstellung von HIV-1-Vakzine-Vektoren mit hgag- Expressionskassette	76
4.1.2 Nachweis der hgag-Expression	78
4.1.3 Die lentivirale Transduktion der eukaryotischen Zelllinien	79
4.1.4 Die lentivirale Transduktion der humanen PBMCs und Mausmilzzellen in vitro	81
4.1.5 Konzentrierung VSV-G-pseudotypisierter viraler Partikel	83
4.2 Direkter Nachweis der Expression des Transgens in vivo	84
4.2.1 Nachweis der Luciferase-Expression nach der Transduktion mit HIV-1- Vektoren in vivo	84
4.3 Immunisierung mit lentiviralen HIV-1-Vektoren	86
4.3.1 Nachweis der Gag-spezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit replikationsinkompetenten HIV-1 Vektoren	87
4.3.1.1 Immunisierungsschema mit Vektor-Primärimmunisierung	87
4.3.1.2 Immunisierungsschema mit DNA-Primärimmunisierung	89
4.3.2 Analyse der EGFP-spezifischen T-Zellimmunantwort nach lentiviralem Gentransfer	92
4.4 Herstellung von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren	94
4.3.1 Herstellung der lentiviralen Kassette	94
4.3.2 Analyse der Genexpression aus der lentiviralen Kassette	97
4.3.3 Konstruktion von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren	98
4.3.4 Analyse der Vektorgenome der Vacciniavirus/HIV-Vektoren	100
4.3.4 Analyse der Genexpression der Vacciniavirus/HIV-Vektoren	102
4.3.5 Infektionsanalyse	103
5 Diskussion	105
5.1 Die Herstellung und In-Vitro-Infektionsanalyse von HIV-1-Vakzine-Vektoren	105
5.2 Direkter Nachweis der Expression des Transgens in vivo	111
5.3 Immunisierung mit lentiviralen HIV-1-Vektoren	112
5.4 Herstellung von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren	116
6 Zusammenfassung	124
7 Summary	125
8 Literaturverzeichnis	126
9 Anhang	140

9.1 Erklärungen	140
9.2 Lebenslauf	141
9.3 Publikationsliste	142
9.4 Danksagung	143

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APS	Ammoniumperoxysulphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Antibiotic-Trypsin-Versene
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
CCR5	chemokine (C-C motif) receptor 5
Cph	Copenhagen
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CMV	Cytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ELISpot	Enzyme-Linked Immuno Spot Technique
Env	envelope glycoprotein (Hüllglykoprotein)
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FKS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigungskonstante
Gag	gruppenspezifisches Antigen
gp	Glycoprotein
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hgag	humanisiertes (synthetisches) gag-Gen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTL	Helfer-T-Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
kB	Kilobase
LTR	Long Terminal Repeat
MEM	Modified Eagle Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex
MOI	multiplicity of infection
MuLV	Murine Leukemia Virus (Mäuse-Leukämievirus)

MVA	Modified Vaccinia Ankara
NIH	National Institutes of Health
OD	optische Dichte
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PBS	Primer-Bindungsstelle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Phycoerythrin
pfu	plaque forming units (Plaques-bildende Einheiten)
PHA	Phytohämagglutinin
pol	Polymerase
PPT	Polypurintrakt
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
rev	regulator of virion
RLU	Relative Light Unit
RNA	ribonucleic acid (Ribonucleinsäure)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
RRE	Rev responsive element
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	sodium dodecyl sulfate (Na-Dodecylsulfat)
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SFU	Spot Forming Unit
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus (Affen-Immunschwächevirus)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylen-diamin
TNF	Tumor Necrosis Factor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton-X-100	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
UZ	Ultrazentrifugation
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus
VV	Vacciniavirus
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
wt	wild-type (Wildtyp)

1 Einleitung

1.1 HIV

HIV (human immunodeficiency virus) lässt sich aufgrund der taxonomischen Charakteristika, wie Struktur, Aufbau und Eigenheiten des Replikationsverhaltens in ein eigenes Genus – *Lentivirus* - der Familie *Retroviridae* einordnen. Im Gegensatz zu anderen Retroviren, haben Lentiviren konische Kapside. Sie sind komplexe Retroviren, die neben den kodierenden Gene für die Strukturproteine (Gag, Env) und für die Replikation der Viren notwendigen viralen Enzyme (pol) zusätzliche akzessorische offene Leseraster besitzen, wie z. B. tat (tax) und rev, die bisher nur bei den Lentiviren identifiziert worden sind. Diese regulatorischen Gene sind neben anderen Funktionen dafür verantwortlich, dass die lentivirale Genexpression in zwei Phasen erfolgt (Kim et al., 1989).

Vertreter dieser Virusgruppe wurden aus verschiedenen Primatenspezies und anderen Säugetieren, wie Schafen, Ziegen, Katzen, Rindern und Pferden isoliert. Im natürlichen Wirt etablieren die Lentiviren persistierende Infektionen, die meist chronische und langsam fortschreitende entzündliche Erkrankungen hervorrufen, weshalb sie ihren spezifischen Namen bekommen haben (lat.: lenti = langsam).

1.1.1 Struktur von HIV

Die infektiösen viralen Partikel des HIV sind von einer Lipidmembran umhüllt (Abb. 1), die aus der Zellmembran der Wirtszelle gebildet wird und die mit Env-Proteinen (Env steht für envelope) besetzt ist. Die Env-Proteine werden aufgrund ihrer starken Glykosylierung auch als Glykoproteine (gp) bezeichnet. Man unterscheidet das in die Membran eingelagerte gp41 und das daran nichtkovalent gebundene gp120. Die Env-Proteine ermöglichen dem HIV den Eintritt in die CD4-positive Zelle des Immunsystems.

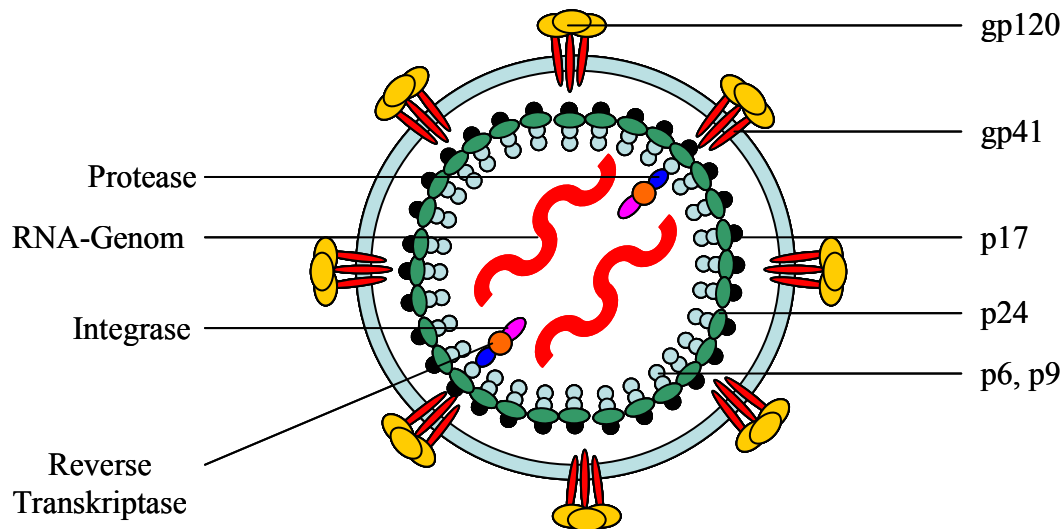


Abb. 1: Die Struktur von HIV (modifiziert nach Stevenson, 1999).

Das Partikelinnere besteht aus dem Nucleokapsid, welches aus den Gag-Proteinen gebildet wird. In dem Kapsid befindet sich ein diploides, 9,2 kB großes RNA-Genom zusammen mit den Enzymen Reverse Transkriptase (RT), Integrase und Protease. Die virale RNA hat, genau wie die eukaryotische mRNA, am 5'-Ende eine Capstruktur und am 3'-Ende eine Polyadenylierung. Nach der Infektion einer Wirtszelle wird die genomische RNA in doppelsträngige DNA umgeschrieben, welche als provirales Genom in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Das lentivirale Genom weist unter anderem die bei allen replikationskompetenten Retroviren typischen offenen Leseraster für die Strukturproteine gag, pol und env auf. Lentiviren sind komplexe Retroviren, die zusätzlich über akzessorische Gene verfügen. Das Genom wird zu beiden Seiten von "long terminal repeats" (LTR) flankiert. Die LTRs enthalten *cis*-aktive Sequenzen, wie Promotor- bzw. Enhancer-Elemente, die für die Expression der viralen Gene benötigt werden.

Alle Proteine, die am Aufbau infektiöser Partikel beteiligt sind, werden während der Morphogenese zunächst als Vorläuferproteine synthetisiert, die später durch die viralen oder zellulären Proteasen in einzelne Komponenten gespalten werden (Tab. 1; Abb. 2). Die Gag-Proteine (gruppenspezifische Antigene) werden zunächst als 55 kD Vorläuferproteine synthetisiert, welche im Verlauf der Morphogenese in einzelne Komponenten gespalten werden. Damit entstehen Matrix- (p17), Kapsid- (p24) und Nucleokapsidproteine (p9). Beim HIV wurde ein Link-Protein (p6) identifiziert, das ebenfalls den Gag-Proteinen zugerechnet wird.

Im zentralen Bereich des HIV-Genoms befinden sich die Gene, welche für die Synthese der viralen Protease, der Reversen Transkriptase und der Integrase verantwortlich sind. Die Produkte des pol-Gens werden zuerst als Gag/Pol-Fusionsprotein synthetisiert (160 kD). Die Membranproteine (Oberflächenprotein gp120 und Transmembranprotein gp41) werden vom env-Gen kodiert und werden als Vorläuferproteine (gp160) von einfach gespleißten mRNAs synthetisiert.

Protein	Gen	Größe	Funktion
Strukturproteine			
gruppenspezifische Antigene (Gag)	gag	p24 p17 p9 p6	Kapsidprotein Matrixprotein Nucleokapsidprotein, RNA-Bindung Verbindung zw. Kapsid und Membran
Membranproteine	env	gp120 gp41	Bindung an CD4 und Korezeptor (CXCR4 oder CCR5) Fusion
Enzyme	pol		
Reverse Transkriptase		p51/66	Synthese von cDNA aus RNA-Genom; RNaseH-Aktivität
Protease		p10	Prozessierung des Gag-Pol Vorläuferprotein
Integrase		p32	Integration der viralen cDNA in das Wirtsgenom
regulatorische Proteine	tat rev	p14 p19	Transaktivator der Transkription RNA-Transport
akzessorische Proteine	vif vpr vpu nef	p23 p15 p16 p27	Erhöhung der Infektiosität, Virusmaturation Transaktivator Hilfe bei der Virusfreisetzung CD4-Herabregulierung

Tab. 1: Die Eigenschaften der Proteine von HIV-1 (modifiziert nach Kuiken et al., 2002).

Außerdem werden bei den Lentiviren die regulatorischen Proteine Tat und Rev synthetisiert, welche die Transkription bzw. Expression der viralen Gene ermöglichen. Die akzessorische Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef haben ebenfalls eine regulatorische Funktion im Infektionszyklus des HIV, sind aber für den Replikationszyklus in Zellkultur nicht essentiell.

Die Gene, die für die regulatorischen und akzessorischen Proteine kodieren, bestehen häufig aus mehreren Exons und werden von mehrfach gespleißten mRNAs translatiert.

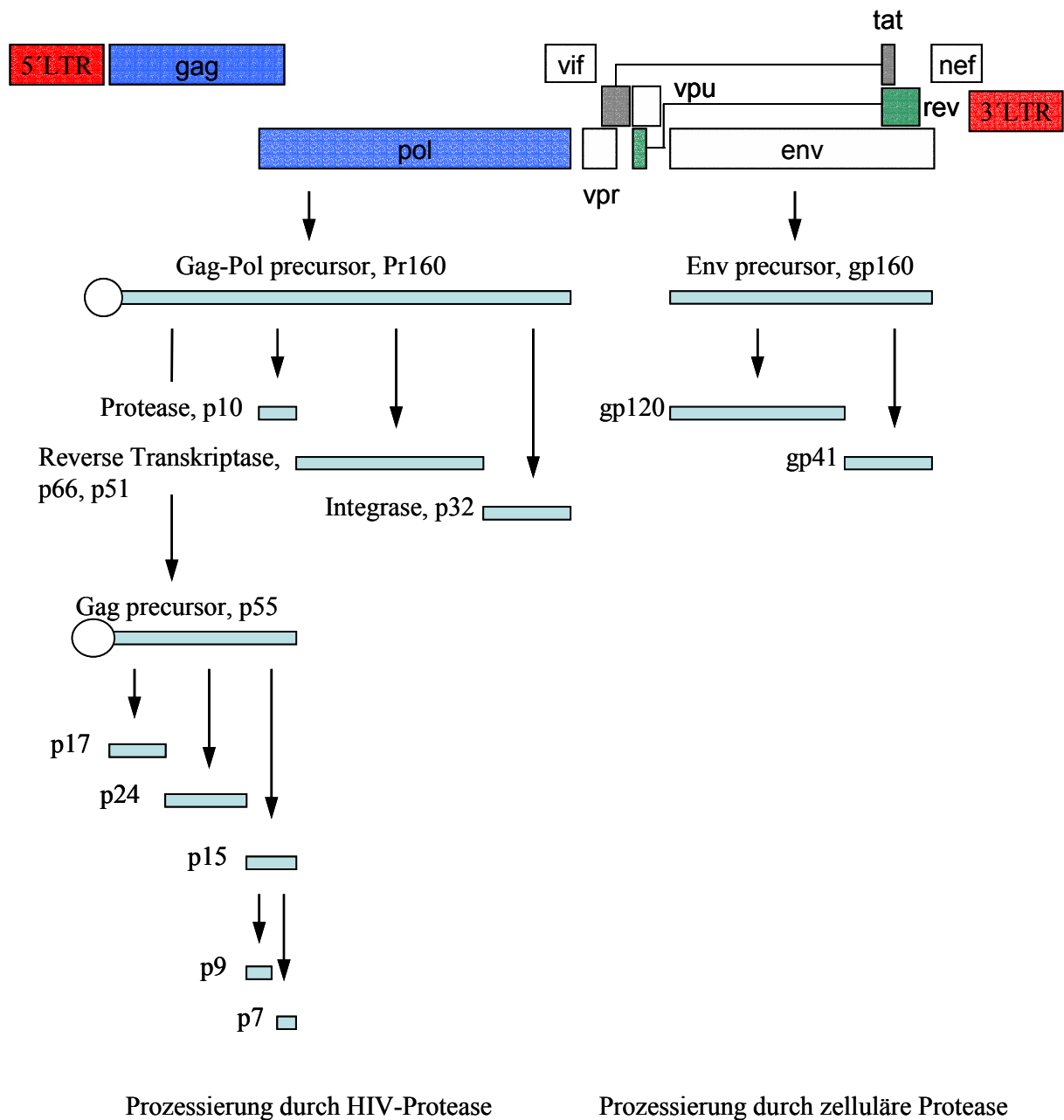


Abb. 2: Die genomische Organisation von HIV (modifiziert nach Levy, 1994).

1.1.2 Der Replikationszyklus von HIV

HIV infiziert die Zellen des Immunsystems, die den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche besitzen. Es handelt sich um T-Helferzellen, Makrophagen und Monocyten. Die Bindung zwischen Virion und Zelle erfolgt über den Kontakt zwischen gp120 und dem CD4-Rezeptor, sowie einem der beiden Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 (Dalglish et al., 1984; Deng et al., 1996). Durch die Bindung an beide Rezeptoren wird in gp41 eine Konformationsänderung ausgelöst, welche dazu führt, dass die N-terminale Domäne des gp41 in die zelluläre Membran eindringt. Danach kommt es relativ rasch zur vollständigen Membranfusion zwischen Virus und Zielzelle (Chan and Kim, 1998). Durch diese Membranfusion wird das virale Kapsid in die Zielzelle aufgenommen. Im Zytoplasma wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase das RNA-Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben. Als Primer für die Reverse Transkription dient das tRNA-Molekül des Lysins, das an die Primer-Bindungsstelle im 5'-Bereich des RNA-Genoms bindet (Frankel and Young, 1998).

Die virale cDNA gelangt danach in den Zellkern und wird dort durch die Integrase in die DNA der Zelle eingebaut. Die Integration der viralen DNA verändert das Zellgenom. Das kann dazu führen, dass die zellulären Gene zerstört werden oder sie unter die Kontrolle des 3'-LTR-Promotors kommen und dadurch aktiviert werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Marshall, 2002). Es wird viel darüber diskutiert, ob bestimmte Sequenzen im Genom dafür verantwortlich sein können, dass das HIV dort bevorzugt integriert. Nach neuesten Erkenntnissen integriert sich die virale DNA von HIV häufiger inmitten des zellulären Transkripts, dagegen eher selten an seinem Anfang oder seinem Ende (Schroder et al., 2002; Wu et al., 2003).

Nach der Aktivierung der Zelle kommt es zuerst zur Synthese der regulatorisch aktiven Proteine Tat, Rev und Nef im Zytoplasma, die zur verstärkten Transkription und Translation der viralen Struktur- und der akzessorischen Proteine dienen. Die HIV-Env-Proteine reichern sich auf der Zelloberfläche an, während im Zytoplasma die neugebildeten Virus-RNAs in die entstehenden Kapsidstrukturen verpackt werden. An einigen Stellen der Zelloberfläche tritt eine besonders starke Anreicherung der Env-Proteine auf, an denen es schließlich zur Knospung unreifer Viruspartikel kommt. Während der Reifung werden aus dem Gag- und Gag/Pol Vorläuferprotein die Matrix-, Kapsid- und Nucleokapsidproteine sowie die Reverse Transkriptase, Protease und Integrase prozessiert. Anschließend kommt es zur Ausbildung des konischen Kapsids, wodurch die Viruspartikel infektiös werden (Feng et al., 1996).

1.1.3 HIV Pathogenese

HIV infiziert die CD4-positiven Zellen des Immunsystems wie T-Helferzellen, Makrophagen oder dendritische Zellen und verursacht dadurch die Anfälligkeit des Organismus für Infektionen mit opportunistischen Pathogenen. In vielen Fällen treten zusätzlich eine aggressive Form des Kaposi-Sarkoms oder der B-Zell-Lymphome auf. Das klinische Bild dieser Erkrankungen wird unter dem Begriff AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) zusammengefasst und endet immer mit dem Tod (Levy, 1994). Bis heute gibt es weder einen Impfschutz vor HIV, noch eine Therapie, die zur Heilung des Patienten führt.

HIV wird durch den Kontakt mit Körperflüssigkeiten wie Blut, Samenflüssigkeit, Vaginalsekret oder Muttermilch übertragen. In vielen Fällen zeigen sich bei der primären HIV-Infektion keine Symptome. Häufig tritt aber eine grippeähnliche Erkrankung auf, die innerhalb weniger Tage bis Wochen wieder nachlässt. Während dieser ersten Phase der Infektion kommt es zu einer starken Vermehrung von HIV, was das vorübergehende Absinken der Zahl der CD4-positiven Lymphocyten verursacht. Anschließend sind die CD8-T-Zellen aktiviert und es werden die HIV-spezifischen Antikörper (Serokonversion) gebildet. Durch die Immunantwort gegen HIV wird die Virämie unter Kontrolle gebracht, die Anzahl an Viren (Viruslast) geht zurück und die Zahl der CD4-Zellen im Blut steigt wieder an (Fauci, 1996).

Die akute Phase der Infektion geht bei den meisten HIV-infizierten Patienten in eine Phase der scheinbaren Ruhe über, die auch als asymptomatische Phase bezeichnet wird. Während dieser Phase erfolgt die Virusvermehrung auf einem sehr niedrigen Niveau und die Anzahl der CD4-Zellen im Blut nimmt kontinuierlich ab. Zu diesem Zeitpunkt korreliert die Anzahl der infektiösen Partikel im Blut mit der Progression der Krankheit. Je höher der Virustiter ist, desto schneller entwickelt sich die Krankheit. Diese Phase kann zwei bis 15 Jahre dauern.

Nachdem die Anzahl der CD4-T-Zellen unter 200 pro μ l Blut sinkt, ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, den Organismus vor opportunistischen Infektionen zu schützen. Diese Phase entspricht dem Vollbild AIDS. Eine schematische Übersicht über den Infektionsverlauf zeigt die Abbildung 3.

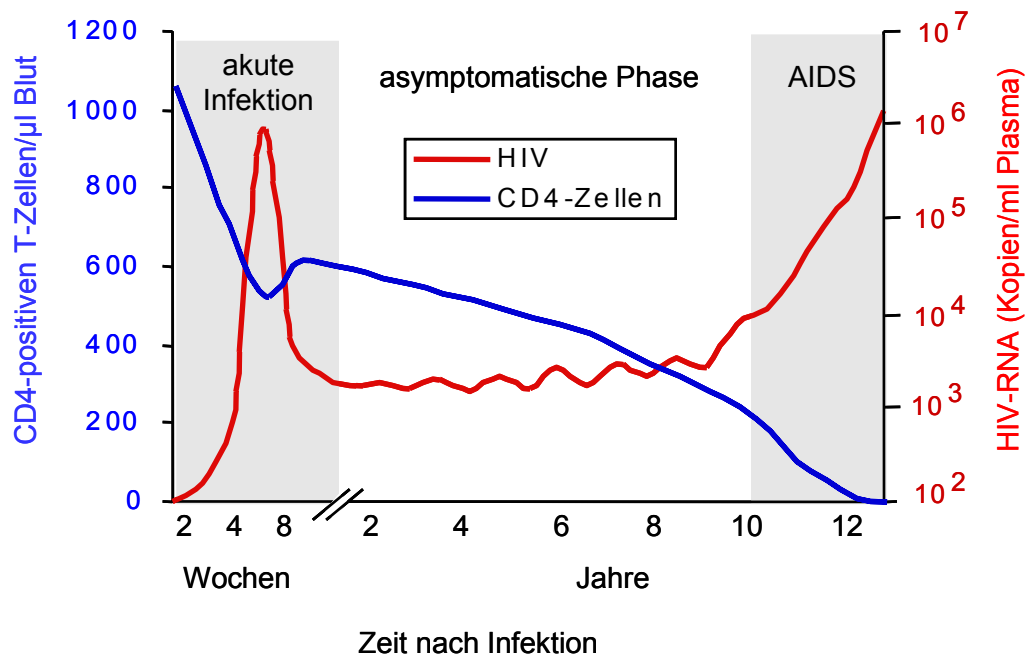


Abb. 3: Der klinische Verlauf der HIV-Infektion (modifiziert nach Pantaleo et al., 1993).

1.1.4 Zelluläre und humorale Immunantwort bei der HIV-Infektion

1.1.4.1 HIV-spezifische CTL-Antwort

Die zytotoxischen T-Zellen (CTL) spielen die wichtigste Rolle bei der Abwehr von Virusinfektionen allgemein. Sie erkennen endogen produzierte Viruspeptide in MHC-Klasse-I-restringierter Weise. Die aktivierten CTL lysieren nicht nur ihre Zielzellen, sie sezernieren darüber hinaus bei Antigenkontakt zahlreiche Zytokine, wie IFN- γ , Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , TNF- β , IL-2, -3, -4 und den Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF). Die CTL produzieren darüber hinaus die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, welche physiologischerweise an einen der HIV-Korezeptoren, das CCR5-Molekül, binden (Lusso, 2002).

Die Ergebnisse zahlreicher Forschungsgruppen haben gezeigt, dass auch in den meisten HIV-Infizierten eine robuste HIV-spezifische CTL-Antwort vorhanden ist, und dass sie eine zentrale Rolle für die Kontrolle der HIV-Infektion spielt (Brander and Walker, 1999; Goulder et al., 1999). Die CTL-Antwort ist nicht nur sehr stark, sie ist auch dauerhaft und kann in den Infizierten über viele Jahre nachgewiesen werden. Obwohl die HIV-spezifische CTL-

Immunantwort mit der Krankheitsprogression korreliert, wurde eine sehr starke CTL-Antwort ebenfalls bei den Personen mit der asymptomatischen chronischen Infektion beobachtet (Harrer et al., 1996; Rinaldo et al., 1995). Erst bei zunehmender Immunschwäche und Progression der AIDS-Erkrankung wird auch die CTL-Antwort schwächer (Klein et al., 1998).

Einige Untersuchungen mit HIV-Infizierten zeigen einen Zusammenhang zwischen CTL-Antwort und Viruslast. Unter anderem wurde bei Studien mit akut infizierten Personen beobachtet, dass sich die CTL-Antwort sehr rasch nach der Infektion entwickelt und bereits vor der Entstehung neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig mit dem Auftreten der CTL-Antwort wurde dabei eine Abnahme der Virusmenge im Blut beobachtet, ein Umstand, der auf einen kausalen Zusammenhang von CTL-Antwort und Virushemmung schließen lässt (Borrow et al., 1994). Der entscheidende Hinweis auf die schützende Funktion der CTL stammt allerdings aus Versuchen mit SIV-infizierten Rhesus-Affen nach der CD8⁺ T-Zell-Depletion. Dabei wurde gezeigt, dass die Virämie ohne die Hilfe CD8-positiver Zellen nicht unter Kontrolle gebracht werden kann (Jin et al., 1999; Schmitz et al., 1999).

Sowohl die Strukturproteine Gag und Env als auch die Enzyme, regulatorische und akzessorische Proteine sind Ziele der antiviralen CTL-Antwort. Die zytotoxische Reaktion in den Infizierten ist am stärksten gegen Gag. Der Anteil Nef- und Pol-spezifischer CTL ist etwas geringer, Env-Epitop-spezifische CTL sind noch seltener und CTL gegen die regulatorischen und akzessorischen Proteine, wie Tat, Vif und Rev sind nur gelegentlich anzutreffen (Lamhamedi-Cherradi et al., 1992). Die Wirkung dieser T-Zellen auf die Krankheitsprogression ist allerdings nicht ohne Bedeutung (Menendez-Arias et al., 1998; van Baalen et al., 1997).

Auch wenn nicht alle Studien als Ergebnis einen Zusammenhang von CTL-Antwort und Viruslast gezeigt haben, so besteht doch im Rahmen der HIV-Forschung Übereinstimmung darin, dass HIV-spezifische CD8⁺ CTL entscheidend dazu beitragen, die Virusvermehrung in HIV-Infizierten zu unterdrücken und so dazu beitragen, im Betroffenen den Krankheitsverlauf wesentlich zu verlangsamen.

1.1.4.2 HIV-spezifische T-Helferzell-Immunantwort

Die Helfer-T-Lymphozyten (HTL) sind für die Ausbildung und Reifung einer B-Zell-Antwort gegen körperfremde Proteine notwendig. Außerdem stimulieren die HTL über die Sekretion von IFN- γ Makrophagen zu antimikrobieller Aktivität und optimierter MHC-Klasse II-Expression und locken durch IL-4-Sekretion Mastzellen, basophile und eosinophile Granulozyten an den Ort des Immungeschehens. Schließlich scheint eine funktionierende HTL-Antwort für die Aufrechterhaltung einer stabilen, funktionierenden zytotoxischen T-Lymphozytenantwort notwendig zu sein.

Obwohl es weniger Informationen über die HIV-spezifische T-Helferzell-Immunantwort gibt, ist es evident, dass CD4⁺ T-Lymphozyten ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der HIV-Replikation spielen. Die Messung der proliferativen Immunantwort hat bei den Infizierten keine oder wenn doch, dann nur eine sehr schwache virusspezifische T-Helferzell-Antwort nachgewiesen und das ohne Berücksichtigung des Krankheitsstadiums (Musey et al., 1999; Rosenberg and Walker, 1998). Diese Immunantwort ist am kräftigsten gegen Gag. HTL gegen Env und Pol wurden nur selten beobachtet (Picker and Maino, 2000; Zhang et al., 2001b).

Es wurde jedoch über eine Ausnahme bei den asymptomatischen chronisch infizierten Patienten (LTNP = long-term nonprogressors) berichtet, die eine starke HIV-spezifische CD4⁺ T-Lymphozytenvermittelte Immunantwort besitzen (Rosenberg et al., 1997). Welchen Anteil diese Tatsache aber an einer nicht progressiven Infektion bei diesen Patienten hat, ist allerdings unklar.

Die Anwendung sensitiverer Methoden, die die Zytokinproduktion (IFN- γ) als Antwort auf eine Stimulation mit virusspezifischen Peptiden gemessen haben, hat gezeigt, dass viele Infizierte über virusspezifische CD4⁺ T-Lymphozyten verfügen. Dabei stellte sich heraus, dass durchschnittlich 0,3 bis 0,4% der CD4⁺ T-Lymphozyten HIV-spezifische HTL sind. Patienten mit fortgeschrittener Infektion hatten weniger HIV-spezifische HTL als Infizierte mit erst beginnender Immunschwäche (McNeil et al., 2001; Picker and Maino, 2000; Zhang et al., 2001b). Die gefundene Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus den Proliferationsstudien und denen mittels intrazellulärer Zytokinfärbung deutet darauf hin, dass in HIV-Infizierten normalerweise die virusspezifischen HTL erhalten bleiben. Meist haben die HTL jedoch gewisse Eigenschaften, wie z. B. die IL-2-Produktion, die sie zur Proliferation in vitro benötigen, verloren (Iyasere et al., 2003).

1.1.4.3 Humorale Immunantwort

Die Antikörper, die gegen HIV-Proteine gerichtet sind, können meistens erst nach zwei bis acht Wochen nachgewiesen werden. Etwa drei bis vier Wochen nach der Infektion sind IgM-Antikörper gegen die Gag- und Env-Proteine vorhanden. Ihnen folgen die IgG-Antikörper gegen die Strukturproteine. Als erste lassen sich die Antikörper gegen p24 und p17 und das Gag-Vorläuferprotein p55 nachweisen. Die Antikörper gegen die Env-Proteine (gp160, gp120, p88 und gp41) treten später und im gleichen Zeitraum wie die Antikörper, die gegen die Pol-Proteine (p31, p51 und p66) gerichtet sind, auf.

Bis jetzt ist die Rolle der Anti-Gag-Antikörper für die Kontrolle der HIV-Infektion umstritten. Langzeitstudien zeigen, dass der Titer der Anti-p24-Antikörper sowohl mit der Krankheitsprogression als auch mit der Abnahme der Anzahl der CD4-Zellen im Blut korreliert (Chargelegue et al., 1995; Morand-Joubert et al., 1995). Die Abnahme des Antikörpertiters während der akuten Phase der Infektion wird nicht der steigenden Viruslast und der dadurch größeren Bindung zu den freien Viruspartikeln zugeschrieben, sondern wird eher durch den Rückgang der T-Helferzellen und der aktiven B-Lymphozyten, die Anti-p24-Antikörper produzieren, verursacht (Hogervorst et al., 1995; Teeuwsen et al., 1991). Diese Studien deuten darauf hin, dass der Titer der Anti-p24-Antikörper vor allem eine prognostische Funktion für die Krankheitsentwicklung hat, wobei ihre Schutzfunktion bislang unklar ist (Mofenson et al., 1999).

Die Antikörper gegen die Env-Proteine werden über ihre Fähigkeit, die Infektiosität des Virus zu blockieren oder zu neutralisieren (neutralisierende Antikörper), definiert (Coffin et al., 1997). Die Env-Glykoproteine gp120 und gp41 sind die einzigen Ziele der neutralisierenden Antikörper. Die neutralisierenden Antikörper blockieren entweder die Bindung des Virus an die Zellrezeptoren oder die Fusion der Virus- und Zellmembran (Parren and Burton, 2001). Nicht ohne Bedeutung sind die Antikörper, die gegen die akzessorischen und regulatorischen Proteine gerichtet sind. Es wurde eine Korrelation zwischen dem Titer der Antikörper gegen die Nef- und Tat-Proteine und der Krankheitsprogression und Viruslast beobachtet (Chen et al., 1999; Re et al., 2001). Der kausale Zusammenhang ist unklar.

1.2 HIV-Impfstoffentwicklung

Weltweit sind über 38 Millionen Menschen mit HIV (human immunodeficiency virus) infiziert (Abb. 4) bei mehr als 11 000 Neuinfektionen pro Tag (UNAIDS, 2006). Über 95 % der Infizierten leben in den Entwicklungsländern, in denen die teuren Medikamente fast unerreichbar sind. Ein Impfstoff gegen HIV, der einerseits vor einer HIV-Infektion schützt oder zumindest die Krankheitsprogression verlangsamt, ist deswegen dringend notwendig.

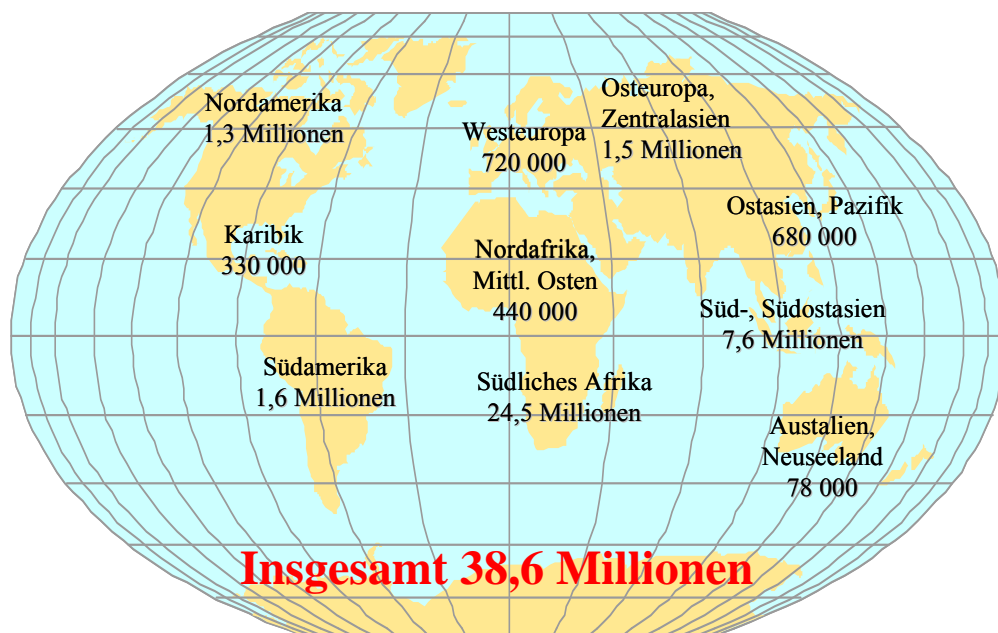


Abb. 4: Die Schätzungen über die HIV/AIDS Epidemie am Ende des Jahres 2005.

1.2.1. Ziele der HIV-Impfung

Die meisten Impfungen gegen andere virale Krankheitserreger induzieren eine T- und/oder B-Zell-Immunantwort, die den Erreger eliminieren, bevor es zum Eintreten der Krankheitssymptome kommt. Die Induktion dieser sogenannten sterilisierenden Immunität war auch das vorherrschende Ziel der HIV-Impfstoffentwicklung. Die bisherigen Experimente haben allerdings noch nicht gezeigt, dass der menschliche Organismus prinzipiell in der Lage ist, bei einer Infektion mit HIV, das Virus zu eliminieren. Es ist fraglich, ob eine vollständige Eliminierung durch das Immunsystem bei einer natürlichen Infektion überhaupt möglich ist (Fauci, 2003).

Wie auch die Ergebnisse mit geimpften Affen gezeigt haben, scheint es realistischer zu sein, einen Impfstoff herzustellen, der in der Lage ist, bei einer Infektion die Virusvermehrung zu begrenzen, den Krankheitsprozess zu verzögern und damit auch das Übertragungsrisiko zu minimieren. Im Vordergrund der Impfbemühungen steht anstelle bisheriger Impfkonzeppte, die einen vollständigen Schutz oder maximal eine zeitlich begrenzte Infektion zum Ziel hatten, die Langzeitkontrolle der Infektion (Hanke, 2001; Peters, 2002).

1.2.2 HIV-Impfstoffkandidaten

Ein Problem der Austestung von Impfstoffen gegen HIV ist, dass, im Gegensatz zu anderen Infektionen, kein immunologisches Korrelat für den Schutz vor der Infektionskrankheit bekannt ist. Weder die Antikörper-Antwort noch das Ausmaß der zellulären Immunantwort bzw. ein anderer Parameter können eine Vorhersage für die sichere Wirksamkeit einer Immunisierung geben. Der Impferfolg wird bis jetzt anhand neutralisierender Antikörper, insbesondere gegen Wildtyp-HIV-Isolate, der Qualität und Quantität der CTL-Antwort, der Fähigkeit zur Induktion von HIV-hemmenden Chemokinen sowie möglicherweise auch der HIV-spezifischen HTL-Reaktion gemessen. Ziel ist eine maximale und lang anhaltende Induktion dieser Immunparameter, die Voraussetzung für einen Schutz oder zumindest für eine Kontrolle der Infektion ist.

Die Wirksamkeit der Immunisierung wird ebenfalls von der Wahl der Impfantigene bestimmt. Die meisten der getesteten Impfstoffe zielen auf die Induktion neutralisierender Antikörper ab und enthalten deshalb HIV-Hüllglykoproteine bzw. ihre Derivate (Burton et al., 2004). Andere Immunisierungsstrategien haben das Ziel sowohl Antikörper zu bilden als auch T-Zell-Immunantworten gegen Gag und Pol bzw. gegen die früh exprimierten regulatorischen Polypeptide Nef, Tat oder Rev zu induzieren (Amara et al., 2002a; Robinson et al., 1999; Wee et al., 2002).

Alle bisher gegen Virusinfektionen zugelassenen Impfstoffe beruhen auf den Prinzipien von Lebend- bzw. Tot- oder Proteinimpfstoffen. Gegen die HIV-Infektion kommen zahlreiche Strategien zur Anwendung, wobei bisher am besten die HIV-Proteinimpfstoffe untersucht worden sind.

1.2.2.1 Proteinvakzine

Proteinvakzine sind synthetisch hergestellte Kopien einzelner viraler Proteine oder aufgereinigte Virusbestandteile. In erster Linie induzieren sie eine humorale Immunantwort und vielfach eine CD4⁺ T-Zellreaktion. Zahlreiche Glykoprotein-Impfstoffkandidaten wurden bisher auf ihre Sicherheit und Immunogenität getestet (Birn et al., 2000; Ratto-Kim et al., 1999; Redfield et al., 1991). Die meisten von ihnen wurden auf der Basis eines HIV-1 Subtyp B-Laborstamms entwickelt (Tsoukas et al., 1998). In allen durchgeführten Phase I- und Phase II-Studien erwiesen sich die Impfkonstrukte als gut verträglich (Klein, 2001). Klinische Studien zeigen, dass HIV-Glykoproteine zuverlässig in der Lage sind, neutralisierende Antikörper zu induzieren. Es hat sich allerdings gezeigt, dass die neutralisierenden Antikörper gegen HIV-Env, die nach der Impfung gebildet wurden, äußerst typspezifisch waren. Das heißt, dass diese Antikörper kaum einen Schutz gegen Infektionen mit anderen HIV-Isolaten oder Wildtyp-HI-Viren boten. Inzwischen werden Proteine, deren Aminosäuresequenz denen von Wildtyp-Viren entsprechen, verwendet. Allerdings waren in bisherigen Untersuchungen auch hierbei die induzierten Antikörper typspezifisch, d. h. sie neutralisierten nur selten Virusvarianten mit Hüllglykoproteinen anderer Virusstämme (Mascola et al., 1996). Ungenügende Induktion kreuzreagierender Antikörper und zellulärer Immunantworten werden für den mangelhaften Schutz in bisherigen Phase-I- und -II-Studien verantwortlich gemacht. Obwohl die Ergebnisse der Phase II-Studien bereits darauf hindeuten, dass durch rekombinante Glykoprotein-Immunsierung allein kein vollständiger Schutz vor HIV-Infektion erzielt werden kann, werden Glykoprotein-Immunogene auch in Impfstudien der Phase-III getestet. Erst die Ergebnisse dieser Projektphase erlauben Aussagen über eine partielle Wirksamkeit der Test-Impfstoffe (Francis et al., 2003). Um die Wirksamkeit rekombinanter Impfstoffe auf der Basis der HIV-Glykoproteine zu erhöhen und damit eine bessere Induktion kreuzreaktiver neutralisierender Antikörper zu erreichen, sollen gleichzeitig Glykoproteine oder Glykoprotein-Abschnitte von weiteren Virusisolaten in die Impfstoffe integriert werden (Pinto et al., 1999; VanCott et al., 1999).

1.2.2.2 HIV-Lebend- und Totimpfstoffe

Sowohl Lebend- als auch Totimpfstoffe werden weltweit erfolgreich für die Immunisierung gegen eine Reihe von Viruserkrankungen erfolgreich eingesetzt. Lebendimpfstoffe, attenuierte, infektiöse Immundefektviren, induzieren die kompletteste und über die längste

Zeit nachweisbare und wirksame Immunität. Die Immunisierung von Rhesusaffen mit einem attenuierten SIVmac haben tatsächlich einen Schutz vor einer Infektion vermitteln können. Spätere Untersuchungen zeigten allerdings, dass dieses rekombinant-attenuierte SIVmac in juvenilen Rhesusaffen eine AIDS-ähnliche Erkrankung induziert (Hofmann-Lehmann et al., 2003; Whitney and Ruprecht, 2004). Deshalb wird der Einsatz von attenuierten HI-Viren bei Menschen als zu riskant angesehen, und derzeit werden mit diesen Impfstoffkandidaten keine klinischen Studien durchgeführt.

Ebenfalls hat der Einsatz eines mit Formalin-inaktivierten Gesamtvirusimpfstoffes von SIV die Induktion einer protektiven Immunantwort in Rhesusaffen hervorgerufen (Lifson et al., 2002; Murphey-Corb et al., 1989). Allerdings konnte bei Versuchen mit inaktivierten HIV-1 in Schimpansen kein Schutz gegen der HIV-Infektion erreicht werden (Gibbs et al., 1991). Der Einsatz der Tot-Impfstoffe ist auch aufgrund einer theoretisch unzureichenden Inaktivierung mit einem gewissen Rest-Infektionsrisiko verbunden. Trotzdem wurde ein chemisch inaktiviertes Virus (Remune), das gleichzeitig kein gp120 enthält, zur Austestung in HIV-Infizierten zugelassen (Moss et al., 1997). Obwohl Remune nur im begrenzten Maße eine neutralisierende Antikörper-Antwort hervorrufen kann, hat die Immunisierungsstudie in Infizierten jedoch eine starke zelluläre Immunantwort und eine Abnahme der Virusmenge im Blut gezeigt (Turner et al., 2001).

1.2.2.3 DNA-Vakzine

Die trans- oder intradermale sowie intramuskuläre Applikation von DNA-Impfstoffen kann eine Immunantwort gegen auf der DNA kodierte Proteine induzieren (Wolff et al., 1990). Die Gene der applizierten DNA werden dann höchstwahrscheinlich in dendritischen Zellen exprimiert und dem Immunsystem präsentiert. Die Immunisierung mit den DNA-Impfstoffen kann eine starke CTL- und HTL-Reaktion induzieren und ebenfalls zur Bildung neutralisierender Antikörper führen (Barouch and Letvin, 2000; Peters, 2002). Bei den Versuchen in Schimpansen führte die Applikation von DNA sogar zu einer protektiven Immunantwort gegen ein apathogenes HIV-Isolat (Boyer et al., 1997). Die Rhesusaffen konnten allerdings nicht oder nur teilweise gegen die Infektion mit pathogenen SIVmac oder SHIV geschützt werden (Barouch et al., 2000; Kim et al., 2001; Shen and Siliciano, 2000). Doch neuere Untersuchungen machen Hoffnung, dass Immunisierungen auf der Basis von DNA-Plasmiden auch im Menschen möglich sind und dort ebenfalls eine bedeutende

Immunreaktion hervorrufen. Bis vor kurzem befanden sich einige DNA-Impfstoffe in klinischen Studie der Phase I und II (McMichael and Hanke, 2003).

Die rekombinanten Plasmide, die bereits in Phase I getestet wurden, enthielten das HIV-1 env-Gen kombiniert mit rev oder anderen regulatorischen Genen sowie die gag und pol-Gene (Gilbert et al., 2003; Kim et al., 2001). Zur Verbesserung der Immunogenität wurden auch Plasmid-Konstrukte mit Kodon-optimierten HIV-Genen eingesetzt. Die Optimierung der Kodons, d. h. die Verwendung „humaner“ Triplets für HIV-Gene führt zu einer deutlich stärkeren Expression des entsprechenden HIV-Gens (Schneider et al., 1997). Die in vivo-Studien haben auch einen deutlichen Effekt auf die induzierte CTL-Antwort gezeigt (Deml et al., 2001; Vinner et al., 1999; zur Megede et al., 2000).

1.2.2.4 Rekombinante Virusvektoren

Im Gegensatz zu rekombinanten Proteinen kann durch eine Immunisierung mit rekombinanten Viren eine CTL-Antwort induziert werden. Rekombinante Viren enthalten ein oder mehrere Gene des HIV. Für HIV-Impfstudien wurden verschiedene Vakziniavirus- und Vogelpockenviruskonstrukte (Amara et al., 2002b; Cao et al., 2003) hergestellt, sowie rekombinante Viren auf der Basis von replikationsinkompetenten Adenoviren (Shiver et al., 2002), Alphaviren (Davis et al., 2000), Rhabdoviren (Rose et al., 2001), Herpesviren (Murphy et al., 2000), Adeno-Assoziierten Viren (Chen et al., 1996) und Pikornaviren (Andino et al., 1994) entwickelt.

Vakziniaviren induzieren erfahrungsgemäß eine gute CTL-Antwort. Aus Sicherheitsgründen wurde allerdings der Einsatz von Vakziniaviren nur auf ein stark attenuiertes modifiziertes Vakziniavirus, den Stamm Ankara (MVA), begrenzt. Kanarienvogelpockenviren und andere aviäre Pockenviren können sich nicht in humanen Zellen vermehren, deshalb sind sie für die Impfstoffentwicklung besonders sicher. Da der Replikationszyklus der Pockenviren im Zytoplasma stattfindet, ist die Expression der HIV-Gene unabhängig von Rev. Zur Evaluierung der Pockenvirusvektoren wurden einige Vakziniavirus-Konstrukte (z. B. MVA, NYVAC) und fünf rekombinante Kanarienvogelpockenviren (ALVAC), die das HIV Glykoprotein-Gen alleine oder in Kombination mit dem vollständigen gag-Gen und Abschnitten der pol- und nef-Gene enthalten, auf optimale Dosis, Sicherheit und Immunogenität getestet (de Bruyn et al., 2004; Hanke and McMichael, 2000; Hel et al., 2002;

Hel et al., 2001). Alle Konstrukte waren gut verträglich und haben eine starke zelluläre und humorale Immunantwort induziert.

Neben den Pockenviren hat auch der Einsatz von Adenoviren (Ad5) zu großen präklinischen Erfolgen geführt. Die Infektion mit diesen führt wie bei den Pockenviren zu einer starken Expression der HIV-Gene. Da die Transkription im Kern abläuft, ist es allerdings notwendig, dass die HIV-Gene kodon-optimiert sind, um eine Rev-Abhängigkeit der Expression zu vermeiden. Problematisch bleibt jedoch die bestehende Immunität gegen Adenoviren und Vacciniaviren. Etwa 45 % der Bevölkerung besitzen neutralisierende Antikörper gegen Ad5. Personen, die bereits gegen Pocken geimpft wurden, reagierten schwächer als Ungeimpfte auf die Immunisierung mit rekombinanten Vacciniaviren (MVA) (Robinson, 2002).

1.2.2.5 Kombinierte Immunisierungen

Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die größten Impferfolge mit den so genannten Prime-Boost-Verfahren erreicht werden können (Amara et al., 2001; Robinson, 2003; Robinson et al., 2000). Zweck des Verfahrens ist es, die Nachteile einer alleinigen Immunisierung mit einer Kombination aus einzelnen Komponenten auszugleichen. Dabei werden Immunogene, die neutralisierende Antikörper induzieren können (zum Beispiel Proteinimpfstoffe), gerne mit Vakzinekandidaten kombiniert, die besonders gut eine zelluläre Immunantwort generieren (z. B. virale Vektorimpfstoffe) (Malkevitch et al., 2003). Eine Prime-Boost-Strategie ist beim Einsatz von viralen Vektoren zwingend erforderlich, da bereits nach der erstmaligen Anwendung der Vektoren das Immunsystem massiv auf das Trägervirus reagiert. Bei einer zweiten Applikation verringert sich die Wirksamkeit rapide, da die Immunantwort die transportierten HIV-Proteine überlagert (Jassey and Wagner, 2002).

Am weitesten fortgeschritten sind die Phase-II-Studien, bei denen neben dem rekombinanten Virus aus der Familie der Pockenviren, ein rekombinantes HIV-Glykoprotein eingesetzt wurde. Dieses Kombinationsverfahren induziert, ähnlich wie die Immunisierung mit rekombinantem HIV-Glykoprotein, eine starke Bildung neutralisierender Antikörper. Allerdings war auch hier nur eine geringe Kreuzreaktivität gegenüber anderen HIV-Isolaten festzustellen. Außerdem wurde eine starke HIV-Protein-spezifische CTL-Antwort erzeugt.

Sehr populär ist inzwischen ein Prime-Boost-Verfahren, bei dem die DNA-Immunisierung mit der Applikation von viralen Vektoren kombiniert wird. Bisher wurden Phase-I und II-Versuche mit der DNA und dem MVA durchgeführt (Mwau et al., 2004). Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass durch die Kombination der beiden Konstrukte eine stärkere

CTL-Antwort erzeugt werden kann als mit nur einem der beiden Impfstoffkandidaten (Amara et al., 2002a; Amara et al., 2001). Aufgrund von Erkenntnissen aus präklinischen Studien wird zunächst mit DNA und anschließend mit MVA immunisiert. In Phase I- oder sogar Phase II-Studien, bei denen DNA und MVA oder DNA und Adenovirus appliziert wurde, wird sowohl die Immunantwort gegen Gag, Pol und Nef als auch gegen mehrere Subtypen von Env induziert (<http://www.hvtn.org>).

Neue Möglichkeiten bei der HIV-Impfstoffentwicklung zeigen Studien, bei denen eine Immunisierung mit MVA und mit dem Hühnerpockenvirus durchgeführt wurde. Diese Kombination von zwei viralen Impfstoffvektoren induziert eine noch stärkere CTL-Immunantwort, als das bei der Anwendung von DNA-Prime/Pockenvirus-Boost Immunisierungen der Fall war (Vazquez-Blomquist et al., 2003).

1.2.2.6 Andere HIV-Impfstoffkandidaten

Neben den oben genannten HIV-Impfstoffkandidaten wurden in letzter Zeit viele andere Impfstoffe in Phase-I-Studien getestet. Dazu gehören insbesondere Pseudovirionen, nichtinfektiöse virusähnliche Partikel, die aus Kapsid, Pol-Proteinen und der Hülle des Virus bestehen, verschiedene Peptid-Impfstoffe, Lipopeptide und attenuierte rekombinante bakterielle Vektoren, insbesondere *Listeria* und *Salmonella*-Konstrukte (McMichael and Hanke, 2003; Peters, 2002). Die Wirkung dieser Impfstoffkandidaten ist besonders auf die zelluläre Immunantwort gegen HIV gerichtet.

Erfolgversprechend ist auch die Kombination der Protein-, DNA- oder Virusimpfstoffe mit neuen Adjuvanzen, die die Immunogenität noch erhöhen sollen. Dazu gehören neben neuen immunaktivierenden Saponinen oder Lipiden auch die Koapplikation von CpG-enthaltenden Oligodeoxynukleotiden oder Zytokinen wie GM-CSF, IL-2 oder IL-12 (Ahlers et al., 2003; Singh and Srivastava, 2003).

Eine vollständige Auflistung der hergestellten und getesteten Impfstoffkandidaten enthält der sogenannte Jordan-Report, der regelmäßig aktualisiert wird (<http://www.niaid.nih.gov>).

1.3 Virale Vektoren und Gentherapie

Die Gentherapie ist eine vielversprechende Methode zur Behandlung vieler infektiöser, genetischer oder neurologischer Erkrankungen bzw. von Tumoren (Kresina, 2001). Dieses

Verfahren umfasst den Transfer der therapeutischen Genprodukte in die Zielzellen des erkrankten Organismus mit dem Ziel einer stabilen Expression. Der Gentransfer kann durch Transfektion, virale und bakterielle Vektoren oder auch transposable Elemente durchgeführt werden.

Virale Vektoren gewinnen immer mehr an Bedeutung für gentherapeutische Zwecke, da Viren in der Lage sind, eukaryotische Zellen zu infizieren. Nach Infektion der Zelle veranlassen sie deren Synthesemaschinerie ihr genetisches Material zu produzieren.

Virale Vektoren	Vorteile	Nachteile
Retroviren (MuLV, Lentiviren)	stabile Integration in die Zielzellen keine Expression viraler Gene Lentiviren infizieren auch teilungsunfähige Zellen	niedrige Titer (10^7 IU/ml) limitierte Insertgröße (max. 8 kB) Integration in unspezifische Stellen des Zellgenoms
Adenoviren (Ad5)	hohe Titer (bis 10^{12} U/ml) Insertgröße bis 36 kB starke und langfristige Genexpression breites Wirtsspektrum	starke Immunantwort transiente Genexpression keine Verpackungszelllinien
Adeno-Assoziierte Viren	spezifische Integrationsstelle infiziert nicht-replizierende Zellen nicht pathogen	limitierte Insertgröße (max. 4 bis 5 kB) braucht für die Replikation ein Helfervirus (AdV oder HSV)
Herpesviren (HSV)	hohe Titer (10^{11} pfu/ml) große Insertkapazität (bis 50 kB) neurotrop in vivo	starke Immunantwort keine Verpackungszelllinie
Pockenviren (Vacciniavirus)	starke Genexpression große Insertkapazität (25 kB) hohe Titer (bis 10^{10} pfu/ml)	sehr starke lokale und systemische Immunantwort transiente Genexpression

Tab. 2: Am häufigsten verwendete virale Vektoren und ihre Vor- und Nachteile (Davidson and Breakefield, 2003; Robbins et al., 1998).

Als experimentelle virale Vektoren werden am häufigsten Retroviren, Adenoviren, Adeno-Assoziierte Viren, Herpesviren und Pockenviren verwendet (Davidson and Breakefield, 2003). Natürlich hat jede dieser Vektorgruppen ihre spezifischen Vor- und Nachteile für die Gentherapie (Tab. 2), so dass die Auswahl, des für den jeweiligen therapeutischen Ansatz geeigneten Systems, von vielen Faktoren, wie der Art und Größe des Transgens, von der Dauer, dem gewünschten Ort der Expression und der Regulation der Expression, abhängt.

1.3.1 Lentivirale Vektoren

Lentivirale Vektoren haben gegenüber anderen viralen Vektoren den Vorteil, dass sie in der Lage sind, ruhende oder sich nur langsam teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Das führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen (Verma and Somia, 1997).

Für verschiedene genetische Studien und gentherapeutische Anwendungen ist weder die Expression viraler Proteine, noch die Herstellung neuer infektiöser Partikel in den Zielzellen erwünscht. Um diese Probleme zu lösen und gleichzeitig die Insertkapazität lentiviraler Vektoren zu vergrößern, wurden replikationsinkompetente Vektorsysteme entwickelt.

Um replikationsinkompetente Vektoren herzustellen, werden die *trans*-aktiven Elemente der Lentiviren, die für regulatorische-, akzessorische- und Strukturproteine kodieren, entfernt, so dass der Vektor selbst keine viralen Proteine produzieren kann. Die Sequenzen lentiviraler Vektoren werden damit auf die *cis*-aktiven Sequenzen reduziert, die für die Verpackung, die reverse Transkription und Integration essentiell sind (Kim et al., 1998b; Parolin et al., 1994). Diese Minimalsequenzen beschränken sich auf den Promotor, das Verpackungssignal (Ψ), die für die reverse Transkription notwendigen Sequenzen - die R-Region, die Primer-Bindungsstelle (PBS), den Polypurintrakt (PPT) und den zentralen Polypurintrakt (cPPT), die Erkennungssequenzen der Integrase in den U3- und U5-Regionen und das für die mRNA-Bildung wichtige Polyadenylierungssignal (Miller, 1997). Wenn für den Export des nicht- oder einfach-gespleißten mRNA-Moleküls in das Zytoplasma das rev-RRE System von HIV verwendet wird, muss der Vektor zusätzlich die RRE-Sequenzen enthalten (Malim et al., 1989). Die Sequenz am Anfang des gag-Genes ist für die Verpackung der viralen RNA wichtig. Ihre Deletion kann die effiziente Vektorproduktion beeinflussen (Cui et al., 1999) (Abb. 5).

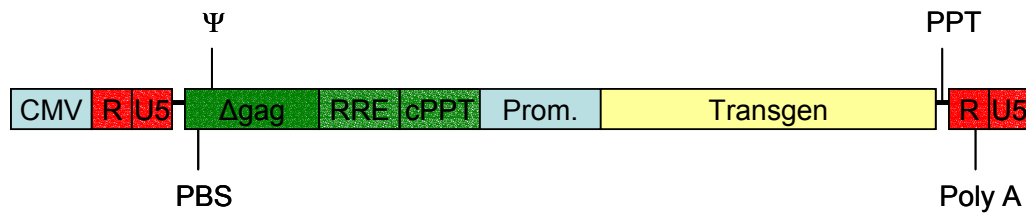


Abb. 5: Aufbau eines replikationsinkompetenten lentiviralen Vektors der dritten Generation (PBS - Primer-Bindungsstelle, ψ - Verpackungssignal, cPPT - zentraler Polypurintrakt, RRE - rev responsive element, PPT – Polypurintrakt, PolyA - Polyadenylierungssignal).

Anstelle der deletierten Sequenzen wird eine Expressionskassette eingesetzt, die das zu übertragende Transgen enthält. Dieses Gen wird von einem fremden, internen Promotor exprimiert.

Die Produkte der gag-, pol- und env-Gene, die für die Partikelbildung benötigt werden, können in *trans* von anderen Konstrukten oder einer Verpackungszelllinie bereitgestellt werden. Deshalb wird dieses Verfahren als *trans*-Komplementation bezeichnet (Buchschacher and Wong-Staal, 2000). Mit Hilfe dieser Proteine wird das Vektorkonstrukt in Partikel verpackt, die das gewünschte Fremdgen auf die Zielzellen übertragen. Replikationsinkompetente Vektoren sind in der Lage, die Zielzellen zu infizieren, können aber keine neuen Infektionszyklen einleiten, da in den Zielzellen keine viralen Proteine mehr exprimiert werden.

Die mRNAs der HIV-Strukturgene enthalten inhibierende Sequenzen, welche für die große Instabilität der Transkripte verantwortlich sind. Deshalb ist die Expression des Rev-Proteins notwendig, da es die RNA-Transkripte stabilisiert. Aus diesem Grund ist der Transport der mRNA-Moleküle in das Zytoplasma Rev-Protein-abhängig und damit sehr uneffizient. Um die Effizienz zu erhöhen, kann die Sequenz modifiziert werden, so dass die inhibierenden Sequenzen entfernt werden, ohne die Proteinstruktur zu beeinflussen (Schneider et al., 1997; zur Megede et al., 2000). Alternativ kann das ursprüngliche rev-RRE-System durch andere heterologe Transportelemente, wie zum Beispiel durch das CTE (constitutive transport element) des Mason-Pfizer-Affen-Virus (Kim et al., 1998b) oder das PRE (posttranscriptional regulatory element) des Woodchuck Hepatitis B-Virus (Zufferey et al., 1998), ersetzt werden. Es ist bekannt, dass die Nukleokapside verschiedener Viren in der Lage sind, Hüllproteine anderer Viren und sogar Hüllproteine von Viren aus fremden Virusfamilien in ihre Viruspartikel einzubauen (Zavada, 1972). Diese, als Pseudotypisierung bezeichnete Phänomen, wird auch bei der Herstellung viraler Vektorsysteme verwendet. Lentivirale Vektoren werden meistens mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV)

pseudotypisiert (Bartz and Vodicka, 1997; Burns et al., 1993). Das Glykoprotein des VSV ist gegenüber den HIV-Hüllproteinen sehr stabil. Da es einen Phosphattransporter als Rezeptor benutzt, ist das Virus in der Lage, die Zellen verschiedener Spezies zu infizieren (Barrette et al., 2000; Liu et al., 1996; Shiraishi et al., 1999).

Der für die Replikation notwendige virale Transaktivator (*tat*) kann aus dem Verpackungskonstrukt deletiert werden, wenn der ursprüngliche U3-Promotor durch einen konstitutiv aktiven Promotor ersetzt wird. Bei der Herstellung Tat-unabhängiger Expressionskonstrukte wird überwiegend der Promotor des Zytomegalievirus (CMV) verwendet (Dull et al., 1998).

Die Tatsache, dass die Vektoren weitgehende Gemeinsamkeiten mit den Ursprungsviren haben, lässt sie auch für andere Anwendungen geeignet erscheinen. So wäre es möglich, die von HIV abgeleiteten Vektoren dort einzusetzen, wo bisher mit pathogenem HIV gearbeitet wurde.

1.3.2 Pockenviren und pockenvirale Vektoren

Zu der Familie der *Poxviridae* gehören die größten bekannten Viren, die sowohl bei Säugetieren als auch bei Vögeln und Insekten Infektionen auslösen. Die bekanntesten Pockenviren sind Variola und Vacciniavirus, die zu den *Orthopoxvirus* gehören. Variola verursachte beim Menschen die Pockenerkrankung (Variola vera). Dieser Virus wurde 1979 von der WHO als ausgerottet erklärt, nachdem das Vacciniavirus als Impfstoff eingesetzt worden war (WHO, 1980).

1.3.2.1 Aufbau der Pockenviren

Die intrazelluläre Form der Pockenviren enthält das Kapsid, das von einer Lipidmembran umhüllt ist. Extrazelluläre Viruspartikel besitzen eine weitere, äußere Hüllmembran, wobei beide Formen des Virus infektiös sind.

Im Inneren des Kapsids befinden sich eine große Anzahl enzymatisch und regulatorisch aktiver Proteine, die für die Transkription und Replikation des Genoms notwendig sind. Aus diesem Grund werden die zellulären Enzyme im Nukleus der infizierten Zelle nicht benötigt, und der Replikationszyklus findet im Zytoplasma der infizierten Zellen statt (Moss, 1990;

Moss et al., 1991). Zwischen dem Kapsid und der Membranhülle befinden sich zwei Lateralkörper, deren Funktion unklar ist (Abb. 6).

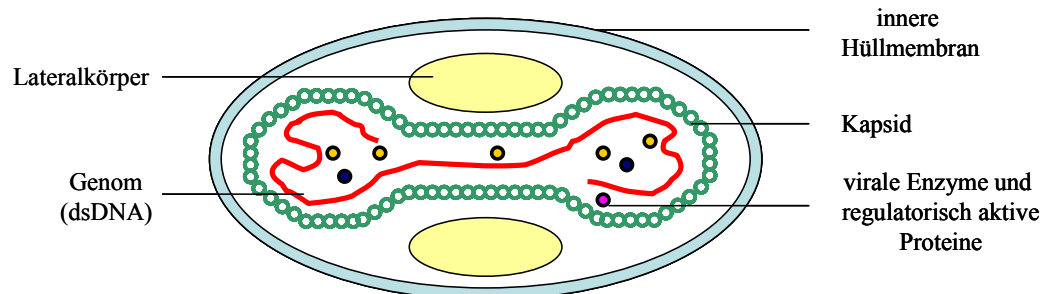


Abb. 6: Schematische Darstellung der intrazellulären Form von Pockenviren (Modrow and Falke, 1997).

Das Genom von Pockenviren besteht aus linearer, doppelsträngiger DNA mit einer Länge von 130 kB bis zu 300 kB. Das Genom des Vacciniavirus umfaßt etwa 190 kB (Stamm „Copenhagen“). Die DNA ist an beiden Enden kovalent geschlossen. Das virale Genom enthält an beiden Enden identische invertierte terminale Wiederholungen (ITR = “inverted terminal repeat“), die beim Vacciniavirus 12 kB lang sind. Das Genom des Vacciniavirus kodiert für etwa 200 Gene. Da die Gene im Zytoplasma nicht gespleißt werden können, besitzen diese auch keine Intronsequenzen (Goebel et al., 1990).

1.3.2.2 Replikationszyklus der Pockenviren

Das Vacciniavirus kann viele verschiedene Zelltypen infizieren, manche andere Pockenviren oder Orthopoxviren dagegen besitzen ein sehr enges Wirtsspektrum. Nach Eintritt und Freisetzung der Viren in das Zytoplasma der infizierten Zelle beginnt die Transkription der frühen viralen Gene, wobei die daran beteiligten Enzyme als Bestandteile des Virus in die Zellen eingebracht werden. Die Gene, die in der frühen Phase der Infektion exprimiert werden, besitzen ähnliche Promotorsequenzen. Die Sequenzabfolge der ersten 15 Nukleotide, die auch „critical region“ genannt wird, hat eine entscheidende Wirkung auf die Stärke der Expression. 11 Nukleotide der sogenannten „Spacer“ Sequenz trennen dann diese Sequenz von den letzten sieben Nukleotiden am 3'-Ende, wo sich die eigentliche Initiationsstelle für die mRNA-Synthese befindet. Das Transkriptionseende der frühen Gene ist durch die

Konsensussequenz TTTTNT festgelegt, die ungefähr fünfzig Nukleotide vor dem Terminationspunkt lokalisiert ist (Davison and Moss, 1989a). Die frühen mRNA-Moleküle werden am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert und am 3'-Ende polyadenyliert. Die frühen viralen Genprodukte bereiten die Replikation der viralen DNA vor, die bereits circa sechs Stunden nach der Infektion abgeschlossen ist. Die DNA-Replikation führt zur Ausbildung von Konkatalamern, die in einzelne Genome prozessiert werden müssen.

Nach der DNA-Replikation werden die späten Transkriptionsprodukte synthetisiert. Die Promotorsequenzen der späten Gene beginnen mit einem A/T-reichen Bereich, der circa 20 Nukleotide lang ist. Die Initiationsstelle ist stark konserviert und wird von der Nukleotidfolge TAAAT gebildet. Zwischen diesen zwei Sequenzen befindet sich ein sechs Nukleotid langer „Spacer“ (Davison and Moss, 1989b). Die Konsensussequenz, die als Terminationssignal der frühen Transkripte fungiert, ist später nicht mehr aktiv und wird damit überlesen. Das 3'-Ende der späten mRNA wird durch eine viruscodierte Endonuclease hergestellt und anschließend polyadenyliert. Die späten Gene kodieren überwiegend Strukturproteine, aber auch einige Enzyme, wie z. B. zwei Proteinkinasen und eine Protease, die nach der Infektion für die Freisetzung des DNA-Genoms benötigt werden. Die verschiedenen viralen Strukturbestandteile werden im Zytoplasma in reife Viruspartikel zusammengefügt. Im weiteren Reifungsverlauf, bei dem die Partikel von den Membranhüllen ummantelt werden, werden die Pockenviren mit den Golgi-Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und in die Umgebung entlassen.

1.3.2.3 Pockenvirale Vektoren

Das Vacciniavirus wurde erfolgreich für die Impfung gegen das menschliche Variolapockenvirus eingesetzt. Heute setzt man Vacciniaviren überwiegend als Vektoren zur Expression von Fremdgenen in eukaryotischen Zellen ein. Das genetisch modifizierte, von Vaccinia (Stamm „Copenhagen“) abgeleitete NYVAC und das attenuierte MVA-Vaccinia sowie Pockenviren anderer Spezies, wie z. B. das Pockenvirus der Kanarienvögel, werden heute wieder für die Entwicklung von Impfstoffen gegen bestimmte infektiöse Erreger angewandt (Moss, 1996; Sutter and Moss, 1992; Sutter and Staib, 2003). Diese Viren sind sicherer als das ursprüngliche Vacciniavirus, dessen Einsatz in manchen Fällen zu schweren Impfreaktionen führt.

Mittlerweile wurden mehrere Techniken entwickelt, um ein oder mehrere Fremdgene ins Vaccinia-Genom einzubringen. Im ersten Schritt muss die Sequenz der klonierten

Expressionskassette überprüft werden, ob sie nicht die Consensussequenz TTTTNT der Vaccinia-Gene enthält. Falls diese Sequenz innerhalb des Transgens vorhanden ist, muss sie mit Hilfe der PCR-Mutagenese entfernt werden, da sie die Länge des erwünschten Transkripts beeinflussen würde (Earl et al., 1990).

Eine konventionelle Methode zur Herstellung rekombinanter Pockenviren ist die homologe Rekombination, bei der die Expressionskassette, die den pockenviralen Promotor enthält, von den Sequenzen aus dem Vaccinia-Genom flankiert wird. Für die Rekombination werden dann die Sequenzen in den Genen ausgewählt, die für die Virusreplikation nicht absolut essentiell sind (z. B. Thymidinkinasegen). Zudem können rekombinante Viren, die kein Thymidinkinasegen besitzen, leichter identifiziert werden, was die spätere Selektion und Aufreinigung erst ermöglicht (Mackett et al., 1984). Außerdem können zur vereinfachten Detektion des rekombinanten Virus die Reportergene β -Galaktosidase oder β -Glukuronidase verwendet werden (Carroll and Moss, 1995; Chakrabarti et al., 1985).

Obwohl die Genome der Pockenviren sehr groß sind, ist die In-vitro-Ligation mit Fremdgenen durchführbar und wird deshalb häufig für die Herstellung rekombinanter Viren angewendet. Die Ligation erfolgt nach dem Verdau der Vaccinia-DNA mit den Restriktionsenzymen NotI oder SmaI, deren Schnittstellen in der gesamten DNA-Sequenz nur einmal vorkommen. Für die Verpackung und Generierung des Vacciniavirus aus der DNA („rescue“) ist nach der Transfektion der Zellen die Koinfektion mit dem Helfervirus notwendig. Als Helfervirus kann entweder ein temperatursensitives Vacciniavirus oder der Hühnerpockenvirus dienen (Scheiflinger et al., 1992). Bei diesem Verfahren können in das Vaccinia-Genom bis zu 25 kB zusätzliche DNA-Sequenzen inseriert werden (Merchlinsky and Moss, 1992).

1.3.2.4 Hybridvektoren

Hybridvektoren werden verwendet, wenn man die Vorteile zweier oder mehrerer viraler Vektorsysteme kombinieren will. Somit kann man effizientere und sicherere Gentransfersysteme erhalten, die zielgewebsspezifisch infizieren und/oder bei denen die Transgenexpression zielgewebsspezifisch reguliert wird (Lam and Breakefield, 2000).

Pockenviren können mit hohem Titer hergestellt werden (bis 10^{10} pfu/ml) und zeichnen sich aufgrund ihrer Kapazität große Inserts (über 25 kB) aufzunehmen, aus. Außerdem werden alle Enzyme, die für die Replikation notwendig sind, als Bestandteile des Virus in die infizierte Zelle transportiert. Das ermöglicht eine vom Zellkern unabhängig stattfindende Transkription.

Diese Eigenschaft wurde schon für die Produktion von einigen RNA-Viren genutzt (Casais et al., 2001; Thiel et al., 2001).

Retrovirale Vektoren haben die einzigartige Fähigkeit der stabilen Integration in das Wirtsgenom, was zu einer langfristigen Expression des Transgens führt. Aus diesem Grund werden diese Vektoren oft in der Gentherapie verwendet. Limitierende Faktoren dieser Technologie sind relativ niedrige Herstellungstiter und die Instabilität der Vektorpartikel. Außerdem wurde festgestellt, dass retrovirale Vektoren in vivo vom Komplement-System inaktiviert werden können, wenn diese mit Hilfe eine Verpackungszelllinie hergestellt worden sind, die sich genetisch vom Therapieempfänger (allogenetisch) unterscheiden (DePolo et al., 2000; Pensiero et al., 1996).

Um diese Probleme zu lösen, wurden mehrere virale Vektoren konstruiert, die Bestandteile retroviraler Vektoren exprimieren und deren Transduktion zur Herstellung kompletter retroviraler Partikel führt. Es wurden bereits chimere Adenovirus-Retrovirus- (MuLV und Foamy Virus) (Feng et al., 1997; Picard-Maureau et al., 2004) und Vacciniavirus-Retrovirus (MuLV)-Systeme (Konetschny et al., 2002; Konetschny et al., 2003) beschrieben. Die Vacciniavirus-Retrovirus-Hybridvektoren exprimieren gleichzeitig gag-pol-Gene, das env-Gen und das Genom des retroviralen Vektors. Die kompletten retroviralen Partikel werden dann freigesetzt, bevor ein zytopathischer Effekt (CPE), der durch eine Vacciniavirus-Infektion induziert wird, auftritt (Konetschny et al., 2003).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit soll ein Impfkonstrukt für das Humane Immundefektvirus (HIV) auf der Basis eines replikationsinkompetenten HIV-Vektors entwickelt und erprobt werden. Dafür wurde ein HIV-Vektor, der das humanisierte gag-Gen von HIV-1 enthält und exprimiert, hergestellt. Die Transgenexpression wurde sowohl *in vitro* in Zelllinien und in primären Zellen als auch *in vivo* in Balb/c-Mäusen getestet. Dabei wurde insbesondere der Einfluss der Transgenexpression *in vivo* auf die Transgen-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort untersucht.

Im Rahmen der hierzu durchgeführten Arbeiten wurden außerdem Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren hergestellt und analysiert. Die Hybridvektoren vereinen die Vorteile von rekombinanten Vacciniaviren, die sehr stabil und in hohen Titern herstellbar sind, mit den Vorteilen lentiviraler Vektoren, die stabil integrieren.

2 Materialien

2.1 Geräte

Brutschrank, CO ₂ -begast	Heraeus
Bakterienkulturschüttler	Certomat, Braun
Dispenser	Socorex
Douncer	Schott
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton & Dickinson
Elektrophoresekammern	Hauswerkstatt
Feinwaage	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Gefrier- und Kühlschränke	Bosch
Gelgießsystem für PAGE	Pharmacia
Graphitblotkammern	Hauswerkstatt
Harvester	Skatron Instruments
Hybridisierungsofen	MWG-Biotech
Inkubatoren	Heraeus
Kapillarsequenzierer ABI Prism 3100	PE Applied Biosystems
Laborwaage	Vibra
Luminometer Microlummat LB96P	EG&G Berthold
Magnetrührer	GLW
Mikroskop	Leitz
Mikrowellenherd	Sharp
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
pH-Meter	Schott
Pipettierhilfe Pipetboy Plus	Technorama
Pipetten	Eppendorf, Gilson, Socorex
Plattenphotometer	Behring
Spektralphotometer GeneQuant	Pharmacia
Sterilbank	Nuaire
Thermocycler PTC-200	MJ Research
UV-Crosslinker Stratalinker	Stratagene
UV-Handlampe	Bachhofer

Vortexer	GLW
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (5417C)	Eppendorf
Zellkulturzentrifuge (Rotana RPC)	Hettich
Großzentrifuge (RC5C)	Sorvall (Rotor Sorvall SS-34 und G3)
Ultrazentrifuge (Combi Plus)	Sorvall (Rotor Sorvall TH 641, Beckman SW 28, Sorvall AH 629)

2.2 Verbrauchsmaterialien

BD Microtainer SST	Becton & Dickinson
Blotting Papier	Whatman
Einmalpipetten	Falcon, Greiner
ELISA-Mikrotiterplatten (Maxisorp)	Nunc
ELISpot-Mikrotiterplatten MultiScreen-IP	Millipore
FACS-Röhrchen	Multimed
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene
Miniaturreaktionsgefäße	Eppendorf, Sarsted
Nylon Blotmembran Hybond XL	Amersham Pharmacia
Quarzküvetten	Hellma
Pipettenspitzen	Eppendorf, Gilson, Roth
PVDF Blotmembran	NEN
Röntgenfilme	Fujifilm
Silikonpaste	Bayer
Sterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Millipore
Tuberkulinspritzen (1 ml)	Becton & Dickinson
Ultrazentrifugenröhrchen Ultra-Clear	Beckman
Zellkulturflaschen	Cellstar, Falcon, Greiner
Zellkulturplatten	Becton & Dickinson, Falcon, Greiner
Zellschaber	Falcon
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon, Greiner

2.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)	Roth
Adenosin-5'-triphosphosäure (ATP)-Dinatriumsalz	AppliChem
Agarose	BioWhittaker Molekular Applications
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Borsäure	Merck
Butanol	AppliChem
Buttersäure Natriumsalz	Merck
Calciumchlorid	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
EDTA	AppliChem
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Formaldehyd (37 %ige wässrige Lösung)	AppliChem
Glycerin	Roth
Glycin	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Mercapthoethanol	Fluka
α -Methyl-D-Mannopyranosid	Roth
MOPS	Roth
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Phenol	Roth
2-Propanol	AppliChem
Saponin	Calbiochem
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Tween-20	AppliChem
Tris	AppliChem
Tris HCl	AppliChem
Trypanblau	Sigma

2.4 Reagenzien

2.4.1 Reagenzien für die Zellkultur

Ficoll (Lymphoprep)	Nycomed Pharma
Fötale Kälberserum (FKS)	Linearis
L-Glutamin	Fluka
HEPES	Roth
RPMI-1640 (ohne Glutamin)	Invitrogen
MEM	hergestellt in der Mediumküche des Instituts

Substanzen zur Zellstimulation

	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Concanavalin A	1 mg/ml	2,5 µg/ml	Sigma
Interleukin-2 (IL-2)	50000 U/ml	100 U/ml	EuroCetus
PHA-2	1 mg/ml	2 µg/ml	Sigma

2.4.2 Peptide und Proteine

	Anwendung	Endkonzentration	Bezugsquelle
AMQMLKETI	ELISpot (gag)	10 µg/ml	Affina, Berlin
HYLSTQSAL	ELISpot (egfp)	10 µg/ml	IZKF Leipzig
Kp55	ELISA	2,5 µg/ml	GlaxoSmithKline

2.4.3 Radiochemikalien

[α - ³² P] dCTP (10 mCi/ml)	Amersham Pharmacia
--	--------------------

2.4.4 Enzyme

CIAP (calf intestine alkaline phosphatase)	MBI Fermentas
Klenow Polymerase	MBI Fermentas
Pfu Polymerase	Promega
Proteinase K	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, NEB
Ribonuklease A	AppliChem
T4 DNA Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA Polymerase	MBI Fermentas
Taq Polymerase	MBI Fermentas

2.4.5 Größen-/Längenstandards

Nukleinsäurenlängenstandards

GeneRuler 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas

Proteingrößenstandards

Multicolored Protein Marker (6,5 -205 kD)	NEN
---	-----

2.4.6 Antibiotika und Substanzen zum Expressionsnachweis

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamycin	30 mg/ml	30 µg/ml
Beetle Luciferin	25 mM	250 µM
IPTG	100 mM	
X-Gal	20 mg/ml	

2.4.7 Kits

ABI Prism Big Dye Kit (3.1)	Sequenzierung	ABI Applied Biosystems
AP Conjugate Substrate Kit	ELISpot Entwicklung	Bio-Rad
ELISA Substrate Reagent	ELISA Entwicklung	Pharmingen
ELISpot Assay for Mouse IFN- γ	ELISpot Assay	Mabtech
Lipofectin	Transfektion	Invitrogen
Megaprime DNA Labelling System	Sondenmarkierung	Amersham
Original TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Gel-Extraktion	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Plasmidpreparation	QIAGEN
QIAprep Spin Miniprep Kit	Plasmidpreparation	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	PCR-Fragment Aufreinigung	QIAGEN
Renaissance	Immunoblot Entwicklung	NEN

2.4.8 Plasmide

pBK-CMV	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Kanamycinresistenz (Stratagene)
pCI	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Intron, Ampicillinresistenz (Promega)
pCR 2.1	TA-Klonierung-Vektor mit Ampicillin- und Kanamycinresistenz (Invitrogen)
pczVSV-G	VSV-Glykoprotein-Expressionsplasmid auf Basis von pcDNA3.1+/Zeo (Pietschmann et al., 1999)
pGJ2egfp	HIV-1 lentiviraler Vektor mit EGFP-Expressionskassette (Jarmy et al., 2001)
pGJ3efgp	HIV-1 lentiviraler Vektor mit EGFP-Expressionskassette (Jarmy et al., 2001)
pGJ3lacZ	HIV-1 lentiviraler Vektor mit lacZ-Expressionskassette (Jarmy et al., 2001)
pSFgp	Expressionsvektor mit SFFV-Promotor und Ampicillinresistenz (M. Heinkelein)

2.4.9 Oligonukleotide

Alle Primer außer dem immunstimulatorischen Oligonukleotid ODN1668 wurden von Invitrogen in einem Synthese-Maßstab von 50 mmol und der Standardaufreinigung hergestellt, in H₂O zu einer Konzentration von 1 nmol/µl oder 100 pmol/µl gelöst und jeweils als 10 pmol/µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

Das immunstimulatorische Oligonukleotid ODN1668 wurde in einem Synthese-Maßstab von 50 mmol und der HPSF-Aufreinigung von der Firma MWG Biotech hergestellt. Um eine höhere Stabilität der Oligonukleotidkette zu erreichen, wurden die Phosphatgruppen durch Phosphothioatgruppen (PTO) ersetzt. Das immunstimulatorische Oligonukleotid wurde in H₂O in einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst und bei -20 °C gelagert.

ODN1668 5'-tccatgacgttcctgatgct-3'
vep 5'-cactactcgagcggccgaaaaattgaaaaactatttagtgaaccgggtctctctgg-3'
apa5 5'-tcttcctttccacattccaacagcc-3'
apa3 5'-ccgcgggcccgggatccaccggtcgc-3'
term1 5'-cttgagtgettcaatgtgtgcccgtctg-3'
term2 5'-gggcacacaaaaattgaagcactcaaggcaagc-3'
gag5 5'-gtcctcctactcctgacatgctgtcatc-3'
gag3 5'-ctatagtgcagaacatccaggggcaaatg-3'
vCopNot5 5'-caattatgtatcaatatagcaacagtagttc-3'
vCopNot3 5'-gcattaatctattttatccgactattaac-3'

2.4.10 Antikörper

	Ziel	Bezugsquelle
183-H12-5C (Maus)	HIV-p24	selbst produziert aus Hybridom
902 (Maus)	HIV-gp120	selbst produziert aus Hybridom
Ziege-anti-Maus IgG-FITC	sek. Antikörper	DAKO
Kaninchen-anti-Maus IgG-HRP	sek. Antikörper	DAKO
Kaninchen-anti-Maus IgG-PE	sek. Antikörper	DAKO

2.4.11 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 α	Institut für Virologie, Würzburg (Transformation von Ligationsreaktionen)
<i>E. coli</i> JM109	Institut für Virologie, Würzburg (Maxipräparation von Plasmiden)

2.4.12 Zelllinien

010-035i-B-LCL	humane B Lymphoblasten, EBV-transformiert (B. Walker)
143B tk-	humane Osteoblasten mit Thymidinkinase-Gendefekt (ATCC# CRL-8303)
183-H12-5	Hybridom, anti-HIV-1-p24-mAb (NIH# 1513)
HEK293	humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC# CRL-1573)
HEK293T	293 Zelllinie, die großes T-Antigen von SV-40 exprimiert (DuBridge et al., 1987)
902	Hybridom, anti-HIV-1-gp120-mAb (NIH# 522)
A3.01	humane CD4+ -T-Lymphoblasten (NIH# 166)
BCRT	Fibroblasten von <i>Sigmodon fulviventer</i> (S. Niewiesk)
CCRT	Fibroblasten von <i>Sigmodon hispidus</i> (S. Niewiesk)
CV-1	Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (ATCC# CCL-70)
HeLa	humane Zervixepithelzelllinie (ATCC# CCL-2)
Jurkat E6-1	humane CD4+ -T-Lymphoblasten (ATCC# TIB-152)
L-929	Maus- Fibroblasten (ATCC# CCL-1)
NIH 3T3	Maus-Fibroblastenzelllinie (ATCC# CRL-1658)
P815	Maus-Mastocytomzelllinie (ATCC# TIB-64)
U373 CXCR4	humane Glioblasten, die CD4 und CXCR4 exprimieren (NIH# 3596)
Vero	Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (ATCC# CCL-81)

ATCC: American Type Culture Collection, Maryland, USA

NIH: NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Maryland, USA

2.4.13 Mäuse

Für alle Experimente wurden Balb/c Mäuse (Weibchen) verwendet. Für die Optimierung der Methoden und für die Vorversuche wurden diese von eigener Zucht genommen. Für die Infektionsversuche wurden dann Mäuse von Fa. Harlan UK Ltd. im Alter von 6 - 8 Wochen bezogen.

2.4.14 Viren

Vacc (Cph)	Vacciniavirus, Stamm Copenhagen	NIH
vAbT141 (Cph)	Vacciniavirus mit HIV-p55	hergestellt mit Plasmid pAbT141 von Therion Biologics, Boston
vPE16 (Cph)	Vacciniavirus (Cph) mit HIV-gp160	hergestellt mit Plasmid pPE16 von B. Moss, NIH
vEGFP	Vacciniavirus (Cph) mit EGFP-Gen	Inst. für Virologie, Würzburg

2.5 Puffer und Lösungen

2.5.1 Bakterienkultur

5-fach konzentriertes LB-Medium

Trypton	50 g
Hefeextrakt	25 g
NaCl	50 g
Glukose	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Autoklavieren.

LB-Agar

Trypton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Glukose	1 g
Agar	10 g
H ₂ O	ad 500 ml

Nach dem Autoklavieren wird das jeweilige Antibiotikum bei einer Temperatur von ca. 60 °C zugegeben.

2.5.2 Zellkultur

MEM (Minimal Essential Medium) (komplett)

MEM	500 ml
FKS	55 ml (10 %)
L-Glutamin	500 µg/ml
Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml

FKS

Tiefgefrorenes FKS wurde bei 37 °C aufgetaut und anschließend zur Inaktivierung des Komplements für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert.

RPMI-1640 (komplett)

RPMI-1640	500 ml
FKS	55 ml (10 %)
HEPES	10 mM; pH 7,4
L-Glutamin	500 µg/ml
Penicillin	100 µg/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Für die Kultivierung von PBMC enthielt das Medium zusätzlich IL-2 (100 U/ml).

ATV

NaCl	8,0 g
KCl	0,4 g
D-Glucose	1,0 g
NaHCO ₃	0,58 g
Trypsin	0,5 g
EDTA (Versene)	0,2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Trypanblaulösung

Trypanblau	0,1 % (v/v)
Ethanol	20 % (v/v)
PBS	

2.5.3 Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

MaxiPrep-Lösung I

Glucose	50 nM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
H ₂ O	

MaxiPrep-Lösung II

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)
H ₂ O	

3 M Natriumazetat pH 5,2

Natriumazetat	3 M
H ₂ O	

Der pH-Wert der Lösung wurde mit konz. Essigsäure eingestellt und anschließend autoklaviert.

2,5-fach konzentriertes Sequenzierungspuffer

Tris-HCl (pH 9,0)	200 mM
MgCl ₂	5 mM
H ₂ O	

2-fach konzentriertes Proteinasepuffer

Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
EDTA (pH 8,0)	10 mM
SDS	0,4 % (w/v)
NaCl	400 mM
H ₂ O	

50-fach konzentrierte TAE (Tris-acetat-EDTA)

Tris	2 M
EDTA (pH 8,0)	50 mM
Konz. Essigsäure	5,71 % (v/v)
H ₂ O	

10-fach konzentrierte TBE (Tris-borat-EDTA)

Tris	0,89 M
0,5 M EDTA (pH 8,0)	20 mM
Borsäure	0,89 M
H ₂ O	

20-fach konzentrierte SSC

NaCl	3 M
Natriumcitrat	0,3 M
H ₂ O	

50-fach konzentriertes Denhardtspuffer

Ficoll 400	1 % (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	1 % (w/v)
BSA (Fraktion V)	1 % (w/v)

H₂O

Lagerung bei -20 °C

Hybridisierungspuffer

SSC	5-fache Konzentration
Denhardtspuffer	5-fache Konzentration
SDS	1 % (w/v)
denaturierte DNA aus Lachssperma	100 µg/ml

Lagerung bei -20 °C

Transformationspuffer I

Kaliumacetat	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Der pH-Wert der Lösung wurde mit 10 % Essigsäure auf 5,8 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm steril filtriert.

Transformationspuffer II

3-Morpholinopropansulfonsäure	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	100 mM
Glycerin	15 % (v/v)

Der pH-Wert des Puffers wurde mit 1 M KOH auf 6,5 eingestellt und anschließend mit einem Filter der Porengröße 0,22 µm steril filtriert.

2.5.4 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

Bradford-Reagenz

Coomassie G250	0,01 % (w/v)
o-Phosphorsäure	15 % (v/v)
H ₂ O	

Lagerung bei 4 °C.

RIPA-Puffer

Tris-HCl (pH 7,4)	20 mM
NaCl	300 mM
Natrium-Deoxycholat	1 %
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %
H ₂ O	

Lagerung bei 4 °C.

2-fach konzentriertes PPP (Proteinprobenpuffer)

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
Bromphenolblau	0,01 %
Glycerol	20 %
SDS	4 %
β-Mercaptoethanol	10 %
H ₂ O	

Lagerung bei 4 °C.

Gelpuffer

Tris-HCl (pH 8,45)	3 M
SDS	0,3 % (w/v)
H ₂ O	

Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 % (w/v)
H ₂ O	

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,3 eingestellt.

Blotpuffer

Tris	50 mM
Glycin	40 mM
SDS	0,037 % (w/v)
Methanol	20 %
H ₂ O	

PBS Tween

Tween 20	0,5 %
PBS	

2.5.5 Puffer und Lösungen für die DNA-Transfektion

2-fach konzentrierte HBS

HEPES	50 mM
KCl	10 mM
Dextrose	12 mM
NaCl	280 mM
Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
H ₂ O	

Es wurden 3 Aliquots mit pH-Wert 7,00; 7,05; 7,10 hergestellt um die Transfektionseffizienz zu testen. Die Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm), aliquotiert und bei - 20 °C gelagert.

2,5 M CaCl₂

CaCl₂ 2,5 M

H₂O

Die Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm), aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

500 mM Natriumbutyrat

Natriumbutyrat 500 mM

PBS

Die Lösung wird sterilfiltriert (0,22 µm) und bei 4 °C gelagert.

2.5.6 Puffer und Lösungen für Durchflußzytometrie

FACS-Puffer

BSA 0,1 % (w/v)

Natriumazid 0,02 % (w/v)

PBS

Formaldehydlösung

Formaldehyd 2 % o.4 % (v/v)

PBS

Saponinlösung

BSA 0,1 % (w/v)

Natriumazid 0,02 % (w/v)

Saponin 0,5 % (w/v)

PBS

2.4.7 Puffer und Lösungen für ELISA und ELISpot

Beschichtungspuffer (ELISA)

Na₂CO₃ 200 mM

H₂O

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,6 eingestellt.

Beschichtungspuffer (ELISpot)

Na₂CO₃ 15 mM

NaHCO₃ 30 mM

Natriumazid 0,02 % (w/v)

H₂O

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,5 eingestellt.

Peptidlösung

Peptid 2 mg/ml

DMSO 10 % (v/v)

DTT 1 % (w/v)

H₂O

DTT ist zu der Peptidlösung fakultativ zugegeben um die Bildung von Cystinbrücken zu verhindern. Die Lösung wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Substrat für ELISpot (BioRad)

Reagenz A 150 µl

Reagenz B 150 µl

Entwicklungspuffer 600 µl

H₂O 14,4 ml

2.4.8 Puffer und Lösungen zum Nachweis der Luciferase-Aktivität

1 M Tris/1 M MES

Tris	1 M
MES	1 M
H ₂ O	

Der pH-Wert wird auf 7,8 eingestellt.

Lyse-Puffer

Tris/MES	100 µM
DTT	1 µM
Triton X-100	0,2 %
H ₂ O	

Assay Puffer

Tris/MES	125 µM
Magnesiumazetat	25 µM
ATP-Lösung	5 µM
H ₂ O	

100 mM ATP-Lösung

ATP-Dinatriumsalz	0,55 g
H ₂ O	10 ml

Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

25 mM Luciferin

Luciferin	10 mg
5 mM K ₂ H/KH ₂ PO ₄ -Puffer	1,25 ml

Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

5 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-Puffer

1M K ₂ HPO ₄	0,94 ml
1M KH ₂ PO ₄	0,06 ml
H ₂ O	199 ml

Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt.

2.4.9 Standardlösungen und Puffer

0,5 M EDTA

EDTA	0,5 M
H ₂ O	

EDTA löst sich erst nachdem der pH-Wert auf 8,0 eingestellt ist. Der pH-Wert wird durch Zugabe von ca. 20 g NaOH eingestellt.

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
KH ₂ PO ₄	1,4 mM
CaCl ₂	1,5 mM
MgCl ₂	1 mM
H ₂ O	

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

Für die folgenden Abschnitte gilt grundsätzlich, dass alle für die Zellkultur verwendeten Medien oder Lösungen auf 37 °C vorgewärmt wurden. Ausnahmen werden im Text hervorgehoben. Die Zentrifugation der Zellen erfolgte in einer Hettich – Kühlzentrifuge (5 min, 1000 rpm (ca. 230 g) bei Raumtemperatur, ohne Anlauf, mit Bremse auf Stufe 9). Von diesem Protokoll abweichende Verfahren werden in den jeweiligen Textabschnitten gesondert beschrieben.

3.1.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in RPMI-1640 in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂ in der Atmosphäre) bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden in der Regel zweimal wöchentlich passagiert, so dass die Zelldichte den Wert von 2×10^6 Zellen/ml nicht überschritt.

3.1.2 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Adhärenente Zellen wurden in MEM in einem CO₂-Inkubator (5 % CO₂) bei 37 °C gehalten. Die Zellen wurden in der Regel zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde zuerst das alte Medium abgesaugt und Reste von FKS durch schnelles Waschen mit ATV entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von ATV abgelöst. Nach Ablösung der Zellen wurden diese in MEM aufgenommen, resuspendiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:5 bis 1:20 verdünnt.

3.1.3 Kultivierung von PBMC

Nach der Isolierung wurden die PBMC für 24 h mit 2 µg/ml PHA in RPMI-1640 bei einer Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml stimuliert. Drei Tage später wurde das Medium abgesaugt

und durch frisches Medium ersetzt, das zusätzlich IL-2 (100 U/ml) enthielt. Gegebenenfalls wurden die Zellen nach 2-3 Wochen restimuliert.

3.1.4 Kultivierung von Maus-Milzzellen

Nach der Isolierung wurden die Milzzellen mit 2,5 µg/ml Concanavalin A (ConA) in RPMI 1640 bei einer Zelldichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml stimuliert. Die Zellen wurden 48 – 96 Stunden kultiviert. Während dieser Zeit wurden alle Tests durchgeführt. Die Restimulation ist bei Milzzellen nach diesem Verfahren nicht möglich.

3.1.5 Isolierung von PBMC durch Ficoll-Gradient

Humane PBMC wurden aus dem Blut (ca. 60 ml) von gesunden Spendern isoliert. Dazu wurde heparinisiertes Blut im Verhältnis 1:1 mit serumfreiem, raumtemperiertem RPMI-1640 verdünnt und in zwei Portionen auf 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Das verdünnte Blut wurde anschließend vorsichtig mit ca. 10 ml raumtemperiertem Ficoll (Lymphoprep) unterschichtet und 30 min bei 1500 rpm (Raumtemperatur, Anlauf 120 s, ohne Bremse) zentrifugiert.

Nach der Ficoll-Hypaque-Zentrifugation entsteht folgende Verteilung: Aufgrund der höheren Dichte sammeln sich Erythrozyten, polymorphkernige Leukozyten (PMNC: basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten) in dem Zentrifugationsrückstand (Blutkuchen). Die weniger dichten mononukleären Zellen (PBMC) wie Lymphozyten (B- und T-Lymphozyten), NK-Zellen und Monozyten sammeln sich oberhalb der Ficollschicht und können abgesaugt werden. Danach wurden diese in RPMI-1640 resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 1500 rpm, RT, ohne Anlauf, mit Bremse auf Stufe 9). Es ist wichtig, dass hierbei das mitabgesaugte Ficoll ausreichend verdünnt wird (ca. 10 ml Ficoll/PBMC-Suspension auf 30 ml RPMI). Das entstandene Zell-Pellet wurde anschließend mit RPMI-1640 gewaschen.

3.1.6 Zelldichtebestimmung

Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Dafür wurden die Zellen gut resuspendiert (adhärente Zellen wurden zuvor mit ATV abgelöst) und eine kleine Probe davon (ca. 50 µl) in einem geeigneten Verhältnis mit Trypanblaulösung verdünnt (in der Regel eine Verdünnung um den Faktor 10). Da nur tote Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Zelldichte, sowie der Vitalität der Kultur.

Das Deckglas wurde unter leichtem Druck an die Zählkammer angepresst. Durch Pipettieren der Zellsuspension an den Rand zwischen Deckglas und Objektträger wurde die Suspension durch die auftretenden Kapillarkräfte in die Zählkammer hineingesaugt. Unter dem Lichtmikroskop wurden dann die in den Großquadraten der Zählkammer liegenden Zellen gezählt.

Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt genau 0,1 mm und jedes der Großquadrate hat eine Fläche von 1 mm x 1 mm. Über jedem der Quadrate bildet sich daher ein Volumen von 0,1 mm x 1 mm x 1 mm = 0,1 mm³ oder 0,1 µl. Anhand der pro Großquadrat Q bestimmten Zellzahl N lässt sich daher die Zellzahl pro Milliliter verdünnter Zellsuspension ermitteln. Durch Einbeziehung des Verdünnungsfaktors V bei der Trypanblaufärbung ergibt sich daraus die Zelldichte D (Zellen/ml) in dem Kulturgefäß.

Man erhält also:

$$D = \frac{N}{Q} \cdot V \cdot 10^4 \text{ Zellen/ml.}$$

3.1.7 Kryokonservierung

Zum Einfrieren wurden die Zellen 5 min bei 1000 rpm in einer Zellkulturzentrifuge pelletiert. Die einzufrierenden Zellen wurden in eisgekühltem Einfriermedium (50 % RPMI; 40 % FKS; 10 % DMSO) aufgenommen und Aliquots von 1-2 ml in Kryostatgefäße überführt. Die Zellen wurden über Nacht in einer Zelleinfrierbox auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die eingefrorenen Zellen im Wasserbad kurz angetaut und sofort zweimal mit Medium gewaschen. Die gewaschenen Zellen wurden in neues Medium aufgenommen und ausgesät.

Da das in dem Einfriermedium enthaltene DMSO zytotoxisch ist, sollten die Zellen immer so schnell wie möglich bearbeitet werden. Dies gilt sowohl für den Einfriervorgang, wie auch für das Auftauen.

3.1.8 Gewinnung von Antikörpern aus Hybridomzelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene Antikörper aus Zellkulturüberständen von Hybridomzelllinien gewonnen. Dazu wurden die jeweiligen Hybridome aufgetaut und in Kultur genommen (RPMI mit 10 % FKS), wie in Abschnitt 3.1.7 beschrieben. Die Zellen wurden mit den Maus-Milzzellen kokultiviert. Bei jeder Passagierung wurde das entfernte Medium zentrifugiert (Hettich, 1500 rpm, 10 min) und der Überstand gesammelt und filtriert. Anschließend wurden die Überstände aliquotiert und tiefgefroren.

3.1.9 Kalziumphosphat-Transfektion

Bei der Transfektion werden fremde Nukleinsäuren (z.B. Plasmid-DNA) von eukaryotischen Zellen aufgenommen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurde die von Soneoka beschriebene Kalziumphosphatmethode (Soneoka et al., 1995) verwendet. Dabei handelt es sich um eine transiente Transfektionsmethode, weil die in die eukaryotischen Zellen eingebrachten fremden Nukleinsäuren im Laufe der Zellteilungen verloren gehen.

Diese Transfektionsmethode ist sehr effizient, vor allem für 293T-Zellen. Andere Zelllinien lassen sich nach diesem Verfahren oft schlecht oder gar nicht transfizieren, da das Transfektionsmedium für sie toxisch ist. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme bei dieser Methode ist nicht bekannt, man geht jedoch davon aus, dass die DNA an Kalziumphosphatkristalle gebunden und durch Endocytose in die Zelle aufgenommen wird. Für die Transfektion wurden 293T-Zellen verwendet, die stabil das große SV40 T-Antigen exprimieren (DuBridge et al., 1987). Das große T-Antigen bindet an den SV40-Replikationsursprung (ori). Dies führt zu einer stärkeren Expression der auf diesen Plasmiden kodierten Proteine. Zugabe von Natriumbutyrat bewirkt eine Stimulation des CMV-Promotors, unter dessen Kontrolle die einzelnen transfizierten Gene exprimiert werden (Soneoka et al., 1995).

$1,8 \times 10^6$ 293T-Zellen wurden am Tag vor der Transfektion in 6 cm-Petrischalen ausgesät. Am nächsten Morgen wurde das Kulturmedium abgesaugt und 4 ml vorgewärmtes Medium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde der folgende Transfektionsmix hergestellt:

je 6 μg Plasmid-DNA
50 μl 2,5 M CaCl_2
ad 500 μl steriles H_2O
500 μl 2x HBS

Der Transfektionsmix wurde 20 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise auf Zielzellen aufgetragen. Die Zellen wurden 7-8 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2) inkubiert. Um die Transfektion zu stoppen und den optimalen pH-Wert der Zellen zu sichern, wurde danach das Transfektionsmedium gegen 4 ml neues MEM-Medium ausgetauscht und die Zellen weiter über Nacht inkubiert. Durch die Zugabe von Natriumbutyrat in einer Endkonzentration von 10 mM erfolgte die Induktion der Expression. Nach 8 Stunden wurde das Medium mit Natriumbutyrat gegen 3 ml frisches Medium gewechselt. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht inkubiert und dann für die anschließenden Experimente verarbeitet.

Die Transfektion wurde auch in 10 cm-Petrischalen durchgeführt. Die Mengen der Reagenzien wurden auf die Größe der Wachstumsfläche umgerechnet, wobei je 16,5 μl Plasmid-DNA eingesetzt wurde.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Methoden zur Arbeit mit lentiviralen Vektoren

3.2.1.1 Herstellung infektiöser Lentivirus-Überstände

In 293T-Zellen wurden lentivirale Partikel hergestellt, die nur einen Infektionszyklus durchlaufen können. Dazu wurden 293T-Zellen mittels Kalziumphosphat-Transfektion mit Plasmiden kotransfiziert, die unter Kontrolle eines CMV-Promotors transient die zur Partikelbildung notwendigen Proteine exprimieren. Dabei handelte es sich um ein Vektor- und Verpackungskonstrukt (Gag-Pol), das zusätzlich über ein Markergen verfügt und welches

eine verpackbare RNA mit selbstinaktivierenden LTRs exprimiert. Das zweite Plasmid trägt das Gen für die Expression des Envs.

Die Viruspartikel, die aus den 293T-Zellen freigesetzt wurden, wurden filtriert (Millipore Filter, Porengröße 0,45 µm) um grobe Zelltrümmer abzutrennen und für die Transduktion von Zielzellen oder für die Immunisierung verwendet.

3.2.1.2 Titerbestimmung der Lentivirus-Überstände

Die Titerbestimmung von hergestellten Virussuspensionen erfolgte durch mathematische Verfahren oder durch die FACS-Analyse.

Bei den Vektoren, welche nach der Infektion EGFP exprimieren, wurde der Titer nach der Methode nach Reed und Muench bestimmt. Dieses Verfahren liefert den Virustiter, der notwendig ist, um 50% der Zellkulturen zu infizieren. Deshalb wird dieser Wert auch als TCID₅₀ (tissue culture infection dose) angegeben.

Die Methode beruht auf der Annahme, dass der sogenannte ID₅₀ Wert (ID: infectious dose) sich durch Interpolation zwischen zwei Werten, einmal oberhalb von 50% und einmal unterhalb von 50%, errechnen lässt. Dies ist möglich unter der Annahme, dass sich der 50% Endpunkt linear in Abhängigkeit der logarithmisch abgestuften Virusverdünnung ändert.

Es wurden A3.01 bzw. 293-Zellen in eine 96-Loch-Flachbodenplatte in einem Zellzahl von 2x10⁴/Napf ausgesät. Die Überstände mit EGFP-Viruspartikeln wurden logarithmisch verdünnt (um den Faktor 10) und jede Verdünnung wurde zu den Zellen in einer Spalte der Vertiefungen zugegeben. So wurde die Zahl der positiven Ereignisse beim Auszählen auf acht bezogen. Die EGFP-Expression wurde anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet, wobei als positives Ergebnis der Nachweis mindestens einer leuchtenden Zelle pro Napf galt. Der prozentuale Anteil der positiven Nöpfe pro Verdünnung wurde errechnet. Es wurde bis zu der Verdünnung gezählt, bei der der Anteil der positiven Nöpfe unter 50% (d.h. <4 positive Nöpfe) gesunken war.

Oft fällt der gesuchte Wert zwischen zwei Verdünnungen. Die sogenannte „proportionale Distanz (PD)“ zwischen den Werten oberhalb und unterhalb von 50% errechnet sich wie folgt:

$$PD = \frac{(\text{Anteil der positiven Nöpfe in \%}) - 50}{(\text{Anteil von positiven Nöpfen in \%}) - (\text{Anteil der negativen Nöpfe unter 50\%})}$$

Beispiel:

Verdünnung	Positive Näpfe	Negative Näpfe	Anteil Positive (%)
10^{-1}	8	0	100
10^{-2}	8	0	100
10^{-3}	8	0	100
10^{-4}	7	1	87,5
10^{-5}	3	5	37,5

Daraus folgt nach oben genannter Formel:

$$PD = \frac{87,5 - 50}{87,5 - 37,5} = \frac{27,5}{50} = 0,55$$

Aus der proportionalen Distanz wurde dann die TCID₅₀ bestimmt:

$$TCID_{50} = -\log(\text{der Verdünnung über } 50\% \text{ positiven Näpfe} + PD)$$

für 100 µl ergibt sich: $-\log 10^{-4,55} = 3,55 \times 10^4$ d.h. in 1 ml Überstand sind $3,55 \times 10^5$ TCID₅₀.

Bei den lentiviralen Vektoren, welche statt dem Markergen hgag enthalten, wurde der Titer nach der FACS-Analyse bestimmt. Der Virusüberstand wurde um den Faktor 2 verdünnt und zu den Zielzellen zugegeben. Nach 72 Stunden wurden die Zellen gefärbt und mit dem FACS-Gerät analysiert. Parallel wurden auch die Zellen analysiert, welche mit gleicher Verdünnung des EGFP-Virus (lentivirale Vektoren mit EGFP als Markergen) infiziert wurden. Da bei EGFP-Viren der Titer nach der Reed und Muench-Methode bestimmt wurde, konnte man den Titer der hgag-Viren nach direktem Vergleich der hgag- und EGFP-Expression berechnen.

3.2.1.3 Konzentrierung viraler Partikel

Um einen höheren Titer für die Immunisierung zu erreichen, müssen die hergestellten viralen Partikel konzentriert werden. Die virushaltigen Überstände wurden nach der Transfektion geerntet, filtriert (0,45 µm) und in die Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman, Ultra-Clear 25x89 mm) überführt und in einem AH 629 Rotor für 90 min bei 4 °C und 25000 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgekippt. Das Sediment wurde kurz getrocknet, in 1 ml PBS resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde die Titerbestimmung durchgeführt (s. 3.2.1.2).

3.2.2 Methoden zur Arbeit mit Vacciniavirus

3.2.2.1 Anzucht von Vacciniaviren

Zur Anzucht von Vacciniaviren wurden 143B-tk⁻ oder CV-1-Zellen in Kultur genommen und in 600 ml-Flaschen bis zum Erreichen eines 70%-ig geschlossenen Zellrasens in MEM (10% FKS) kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml Vacciniavirus-haltigem Medium überschichtet. Die Menge an Vacciniavirus wurde dabei so gewählt, dass das Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln und Zellen 0,05 beträgt (MOI = 0,05 pfu/Zelle). Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und danach die Menge an Medium mit 30 ml MEM ergänzt. Eine erfolgreiche Virusanzucht lässt sich nach 1-2 Tagen an dem ausgeprägten zytopathischen Effekt erkennen, der zu einem bienenwabenartigen Muster im Zellrasen führt. Unter dem Lichtmikroskop sieht man, dass sich die infizierten Zellen abrunden und sich schließlich von der Kulturflasche ablösen, wodurch die charakteristische Struktur im Zellrasen entsteht.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgelöst und in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und sedimentiert. Die gesammelten Zellen wurden in 2,5 ml 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 9,0) resuspendiert und bei -20 °C durchgefroren und wieder aufgetaut. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt, anschließend wurde die Zellsuspension durch Reiben in einem Glasdouncer (mindestens 30 Stöße) homogenisiert. Durch milde Zentrifugation (Hettich, 3000 rpm, 2 min) wurden die großen Zelltrümmer entfernt. Der noch trübe Überstand wurde in kleinen Portionen (ca. 200 µl/Aliquot) eingefroren.

Da infektiöses Vacciniavirus überwiegend zellassoziiert und nicht frei in Lösung vorkommt, ist der Großteil der produzierten Infektiösität in den Zellen und nicht im Kulturüberstand vorhanden. Es ist daher darauf zu achten, dass es bei dem letzten Zentrifugationsschritt in der Virusaufreinigung nicht zu einer vollständigen Klärung des Überstandes kommt, da die zur Trübung führenden Zellmembranen einen Großteil der Infektiösität tragen. Andererseits ist es aber wichtig, die größeren Zelltrümmer zu beseitigen, da diese in der Folge wiederholten Einfrierens und Auftauens einen unlöslichen, schleimigen Klumpen bilden, der eine genaue Dosierung der Infektiösität für folgende Experimente unmöglich macht. Große Zelltrümmer müssen daher verworfen werden, obwohl sie infektiöse Partikel tragen. Um den Anteil an großen Zelltrümmern in der Präparation zu minimieren, ist das sorgfältige Homogenisieren mit dem Glasdouncer unerlässlich. Bei einer derartigen Präparation ist es möglich, Virustiter

von bis zu 10^{10} pfu/ml zu erreichen. Geringere Virustiter sind Zeichen einer suboptimalen Präparation.

3.2.2.2 Titerbestimmung von Vacciniaviren

Der bei der Infektion von 143B-Zellen auftretende charakteristische zytopathische Effekt lässt sich für die Bestimmung des Virustiters nutzen. Dazu wurden 143B-tk⁻-Zellen in eine 6-Loch-Platte ausgesät und bis zum Erreichen eines 70 %-ig geschlossenen Zellrasens kultiviert. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit je 1 ml Medium überschichtet, in dem verschiedene Verdünnungen der zu testenden Viruspräparation enthalten waren, vorzugsweise Verdünnungen von 10^{-5} bis 10^{-10} . Nach Inkubation bei 37 °C für 2 Stunden wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml frisches Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurde der Kulturüberstand abgesaugt und die Zellen mit je 500 µl Färbelösung (0,2 % Kristallviolett; 20 % Ethanol) pro Vertiefung überschichtet und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Färbelösung entfernt und die Platte getrocknet. Der Virustiter konnte nun durch Auszählen der Plaques in den einzelnen Vertiefungen ermittelt werden.

Bei der Bestimmung des Virustiters ist darauf zu achten, dass die Vertiefung auszuzählen ist, in welcher sich ca. 10 – 50 Plaques befinden.

3.2.2.3 Infektion von Suspensionszellen mit Vacciniavirus

Die Suspensionszellen wurden in einem Röhrchen zentrifugiert und das Medium bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl entfernt. In diesem Restvolumen wurden die Zellen resuspendiert und mit Vacciniavirus versetzt (MOI = 1). Nach 2 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde so viel weiteres Medium hinzugefügt, bis die Zellsuspension eine Dichte von $1-5 \times 10^6$ Zellen/ml hatte. Die Zellen wurden mit $1-5 \times 10^6$ Zellen/Vertiefung auf eine 24-Lochplatte verteilt und für 17 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Infektionsrate wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie (s. 3.7) bestimmt und lag typischerweise bei 70-90 %.

Die Infektion von adhärennten Zellen verläuft so, wie es bei 143B-Zellen in 3.2.2.1 beschrieben wurde.

3.2.2.4 Vacciniavirusreinigung in Saccharosegradient

Um DNA von Vacciniavirus isolieren zu können, muss zuerst der Vaccinia-haltigen Überstand aufgereinigt werden.

Wie in 3.2.2.1 beschrieben wurde, sind die CV-1-Zellen in 600 ml-Kulturflaschen mit ca. dem MOI = 1 infiziert worden. Um eine ausreichende Menge an Virus für die DNA-Präparation zu bekommen, empfiehlt es sich, die Viruspräparation aus mindestens 10 Kulturflaschen anzusetzen. Die Zellen wurden für 2-3 Tage bei 37 °C inkubiert, bis man den ausgeprägten zytopathischen Effekt erkennen konnte.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgelöst, in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt und bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die gesammelten Zellen 10 min bei 1500 rpm (4 °C) zentrifugiert und das Pellet wurde dann in 10 ml 10 mM Tris-HCl/ 1 mM EDTA-Lösung (pH 9,0) resuspendiert und dreimal auf dem Trockeneis durchgefroren und wieder aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension für 2 min unter der UV-Lampe bestrahlt und durch Reiben in einem Glasdouncer (mindestens 40 Stöße) homogenisiert. Durch kurze Zentrifugation (Hettich, 3000 rpm, 2 min, 4 °C) wurden die großen Zelltrümmer entfernt.

Der virushaltige Überstand wurde in 50 ml Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) auf ein Saccharosekissen (16 ml 30 % Saccharose w/v in 1 mM Tris; pH 9,0) pipettiert. Durch Ultrazentrifugation mit dem Ausschwingrotor vom Typ SW 28 (14 000 rpm, 4 °C, 80 min) wurden die Viruspartikel sedimentiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation vorsichtig abgekippt und das Pellet wurde in 2 ml 10 mM Tris/1 mM EDTA gelöst. Um die Viruspartikel von den Zellresten besser zu trennen, wurde 0,2 ml Trypsin (0,25 %) zu der Virussuspension zugegeben und 45 min bei 37 °C inkubiert

Anschließend wurde das Virusmaterial durch Dichtezentrifugation in einem Saccharosegradienten aufgereinigt. Der Gradient (jeweils 2 ml 24 %, 28 %, 32 %, 36 %, 40 % Sucrose w/v in 1 mM Tris; pH 9,0) wurde ca. 16 Stunden vor der Verwendung vorbereitet und bei 4 °C gelagert. Danach wurde mit Viruslösung überschichtet und 45 min ultrazentrifugiert (12 000 rpm, 4 °C), so dass sich auf der 32 %igen Saccharose sowie auf der 36 %igen Saccharose eine sichtbare Proteinbande ausbildete. Die obere Bande wurde abgenommen und in einem 15 ml UZ-Röhrchen gesammelt. Wenn nach der Ultrazentrifugation ein Pellet entstand, wurde es in 2 ml 10 mM Tris pH 9,0/ 1 mM EDTA gelöst, mit 0,2 ml Trypsin (0,25 %) 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend erneut über einen Saccharosegradienten ultrazentrifugiert.

Die nach der Ultrazentrifugation gesammelten Banden wurden mit 10 mM Tris pH 9,0/ 1 mM EDTA im Verhältnis höher als 1:1 verdünnt und durch eine erneute Ultrazentrifugation (14 000 rpm, 4 °C, 60 min) im Pellet konzentriert. Das Pellet wurde in 10 mM Tris pH 9,0/ 1 mM EDTA, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.2.2.5 Präparation von Vacciniavirus-DNA

Zu 200 µl konzentriertem Vacciniavirus (siehe 3.2.2.4) wurden 100 µl H₂O, 300 µl 2x Proteinasepuffer und 6 µl Proteinase K (10 mg/ml) pipettiert. Die nächsten Schritte müssen mit abgeschnittenen Spitzen pipettiert werden, um die Vacciniavirus-DNA beim Pipettieren nicht zu zerstören. Nach einer Inkubation für 2 Stunden bei 65 °C wurde die Lösung mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 v/v/v) versetzt, gut durchgemischt und anschließend 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde sorgfältig in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und in gleicher Weise noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die obere, wässrige Phase wurde am Ende in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 2,5 Volumen Ethanol gemischt. Die präzipitierte DNA wurde nach der Zentrifugation (14000 rpm, 10 min, 4 °C) mit 70 % Ethanol gewaschen, kurz bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 200 µl H₂O aufgenommen.

Das gleiche Protokoll kann man für die Präparation von Vaccinia-DNA aus Vacciniavirus-infizierten Zellen verwenden.

3.2.2.6 Vacciniavirus-Rescue

Als Vacciniavirus-Rescue bezeichnet man die Wiederherstellung des Vacciniavirus aus der Vaccinia-DNA mit Hilfe des Hühnerpockenvirus.

Am Vortag wurden CV-1 Zellen in 3 verschiedenen Zellzahlen in eine 6-Loch-Platte ausgesät. In dem Napf, in dem die Zellen am nächsten Tag einen 80 %-ig geschlossenen Zellrasen erreicht haben, wurde die Infektion mit Geflügelpockenvirus (MOI = 1) durchgeführt. Das Geflügelpockenvirus diente als Helfervirus für die Verpackung und Generierung des Vacciniavirus aus der DNA. Eine Stunde nach der Infektion wurden die infizierten Zellen mit Vacciniavirus-DNA, welches das Insert trägt, transfiziert.

Da das Genom von Vacciniavirus ca. 200 kB groß ist, wurde die Transfektion mit Hilfe von Lipofektin (Invitrogen) durchgeführt. Zuerst wurde 12 µl Lipofektin mit 100 µl Opti-MEM gemischt und für 45 min bei RT inkubiert. Das zweite Gemisch enthielt 10 µl DNA (nach der Ligation) und 100 µl Opti-MEM und wurde zu dem ersten Gemisch zugegeben. Dieser Transfektionmix wurde für 15 min bei RT inkubiert.

Vor der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,8 ml Opti-MEM überschichtet. Dazu wurde der Transfektionmix pipettiert. Nach 2 bis 3 Stunden wurden die transfizierten Zellen abgelöst und zusammen mit frischen CV-1-Zellen (ca. $1-2 \times 10^4$ /Napf) in eine 96-Loch-Platte gegeben. Nach 4 bis 10 Tagen wurden die Überstände aus den Näpfen, in welchen die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, abgenommen, und zu den in der 6-Loch-Platte ausgesäten CV-1-Zellen gegeben. Die rekombinanten Vacciniaviren wurden dann weiter mit PCR und Southern Blot analysiert.

3.3 Analyse und Klonierung von DNA

Die Präparation der Plasmid-DNA, sowohl Mini- als auch Maxi-Präparation, und die Gelextraktion der DNA-Fragmenten wurden mit Hilfe von Kits (Qiagen) durchgeführt. Da ich mich an das Standardprotokoll gehalten habe, verweise ich hier auf die den Kits beigelegten Methodenprotokolle.

3.3.1 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Präparation der Plasmid-DNA wurde außer Qiagen-MaxiPrep-Kit die Standardmethode der alkalische Lyse appliziert. So gewonnene DNA wurde so wohl für die Transfektion als auch für manche DNA-Immunisierung verwendet. Für die größere Reinheit der DNA wurde später diese Methode durch die Präparation mit Qiagen-Kit ersetzt.

150 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit einem Klon beimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Durch eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 6000 rpm im Sorvall GS3-Rotor wurden die Bakterien sedimentiert. Der Pellet wurde anschließend in 5 ml MaxiPrep-Lösung 1 resuspendiert und mit 50 µl RNase A (10 µg/ml) für 5 min auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 5 ml MaxiPrep-Lösung 2 wurden die

Bakterien für 5 min unter alkalischen Bedingungen lysiert. Das Lysat wurde mit 10 ml 3 M-Natriumazetat-Lösung neutralisiert. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer und die chromosomale DNA abzentrifugiert (30 Minuten bei 14000 rpm in dem Sorvall SS34 Rotor) und der Überstand wurde durch Gaze in ein neues Gefäß filtriert. Durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und über eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 4000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 1 ml H₂O aufgenommen. Um die RNA-Kontamination zu eliminieren, wurde die DNA-Lösung mit 5 µl RNase A (10 µg/ml) für 60 min bei 37 °C inkubiert. Die Proteinkontamination wurde durch die Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt (s. 3.3.9). Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Ethanol präzipitiert und 10 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 200 µl H₂O aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt und auf 1 µg/µl eingestellt.

3.3.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden in einem Agarosegel, an dem eine elektrische Spannung anliegt, der Größe nach aufgetrennt. Der Auftrennungsbereich von Agarosegelen ist von der Agarosekonzentration abhängig. Für sehr kleine DNA-Fragmente wurden hochprozentige Gele (bis 3 %) verwendet, für sehr große Fragmente niedrigprozentige (bis 0,6 %).

Die Agarose wurde eingewogen, in TAE-Puffer aufgekocht und kurz vor dem Gießen (ca. 60 °C Lösungstemperatur) mit 5 µl/100 ml einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung versetzt. Die DNA-Proben wurden zusammen mit DNA-Probenpuffer in die Taschen des Gels geladen und in einer mit TAE gefüllten Kammer unter Anlegen einer Spannung von 60-100 V aufgetrennt. Die DNA läuft aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Kathode.

3.3.3 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Längere DNA-Fragmente (10 bis 20000 kb) können durch konventionelle Gelelektrophorese nicht mehr aufgetrennt werden. Bei der Pulsfeldgelelektrophorese wechselt die Richtung der elektrischen Felder in verschiedenen Richtungen. Für unsere Zwecke wurde die sogenannte CHEF-Methode (clamped-homogenous electric field) verwendet. Bei dieser Methode sind die

Elektroden hexagonal um das Gel angeordnet. Das elektrische Feld wird durch ein Kontrollgerät zwischen einander gegenüberliegenden Elektroden angelegt.

Für die PFGE wurde konventionell ein 1 %-Agarosegel (Ultra Pure DNA Grade Agarose) gegossen, wobei 0,5 % TBE-Puffer verwendet wurde, welcher zusätzlich als Laufpuffer fungierte. Die Elektrophorese erfolgt ohne Zusatz von Ethidiumbromid, da der Farbstoff die Reorientierung der DNA-Moleküle beeinflussen kann. Für ein homogenes Laufverhalten wurde der Elektrophoreseansatz die ganze Zeit auf 14 °C gekühlt. Der Puffer muss während der Elektrophorese umgepumpt werden, um Temperatur- und pH-Wertdifferenzen innerhalb des Gels zu verhindern.

Für die Trennung der DNA-Fragmente von Vacciniavirus erfolgte die Elektrophorese bei der Feldstärke 6 V/cm, unter dem Winkel von 120 °C, wobei die Pulsdauer zwischen 3 und 30 sec variierte. Die Laufzeit lag bei 16 – 18 Stunden. Anschließend wurde das Gel im Wasser mit 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und weiter analysiert.

3.3.4 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion einer wässrigen DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm, welche dem Absorptionsmaximum des π -Elektronen-Bindungssystems der DNA-Basen entspricht, gemessen. Eine OD (optical density)-Einheit entspricht 50 µg/ml dsDNA bzw. 40 µg/ml ssDNA oder 35 µg/ml RNA. Da auch andere π -Elektronen-Bindungssysteme bei dieser Wellenlänge absorbieren (z.B. Phenol, Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten) wurden die Proben auch bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Aus beiden OD-Werten (OD₂₆₀ bzw. OD₂₈₀) wurde der Quotient errechnet, welcher Information über den Reinheitsgrad gibt. Für reine DNA sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

3.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten spezifische DNA-Sequenzen. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym ist meist eine pallindromische Sequenz. Die DNA wird entweder an den komplementären Strängen um mehrere Nukleotide versetzt

gespalten, so dass einzelne 3'- oder 5'-Überhänge entstehen, oder beide Stränge werden an derselben Stelle getrennt, so dass Enden ohne Überhang entstehen.

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme wurden Plasmide anhand der spezifischen Restriktionskarten analytisch identifiziert (analytischer Verdau) oder wurden aus Plasmiden spezifische Spaltprodukte gewonnen, die für weitere Klonierungen verwendet wurden (präparativer Verdau). Analytische Verdau wurden mit 1 µg DNA in 10 µl, präparative Verdau mit 3-5 µg DNA im 20 µl-Reaktionsansatz durchgeführt. Die Reaktionspuffer und das Enzym wurde gemäß den Angaben des Herstellers zugesetzt und die Probe 2-16 Stunden bei der angegebenen Temperatur inkubiert. Die gespaltenen DNA-Fragmente wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt und analysiert.

3.3.6 Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment

Nach einem Restriktionsverdau entstandene einzelsträngige 5'-Überhänge können mit der Klenow-Polymerase (großes Fragment der E.coli DNA-Polymerase I) aufgefüllt werden. Dabei füllt die 5'-3'-Polymerase-Aktivität des Enzyms in der Anwesenheit von phosphorylierten Desoxyribonukleotiden (dNTPs) die rezessiven Enden bis zur Doppelsträngigkeit auf.

Reaktionsansatz:

1-5 µg	DNA
5 µl	10 mM dNTP's
5 µl	10x Klenow Polymerase Puffer
1 µl (10 U)	Klenow Polymerase
ad 50 µl	H ₂ O (Reaktionsmix von einem Verdau)

Die Reaktion wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend zur Inaktivierung der Enzymaktivität für 10 min bei 72 °C inkubiert.

3.3.7 Entfernung von 3'-Überhängen mit der T4-DNA-Polymerase

Um die nach einem Restriktionsverdau entstandenen einzelsträngigen 3'-Überhänge zu entfernen, wurden diese mit der T4 DNA-Polymerase abgedaut. Hierbei wurde 1 µl T4 DNA-Polymerase (5 U/µl) zum Restriktionsansatz zugegeben und für 20 min bei 12 °C inkubiert.

Anschließend wurde die Enzymaktivität für 10 min bei einer Temperatur von 75 °C inaktiviert.

3.3.8 Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Ligation zu verhindern, dass die Enden eines linearisierten Vektors miteinander religieren können, wurden die 5'-Enden des Vektors mit dem Enzym "calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)" dephosphoryliert. Da das Enzym in allen gängigen Restriktionspuffern aktiv ist, wurde zu den bereits verdauten Restriktionsansätzen 1 µl CIAP (10 U/µl) pipettiert und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Zugabe von EDTA auf eine Endkonzentration von 5 mM und durch Inkubation für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

3.3.9 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Bei der Extraktion werden Proteine aus einer DNA-Lösung entfernt. Dabei wurde die DNA-Lösung zuerst mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1 v/v/v) versetzt, gut durchgemischt und anschließend 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Proteine gingen in die Interphase über, während die DNA in der oberen, wässrigen Phase blieb. Diese wurde sorgfältig in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt und in gleicher Weise noch zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform extrahiert. Die obere, wässrige Phase wurde am Ende in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die extrahierte DNA-Lösung wurde mit Ethanol präzipitiert.

3.3.10 Präzipitation von DNA

Die Präzipitation wird zur Aufkonzentrierung oder Entsalzung von DNA-Lösungen durchgeführt. Dabei wird den DNA-Molekülen bei der erhöhten Salzkonzentration die Hydrathülle durch Ethanol oder Isopropanol entzogen, was zu deren Aggregation und Präzipitation führt. Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumazetat und mit 2,5 Volumen Ethanol oder 0,6 Volumen Isopropanol versetzt, gut durchgemischt und für 10 min

bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in der gewünschten Menge H₂O aufgenommen.

3.3.11 Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden die nach einem präparativem Verdau gewonnenen linearen DNA-Fragmente durch den Aufbau von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-OH-Ende eines Fragments und dem 5'-Phosphatende des anderen Fragments miteinander verbunden. Die T4 DNA-Ligase ist in der Lage, sowohl glatte ("blunt ends") als auch kohäsive Enden ("sticky ends") miteinander zu verknüpfen. In der Reaktion wurde normalerweise ein molares Verhältnis von 1:3 Vektor: Insert verwendet. Folgender Ansatz wurde zusammenpipettiert:

100 ng	Vektor-DNA
300 ng	Insert-DNA
2 µl	10x Ligase-Puffer
1 µl (1 U)	T4 DNA-Ligase
ad 20 µl	H ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend für die Transformation kompetenter Bakterien verwendet.

3.3.12 Herstellung der kompetenten Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurden zunächst 5 ml LB-Medium mit dem jeweiligen Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde 100 ml LB-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur beimpft und bis zu einer optischen Dichte von 0,2-0,3 (OD-Messung erfolgte bei 595 nm) kultiviert. Diese Kultur wurde für 5 Minuten auf Eis gehalten und anschließend für 10 min bei 2500 rpm abzentrifugiert (4 °C). Das Sediment wurde in 40 ml Transformationspuffer I aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml Transformationspuffer II resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

3.3.13 Transformation der kompetenten Bakterien

Bei der Transformation wird fremde DNA, wie z. B. Plasmide, von kompetenten Bakterien aufgenommen, um diese zu vermehren. Während der Transformation werden die Bakterien mit der Plasmid-DNA in einer Lösung aus Kalziumchlorid gemischt, dann einem kurzen Hitzeschock ausgesetzt (Sambrook et al., 1989) und anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen. Da die Plasmide auch ein oder mehrere Gene für Antibiotikaresistenz enthalten, wachsen auf den Agarplatten nur plasmidhaltige Bakterien.

Bei der klassischen Transformation wurden 5 µl von neu ligierten Plasmiden mit 50 µl Suspension der kompetenten Bakterien für 30 min auf Eis inkubiert, über 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und anschließend wieder für 3 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250 µl LB-Medium (ohne Antibiotika) wurden die Bakterien für 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf antibiotikahaltigen Agarplatten (z.B. Ampicillin 100 µg/ml) ausgestrichen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Um bereits hergestellte Plasmide zu transformieren, wurde eine schnellere Transformationsmethode durchgeführt (Quick Transformation nach Pope und Kent, 1996). Hierzu wurde 100 µl Bakteriensuspension mit 0,5 µg der zu transformierenden Plasmid-DNA vermischt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend direkt auf vorgewärmten (30 min bei 37 °C) antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert.

3.3.14 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit der PCR können DNA-Fragmente in definierter Länge in vitro amplifiziert werden. Bei einer Reaktion wird eine einzelsträngige DNA als Matrize für die Synthese eines neuen komplementären Stranges verwendet. Zunächst wird die doppelsträngige DNA durch thermische Denaturierung in Einzelstränge zerlegt. Daraufhin wird ein Paar von spezifischen Oligonukleotiden (Primer) an den gewünschten Stellen an die einzelsträngige Matrize angelagert (Hybridisierungsphase). Dies erfolgt bei geeigneten Temperaturen (50-65 °C), bei der die Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Moleküle binden können. In der anschließenden Elongationsphase wird mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase die bereits vorhandene Matrize verdoppelt. Dieser Reaktionszyklus wird mehrfach hintereinander wiederholt.

Durch die Verwendung von Oligonuklotiden, die am 5' Ende nicht komplementäre Sequenzen zur Matrize enthalten (mutagene Primer), können Mutationen in das gewünschte Produkt eingeführt werden. Die Spezifität der Reaktion ist von der Stringenz der Primerbindung abhängig, die ihrerseits von der Hybridisierungstemperatur (HT) und der Salzkonzentration in der Reaktion abhängt.

Für analytische PCR-Reaktionen wurde die Taq-Polymerase verwendet, die eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit (2000-4000 Nukleotide/min) aber keine Korrekturaktivität aufweist. Um eine möglichst hohe Amplifikationsgenauigkeit zu erreichen, wurde in dieser Arbeit die Pfu-DNA-Polymerase (Promega) verwendet, die zwar eine niedrigere Reaktionsgeschwindigkeit (500 Nukleotide/min) aufweist, dafür aber eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität besitzt und somit in der Lage ist, primäre Fehler der 5'-3'-Polymerase zu korrigieren (proofreading activity). In ein PCR-Reaktionsgefäß wurden die folgenden Komponenten auf Eis zusammenpipettiert:

Reaktionsansatz:	Taq	Pfu
Plasmid oder genomische DNA	0,5 µg	0,5 µg
Primer sense (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl
Primer antisense (10 pmol/µl)	2 µl	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl	---
Puffer 10x	5 µl	5 µl
10 mM dNTP (Fermentas)	1 µl	1 µl
Polymerase	1 µl (5 U)	0,5 µl (1,5 U)
H ₂ O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Reaktionen wurden in 0,2 ml-Dünnwand-Reaktionsgefäßen in einem MJ Research PTC-200 Cycler mit Heizdeckel durchgeführt. Zur Vermeidung von falschen Primerbindungen wurden die Reaktionsgefäße direkt vom Eis in den 94 °C heißen Heizblock des Thermocyclers überführt (cold start).

PCR Programm:

94 °C	2 min	Denaturierung
94 °C	30 sec	Denaturierung
55 °C	30 sec	Hybridisierung
72 °C	(Taq: 2000 bp/min; Pfu: 500 bp/min)	Elongation

30 Zyklen insgesamt, der erste Denaturierungsschritt wurde nur einmal ausgeführt

Die Temperatur des Hybridisierungszyklus hängt von der Schmelztemperatur des Primers. Bei allen Primern konnte mit derselben Temperatur von 55 °C gearbeitet werden. Die Elongationszeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Fragments ab. Die Proben wurden anschließend noch 5 min bei 72 °C inkubiert (verlängerte Elongation).

3.3.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von Plasmiden und DNA-Fragmenten wurden mit der Ampli Taq Big Dye Cycle Sequencing Kit v3.1 durchgeführt. Zunächst wurde das zu sequenzierende DNA-Fragment mit einer zyklischen PCR vervielfältigt. Dazu wurde der folgende Ansatz zusammenpipettiert:

1 µg	DNA
1 µl (10 pM)	Primer
1 µl	2,5x Sequenzierungspuffer
1µl	Big-Dye Mix
ad 5 µl	H ₂ O

Der Ansatz wurde im Thermocycler nach dem folgenden Protokoll amplifiziert:

96 °C	20 sec	Denaturierung
50 °C	15 sec	Hybridisierung
60 °C	4 min	Elongation

25 Zyklen

Nach der PCR wurde der Ansatz mit der Kapillarsequenziergerät PE ABI 3100 gereinigt und anschließend sequenziert.

3.3.16 Southern Blot

Bei der Southern-Blot-Analyse wurden die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Nukleinsäuren mit Hilfe einer markierten DNA- oder RNA-Sonde nachgewiesen. In der hier verwendeten Methode wurde mit Restriktionsenzym verdaute DNA in einem Agarosegel aufgetrennt, durch verdünnte Salzsäure depuriniert, alkalisch denaturiert, mittels eines Vakuumblotting auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen und durch UV Crosslink (UV-Bestrahlung mit 1200 mJ) auf der Membrane fixiert. Die Membran wurde dann in einer Hybridisierungsröhre vorhybridisiert. Als Sonde wurden die DNA-Fragmente verwendet, welche mit $\alpha^{32}\text{P}$ dCTP markiert wurde. Die DNA-Sonde wurde denaturiert und mit der auf der Membran fixierten denaturierten DNA hybridisiert. Die Banden, an denen die Sonde hybridisierte, konnten mittels Autoradiographie dargestellt werden.

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Insertion von lentiviralen Vektoren im Vacciniengenom analysiert. Im Einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Nachdem die Vacciniavirus-DNA (3.2.2.5) im 20 μl -Ansatz mit PvuII-Restriktionsenzym verdaut wurde, wurden die DNA-Fragmente mittels 1 % TBE-Agarosegels aufgetrennt (Lauf in frischem Puffer bei 85 V ca. 2-3 Stunden). Nachdem das Gel fotografiert wurde, wurde es mit der aufgetrennten DNA 20 min in 250 ml 0,2 M HCl gewaschen (Depurinierung). Nach dem Abkippen der Salzsäure folgte der Denaturierungsschritt, wobei das Gel 20 min in 250 ml 0,5 M NaOH/ 1,5 M NaCl gewaschen wurde. Anschließend wurde das Gel 20 min in 250 ml 1 M Tris-HCl, pH 7,5/ 1,5 M NaCl inkubiert.

Vor dem Blotten wurde die Nylonmembran für 5 min in 10x SSC vorinkubiert. In der Vakuumblotkammer wurde die DNA durch Anlegen eines Vakuums unterhalb der Membran aus dem Gel auf die Membran transferiert (in 10x SSC für 2 Stunden bei 2 bar). Wichtig ist, vor dem Blotten auf der Membran die Taschen mit Bleistift zu markieren. Nach dem Blotten wurde die Membran für 10 min in 0,2x SSC gewaschen, 10 min bei RT getrocknet und durch UV-Crosslinking (1200 mJ, Autocrosslink) fixiert.

Die Membran wurde dann zuerst für 1 Stunde in 15 ml Hybridisierungspuffer bei 68 °C im Hybridisierungsofen prähybridisiert und anschließend mit Hybridisierungspuffer und der Sonde bei 68 °C über Nacht hybridisiert.

Als Sonde für die Hybridisierung wurde ca. 150 ng mit Restriktionsenzym (PvuII) verdaute Plasmid-DNA genommen, welche das nachgewiesene Insert enthält. Für die radioaktive Markierung wurde das Megaprime DNA Labelling System (Amersham) verwendet. Die DNA wurde zuerst in 30 μl H₂O für 2 min bei 95 °C aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf Eis

wurde 10 µl Labelingpuffer (blau), 5 µl random Primer, 5 µl [α - 32 P] dCTP und 2 µl Klenow dazu pipettiert, wobei die Reihenfolge beim Pipettieren eingehalten werden muss. Dieses Gemisch wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert. Um die Klenow-Polymerase zu entfernen wurde die Sonde in equilibrierten MicroSpinsäulen kurz zentrifugiert, dann für 2 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend auf Eis inkubiert. Mit der vorbereiteten Sonde wurde die Hybridisierung durchgeführt.

Nach dem Hybridisieren wurde die Membran zweimal für 15 min in 250 µl 2x SSC/ 0,1 % SDS bei RT und anschließend dreimal in 250 ml 0,2x SSC/ 0,1 % SDS bei 68 °C gewaschen. Nachdem die Membran getrocknet wurde, wurde der Röntgenfilm mit der Membran in einer Reflektorkassette bei 4 °C für 2 bis 72 Stunden belichtet.

3.4 Analyse der Proteinexpression

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten zur Proteingelektrophorese und Proteinbestimmung nach Bradford

Für jede Probe wurden 1-2 x 10⁶ Zellen gesammelt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen, in 200-500 µl RIPA-Puffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Zelllysate wurde anschließend mit gleichem Volumen von 2x Proteinprobenpuffer vermischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Fertige Zelllysate wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 1-5 µl des Lysats (ohne Proteinprobenpuffer) mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In einem Photometer wurde die Absorption der Probe bei 595 nm gemessen. Durch Vergleich mit einer Standardkurve mit BSA (0-0,1 mg BSA/ml) konnte die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt werden.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamidelektrophorese lassen sich Proteinproben auf einem 5 % - 15 % Acrylamidgel der Größe nach auftrennen. Der Trennbereich liegt dabei je nach Acrylamidanteil und Vernetzungsgrad zwischen Acrylamid und Bis-Acrylamid bei 10-220 kD. Das Acrylamid polymerisiert durch freie Radikale, die von APS

(Ammoniumperoxysulfat) abgegeben und von TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin) stabilisiert werden. Die Acrylamidfasern werden durch polymerisiertes Bis-Acrylamid quervernetzt (Vernetzungsgrad der hier verwendeten Gele ist 30:0,8). Bei der Auftrennung im Gel werden die Proteine durch SDS (Natriumlaurylsulfat) und β -Mercaptoethanol denaturiert und erhalten durch SDS die gleiche (negative) Ladung.

Die Gele wurden nach folgendem Schema gegossen:

	Trenngel							Sammelgel
	8 %	9 %	10 %	11 %	12 %	13 %	14 %	4 %
Gel-Puffer (ml)	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	13,2	5,2
Glycerin (ml)	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	---
Aa/Bis 30/0,8 (ml)	10,7	12	13,3	14,7	16	17,3	18,7	10
H ₂ O (ml)	12	10,7	9,4	8	6,7	5,4	4	24,8
TEMED (μ l)	40	40	40	40	40	40	40	40
10 % APS (μ l)	300	300	300	300	300	300	300	300

Das Trenngel wurde zuerst gegossen und mit 1,5 ml mit H₂O-gesättigtem Butanol überschichtet. Nach Polymerisierung wurde das Butanol abgenommen und das Sammelgel gegossen.

Die Proteinlysate wurden für 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (14000 rpm, 2 min) und die Überstände auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 35 mA (max. 150 V) pro Gel.

3.4.3 Western Blot

Nach der Auftrennung wurden die Proteine durch elektrischen Strom im Semi-Dry-Verfahren aus einem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran bei maximal 130 mA für 60 min übertragen. Die PVDF-Membran muss für den Elektrobplot zuerst für 2 min mit Methanol und dann mit 0,5 % PBS-Tween gewaschen werden.

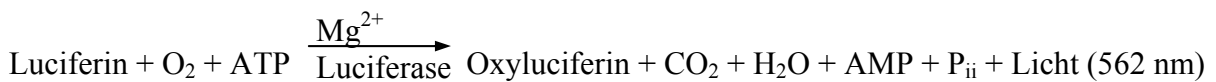
Für die anschließende Immunfärbung wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran für eine Stunde in einer Lösung von 0,2 % Casein in PBS-Tween blockiert, danach folgte die Zugabe des ersten Antikörpers, mit dem die Membran für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Die Membran wurde anschließend dreimal für je 10 min

mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper versetzt. Der zweite Antikörper ist mit Peroxidase (HRP, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt.

Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde die Membran wieder dreimal für je 10 min mit PBS-Tween (0,1 %) gewaschen und für 1 min mit einer Detektionslösung (Renaissance, NEN) versetzt. Anschließend wurde die Membran zwischen zwei Filterpapieren getrocknet und die Lichtemission (Chemolumineszenz) wurde durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert.

3.4.4 Nachweis der Luciferase-Expression

Nach der Transduktion mit dem luciferaseexprimierenden Vektor kommt es in den Zielzellen zur Expression von Luciferase, welche sich über ein biolumineszentes Verfahren nachweisen lässt. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion:



Am Tag der Transduktion (Infektion) wurden die Zielzellen mit einer Zelldichte von 2×10^4 pro Napf einer 96er-Flachbodenplatte in 100 μl Volumen ausgesät. Der Vektortransfer erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen an hergestelltem Virusüberstand. 72 Stunden später wurde das Medium abgesaugt und die transduzierten Zellen mit 100 μl PBS je Napf gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 min durch Zugabe von 100 μl Lysepuffer auf Eis inkubiert. 50 μl Lysat und 50 μl Assay-Puffer wurden je Vertiefung in eine Luminometerplatte übertragen. 100 μl Luciferin-Lösung wurde automatisch durch das Lumineszenzmessgerät auf die Proben injiziert.

Die Messzeit des Luminometers (MicroLumat LB96P; EG & Berthold) wurde auf 15 sec bei einer Wellenlänge von 562 nm festgelegt. Die während der 15 sec Messzeit ermittelten Lichtimpulse werden zu einem Messwert aufaddiert, der in der Einheit rlu (relative light unit) für jede Probe angegeben wird. Sämtliche Werte, die bei einer Dreifachbestimmung eine maximale Standardabweichung von 20 % nicht überschritten haben, wurden für die Auswertung akzeptiert.

Für den Nachweis der In-vivo-Luciferase-Expression wurde 100 μl virushaltiger Überstand subcutan (s.c.) oder intramuskulär (i.m.) appliziert. Nach 24 oder 48 Stunden wurde das

Gewebe an der Stelle der Injektion abgenommen und mit dem Glasdouncer homogenisiert. Der Luciferase-Assay wurde dann nach oben beschriebenen Verfahren durchgeführt.

3.5 Tierexperimente

3.5.1 Immunisierung

Die Mäuse wurden in leichter Äthernarkose immunisiert. Im Fall einer DNA-Immunisierung wurde den Tieren mit einer Tuberkulinspritze intramusculär (i.m.) 50 µg Plasmid-DNA (in PBS) in jeden Quadrizeps-Muskel injiziert. Die Immunisierung mit den lentiviralen Vektoren, bzw. Vacciniaviren, wurde intraperitoneal (i.p.) mit entsprechendem Titer und einem Volumen von max. 1000 µl appliziert. Die Virusüberstände wurden, falls es notwendig war, mit PBS verdünnt.

Als Adjuvans wurde bei allen Immunisierungen ein immunstimulatorisches Oligonukleotid (CpG) in der Konzentration 10 µg/Impfung verwendet.

3.5.2 Milzentnahme

Alle Untersuchungen der Zellimmunität wurden mit Milzzellen durchgeführt. Für die Milzentnahme wurden die Mäuse durch CO₂-Inhalation (Trockeneis) getötet. Zur Entnahme von Milzen wurde die Peritonealhöhle semisteril eröffnet und nach Instrumentenwechsel die Organe entnommen. Die Milzen wurden nach der Entnahme in einem Röhrchen mit FKS-haltigem PBS (0,1 % FKS) aufbewahrt.

3.5.3 Blutentnahme und Serumgewinnung

Getöteten Mäusen wurde Blut durch Herzpunktion entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in Röhrchen (serum separator tubes, Mikrotainer) überführt und zentrifugiert (1 min, 14000 rpm). Die in den Röhrchen vorhandene Wachsschicht trennt nach der Zentrifugation das Serum vom Blutkuchen. Die Seren wurden abgenommen und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Präparation von Milzzellen

Mit sterilen Pinzetten wurde die Milz von anhaftendem Gewebe befreit und in zwei Hälften geteilt. In einer Petrischale wurden die Zellen mittels zweier Pinzetten in einem Stahlsieb ausgestrichen. Gewebereste wurden anschließend mit dem Kolben einer Plastikspritze durch das Stahlsieb gerieben. Die Zellen wurden in 40 ml Waschlösung (PBS mit 0,1 % FKS) aufgenommen und in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen 10 min bei 1000 rpm (15 °C, Anlauf 120 s, ohne Bremse) zentrifugiert.

Das entstandene Pellet wurde 3 min mit 0,16 M NH₄Cl (pH 7,2)-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren und aus der Zellkultur zu entfernen. Diese Inkubationszeit darf nicht überschritten werden, weil damit die Funktion der Zellen beeinträchtigt werden kann. Anschließend wurden die Zellen in der Waschlösung resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 15 °C, ohne Anlauf, mit Bremse auf Stufe 9). Dieser Waschprozess wurde zweimal wiederholt. Das entstandene Pellet wurde anschließend in RPMI-1640, 10 % FKS resuspendiert.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 ELISpot

Zum Nachweis der spezifischen T-Zell-Immunantwort wurde die ELISpot-Methode verwendet, mit der Hilfe man die Häufigkeit der Zytokin-freisetzenden Zellen, welche spezifisch stimuliert wurden, bestimmen kann. In unseren Experimenten haben wir den IFN- γ -ELISpot benutzt.

Die ELISpot-Platten mit PVDF-Membran mussten 1 Tag vor dem Test mit den Antikörpern gegen IFN- γ beschichtet werden. Die PVDF-Membran wurde zuerst für 1–2 min mit 70 % Ethanol inkubiert und dann zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die zu beschichtenden Antikörper aus dem IFN- γ -ELISpot-Kit (Mabtech) wurden in Beschichtungspuffer auf eine Konzentration von 15 μ g/ml verdünnt, 50 μ l/Napf auf die Platte pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten sechsmal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend mit 200 μ l RPMI mit 10 % FKS für 1 Stunde inkubiert.

Für die Untersuchung der Ex-vivo-T-Zell-Antwort wurden 1×10^5 Milzzellen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l/Napf ausgesät. Dazu wurden 50 μ l des Mitogens, in unserem Fall

Concanavalin A, in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml pipettiert. Für die Messung der spezifischen Zytokinfreisetzung wurden die Zellen statt mit Mitogen mit dem entsprechendem Peptid (Endkonzentration 10 µg/ml) für 40 bis 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Negativkontrolle bestand nur aus Zellen mit Medium (RPMI, 10 % FKS), bzw. mit Kontrollpeptid. Pro Ansatz wurden Dreifachbestimmungen ausgeführt.

Wenn eine aktivierte T-Zelle IFN-γ freisetzt, wird das Molekül auf der Membranoberfläche von dem Antikörper festgehalten und kann durch die Färbung sichtbar gemacht werden.

Nach 40 bis 48 Stunden wurden die Zellen aus der Platte entfernt und die Membran wurde sechsmal mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween) gewaschen. Es wurde 50 µl/Napf des zweiten Antikörpers (1:1000) gegen das IFN-γ zugegeben. Dieser Antikörper ist biotinyliert und wurde für 2-3 Stunden bei RT auf der Platte inkubiert. Anschließend wurde die Platte sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und in jeden Napf 50 µl Streptavidin-alkalische Phosphatase-konjugierte Antikörper (1:1000) zugegeben und für 1 bis 2 Stunden bei RT inkubiert.

Nach erneutem sechsmaligem Waschen wurde 100 µl Substratlösung in jeden Napf pipettiert und 30-45 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Leitungswasser beendet. Die Platte wurde zum nächsten Tag bei RT getrocknet.

Um jede T-Zelle, die ursprünglich das IFN-γ sezerniert hat, hat sich ein farbiger Fleck (Spot) gebildet. Aufgrund der Zahl der entstandenen Flecken und der bekannten Anzahl der Milzzellen, die man in jede Vertiefung gegeben hat, lässt sich die Häufigkeit von T-Zellen berechnen, die spezifisch mit dem angegebenen Peptid reagiert haben.

3.6.2 Neutralisationstest

Um die virusneutralisierende Eigenschaft von bestimmten Antikörpern oder Seren zu charakterisieren, wurde der Neutralisationstest verwendet. In diesem Testsystem wird die biologische Eigenschaft, die Infektion permissiver Zellen mit infektiösen Viruspartikeln *in vitro* zu inhibieren, untersucht.

In dieser Arbeit wurde zum Nachweis VSV-G-neutralisierender Antikörper ein Mikroneutralisationstest in 96-Mikrotiterplatten durchgeführt. Von den zu testenden Seren wurden Verdünnungsreihen von 1:64 bis 1:16384 in Zweierschritten durchgeführt und je 50 µl/Napf auf die Mikrotiterplatte verteilt. Pro Ansatz wurden Zweifachbestimmungen ausgeführt. Anschließend wurden pro Napf 100 TCID₅₀ des mit VSV-G pseudotypisierten

lentiviralen Vektors pGJ2egfp in 50 µl MEM zugegeben. Die Platten wurden 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit binden die neutralisierenden Antikörper an die spezifischen Epitope auf der Oberfläche der Vektorpartikel und inhibieren dadurch den späteren Zelleintritt.

Danach wurden 2×10^4 A3.01-Zellen in 100 µl RPMI/10 % FKS in jeden Napf pipettiert und die Platten im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Nach 72 Stunden wurde die EGFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Der End-Titer neutralisierender Antikörper wurde als diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der in Doppelbestimmungen der mit VSV-G pseudotypisierte Vektor gerade noch neutralisiert wurde, d.h. keine EGFP-Expression nachweisbar war. Als Negativkontrolle diente ein Präimmunserum.

3.6.3 ELISA

Mit der ELISA-Technik kann die Konzentration von Antikörpern über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt werden. Der nachzuweisende Probenantikörper bindet im ersten Reaktionsschritt an festadsorbiertes Antigen. Die gebundenen Antikörper werden im zweiten Reaktionsschritt durch enzymmarkierte Anti-Spezies-Antikörper nachgewiesen.

Zum Nachweis Gag-spezifischer Antikörper wurden 96-Loch-Platten mit Rundboden (MaxiSorp) mit 50 µl p55-Protein (2,5 µg/ml) in Beschichtungspuffer beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten sechsmal mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween) gewaschen. Die zu testenden Seren wurden mit RPMI mit 10 % FKS in Zweierschritten verdünnt und die unterschiedlichen Serumverdünnungen wurden in 100 µl/Napf auf die Mikrotiterplatte verteilt und bei Raumtemperatur für 60 Min. inkubiert. Die Proben wurden jeweils im Triplikat bestimmt. Anschließend wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und in jeden Napf 100 µl Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus Antikörper (1:1000) zugegeben und für 60 min bei RT inkubiert. Nach erneutem fünfmaligem Waschen wurde 100 µl Substratlösung (1:1 Verhältnis zw. Reagenz A und B) in jeden Napf pipettiert und 15-30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl konzentrierte Schwefelsäure wurde die Reaktion beendet und die optische Dichte am ELISA-Reader bei einer Absorption von 450 nm (Referenzwellenlänge 570 nm) gemessen. Als Negativkontrolle diente ein Mauspräimmunserum.

3.7 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence Activated Cell Sorting) kann die Expression bestimmter Antigene auf zellulärer Ebene analysiert werden. Das Fluorochrom wird entweder direkt von der Zelle exprimiert, wie z.B. EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), oder der Nachweis der Antigene erfolgt mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die das gesuchte Antigen erkennen und binden. Alternativ dazu können auch nichtmarkierte Antikörper verwendet werden, die durch einen zweiten Färbeschritt mit einem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper nachgewiesen werden können. Derart markierte Zellen werden vom Durchflusszytometer als positiv erkannt und können so quantifiziert werden.

3.7.1 Messung der EGFP-Expression

Die Zellen wurden zuerst gut resuspendiert (adhärente Zellen wurden zuvor mit ATV abgelöst), in einem FACS-Röhrchen gesammelt und dann einmal mit je 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 200 µl 2%iger Formaldehydlösung fixiert und analysiert.

3.7.2 Intrazelluläre Färbung

Für die intrazelluläre Färbung müssen die Zellen zunächst fixiert werden. Dazu wurde je 1 ml 4%-ige Formaldehydlösung in FACS-Röhrchen vorgelegt. In diese Lösung wurden dann die Zellen gegeben und für 10-15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Fixierungsschritt in 4%iger Formalinlösung sollte auf keinen Fall länger als 15 min dauern, da andernfalls die Ergebnisse der Immunfärbung deutlich verschlechtert werden.

Durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml Saponinlösung (Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min) wurde das Formaldehyd entfernt und die Zellen permeabilisiert. Die Zellen wurden durch Zugabe eines oder mehrerer Antikörper in dem Saponinpuffer für 60 min bei 4 °C in einem Volumen von ca. 100 µl gefärbt. Als Negativkontrolle wurde ein Anti-Maus-IgG-Antikörper gleichen Isotyps verwendet. Nichtgebundener Antikörper wurde danach durch zweimaliges Waschen mit je 2 ml Saponinlösung entfernt. Wurde in dem ersten Färbeschritt

ein nichtmarkierter Antikörper verwendet, wurden die Zellen nachfolgend mit einem Detektionsantikörper für weitere 60 min inkubiert und erneut zweimal mit Saponinlösung gewaschen. Nach der Färbung wurden die Zellen in je 200 µl 2 %iger Formaldehydlösung aufgenommen und analysiert.

3.7.3 Probenaufnahme am FACScan

Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Becton & Dickinson FACScan Durchflusszytometers und der Aufnahmesoftware Lysis II (Becton & Dickinson). In der Regel wurden nur die Zellen berücksichtigt, die in der FSC/SSC-Analyse innerhalb der Lebendzell-Population lagen. Bei der Analyse der Proben wurden nur diejenigen Ereignisse als positiv gewertet, die eine höhere Fluoreszenz aufwiesen als die Zellen der Isotyp-Kontrollfärbung, bzw. als die Zellen ohne EGFP-Expression.

4 Ergebnisse

4.1 Die Herstellung und In-Vitro-Infektionsanalyse von HIV-1-Vakzine-Vektoren

4.1.1 Die Herstellung von HIV-1-Vakzine-Vektoren mit hgag-Expressionskassette

Das humanisierte gag-Gen (hgag) wurde von der Firma Entelechon (Regensburg) synthetisiert. Bei dem Entwurf der Sequenz für das Gen wurde die Sequenz des HIV-1 HXB2 Stammes verwendet. Die Kodons in der HIV-1-gag-Sequenz wurden nach der typischen Verwendungshäufigkeit der Kodons bei der Expression im humanen Genom ersetzt. Insgesamt wurden 131 Kodons (36 %) in der Sequenz geändert. Der G + C Gehalt wurde dadurch auf 53,2 % erhöht (Tab. 3), was dem G + C Gehalt der hochexprimierten humanen Gene entspricht. Das synthetisierte gag-Fragment (hgag) ist 1089 bp lang und enthält Sequenzen, die für HIV-p24 und p17 kodieren.

	gag p17/p24 wt	hgag p17/p24
A	38 %	28,6 %
T	19 %	18,2 %
G	24,3 %	27,9 %
C	18,7 %	25,3 %
A + T	57 %	46,8 %
C + G	43 %	53,2 %

Tab. 3: Verwendungshäufigkeit der Nukleotide in der gag-Wildtyp- und humanisierten gag-Sequenz.

Das synthetisierte gag-Gen wurde zuerst mit PCR amplifiziert und dann in einen Polylinker des pCR2.1 Plasmides (Promega) hineinligiert. Um die Entstehung zusätzlicher Mutationen durch PCR auszuschließen, wurde das gesamte Gen sequenziert. Anschließend wurde das gag-Gen in ein Expressionsplasmid unter der Kontrolle eines Spleen Focus Forming Virus (SFFV)-Promotors kloniert. Dafür wurde das Plasmid pSFgp mit den Restriktionsenzymen BamHI und PmeI verdaut und das mit den Enzymen BamHI und StuI ausgeschnittene Fragment von pCR2.1hgag hineinligiert. Die so entstandene Plasmid-DNA wurde für DNA-Immunisierungen verwendet.

Für die Herstellung der HIV-1-Vakzine-Vektoren wurde von dem Plasmid pGJ2egfp bzw. pGJ3lacZ (Jarmy et al., 2001) ausgegangen. In diesem Plasmid sitzt die 5' R-Region aus der HIV-LTR hinter dem konstitutiv aktiven CMV-Promotor am Transkriptionsstart. Das pGJ2-Konstrukt enthält das HIV-Genom mit Deletionen in den offenen Leserastern für *vpu*, *env* und *nef* und eine Deletion in der 3' U3-Region. Das humanisierte gag-Gen wurde aus dem Plasmid pSFhgag mit Hilfe der Restriktionsenzyme AscI und NotI ausgeschnitten und anschließend über die AscI und Bsp1407I Restriktionsstellen in das pGJ2-Plasmid hineinkloniert. Das so entstandene Konstrukt enthält die hgag-Expressionkassette, die unter der Kontrolle eines Spleen Focus Forming Virus (SFFV)-Promotors liegt.

Im pGJ3-Konstrukt sind im Vergleich zu pGJ2 noch die *vif*-, *vpr*- und *tat*-Gene deletiert. Das humanisierte gag-Gen wurde hier aus dem pSFhgag Plasmid über die AscI und BamHI Restriktionsstellen hineinkloniert.

In Abbildung 7 wird der Aufbau der Konstrukte schematisch dargestellt.

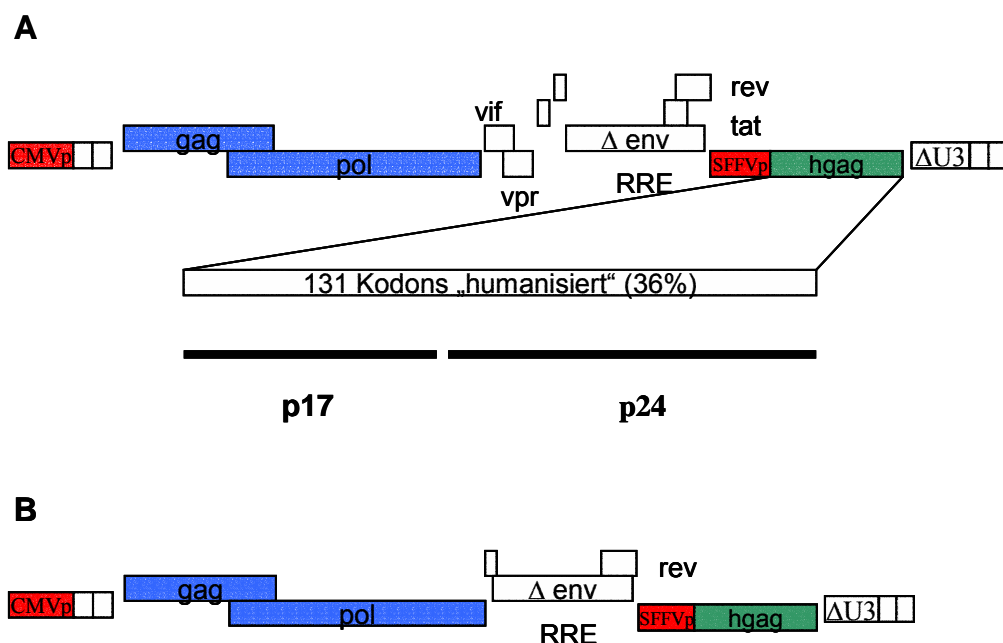


Abb. 7: Schematische Darstellung der hergestellten replikationsinkompetenten HIV-1-Vektoren mit dem synthetischen gag-Gen unter der Kontrolle eines Spleen Focus Forming Virus (SFFV)-Promotors. (A) pGJ2hgag Konstrukt mit den deletierten *vpu*-, *nef*- Genen. (B) pGJ3hgag Konstrukt mit einer Deletion von allen akzessorischen Genen und des *tat*-Gens.

4.1.2 Nachweis der hgag-Expression

Zur Analyse der hgag-Expression wurden 293T-Zellen mittels Kalziumphosphat-Transfektion mit dem hgag-Expressionsplasmid transfiziert. Zelllysate wurden 48 Stunden nach der Transfektion hergestellt.

Gleichzeitig wurde untersucht, ob die mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV-G) pseudotypisierten HIV-1 Vakzine-Vektoren pGJ2hgag und pGJ3hgag in der Lage sind, Zellen zu transduzieren und damit die Expression des Transgens (hgag) in der Zellen zu vermitteln. Dazu wurden 293T-Zellen mit jeweils 6 µg pGJ2hgag oder pGJ3hgag und mit einem Plasmid, welches das Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus enthält, pczVSV-G (Pietschmann et al. 1999), transfiziert. Die Überstände wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet, filtriert (0,45 µm Porendurchmesser) und zur Transduktion von 293-Zellen verwendet. In den Zielzellen wird nach der Transduktion nur die Expressionskassette (z.B. hgag) unter der Kontrolle des internen SFFV-Promotors exprimiert. Die Transduktionseffizienz wurde 72 Stunden später durch eine Western-Blot-Analyse (Abb. 8A) oder durch die Durchflusszytometrie (Abb. 8B) bestimmt. Als Negativkontrolle für die Gag-Expression wurden die Zellen mit den EGFP-exprimierenden Vektoren pGJ2egfp bzw. pGJ3egfp transduziert. Als Positivkontrolle dienten die Zelllysate Gag-exprimierender 293-Zellen.

Die Proteinlysate wurden auf einem 13 %-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit dem Anti-p24-Antikörper (1:100) konnten bei der Positivkontrolle die p55-, p50- und p41-Gag-Vorläuferproteine und das p24-Kapsidprotein nachgewiesen werden. Bei den hgag-exprimierenden Vektoren wurden nur das p41-Vorläuferprotein und p24-Protein detektiert. In der Negativkontrolle wurde keine Expression der Gag-Proteine nachgewiesen, allerdings konnte das p24-Protein aus dem Kapsid der Viruspartikel detektiert werden.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde 72 Stunden nach der Transduktion der 293-Zellen durchgeführt. Die p24-Expression wurde mittels intrazellulärer Färbung nachgewiesen. Als sekundärer Antikörper wurde mit FITC gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet.

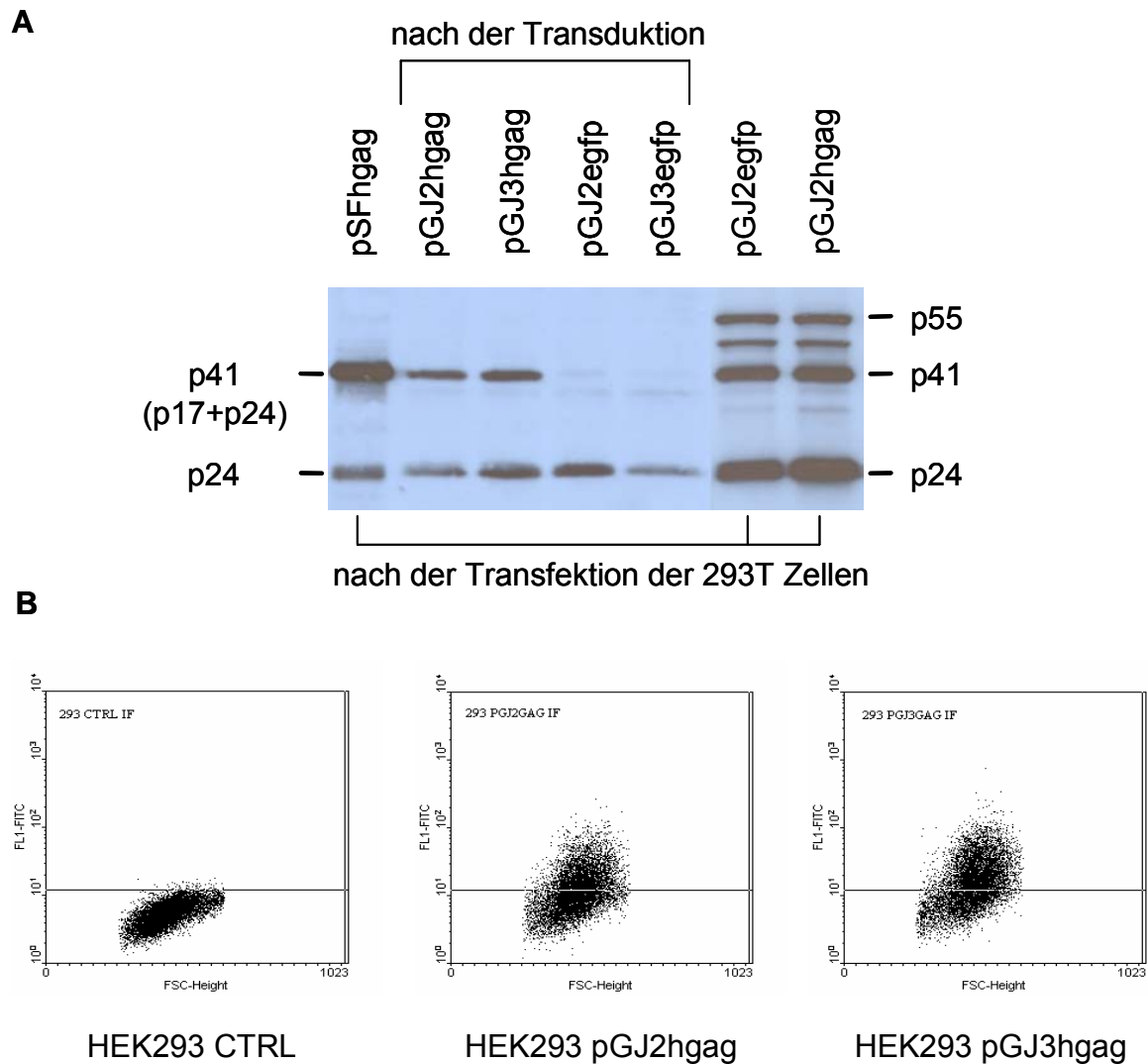


Abb. 8: Expression des hgag nach der Transduktion mit VSV-G pseudotypisierten HIV-1 Vektoren pGJ2hgag und pGJ3hgag. (A) Western-Blot-Analyse der hgag-Expression. Die Zellysate wurden auf einem 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gag-Proteine wurden anschließend mittels Anti-p24-Antikörper detektiert (1:100). (B) Durchflusszytometrische Analyse der hgag-Expression. Die 293-Zellen wurden mit Virusüberstand infiziert. Die Expression wurde 72 Stunden nach der Infektion mittels intrazellulärer Färbung nachgewiesen. Als sekundärer Antikörper wurde mit FITC gekoppelter Anti-Maus-Antikörper verwendet. CTRL: uninfizierte Zellen.

4.1.3 Die lentivirale Transduktion der eukaryotischen Zelllinien

Um zu überprüfen, ob man mit den hergestellten HIV-1-Vektoren auch andere Zelllinien als menschliche infizieren kann, wurden neben den humanen Zelllinien auch die von Mäusen, von Affen und von Baumwollratten transduziert. Damit wurde gleichzeitig überprüft, welches

Tiermodel für die In-Vivo-Experimente in Frage käme, bzw. welches Tiermodel nicht geeignet wäre.

Da die Infizierbarkeit der Zellen auch vom Zelltyp abhängig ist, wurden für die Infektionsanalyse die Zellen gleicher Spezies aber unterschiedlicher Herkunft verwendet. Bei humanen Zelllinien sind das die embryonale Nierenzelllinie HEK 293, Zervixepithelzelllinie HeLa, Osteoblasten 143B, B-Lymphoblasten 010-035i-B-LCL und T-Lymphoblasten A3.01 und Jurkat E6-1. Als Affenzelllinien wurden für die Infektionsanalyse die Nierenzelllinien der grünen Meerkatze CV-1 und Vero verwendet. Von den Mauszellen wurden die Fibroblastenzelllinien L-929 und NIH-3T3 und die Mastocytomzelllinie P815 transduziert. Da sich in der Virologie die Baumwollratte als Tiermodel etabliert hat (Blanco et al., 2004; Langley et al., 1998), wurden auch Fibroblasten von *Sigmodon fulviventer* (BCRT) und *Sigmodon hispidus* (CCRT) in die Infektionsanalyse einbezogen.

Der Virusüberstand wurde mittels Transfektion der 293T-Zellen mit jeweils 6 µg des EGFP-exprimierenden Vektor (pGJ2egfp) und mit 6 µg des pczVSV-G hergestellt. Die entstandenen pseudotypisierten Partikel wurden zur Transduktion von Zellen verwendet. Die EGFP-Expression wurde 72 Stunden nach der Infektion mittels Durchflußzytometrie analysiert (Abb. 9). Die Infektion wurde in Triplikaten angesetzt um die Signifikanz der Unterschiede festzustellen. Das Ergebnis wurde auch mit einem unabhängig wiederholten Experiment bestätigt.

Die festgestellten Unterschiede in der Infizierbarkeit der Zelllinien korrelierten nicht mit der Spezies oder mit dem Zelltyp. Am besten transduzierbar war die embryonale Nierenzelllinie HEK 293. Niedrigste Transduktionseffizienz wurde bei den Nierenzelllinien der grünen Meerkatze beobachtet. Es wurde kein signifikanten Unterschied in der Transduktionseffizienz zwischen den humanen Osteoblasten, humanen T-Lymphoblasten (Jurkat E6-1) und Maus-Fibroblasten (L-929) festgestellt. In allen untersuchten Zelllinien wurde die Expression des Transgens (EGFP) nachgewiesen.

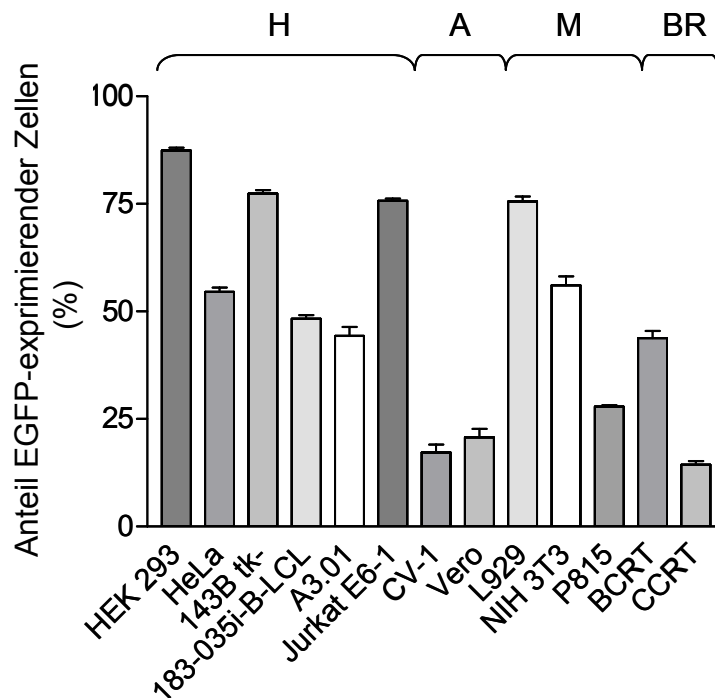


Abb. 9: Infektionsanalyse des VSV-G pseudotypisierten HIV-1-Vektors. Mit dem Überstand des VSV-G-pseudotypisierten pGJ2egfp-Vektors wurden die humanen- (H), Affen- (A), Maus- (M) und Baumwollratten-(BR)-Zelllinien infiziert. Der Anteil EGFP-exprimierender Zellen und damit die Effizienz des Gentransfers wurden 72 Stunden nach der Infektion mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

4.1.4 Die lentivirale Transduktion der humanen PBMCs und Mausmilzzellen in vitro

Die lentivirale Vektoren haben die Fähigkeit auch die ruhenden (teilungsunfähigen) Zellen zu transduzieren, was als Vorteil bei der Gentherapie angesehen wird. In diesem Experiment wurde der VSV-G-pseudotypisierte HIV-1-Vektor für die Transduktion der primären Mausmilzzellen und der humanen PBMCs verwendet. Um die Unterschiede in der Transduktionseffizienz zwischen den ruhenden und proliferierenden Zellen festzustellen, wurden parallel die unstimulierten und stimulierten Zellen infiziert.

Für die Transduktion der Zellen wurde der VSV-G-pseudotypisierte Vektor pGJ2egfp verwendet. Die viralen Überstände wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll hergestellt. Um eine ausreichende MOI für die Infektion zu erreichen, wurde der frisch gewonnene Virusüberstand in der Ultrazentrifuge pelletiert und anschließend 20-fach konzentriert.

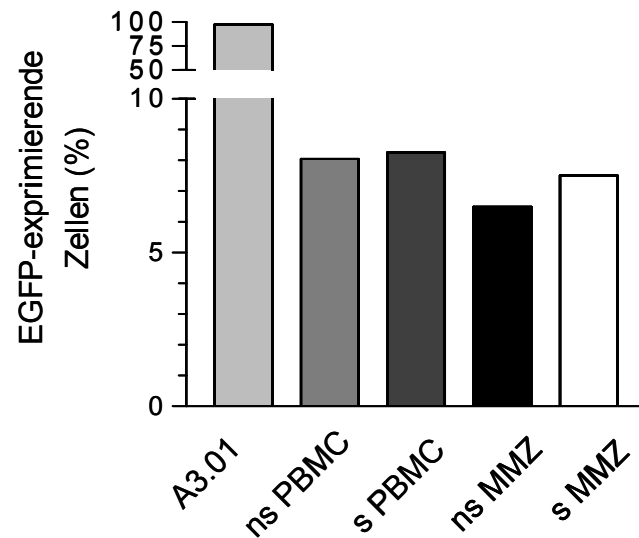


Abb. 10: Transduktion der humanen PBMCs und Mausmilzzellen *in vitro*. Die humanen PBMCs wurden entweder vor (ns PBMC) oder 72 Stunden nach der Stimulation mit PHA (2 µg/ml) (s PBMC) mit HIV-1 Vektor pGJ2egfp/VSV-G infiziert. Die Zellen wurden mit einer MOI von 500 für 3 Stunden bei 800 g zentrifugiert, danach mit PBS gewaschen und für 48 Stunden in RPMI-1640 mit 10 % FKS mit PHA inkubiert. Die Mausmilzzellen wurden ebenfalls entweder nicht stimuliert (ns MMZ) oder 48 Stunden nach der Stimulation mit 2,5 µg/ml Concanavalin A (s MMZ) infiziert. Die Infektion wurde nach gleichen Infektionsbedingungen durchgeführt. Die Infektionseffizienz wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Die humanen PBMC und Maus-Milzzellen wurden nach oben beschriebenem Protokoll präpariert. Die PBMC wurden nach der Isolierung für 72 Stunden mit 2 µg/ml PHA in RPMI-1640 stimuliert. Die Maus-Milzzellen wurden mit 2,5 µg/ml Concanavalin A (ConA) in RPMI-1640 für 48 Stunden stimuliert. Die nichtstimulierten Zellen (ns PBMC und ns MMZ) wurden direkt nach der Präparation für die Transduktion verwendet. 2×10^4 Zellen wurden mit einer MOI von 500 infiziert. Bei der Infektion wurden die Zellen 90 min bei 800 g und 32 °C zentrifugiert, um die Infektionseffizienz zu verbessern. Als Positivkontrolle wurden gleichzeitig humane T-Lymphoblasten A3.01 infiziert. Alle Zellen wurden nach der Infektion zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PHA, bzw. ConA stimuliert.

Die EGFP-Expression und damit die Effizienz des Gentransfers wurden 48 Stunden nach der Infektion mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt (Abb. 10).

Sowohl die humanen PBMC als auch die Maus-Milzzellen waren mit dem VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-lentiviralen Vektor pGJ2egfp transduzierbar. Die Transduktionseffizienz lag bei 7-9 % bei einer MOI von 500. Es wurde kein deutlicher Unterschied der Infektionseffizienz bei nichtstimulierten und stimulierten Zellen festgestellt.

4.1.5 Konzentrierung VSV-G-pseudotypisierter viraler Partikel

Um die In-vivo-Experimente mit ausreichendem Virustiter durchführen zu können, war es notwendig die hergestellten Virusüberstände zu konzentrieren. Das zur Pseudotypisierung verwendete Hüllprotein bestimmt die Stabilität der hergestellten Pseudotypen, was für die Konzentrierung der Vektoren eine wichtige Rolle spielt. Die mit VSV-G-Hüllprotein pseudotypisierten Partikel sind sehr stabil und lassen sich durch Zentrifugation ohne großen Aktivitätsverlust konzentrieren (Burns et al., 1993).

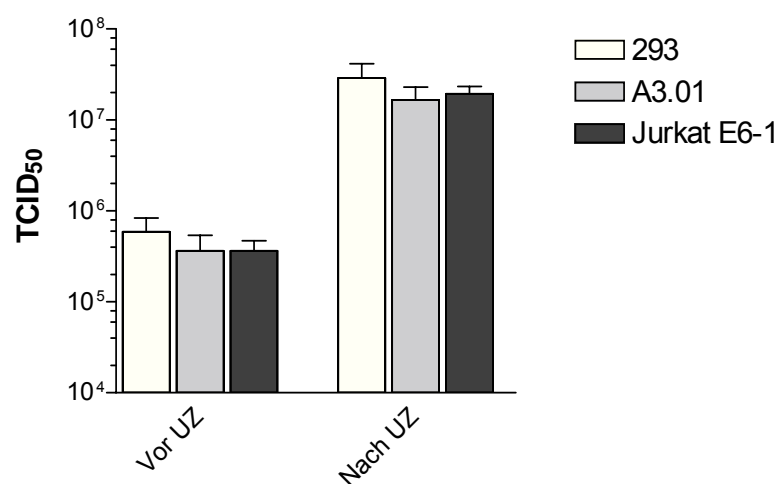


Abb. 11: Konzentrierung VSV-G-pseudotypisierter viraler Partikel. 293T-Zellen wurden jeweils mit 16 µg pczVSV-G und pGJ2egfp auf einer 10 cm-Petrischale kotransfiziert. Ein Teil des hergestellten virushaltigen Überstands wurde unkonzentriert für die Infektion von 293, A3.01 oder Jurkat E6-1 Zellen verwendet. Der Rest wurde unter den beschriebenen Bedingungen (3.2.1.3) 30-fach konzentriert und danach zur Transduktion verwendet. Der Titer wurde nach der Reed-Muench-Methode bestimmt (3.2.1.2). Die Titerbestimmung wurde aus drei unabhängig hergestellten Virusüberständen durchgeführt.

Um die Effizienz der Konzentrierung zu zeigen, wurden die Überstände von VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektor pGJ2egfp durchgeführt. Die viralen Überstände wurden in größerer Menge auf 10 cm-Petrischalen hergestellt, wobei für die Kotransfektion jeweils 16 µg pczVSV-G und pGJ2egfp Plasmid verwendet wurde. Ein Teil der Überstände wurde unkonzentriert für die Transduktion von 293-, A3.01- und Jurkat-Zellen verwendet, während der Rest vorher in der Ultrazentrifuge pelletiert und anschließend 30-fach konzentriert wurde. Der Titer wurde 72 Stunden später nach der Reed-Muench-Methode bestimmt.

Die Ergebnisse zeigten, dass man die VSV-G-pseudotypisierten Vektoren mit hoher Effizienz konzentrieren kann (Abb. 11). Schon frühere Experimente haben gezeigt, dass die 293-Zellen

am besten infizierbar sind und man konnte mit ihnen den höchsten Titer erreichen. Allerdings ist die Titerbestimmung mit 293- und Jurkat E6-1-Zellen nicht zu empfehlen, da die EGFP-Expression bei den höheren Verdünnungen unter dem Fluoreszenzmikroskop nicht so gut sichtbar war, was zu falschen Ergebnissen z.B. beim Neutralisationstest führen kann. Dabei war die Fluoreszenz bei A3.01-Zellen ohne größeren Aufwand gut sichtbar und die erhaltenen Ergebnisse damit aussagekräftiger.

4.2 Direkter Nachweis der Expression des Transgens in vivo

4.2.1 Nachweis der Luciferase-Expression nach der Transduktion mit HIV-1-Vektoren in vivo

Nachdem gezeigt wurde, dass alle getestete Zelllinien, bzw. primären Zellen mit dem VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-Vektor infizierbar sind, wurde die Transgenexpression in vivo getestet. Da bekannt ist, dass die Präsenz von manchen akzessorischen Proteinen die Transduktionseffizienz beeinflussen kann (Chinnasamy et al., 2000), wurden für die weiteren In-vivo-Experimente die pGJ2-Vektoren eingesetzt.

Für den direkten Nachweis der Transgenexpression in vivo wurde in dem pGJ2egfp-Vektor das egfp-Gen durch das Luciferase-Gen ersetzt. Der Luciferase-Assay ist sehr sensitiv, die Vermessung der Enzymaktivität erfolgt im Luminometer und die Genexpression in vivo ist dadurch einfacher zu quantifizieren. Zuerst wurde das Luciferase-Gen aus dem anderen lentiviralen Vektor pGJ3luci ausgeschnitten und über die Restriktionsstellen in das mit AscI und XbaI pGJ2egfp-Plasmid hineinligiert (Abb. 12).

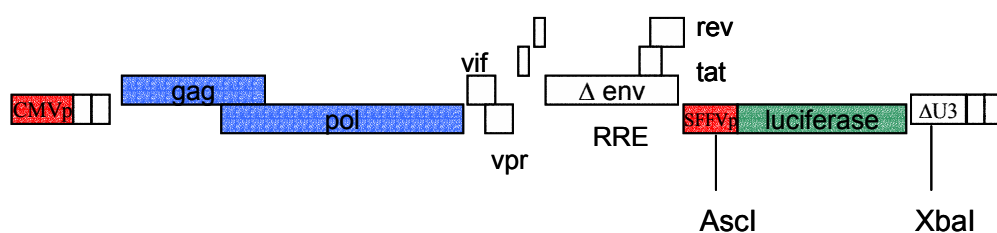


Abb. 12: Der replikationsinkompetente HIV-1-Vektor für In-vivo-Gentransfer des Luciferase-Genes unter der Kontrolle eines Spleen Focus Forming Virus (SFFV) Promotors. Als Ausgangsplasmid wurde der lentivirale Vektor pGJ2egfp verwendet (Jarmy et al., 2001).

Die viralen Überstände wurden zuerst in größerer Menge auf 10 cm-Petrischalen hergestellt, wobei für die Kotransfektion jeweils 16 μg pczVSV-G und pGJ2luci-Plasmid verwendet wurde. Der entstandene viruspartikelhaltige Überstand wurde 30-fach konzentriert und anschließend danach für die Transduktion verwendet.

Ein Teil des hergestellten Virus wurde zuerst für die Überprüfung der Expression des Luciferase-Gens *in vitro* verwendet. Als Zielzellen wurden humane embryonale Nierenzelllinie HEK-293 und die Maus-Fibroblastenzelllinie L-929 benutzt. Der Luciferase-Assay wurde ein, drei und sechs Tage nach der Transduktion durchgeführt (Abb. 13).

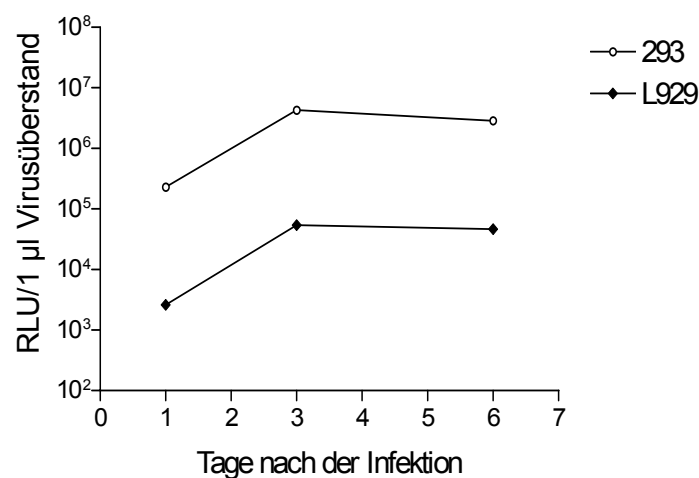


Abb. 13: Nachweis der Luciferase-Expression *in vitro*. Die Transduktionseffizienz wurde durch Infektion von 2×10^4 humanen 293- und Maus-L929-Zellen bestimmt. 24, 72 und 148 Stunden nach der Infektion wurde der Luciferase-Assay durchgeführt und die Luciferaseaktivität pro 1 μl Virusüberstand bestimmt.

Der direkte Nachweis der Transgenexpression bei der Transduktion mit den replikationsinkompetenten Vektoren *in vivo* ist nur dann möglich, wenn die transduzierten Zellen möglichst auf einem Ort lokalisiert sind. Dafür ist am besten der intramuskuläre (i.m.), intradermale (i.d.) oder subcutane (s.c.) Infektionsweg geeignet. In diesem Versuch wurde das Virus mit Luciferase-Transgen subcutan (s.c.) und intramuskulär (i.m.) injiziert. Als Negativkontrolle wurden Virusüberstände von der gleichen Präparation mit Hitze inaktiviert (56°C für 1 Stunde) und über die gleichen Infektionswege wie intakte Partikel den Mäusen injiziert. 24, 72 und 148 Stunden später wurde das Gewebe an der Stelle der Injektion entnommen, homogenisiert und die Expression des Luciferase-Gens mit Hilfe des Luciferase-Assay analysiert. Gleichzeitig wurde die Proteinkonzentration des Proteinextrakts gemessen um die Luciferaseaktivität pro 1 mg Protein festzustellen (Abb. 14).

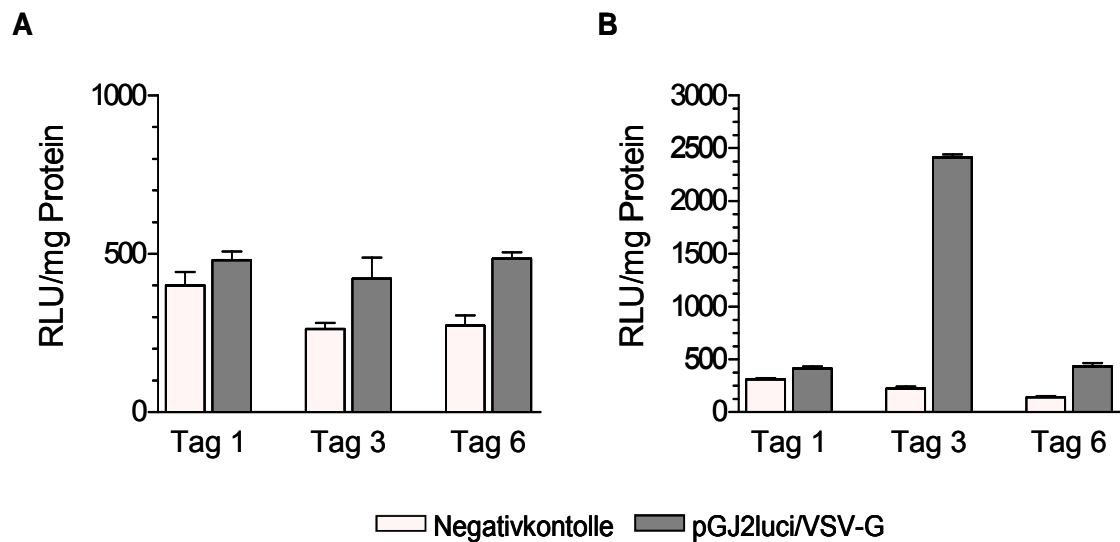


Abb. 14: Nachweis der Luciferase-Expression in vivo. Mit 100 μ l des Virusüberstandes wurden 8 Wochen alte Balb/c Mäuse (Weibchen) subcutan (s.c.) (A) oder intramuskulär (i.m.) (B) infiziert. Die gemessene Luciferaseaktivität wurde auf die Menge der Proteinmasse bezogen.

Sowohl subcutan als auch intramuskulär konnte die Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse wurden 72 Stunden nach der Infektion bei der intramuskulären Gabe festgestellt. Die Luciferaseaktivität konnte noch 6 Tage nach dem Gentransfer analysiert werden.

4.3 Immunisierung mit lentiviralen HIV-1-Vektoren

Die Ergebnisse der Transgenexpression in vivo deuten darauf hin, dass die VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-Vektoren für den Gen-Transfer in vivo fähig sind. Da das Transgen noch 6 Tage nach der Infektion nachgewiesen werden konnte, ist es zu erwarten, dass auch eine Immunantwort gegen das Transgen induziert wird.

4.3.1 Nachweis der Gag-spezifischen Immunantwort nach Immunisierung mit replikationsinkompetenten HIV-1 Vektoren

4.3.1.1 Immunisierungsschema mit Vektor-Primärimmunisierung

Frühere Experimente haben gezeigt, dass der lentivirale Vektor pGJ2 alle Voraussetzungen für effizienten Gentransfer erfüllt. Anhand dieser Erkenntnisse wurde untersucht, ob eine Immunisierung mit dem lentiviralen Vektor pGJ2 eine humorale und eine zelluläre Immunantwort induzieren kann. Dabei sollte vor allem die Gag-spezifische Immunantwort analysiert werden. Für die Immunisierung wurde der Vektor benutzt, der eine Expressionskassette mit dem synthetischen gag-Gen (hgag) enthält. Dadurch sollte vor allem die CTL-Immunantwort verstärkt werden.

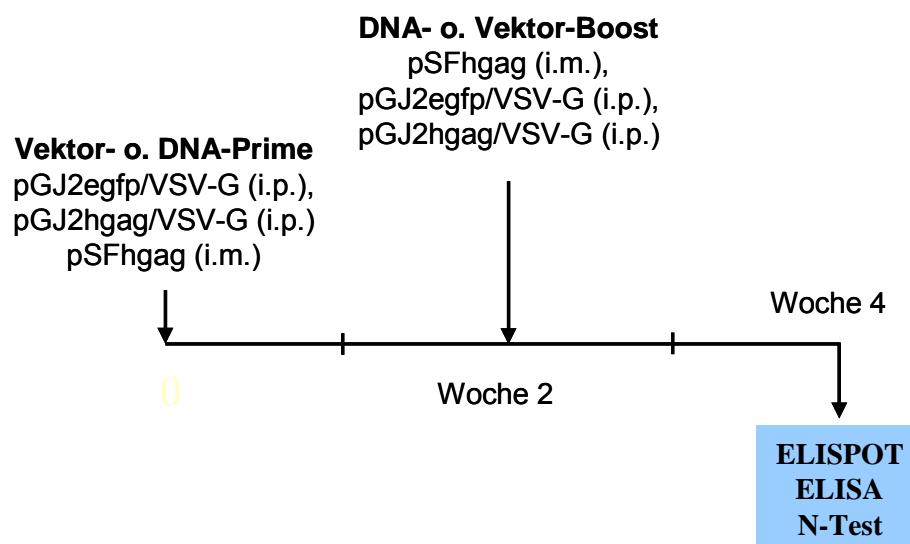


Abb. 15: Das Immunisierungsschema für die Analyse der Gag-spezifischen Immunantwort nach dem Gentransfer mit lentiviralen Vektoren. Die Primärimmunisierung wurde intraperitoneal mit 5×10^6 IU des Gag- oder EGFP-exprimierenden lentiviralen Vektors durchgeführt. Zwei Wochen später wurden Balb/c Mäuse intramuskulär (i. m.) mit $100 \mu\text{g}$ Gag-kodierter Plasmid-DNA oder intraperitoneal (i.p.) mit dem lentiviralen Vektor immunisiert. Vier Wochen nach Primärimmunisierung wurden das IFN- γ -ELISpot-Assay, ELISA und Neutralisationstest durchgeführt um die Gag-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort zu analysieren. Als Kontrolle diente die Immunisierung alleine mit Plasmid pSFhgag (DNA-Prime und DNA-Boost).

Zuerst wurde die Immunisierung nach einem Protokoll durchgeführt, in dem als Primärimmunisierung die lentiviralen Vektoren appliziert wurden (Abb. 15). Die VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren pGJ2egfp und pGJ2hgag wurden intraperitoneal mit dem Titer 5×10^6 IU injiziert. Die Vektoren mit der EGFP-Expressionskassette wurden als

Negativkontrolle benutzt, um die Unterschiede zwischen der Immunantwort, die durch die Transgenexpression und durch das in Viruspartikel-enthaltenem Kapsid-Protein (p24) hervorgerufen wird, festzustellen. Gleichzeitig wurde eine Versuchsgruppe (n = 5) mit 100 µg hgag-kodierendem Plasmid pSFhgag immunisiert (s. 4.1.1). Das gag-Gen liegt in diesem Plasmid unter der Kontrolle des SFFV-Promotors und hat eine starke Expression in transient transfizierten Zellen bewiesen. Zwei Wochen später wurde die Boosterimmunisierung mit dem gleichen lentiviralen Vektor oder mit dem Plasmid pSFhgag durchgeführt. Sowohl bei der Primärimmunisierung als auch beim Boostern wurde 10 µg CpG-Adjuvans zugegeben. Vier Wochen nach Primärimmunisierung wurden die Tiere euthanasiert, Milz und Blut entnommen, um die zelluläre und humorale Immunantwort zu analysieren.

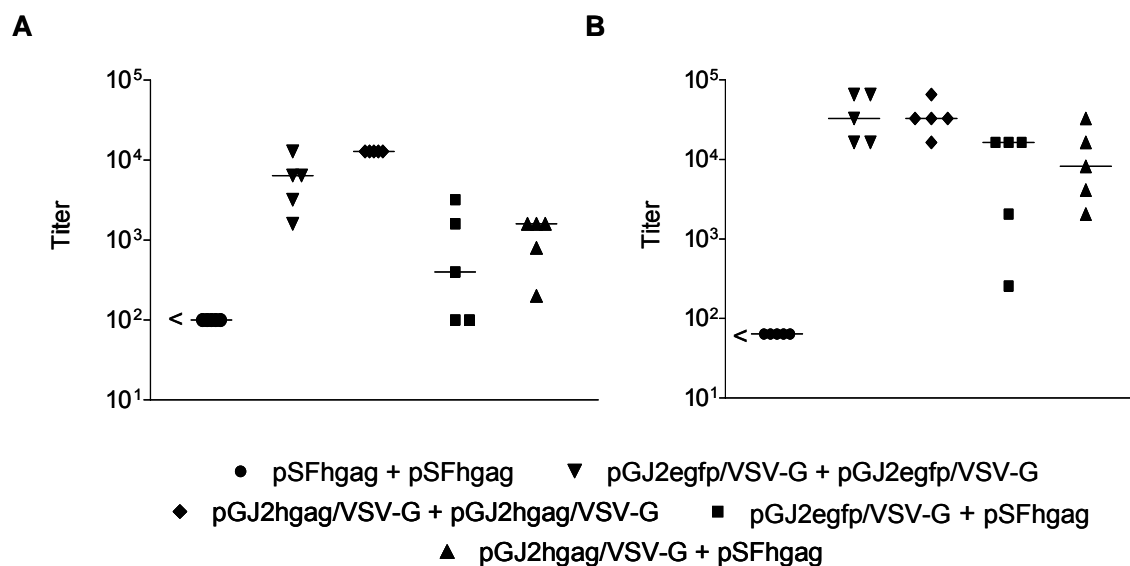


Abb. 16: Nachweis der humoralen Immunantwort. (A) Der Titer der Gag-spezifischen Antikörper wurde mit Hilfe des Anti-p55-ELISA analysiert. Der Cut-Off-Wert wurde aus der OD des Serums von naiven Mäusen festgelegt. (B) Als Titer neutralisierender Antikörper wurde diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der in Doppelbestimmungen der mit VSV-G-pseudotypisierte Vektor gerade noch neutralisiert wurde.

Für die Analyse der Gag-spezifischen T-Zellimmunantwort wurden die frisch isolierten Milzzellen mit dem Peptid AMQMLKETI restimuliert. Es konnte bei den restimulierten Zellen keine IFN- γ -Freisetzung nachgewiesen werden. Die Analyse der Gag-spezifischen Antikörper hat allerdings gezeigt, dass Anti-p55-Antikörper vorhanden sind. Die Gruppen, die zweimal mit den lentiviralen Vektoren immunisiert wurden, weisen höhere Titer an Anti-p55-Antikörpern auf (Abb. 16A). Diesen Unterschied konnte man allerdings nicht als signifikant betrachten. Es wurden vergleichbare Titer der VSV-G-neutralisierenden

Antikörper festgestellt, wenn die Tiere entweder zweimal mit den lentiviralen Vektoren oder einmal mit dem Vektor und einmal mit DNA immunisiert wurden (Abb. 16B). Der Titer von VSV-G-neutralisierenden Antikörpern war 4 Wochen nach der Immunisierung (Gruppe „pGJ2egfp/VSV-G + pSFhgag“ und „pGJ2hgag/VSV-G + pSFhgag“) immer noch sehr hoch (Neutralisationstiter bis zu 1:32768) und unterschied sich nicht signifikant von den Mäusen, denen zweimal die VSV-G-enthaltenden Viruspartikel injiziert wurden.

Obwohl die Schwankungen zwischen den einzelnen Titer-Werten in der Relation der intraindividuellen Variabilität ist, wurde in den Abbildungen der Median als sinnvollerer Indikator des Verteilungsschwerpunktes festgelegt.

4.3.1.2 Immunisierungsschema mit DNA-Primärimmunisierung

Die aktuellen Erkenntnisse der HIV-Vakzinenforschung deuten darauf hin, dass bei HIV-Infizierten der zelluläre Immunantwort eine entscheidende Schutzfunktion zukommt. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL). Da nach der Primärimmunisierung mit den lentiviralen Vektoren und anschließendem Boostern mit DNA, bzw. mit gleichen Vektoren, die zelluläre Immunantwort nicht nachgewiesen wurde, wurde das Immunisierungsschema geändert (Abb. 17).

Die Primärimmunisierung wurde mit dem hgag-kodierenden Plasmid pSFhgag durchgeführt. Jeweils 50 µg Plasmid-DNA wurde den Tieren in jeden Quadrizeps-Muskel (i.m.) injiziert. Drei Wochen später wurde die Boosterimmunisierung mit den VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektoren pGJ2egfp und pGJ2hgag durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die Mäuse mit dem Gag-exprimierenden rekombinanten Vacciniavirus vAbT141 geboostert. Den Mäusen wurde intraperitoneal mit 5×10^6 IU des Virus injiziert. Gleichzeitig wurde eine Versuchsgruppe (n = 5) nach gleichem Schema nur mit Plasmid-DNA pSFhgag immunisiert. Sowohl bei der Primärimmunisierung als auch beim Boostern wurden 10 µg CpG-Adjuvans zugegeben. Fünf Wochen nach der Primärimmunisierung wurden die Tiere getötet, Milz und Blut wurde entnommen, um die zelluläre und humorale Immunantwort zu analysieren.

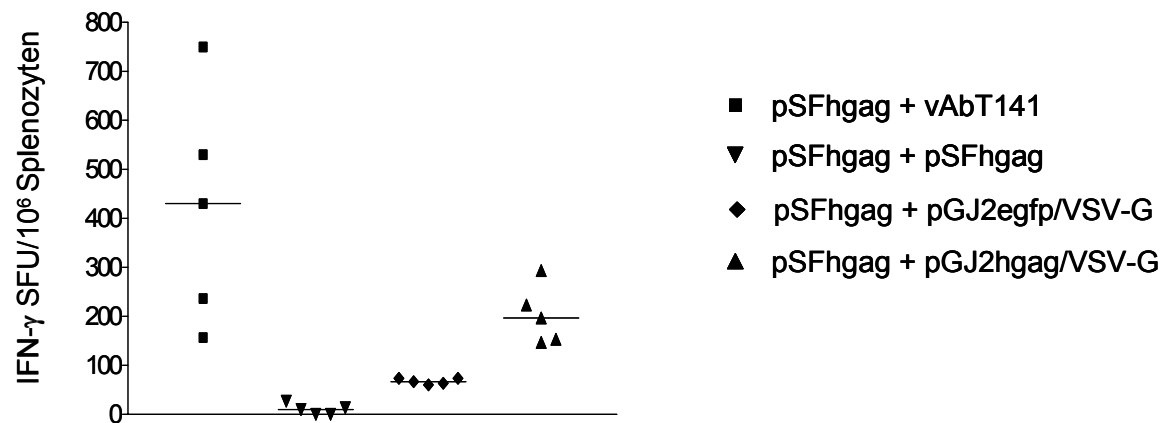


Abb. 18: ELISpot-Analyse der Gag-spezifischen T-Zellimmunantwort. Die Milzzellen wurden mit dem Peptid AMQLMKETI (10 $\mu\text{g/ml}$) für 40 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Concanavalin A stimuliert und als Negativkontrolle wurde zur Stimulation HIV-gp120-Peptid in der gleichen Konzentration eingesetzt. Die Freisetzung des IFN- γ als eine spezifische Antwort auf die Stimulation wurde analysiert. Die Abbildung zeigt die Zahl der Spot-bildenden Einheiten (Spot-Forming Units; SFU) in Kulturen, die mit dem Gag-Peptid inkubiert wurden.

Die Analyse der Gag-spezifischen Antikörper (Abb. 19A) konnte allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen, die mit den beiden lentiviralen Vektoren und mit Vacciniavirus immunisiert wurden, feststellen. Die zweifach wiederholte DNA-Immunisierung mit dem Plasmid pSFhgag führte nicht zu einer Bildung von Anti-p55-Antikörpern.

Bei den Versuchsgruppen die mit den lentiviralen Vektoren geboostert wurden, konnten gleiche Titer der VSV-G-neutralisierenden Antikörper gemessen werden (Abb. 19B). Obwohl die Schwankungen zwischen den einzelnen Titer-Werten in der Relation der intraindividuellen Variabilität ist, wurde in den Abbildungen der Median als sinnvollerer Indikator des Verteilungsschwerpunktes festgelegt.

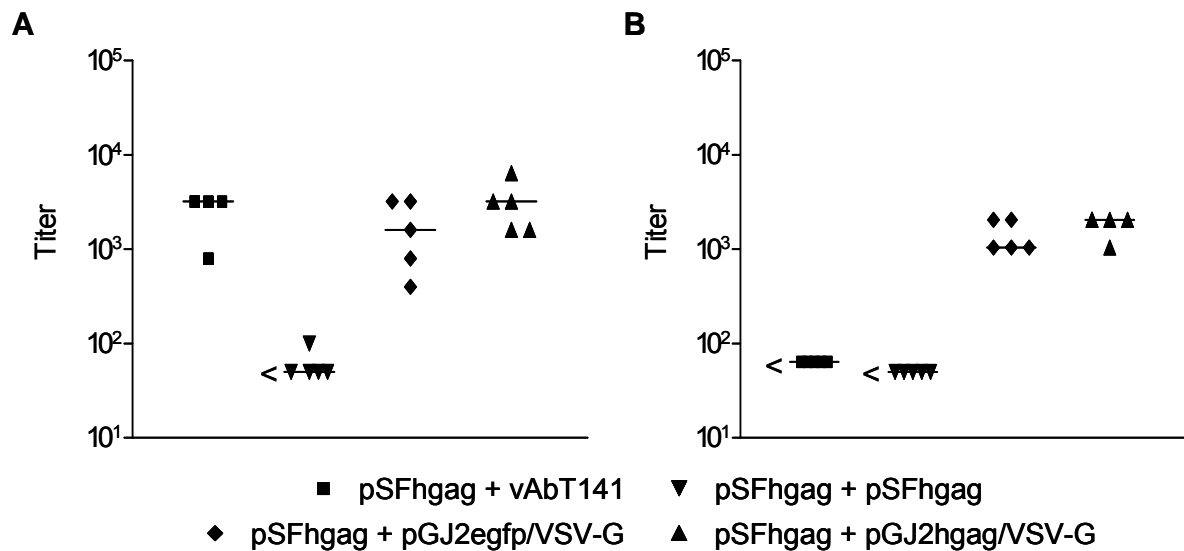


Abb. 19: Nachweis der humoralen Immunantwort. (A) Der Titer der Gag-spezifischen Antikörper wurde mit Hilfe des Anti-p55-ELISA bestimmt. Der Cut-Off-Wert wurde aus der OD des Serums von naiven Mäusen festgelegt. (B) Der Titer neutralisierender Antikörper wurde als diejenige Serumverdünnung angegeben, bei der in Doppelbestimmungen der mit VSV-G-pseudotypisierte Vektor gerade noch neutralisiert wurde.

4.3.2 Analyse der EGFP-spezifischen T-Zellimmunantwort nach lentiviralem Gentransfer

Die Immunisierungsexperimente haben gezeigt, dass die lentiviralen Vektoren in der Lage sind, eine starke Immunantwort gegen das Transgen und eine besonders starke Immunantwort gegen eigene virale Proteine zu induzieren. Dabei wurde festgestellt, dass die Gag-Proteine, die ein Strukturbestandteil von Viruspartikeln sind, sich deutlich an der Induktion von humorale und auch zelluläre Immunantwort beteiligen. Um besser die Rolle der Transgenexpression für die Induktion der zellulären Immunität festzustellen, wurde es notwendig die Immunantwort gegen das Transgen zu untersuchen, der nicht ein Bestandteil des Viruspartikels ist. Dafür wurden die Balb/c Mäuse mit den gfp-exprimierenden Vektoren, die bisher in den Kontrollen eingesetzt worden sind, immunisiert. Anschließend wurde die EGFP-spezifische CTL-Immunantwort analysiert.

Die Primärimmunisierung wurde mit dem egfp-kodierenden Plasmid pcegfp durchgeführt. Das egfp-Gen liegt in diesem Plasmid unter der Kontrolle eines CMV-Promotors. Es wurde eine starke Expression in transient transfizierten Zellen nachgewiesen. Jeweils 50 µg Plasmid-DNA wurde den Tieren in jeden Quadrizeps-Muskel (i.m.) injiziert. Drei Wochen später wurde die Boosterimmunisierung mit dem VSV-G-pseudotypisierten lentiviralen Vektor

pGJ2egfp bzw. mit dem rekombinanten Vacciniavirus vEGFP, das ebenfalls ein Gen für das grün fluoreszierende Protein enthält, durchgeführt. Den Mäusen wurde intraperitoneal 5×10^6 IU des Virus injiziert. Sowohl bei der Primärimmunisierung als auch beim Boostern wurde $10 \mu\text{g}$ CpG-Adjuvans zugegeben. Fünf Wochen nach der Primärimmunisierung wurden die Tiere euthanasiert. Milz und Blut wurden entnommen, um die zelluläre und humorale Immunantwort zu analysieren. Das Immunisierungsschema ist in der Abbildung 20 dargestellt.

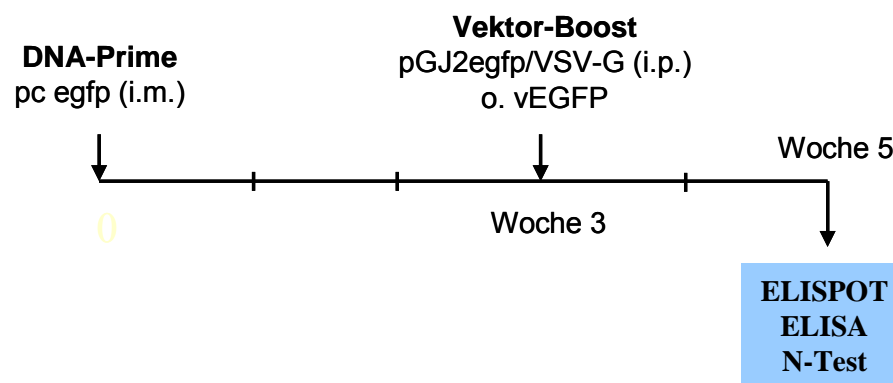


Abb. 20: Das Immunisierungsschema für die Analyse der EGFP-spezifischen Immunantwort nach dem Gentransfer mit lentiviralen Vektoren. Die Primärimmunisierung wurde mit $100 \mu\text{g}$ EGFP-kodierender Plasmid-DNA (i.m.) durchgeführt. Als Boosterimmunisierung wurde drei Wochen später mit dem EGFP-exprimierenden lentiviralen Vektor pGJ2egfp/VSV-G bzw. mit dem EGFP-exprimierenden rekombinanten Vacciniavirus vEGFP injiziert. Fünf Wochen nach Primärimmunisierung wurden IFN- γ -ELISpot-Assay, ELISA und Neutralisationstest durchgeführt um die zelluläre und humorale Immunantwort zu analysieren.

Für die Stimulation der T-Zellen ex vivo wurde ein EGFP-spezifisches Peptid benutzt, das in den Balb/c-Mäusen an H2-Kd MHC-Klasse-I-Moleküle bindet (Gambotto et al., 2000). Sowohl die Immunisierung mit dem lentiviralen Vektor als auch mit dem Vacciniavirus vEGFP induzierte eine starke EGFP-spezifische zelluläre Immunantwort (Abb. 21A). Die Analyse der Gag-spezifischen und VSV-G-Neutralisierenden Antikörper hat gezeigt, dass in den mit lentiviralen Vektoren immunisierten Mäusen auch eine humorale Immunantwort stark induziert wurde (Abb. 21B).

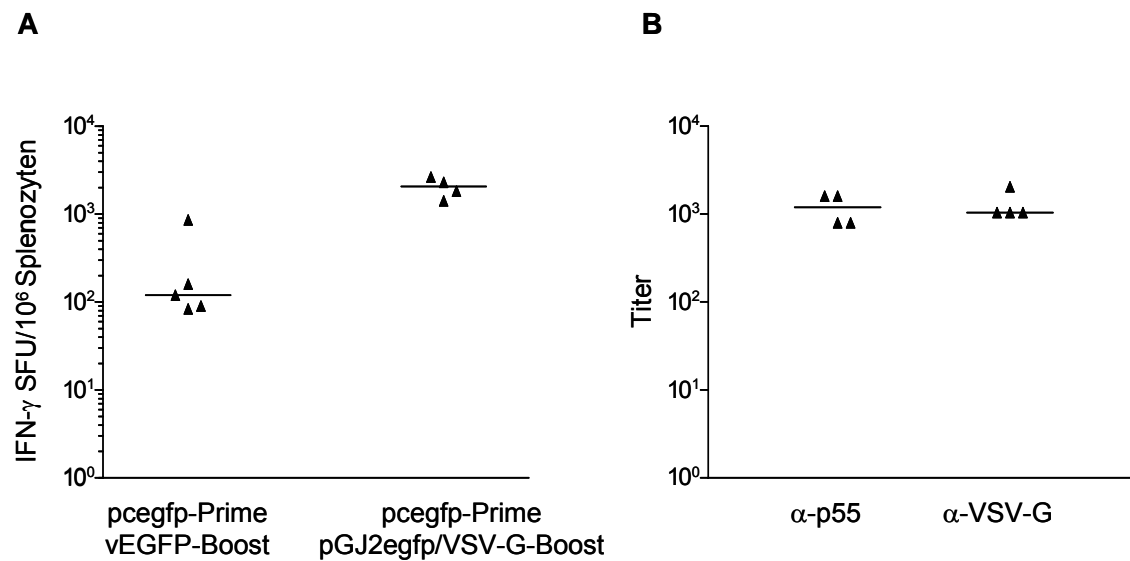


Abb. 21: (A) ELISpot-Analyse der EGFP-spezifischen T-Zellimmunantwort. Die Splenozyten wurden mit dem Peptid HYLSTQSAL (10 μ g/ml) für 40 Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 2,5 μ g/ml Concanavalin A stimuliert und als Negativkontrolle wurde zur Stimulation HIV-gp120-Peptid in der gleichen Konzentration verwendet. Die Freisetzung des IFN- γ als eine spezifische Antwort auf die Stimulation wurde analysiert. Die Abbildung zeigt die Zahl der Spot-bildenden Einheiten (Spot-Forming Units; SFU) in Kulturen, die mit dem EGFP-Peptid inkubiert wurden. (B) Nachweis der humoralen Immunantwort nach der Immunisierung mit DNA und lentiviralen Vektoren. Die Bildung der Gag-spezifischen (α -p55) und VSV-G-neutralisierenden (α -VSV-G) Antikörper wurde untersucht.

4.4 Herstellung von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren

4.3.1 Herstellung der lentiviralen Kassetten

Retrovirale Vektoren werden oft in der Gentherapie angewendet, bei der eine langfristige Expression des Transgens erwünscht ist. Außerdem wurde in den vorherigen Experimenten nachgewiesen, dass die Immunisierung mit replikationsinkompetenten lentiviralen Vektoren zu einer starken zellulären und humoralen Immunantwort führt. Da der Herstellungstiter relativ niedrig ist, ist die Anwendung der lentiviralen Vektoren als effizienter HIV-Vakzine begrenzt. Außerdem wurde festgestellt, dass die retroviralen Vektoren in vivo vom Komplement-System inaktiviert werden können, sofern sie mit Hilfe einer Verpackungszelllinie hergestellt wurden, die genetisch unterschiedlich von dem Therapieempfänger (allogenetisch) ist (DePolo et al., 2000; Pensiero et al., 1996).

Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektoren sollen die Vorteile der Vaccinia- und lentiviralen Vektorsysteme kombinieren, um einen effizienten Vakzinekandidat zu schaffen. Das Vacciniavirus kann in hohem Titer (bis 10^{10} pfu/ml) hergestellt werden und ist für eine große Insertkapazität (über 25 kB) bekannt. Damit ist das Vacciniavirus als Transfersystem des ganzen lentiviralen Vektorgenoms, zuzüglich des Hüllproteingens, gut geeignet.

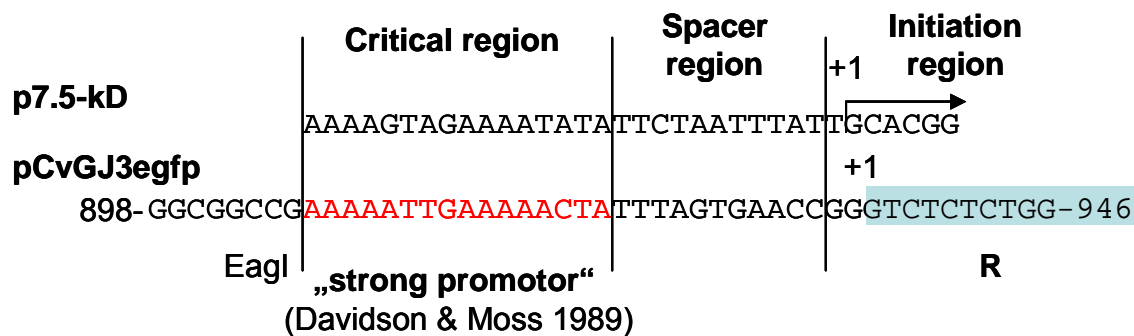


Abb. 22: Struktur des Vaccinia-Early-Promotors. Der modifizierte p7.5-Promotor wurde am Anfang der lentiviralen Vektor-Kassette mit Hilfe der PCR-Mutagenese eingebaut. Die Sequenz der kritischen Region wurde modifiziert um eine starke Expression zu erreichen. Die Sequenzen der „spacer“- und „initiation“-Region ist mit der Sequenz von HIV-1 HXB2 identisch.

Im ersten Schritt wurde überprüft, ob die Transkription-Terminationssequenz TTTTTNT der Vacciniogene innerhalb der lentiviralen Vektor-Kassette im pGJ3egfp-Plasmid enthalten war. Diese Sequenz liegt bei frühen Vacciniagenen ungefähr fünfzig Nukleotide vor dem Terminationspunkt der Transkription und könnte die Länge des erwünschten Transkripts beeinflussen.

Um die Transkription der lentiviralen Vektor-Kassette durch das Vacciniavirus zu ermöglichen, war es notwendig vor dem Transkriptionsstart einen Vaccinia-Promotor zu setzen. Durch die PCR-Mutagenese wurde ein modifizierter p7.5 Promotor vor der HIV-1-R-Region kloniert (Abb. 22). Das PCR Fragment (1640 bp), das gleichzeitig die Schnittstellen für die Enzyme XhoI und EagI enthielt, wurde mit den Restriktionsenzymen XhoI und ApaI in das Plasmid pBK-CMV ligiert. Dadurch entstand das 5'-Ende der für Vacciniavirus geeigneten Kassette.

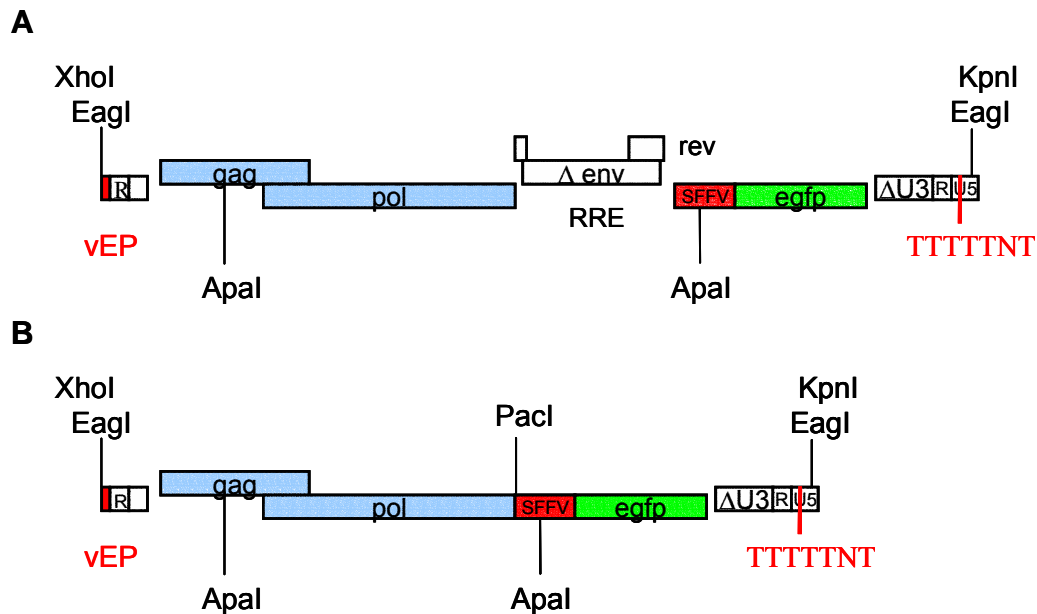


Abb. 23: Schematische Darstellung der lentiviralen Vektor-Kassetten für die Herstellung von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren. (A) pCvGJ3egfp-Konstrukt enthält die lentivirale Kasette, die mit dem Konstrukt pGJ3egfp identisch ist. Am 5'-Ende wurde der Vaccinia-Early-Promotor (vEP) und am 3'-Ende die Terminationssequenz (TTTTTNT) kloniert. (B) pCvGJ3egfp Δ env-Konstrukt mit einer Deletion von allen akzessorischen Genen und der tat- und rev-Genen.

An das 3'-Ende wurde im nächsten Schritt die Terminationssequenz TTTTTNT angehängt. Durch die PCR Mutagenese mit den apa3, term1, term2 und kpn-Primern wurde die Terminationssequenz hinter der 3'-R-Region und die EagI und KpnI Schnittstellen hinter die 3'-U5-Region gesetzt. Das PCR-Fragment (1095 bp) wurde nach dem Verdau mit den Enzymen ApaI und KpnI in das Plasmid pBK-CMV kloniert. Beide angefertigten Teile der lentiviralen Vektor-Kasette, 5'-Ende und 3'-Ende, wurden sequenziert um mögliche zusätzliche Mutationen auszuschließen. Anschließend wurde das 5'-Ende mit dem Vaccinia-Promotor, das 3'-Ende mit der Terminationssequenz und die Region zwischen beiden ApaI-Schnittstellen zusammenligiert und damit die ganze lentivirale Vektorkasette zusammengesetzt. Dadurch ist das Plasmid pCvGJ3egfp entstanden, das vom Aufbau her mit dem lentiviralen Vektor pGJ3egfp identisch ist und zusätzlich ein Vaccinia-Promotor und eine Terminationssequenz enthält (Abb. 23A).

Durch die Deletion des gesamten Env-Gens wurde das Konstrukt pCvGJ3egfp Δ env hergestellt (Abb. 23B). Dieses Konstrukt wurde zunächst nicht für die Klonierung ins Vaccinia-Genom verwendet, obwohl es alle notwendigen Sequenzen enthielt und die Gefahr der homologen Rekombination bei Vaccinia-Stamm vPE16 wesentlich verringert wurde.

4.3.2 Analyse der Genexpression aus der lentiviralen Kasette

Da die Klonierungen des Vaccinia-Promotors und der Terminator-Sequenz die Stabilität der lentiviralen Vektoren beeinflussen könnte, wurde vor der Insertion des Vektors in das Vaccinia-Genom die Expression der einzelnen Gene überprüft.

Es wurde untersucht, ob nach der Transfektion die Gag-Proteine (p55, p41 und p24) und die Reverse Transkriptase (RT) vollständig exprimiert und prozessiert werden. Die ganze lentivirale Kasette liegt unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Da zwischen dem CMV-Promoter und der R-Region von HIV noch der Vaccinia-Promotor liegt, konnte durch die Transfektion die Expression der HIV-Proteine überprüft werden, die Vektor-Partikel Herstellung ist jedoch nicht möglich. Dazu muss der Transkriptionsstart exakt am Anfang der R-Region sein, was nur nach der Transkription von Vaccinia-Promotor möglich wird.

Die 293T-Zellen wurden mit jeweils 6 µg pCvGJ3egfp oder pCvGJ3egfpΔenv transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden aus der transient-transfizierten Zellen die Proteinlysate für Western-Blot-Analyse hergestellt. Als Positivkontrolle dienten die Zelllysate der mit pGJ3egfp-transfizierten Zellen. Die Proteinlysate wurden auf einem 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit dem Anti-p24-Antikörper (1:100) konnten in den Zellen nach der Transfektion mit pCvGJ3egfp und pGJ3egfp die p55-, p50- und p41-Gag-Vorläuferproteine und p24-Kapsidprotein nachgewiesen werden. Bei den gleichen Proben wurde mit dem Anti-RT-Antikörper (1:1000) die Expression der Reversen Transkriptase festgestellt. Da das Plasmid pCvGJ3egfpΔenv nicht die Sequenz für das Rev-Protein enthält, konnte nach der Transfektion nur eine sehr schwache gag-Expression detektiert werden (Abb. 24). Die Expression von pol-Gen war unter dem nachweisbaren Limit.

Bei den transfizierten 293T-Zellen wurde außerdem die EGFP-Expression unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Transfektion mit den untersuchten Plasmiden führt in allen Fällen zu einer guten EGFP-Expression.

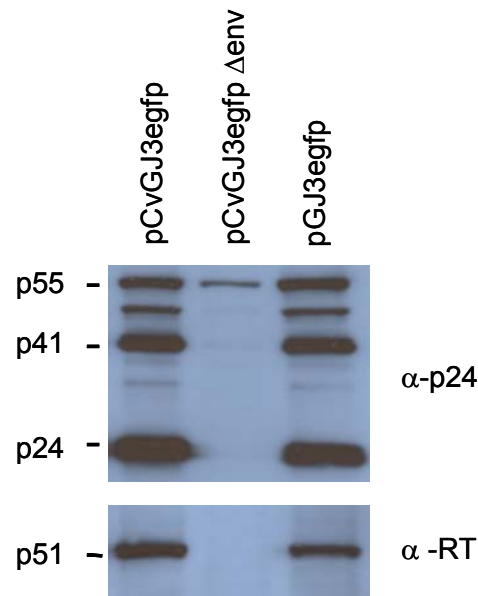


Abb. 24: Nachweis der Expression des gag- und pol- Gens mit Hilfe der Western-Blot-Analyse. Die 293T-Zellen wurden mit den Plasmiden, die für die Herstellung des Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektoren die lentivirale Kasette enthalten, transfiziert. Die Zellysate wurden auf 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gag-Proteine wurden mittels Anti-p24-Antikörper detektiert (1:100). Für den Nachweis der pol-Expression wurden Antikörper gegen die Reverse Transkriptase verwendet (α -RT).

Da die 5'-R-Region nicht genau am Transkriptionsstart des CMV-Promotors liegt, sondern sich erst hinter der Sequenz des eingebauten Vaccinia-Promotors befindet, konnte nicht überprüft werden, ob die hinzugefügten Sequenzen am Anfang und am Ende der lentiviralen Kasette die Verpackung und die Integration nach der Transduktion beeinflussen.

4.3.3 Konstruktion von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren

Für die Herstellung der Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren wurde die Erkenntnis genutzt, dass das Genom des Vaccinia-Stammes „Copenhagen“ nur eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI enthält. Diese Schnittstelle liegt in der Position 45477 nt und wurde häufig für die Klonierung des beliebigen Transgen verwendet (Pfleiderer et al., 1995; Scheiflinger et al., 1992).

Die lentivirale Kasette, die als Genom für die replikationsinkompetente HIV-1-Vektoren dienen sollte, wurde in den Vacciniavirusstamm Copenhagen (vCph wt) und vPE16 hineinkloniert. Der vPE16 Stamm enthält die Sequenz, die für HIV-1 gp160 kodiert, und ursprünglich aus dem Stamm Copenhagen hergestellt wurde. Für die Präparation der

Vaccinia-DNA wurde das Vacciniavirus in Sucrosegradient aufgereinigt. Die DNA wurde anschließend mit NotI-Restriktionsenzym über Nacht verdaut. Dadurch sind ein kürzeres (45,5 kB; V1) und ein längeres (146,2 kB; V2) Fragment entstanden.

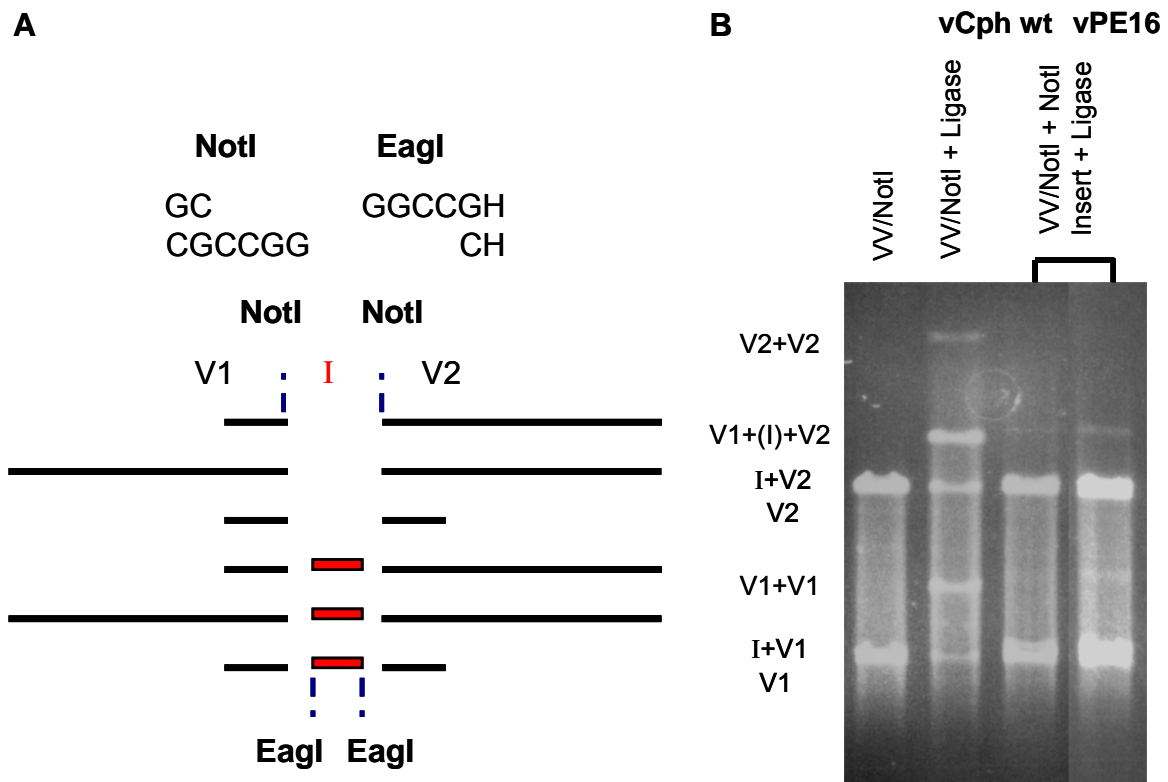


Abb. 25: Klonierungsstrategie für die Herstellung der Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren. (A) Die lentivirale Vektor-Kassette (I) wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym EagI aus dem Plasmid pCvGJ3egfp ausgeschnitten und in Vacciniavirus DNA, die mit dem Restriktionenzym NotI verdaut wurde, hineinkloniert. Die Religation von dem kürzeren (V1) und dem längeren (V2) Fragment der NotI-verdauten Vaccinia-DNA wurde durch die Zugabe des NotI-Enzyms vermieden. (B) Das Ergebnis des Verdauens und der Ligation wurde mittels Pulsfeld-gelelektrophorese analysiert. Die Fragmente wurden nach 18 Stunden auf dem 1 % Agarosegel in 0,5 % TBE-Puffer aufgetrennt (Feldstärke 6 V/cm, Winkel von 120 °C, Pulsdauer zwischen 3 und 30 sec). Als VV/NotI ist die NotI-verdauten Vaccinia-DNA gekennzeichnet.

Aus dem Plasmid pCvGJ3egfp wurde mittels des Restriktionsenzym EagI die lentivirale Vektor-Kassette ausgeschnitten (auf der Abb. 25 als I dargestellt) und mit den beiden Fragmenten der NotI-verdauten Vaccinia-DNA ligiert. Die Sequenzen der 5'-Überhänge, die nach dem Verdau mit EagI und NotI entstanden sind, sind gegenseitig komplementär. Die Stelle der Ligation konnte allerdings vom NotI-Enzym nicht mehr erkannt werden (Abb. 25A). Infolgedessen wurden die Ligation in Gegenwart von NotI-Enzym durchgeführt, um die Religation der beiden Vaccinia-DNA Fragmente ohne Insert zu vermeiden. So konnten

theoretisch nur drei Ligationsprodukte entstehen, die Insert trugen, und die, welche nur einen von den beiden Vaccinia-Genom-Fragmenten (V1 oder V2), bzw. ihre Kombination enthielten (im unteren Bildbereich der Abb. 25A). Die Entstehung der Ligationsprodukten wurde mittels Pulsfeldgelelektrophorese bestätigt (Abb. 25B).

Um Vacciniavirus aus der DNA herzustellen, wurden CV-1-Zellen mit Hühnerpockenvirus infiziert und anschließend mit rekombinanter DNA transfiziert (s. 3.2.2.6). Ein Vacciniavirus konnte dabei nur aus den Ligationsprodukten hergestellt werden, die das komplette Genom des Vacciniavirus enthielten, das heißt sowohl das kürzere als auch das längere Fragment nach dem NotI-Verdau. Die Zellen wurden für 4 bis 10 Tagen inkubiert. Die Überstände wurden aus den Näpfen, in welchen die Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, abgenommen und weiter mit PCR und Southern Blot analysiert. Insgesamt wurden 23 Klone von dem rekombinanten Vacciniavirus gewonnen, der ursprünglich aus dem Stamm Copenhagen hergestellt wurde (vTR1). Vier Klone wurden nach der Klonierung in vPE16 erhalten (vTR2).

4.3.4 Analyse der Vektorgenome der Vacciniavirus/HIV-Vektoren

Um festzustellen, welche Klone der Vacciniaviren die inserierte lentivirale Kasette tragen, wurde 48 Stunden nach der Infektion von CV-1-Zellen die Vacciniavirus-DNA präpariert und mittels PCR analysiert. Für die PCR-Analyse wurden zuerst die Primer gag5 und gag3 benutzt, die ein Fragment aus dem gag-Bereich des lentiviralen Vektors amplifizieren (Abb. 26A). Für 16 Klone des rekombinanten Vacciniavirus vTR1 und für 2 Klone des rekombinanten Vacciniavirus vTR2 wurde die PCR positiv. Diese Klone enthielten die lentivirale Vektor-Kasette im Vaccinia-Genom.

Anschließend wurde mit den Primern vCopNot5 und vCopNot3 analysiert (Abb. 26B), ob sich es bei den Klonen um ein Gemisch aus rekombinantem Vacciniavirus und Vacciniavirus WT handelt. Mit Hilfe dieser PCR-Analyse konnten außerdem die negativen Klone bestätigt werden. Diese Primer binden außerhalb der NotI-Schnittstelle an der Sequenz der Vaccinia-DNA. Falls das 334 bp-Fragment amplifiziert wurde, bedeutet das, dass der Klon kein Insert enthielt. Nach dieser PCR wurden acht Klone von dem Konstrukt vTR1 und ein Klon von vTR2 (mit Sternchen markiert) als Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektoren detektiert.

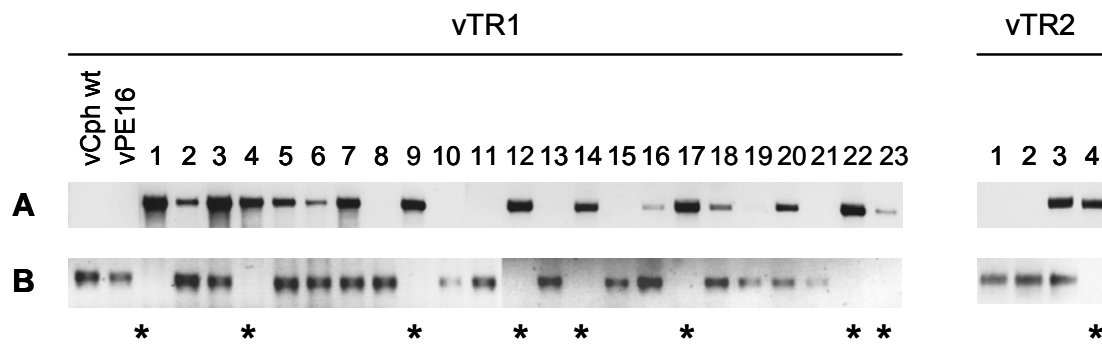


Abb. 26: Die PCR-Analyse der Klone von vTR1 und vTR2 Vacciniaviren. (A) Mit der Primerkombination (gag5 und gag3) wurde ein 671 bp-Fragment amplifiziert, das der Sequenz aus dem gag-Bereich des lentiviralen Inserts entsprach. (B) Das Primerpaar vCopNot5 und vCopNot3 wurde für die Detektion der negativen Klone verwendet. Damit wurden die Klone analysiert, die nur das Insert enthielten und nicht mit Wildtyp-Viren (vCph und vPE16) verunreinigt waren (mit Sternchen markiert).

Die virale DNA der PCR-positiven Klone wurde zusammen mit einer Plasmidkontrolle der lentiviralen Vektor-Genome im Southern-Blot-Verfahren mit ^{32}P markierten Sonden untersucht (Abb. 27). Als Sonde wurde das pCvGJ3egfp Plasmid mit dem Restriktionsenzym PvuII verdaut und radioaktiv markiert. Die virale DNA wurde 48 Stunden nach der Infektion mit Vacciniaviren präpariert und ebenfalls mit PvuII verdaut. Die DNA-Fragmente wurden mittels 1 % TBE-Agarosegel aufgetrennt und mit der radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Bei den Hybridvektoren waren Banden bei 3530, 2154 und 1044 bp zu erwarten. Die Plasmidkontrolle sollte Banden gleiche Größe zeigen. In der Kontrolle wurde außerdem eine Bande von 4809 bp erkannt, die der Sequenz des pC-Plasmids entsprach, die nicht in dem Vaccinia-Genom enthalten ist.

In dem Southern-Blot konnte die Integrität der analysierten Bereiche der Vektorgenome nachgewiesen werden. Die zu erwartenden Banden konnten gezeigt werden. In den DNA-Proben von vPE16 und vTR2 (Klon 4) wurde eine ca. 2,5 kB große Bande detektiert, die aus dem Bereich des erhaltenen env-Gens stammt.

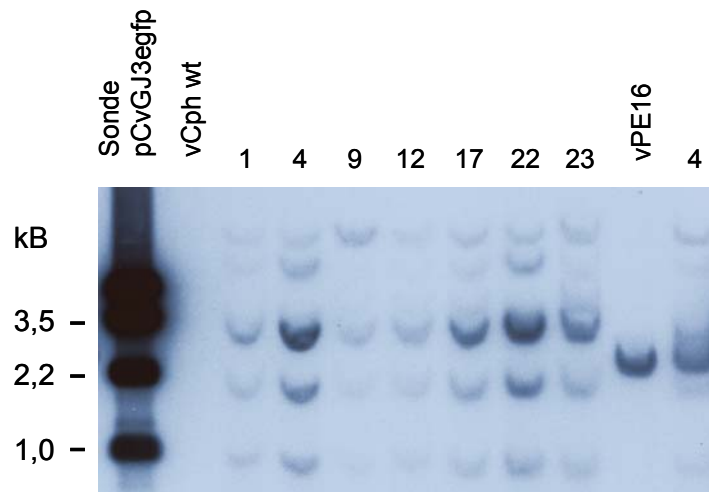


Abb. 27: Southern-Blot-Analyse der viralen Genome. 48 Stunden nach der Infektion von CV-1-Zellen wurde die chromosomale DNA präpariert und für die Analyse mit PvuII verdaut. Die DNA-Fragmente wurden mittels 1 % TBE-Agarosegels aufgetrennt. Der Blot wurde mit der Sonde über Nacht bei 68 °C hybridisiert. Als Sonde wurde pCvGJ3egfp Plasmid mit dem Restriktionsenzym PvuII verdaut und radioaktiv markiert.

4.3.4 Analyse der Genexpression der Vacciniavirus/HIV-Vektoren

Nachdem durch die Analyse des Vaccinia-Genoms festgestellt wurde, dass manche Klone die lentivirale Vektor-Kassette enthalten, wurde untersucht, ob der eingebaute Vaccinia-Promotor zur Expression der Gene des lentiviralen Vektors führte.

Die Expression und die richtige Prozessierung der Gag-Proteine (p55, p41 und p24) und des Env-Proteins wurden mit Hilfe des Western-Blots analysiert. Dazu wurden CV-1-Zellen mit dem Vacciniavirusüberstand infiziert. 48 Stunden nach der Infektion wurden die Proteinlysate für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Als Positivkontrolle für die Gag-Expression dienen die Zelllysate der mit pGJ3egfp-transfizierten Zellen. Die Proteinlysate wurden auf einem 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Mit dem Anti-p24-Antikörper (1:100) konnten in den Zellen nach der Infektion mit vTR1 und vTR2 keine oder sehr schwache Expression der Gag-Proteine nachgewiesen werden. Bei gleichen Proben wurde mit dem Antikörper 902 (1:100), die HIV-gp120-Proteinexpression in den vPE16 und vTR2 (Klon 4) infizierten Zellen festgestellt (Abb. 28).

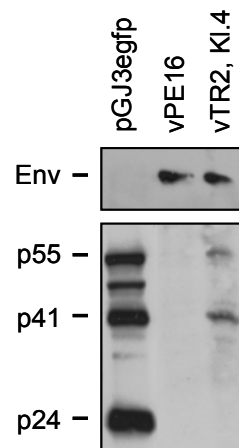


Abb. 28: Nachweis der Expression des Gag- und Env- Gens mit Hilfe der Western-Blot-Analyse. Die CV-1-Zellen wurden mit Vacciniavirus/HIV-Hybridvektor vTR2 (Klon 4) oder mit vPE16 als Negativkontrolle infiziert. Die Zelllysate wurden 48 Stunden nach der Infektion hergestellt und auf 13 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Gag-Proteine wurden mittels Anti-p24-Antikörper detektiert (1:100). Für den Nachweis der Env-Expression wurde der Antikörper 902 verwendet, der HIV-gp120-Protein erkennt.

4.3.5 Infektionsanalyse

Obwohl die Expression von lentiviralen Strukturbestandteilen nur mäßig nachgewiesen werden konnte, wurde es trotzdem überprüft, ob die Infektion mit dem Vaccinia/HIV-Hybridvektor zu der Prozessierung der lentiviralen Vektoren führt. Die 293T-Zellen wurden zuerst mit dem Plasmid pczVSV-G transient transfiziert und 24 Stunden später mit dem Hybridvektor vTR1 infiziert. Mit dem Hybridvektor vTR2 wurden die nicht transfizierten Zellen infiziert, da das Vacciniavirus selbst die HIV-Env-Proteine exprimiert. Nach der Infektion wurde das Vacciniavirus in die Zelle aufgenommen, wobei im Zytoplasma die Transkription der früheren Gene stattfand. Gleichzeitig sollte die RNA des lentiviralen Vektors transkribiert und die lentiviralen Genprodukte exprimiert werden (Abb. 29). 24 Stunden später wurden die Überstände geerntet und zweimal mit 0,22 μm -Filter filtriert. Dadurch wurden die früher entstandenen Vacciniaviren entfernt. Mit dem Überstand wurden anschließend 293T-Zellen oder die CD4-positiven A3.01 transduziert.

Vacciniavirus/HIV-Hybridvektor

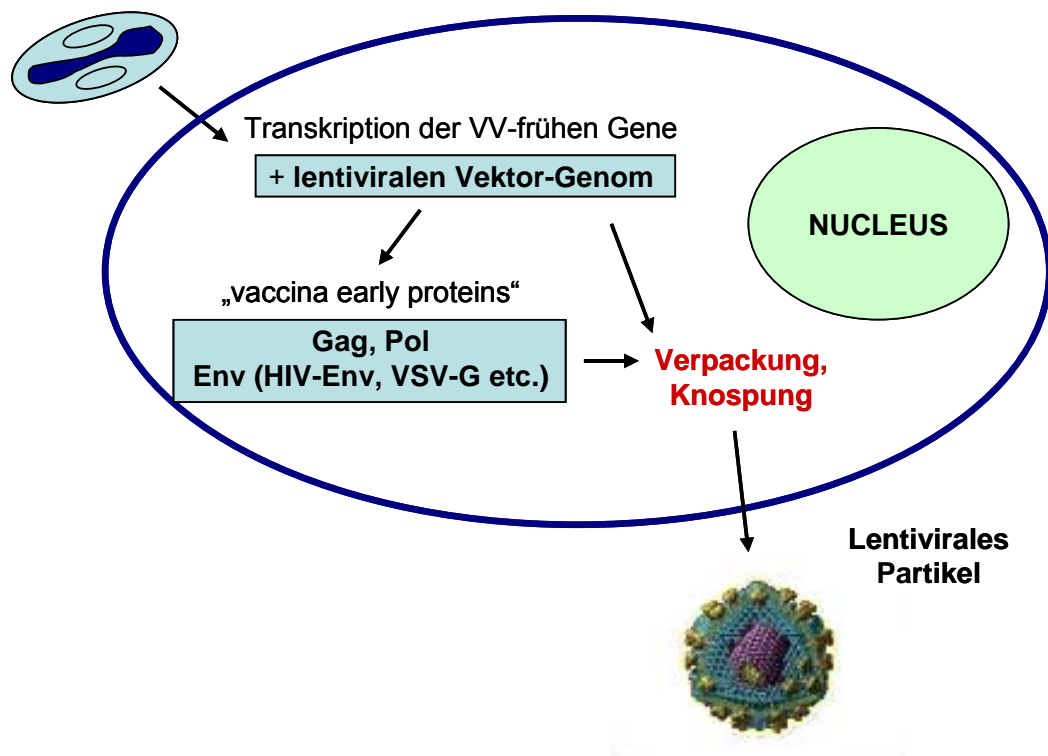


Abb. 29: Transduktionsmechanismus der Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren. Nach der Infektion der Zelle mit Vaccinia/HIV-Hybridvektor werden die Strukturproteine und genomische RNA des lentiviralen Vektors im Zytoplasma prozessiert. Die entstandenen lentiviralen Partikel können anschließend weitere Zellen transduzieren und zu einer stabilen Expression führen.

Falls nach Infektion mit Vacciniavirus die Partikel entstehen, sollten sie andere Zellen transduzieren, in denen das EGFP-Markergen stabil exprimiert wird. 72 Stunden nach der Transduktion konnte allerdings keine EGFP-Expression nachgewiesen werden. Auch nach der Wiederholung des Experiments und der Optimierung der Infektionsbedingungen konnte die Bildung der infektiösen lentiviralen Vektoren nicht festgestellt werden.

5 Diskussion

5.1 Die Herstellung und In-Vitro-Infektionsanalyse von HIV-1-Vakzine-Vektoren

Obwohl die Sequenz von HIV-1 schon mehr als 20 Jahre bekannt ist (Ratner et al., 1985), hat die Suche nach geeignetem Impfstoff erst in den letzten Jahren Erfolge, wenngleich nur partielle, gefeiert. HIV besitzt mehrere einzigartige Fähigkeiten, die die Herstellung von einem wirksamen Impfstoff schwierig machen. Da die relevante Epitope von den Membranglykoproteinen sehr variabel sind und durch starke Glykosylierung in der inneren Struktur des Proteins versteckt bleiben (Kwong et al., 1998), bieten die gebildeten neutralisierenden Antikörper kaum einen Schutz gegen HIV-Infektion. Auf der anderen Seite weisen zahlreiche Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre darauf hin, dass bei HIV-Infizierten die zelluläre Immunantwort eine entscheidende Schutzfunktion hat. Insbesondere CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) spielen dabei eine wesentliche Rolle (Greenough et al., 1997; Gruters et al., 2002; Schmitz et al., 1999).

Sowohl die Strukturproteine Gag und Env als auch die Enzyme, regulatorische und akzessorische Proteine sind Ziele der antiviralen CTL-Antwort. Die zytotoxische Reaktion in den Infizierten ist allerdings am stärksten gegen Gag. Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) scheinen für die Kontrolle der Viruslast sowohl während der akuten Infektion (Borrow et al., 1994; Koup et al., 1994) als auch während der asymptomatischen Phase der Infektion (Klein et al., 1995; Moss et al., 1995) wichtig zu sein. Obwohl die HIV-spezifische CTL-Immunantwort mit der Krankheitsprogression korreliert, wurde eine sehr starke CTL-Antwort ebenfalls bei Personen mit der asymptomatischen chronischen Infektion beobachtet (Harrer et al., 1996; Rinaldo et al., 1995). Interessant sind auch Untersuchungen von Kohorten häufig exponierter seronegativer Prostituierten in Afrika, die an eine schützende Funktion von Gag-spezifischer CTL-Antwort andeuten (Clerici and Shearer, 1996). Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem eine robuste Gag-spezifische CTL-Antwort eine zentrale Rolle für die Kontrolle der HIV-Infektion spielt (Brander and Walker, 1999; Goulder et al., 1999) und es besteht im Rahmen der HIV-Vakzineforschung Übereinstimmung darin, dass die Immunantwort, die gegen Gag-Protein gerichtet ist, eine wichtige Komponente der effizienten HIV-Vakzine ist. Dafür spricht auch der Fakt, dass zwischen den verschiedenen HIV-Stämmen und Subtypen Kapsid- und Matrix-Strukturproteine (Gag) von HIV genetisch am besten konserviert sind (Betts et al., 1997; Durali et al., 1998).

Um CD8 T-Zell-Immunantwort zu induzieren, muss das Antigen (virale Proteine) innerhalb der Zellen exprimiert werden, weil diese Proteine Zugang zu den Signalwegen für die Verarbeitung und Präsentation durch die MHC-Klasse-I haben. In der Vergangenheit waren es die Lebendimpfstoffe, attenuierte, infektiöse Viren, die am besten die spezifische T-Zell-Immunantwort induziert haben. Diese Vakzinierungsstrategie ist allerdings bei den HI-Viren als zu riskant angesehen (Baba et al., 1995; Baba et al., 1999). Also nur die Impfstoffe, die Teile von dem Pathogen exprimieren oder als replikationsdefiziente Viren Pathogen imitieren, sind bevorzugte Kandidaten für AIDS-Impfstoffe. Um so einen Effekt zu erzeugen kommen eigentlich nur die DNA- Impfstoffe und lebende Virusvektoren in Frage.

Auf Basis dieser Erkenntnisse wurde in dieser Arbeit die Induktion einer Gag-spezifischen Immunantwort mittels der Vakzinierung mit replikationsinkompetentem lentiviralem Vektor für das Hauptziel gesetzt. Diese Vektoren sollen HI-Viren imitieren und gleichzeitig verstärkt Gag-Protein exprimieren.

Für die Herstellung der HIV-1 Vakzine-Vektoren wurde von dem Plasmid pGJ2egfp bzw. pGJ3lacZ ausgegangen (Jarmy et al., 2001). Da HIV ein sehr hohes Pathogenitätspotential hat, müssen bei der Herstellung der auf HIV basierenden Vektorsysteme wichtige Sicherheitsaspekte beachtet werden (Verma and Somia, 1997). Die ursprüngliche 5'-U3-Region ist in diesem Vektor durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor ersetzt. Durch den Austausch der ursprünglichen 5'-U3-Region mit einem konstitutiv aktiven Promotor (CMV), können tat-unabhängige Konstrukte hergestellt werden (Dull et al., 1998; Kim et al., 1998b). Aus dem HIV-Genom sind außerdem *env* und akzessorische Gene *vpu* und *nef*, sowie die Promotorsequenzen aus der 3'-U3-Region deletiert, was zu einer erhöhten Sicherheit führt (Zufferey et al., 1998). Da durch die eingeführten Deletionen *env* und die wichtigen Virulenzfaktoren aus dem Vektorkonstrukt entfernt worden sind, wurde die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination deutlich reduziert und deswegen auf die Trennung der Vektor- und Gag-Pol-Expressionskonstrukte verzichtet. Damit wurde das oben beschriebene Dreiplasmidsystem (Vektor-, Gag-Pol- und Env-Expressionskonstrukt) auf zwei Komponenten reduziert.

Da nach der Infektion/Transduktion von der Zelle kein Vektorbestandteil exprimiert werden kann, wurde eine gag-Expressionskassette unter die Kontrolle eines inneren Spleen Focus Forming Virus (SFFV)-Promotors in den HIV-1-Vektor kloniert. Damit kann die Expression der Gag-Proteine und dadurch die Induktion der Gag-spezifischen CTL-Antwort gewährleistet werden. Die Expression von HIV-Strukturgenen in rekombinanten Vektoren ist allerdings sehr schwach, da sie stark von der Präsenz des Rev-Proteins abhängig ist (Nasioulas et al.,

1994). HIV-Rev-Protein bindet an HIV-kodierte mRNAs für Strukturproteine und ist damit für den mRNA-Transport aus dem Zellkern verantwortlich (Pollard and Malim, 1998). Rev stabilisiert gleichzeitig das RNA-Transkript, das relativ häufig die Nukleotidkombination AU und destabilisierende Motive AUUUA (auch inhibierende Sequenzen (INS) genannt) enthält (Maldarelli et al., 1991; Nasioulas et al., 1994). Die Entfernung von diesen Sequenzen führt dann zu der Rev-unabhängige Expression (Kotsopoulou et al., 2000). Um die Expression und gleichzeitig die Immunogenität noch weiter zu verbessern, wurden in den Vakzinekonstrukten die Kodon-optimierte HIV-Gene angesetzt (Andre et al., 1998; Casimiro et al., 2003; zur Megede et al., 2000). Hintergrund der Kodonoptimierung ist die Beobachtung, dass verschiedene Lebewesen und Viren bestimmte Kodons für ein und dieselbe Aminosäure unterschiedlich häufig verwenden. So wird in menschlichen RNAs für die Kodierung der Aminosäure Glycin meist das Triplet GGC verwendet, während im HIV-Gag-Gen für die gleiche Aminosäure meist GGA verwendet wird (Haas et al., 1996).

Bei dem Entwurf der Sequenz für das gag-Gen in lentiviraler Expressionskassette wurde von der Sequenz des HIV-1 HXB2 Stammes ausgegangen. Die Kodons in der HIV-1-gag-Sequenz wurden nach der typischen Verwendungshäufigkeit des Kodons bei der Expression im humanen Genom ersetzt. Insgesamt wurden 131 Kodons (36 %) in der Sequenz geändert. Der G + C Gehalt wurde dadurch auf 53,2 % erhöht, was dem G + C Gehalt der hochexprimierten humanen Gene entspricht. Da die Studien bei den Patienten vor allem die Bedeutung einer Immunantwort gegen p24- und p17-Proteine gezeigt haben (Gruters et al., 2002; Zhang et al., 2001a), enthält auch die Expressionkassette in dem HIV-1-Vektor synthetische Sequenzen, die für HIV-p24 und p17 kodieren. Die Infektion mit so hergestellten Vektoren hat Rev-unabhängige Expression von p17/p24 Polyprotein gezeigt, während dessen nach der Infektion mit Kontrollviren nur schwache Präsenz von p24 nachgewiesen werden konnte. Es deutet darauf hin, dass p24, das im Kapsid enthalten ist, auch nach mehreren Tagen in den Zellen nachweisbar ist. Das führt zu der Annahme, dass replikationsdefiziente HIV-Vektoren unabhängig von der hgag-Expression, zu der Induktion von Gag/p24-spezifischer Immunantwort führen können.

Lentivirale Vektoren sind zurzeit sehr häufig in der Gentherapie angewendet, da sie die einzigartige Fähigkeit besitzen, sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen zu infizieren. Vor allem die Vektoren, deren Genom die Sequenzen von HI-Virus enthalten, sind in vitro und in vivo in mehreren Situationen verwendet worden. Es wird allgemein angenommen, dass die Effizienz des Gentransfers der entscheidende Punkt bei der Etablierung erfolgreicher

Behandlungsstrategien ist. Neben der Wahl des Virussystems (Onkoretrovirus oder Lentivirus) kann auch die Präsenz der akzessorischen Proteine die Infektiosität des Vektors stark beeinflussen (Chinnasamy et al., 2000). In dieser Arbeit wurde ein lentiviraler Vektor benutzt, der die akzessorischen Proteingene vpr und vif enthält. Dabei wurde optimale Sicherheit mit optimaler Transduktionseffizienz kombiniert. Die Präsenz von manchen akzessorischen Proteinen erhöht außerdem die Immunogenität des Vektors (Camaur and Trono, 1996; Sato et al., 1996).

Tierexperimente sind häufig für die vorklinische Prüfung von Gentherapie-Protokollen erforderlich. Es ist deshalb notwendig, die Wirtsspezifität von Vektoren zu untersuchen, und damit zu überprüfen, welches Tiermodell für die In-Vivo-Experimente in Frage käme, bzw. welches Tiermodell nicht geeignet wäre. Deshalb wurden neben den humanen Zelllinien auch die von Mäusen und von Affen transduziert. Da sich in der Virologie die Baumwollratte als Tiermodell etabliert hat (Blanco et al., 2004; Langley et al., 1998), wurden auch Fibroblasten von *Sigmodon fulviventer* (BCRT) und *Sigmodon hispidus* (CCRT) in die Infektionsanalyse einbezogen. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass der VSV-G pseudotypisierte HIV-1-Vektor pGJ2 erfolgreich für die Infektion aller getesteten Zellarten eingesetzt werden kann. Dabei wurde festgestellt, dass es nur geringe Unterschiede in der Transduktionseffizienz zwischen den humanen und Mauszellen gibt. Interessanterweise wurden getestete Affenzelllinien ca 5-fach weniger effizient transduziert als menschliche Zellen. Diese Ergebnisse korrelieren zum Teil nicht mit den Ergebnissen von manchen Autoren, die gezeigt haben, dass HIV-Vektoren einige nichthumane Zelllinien, einschließlich Maus- und Ratte-Zellen, weniger effizient infizieren können, was als Problem für die vorklinischen Studien angesehen wurde. In den Studien wurden allerdings HIV-Vektoren verwendet, die eine Expressionskassette unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthalten haben. Gerade dies wurde als Grund für die anscheinend niedrige Transduktionsrate bei Nagerzellen genannt, da eine niedrigere Expression von CMV-Promotor in Maus- und Rattenzellen festgestellt wurde (Ikeda et al., 2002). Unser HIV-Vektor enthält allerdings einen inneren SFFV-Promotor, der, wie es gezeigt wurde, auch in den Mauszellen stark aktiv ist. Die Daten demonstrieren, dass die In-vivo-Experimente mit dem Vektor pGJ2 von der Infizierbarkeit her sehr gut in dem Mausmodell durchgeführt werden können.

Die effiziente Transduktion von zahlreichen Zelllinien deutet zwar darauf hin, dass pGJ2-Vektoren für den Gentransfer in Zellen von unterschiedlichen Wirten und Herkunft eingesetzt werden können, die Effizienz des In-vivo-Einsatzes kann damit allerdings nicht garantiert

werden. Die lentivirale Vektoren haben die Fähigkeit auch die ruhenden (teilungsunfähigen) Zellen zu transduzieren, was als Vorteil bei der Gentherapie angesehen wird. Um diese Fähigkeiten zu überprüfen und damit gleichzeitig die Argumente für den Einsatz von pGJ2-Vektoren *in vivo* zu bekräftigen, wurde der VSV-G pseudotypisierte pGJ2-Vektor für die Infektion von nicht stimulierten humanen PBMCs und von Mausmilzzellen verwendet. Die genetische Modifikation der T-Lymphozyten bietet ein großes Potential für die Therapie des Krebses, der T-Zellerkrankungen und der Immundefekte. Obwohl die retroviralen Vektoren, die auf der Basis der MoMuL-Virus (Moloney murine leukemia virus) hergestellt worden sind, erfolgreich für die Transduktion vieler Zelltypen eingesetzt wurden, sind sie für die Transduktion der primären Lymphozyten nicht geeignet. Um dieses Problem zu lösen, müssen die Lymphozyten *in vitro* stimuliert werden. Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl die humanen PBMC als auch die Maus-Milzzellen mit dem VSV-G-pseudotypisierten HIV-1-lentiviralen Vektor pGJ2egfp transduzierbar sind. Die Transduktionseffizienz liegt bei 7-9 % bei einer MOI von 500. Dabei wurde kein deutlicher Unterschied der Infektionseffizienz bei den nichtstimulierten und stimulierten Zellen festgestellt. Diese Ergebnisse korrelieren zum Teil mit den Daten von Chinnasamy et al. (2000), die gezeigt haben, dass die Transduktionseffizienz von T-Lymphozyten vor allem von der Präsenz von akzessorischen Proteinen abhängt. Die HIV-Vektoren, die kein Vpr-Protein enthalten, haben um 50% verringerte Transduktionseffizienz gezeigt. Es ist allerdings zu erwähnen, dass bei bestimmten Zellen, wie z.B. bei Neuronen von der Ratte, kein Effekt von akzessorischen Proteinen bei der Transduktionseffizienz festgestellt wurde. Die Gründe, warum zusätzliche Proteine für die effiziente Transduktion von einigen Zelltypen und nicht von anderen entbehrlich sind, sind nicht völlig bekannt. Humane T-Lymphozyten sind ein natürlicher Wirt für das HIV, und es ist wahrscheinlich, dass das Virus für die Replikation in diesen Zellen angepasst ist. Es ist deshalb nicht überraschend, dass die Anwesenheit zusätzlicher Proteine den lentiviralen Gentransfer verbessert. Es wurde gezeigt, dass Vif, ein spätes HIV-1-Genprodukt, für die produktive HIV-1-Infektion in den T-Lymphozyten essenziell ist (Inubushi and Adachi, 1999). Obwohl produktive Infektion nicht eine Eigenschaft von lentiviralen Vektoren ist, ist es möglich, dass eine notwendige virale Funktion, die auch mit dem Gentransfer assoziiert ist, weniger effizient bei der Absenz von Vif-Protein verläuft (Chinnasamy et al., 2000; Costello et al., 2000). Die Präsenz des größten von den akzessorischen Proteinen, Nef, kann ebenfalls die Infizierbarkeit von T-Zellen beeinflussen. Die Unterschiede sollen vor allem bei der Infektion von stimulierten und nicht stimulierten T-Zellen markant sein. Obwohl der lentivirale Vektor pGJ2egfp kein nef-Gen enthält, wurden

keine Unterschiede in der Infektion von nichtstimulierten und stimulierten PBMCs festgestellt. Die Effizienz der Infektion von T-Lymphozyten ist mit pGJ2-Vektoren allerdings etwas niedriger als unterschiedliche Autoren zeigen. Unsere Ergebnisse lassen sich aber nur schwer mit publizierten Daten vergleichen, da unterschiedliche Vektoren, MOI und Methoden, die die Transduktionseffizienz optimieren sollen, angewendet sind. Viele Autoren berichten, dass die Infektionseffizienz durch die Zugabe von kationischen Polymer Polybrene und durch zusätzliche Zentrifugation erhöht werden kann (Costello et al., 2000; Sharma et al., 1996). Wichtig zu erwähnen sind auch Faktoren, wie Art der Stimulation oder die unterschiedliche Aufnahmefähigkeiten von Zellen der verschiedenen Individuen (Costello et al., 2000; Pollok et al., 1998). Es wurde aber trotzdem deutlich, dass die VSV-G-pseudotypisierten pGJ2-Vektoren auch primäre Lymphozyten infizieren können.

Weiterer limitierende Faktor, der für die Anwendung der retroviralen Vektoren eine große Rolle spielt, ist ausreichender Titer, der vor allem bei den In-Vivo-Experimenten über den Erfolg der Gentherapie entscheidet. Schon in den Siebzigerjahren wurde beobachtet, dass Nukleokapside verschiedener Viren in der Lage sind, Hüllproteine anderer Viren und sogar Hüllproteine von Viren aus fremden Virusfamilien in ihre Viruspartikel einzubauen (Zavada, 1972). Dieses als Pseudotypisierung bezeichnete Phänomen wird auch bei der Herstellung viraler Vektorsysteme verwendet. Das zur Pseudotypisierung verwendete Hüllprotein bestimmt dann die Stabilität der hergestellten Pseudotypen, was für die Konzentrierung der Vektoren eine wichtige Rolle spielt. Retroviralen Vektoren werden meistens mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert (Bartz and Vodicka, 1997; Burns et al., 1993). Die mit VSV-G-Hüllprotein pseudotypisierten Partikel sind sehr stabil und lassen sich durch Zentrifugation ohne großen Aktivitätsverlust konzentrieren (Burns et al., 1993). Für unsere Experimente wurden die Vektoren bis zu 30-fach konzentriert und damit der Titer 2 bis 4×10^7 IU/ml erreicht. Burns et al. (1993) haben nach diesem Verfahren ein Titer über 10^8 IU/ml erreicht, was bis zu 2000-fach konzentriertem Virusüberstand entspricht. Die Herstellung einer so hohen Virustiter nach dieser Methode ist allerdings sehr aufwendig und für die Praxis fast nicht anwendbar. Eine Alternative ist Verwendung einer Verpackungszelllinie, die direkt zu Herstellung eines Virustiters 10^7 IU/ml führen kann (Arai et al., 1998; Farson et al., 2001).

5.2 Direkter Nachweis der Expression des Transgens in vivo

Eine Voraussetzung für die Anwendung der lentiviralen Vektoren für die Immunisierung ist eine In-vivo-Expression des Transgens nachzuweisen. Nachdem gezeigt wurde, dass HIV-Vektoren sehr effizient sowohl unterschiedliche Zelllinien als auch primäre Zellen verschiedener Spezies infizieren können, wurde die direkte Transgenexpression in vivo getestet. Für diese Zwecke eignet sich am besten der pGJ2-Vektor mit Luciferase-Expressionskassette. Luciferase wird als Reportergen allgemein in der Zellbiologie verwendet, da die Reporteraktivität direkt nach der Translation messbar ist (de Wet et al., 1987). Die Nachweismethoden für die Expression sind sehr empfindlich, weil die Lichtproduktion die höchste Quant-Effizienz hat, die für chemilumineszente Reaktionen bekannt ist. Allgemein ist die Luciferase-Messung 100-fach empfindlicher als die Messung der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) und es ist möglich schon 10^{-20} mol von Luciferase zu detektieren (Alam and Cook, 1990). Die Vorteile der Luciferase als Reportergen wurden allerdings für In-vivo-Experimente erst mit der Entwicklung des In-vivo-Imaging deutlich (Jeon et al., 2006; Welsh and Kay, 2005; Wilber et al., 2005).

Für die herkömmliche Methode wurde es notwendig die Proteinlysate von dem Gewebe herzustellen, in der Luciferase-Expression vermutet wird. Obwohl eine relativ hohe Menge von dem lentiviralen Vektor injiziert wurde, ist es notwendig, dass die transduzierten Zellen möglichst auf einem Ort des Organismus lokalisiert bleiben. Die systemische Applikation würde zur Infektion von vielen Zellen führen, die sich durch den ganzen Organismus verbreiten würden. So applizierte Vektoren würden zwar eine Immunantwort erzeugen können, der direkte Nachweis der Transgen-Expression wäre allerdings unmöglich. Deshalb wurden die lentiviralen Vektoren intramuskulär oder subkutan injiziert. Sowohl subkutan als auch intramuskulär konnte die Luciferaseexpression nachgewiesen werden. Die besten Ergebnisse wurden 72 Stunden nach der Infektion bei der intramuskulären Gabe festgestellt. Der Unterschied zwischen der i.m. und s.c. Applikation kann wahrscheinlich durch die schwierige Lyse der Haut und des Subkutangewebes verursacht werden. Diese Ergebnisse zeigen gleichzeitig, dass lentiviraler Gentransfer eine bessere Alternative zu der DNA-Immunisierung sein kann, wo die Vakzine-Effizienz vor allem bei größeren Versuchstieren und bei Menschen limitiert ist. Die Immunantwort wird nach der DNA-Vakzinierung durch die Expression des Antigens in den dendritischen Zellen in den nicht lymphoiden Zellen induziert (Akbari et al., 1999; Cui, 2005; Donnelly et al., 2000). Selbst die vielfache Immunisierung von hohen DNA-Dosen erreicht häufig nur eine bescheidene Immunantwort

(Liu et al., 1997). Dupuis et al. (2000) konnten zeigen, dass diese Limitierung vor allem durch die Aufnahmefähigkeiten der Zellen für die DNA und damit durch die geringe Expressionslevel verursacht sind.

5.3 Immunisierung mit lentiviralen HIV-1-Vektoren

Mehrere HIV-Impfstoffkandidaten werden derzeit in klinischen Testreihen untersucht. Anstelle der klassischen Tot- und Lebendimpfstoffe werden verschiedene neue Formen der Immunisierung, unter anderem Protein- und DNA-Impfstoffe sowie virale und bakterielle Vektoren, erprobt. Es gibt allerdings bisher weder experimentelle noch klinische Hinweise darauf, dass Impfstoffe die HIV-Infektion wirklich verhindern können. Studien im Affenmodell belegen jedoch, dass eine prophylaktische Immunisierung den klinischen Verlauf einer Infektion günstig beeinflussen kann. Eine Impfstrategie, bei der die Infektion zwar nicht verhindert, jedoch die Krankheit hinausgezögert, die Viruslast verringert und damit das Transmissionsrisiko reduziert würde, wäre epidemiologisch sinnvoll und könnte möglicherweise realisiert werden.

Eine optimale HIV-Vakzine sollte in der Lage sein, dauerhafte humorale und vor allem zelluläre Immunantworten zu induzieren. Dazu eignen sich eigentlich nur die DNA-Impfstoffe und lebende Virusvektoren (Jasoy and Wagner, 2002). Eine Reihe von rekombinanten Viren wurde als potenzielle Impfstoffe gegen HIV untersucht. Immunogenität von retroviralen und lentiviralen Vektoren wurde als ein Haupthindernis für deren Applikation in der Gentherapie betrachtet worden. Das kann allerdings als Vorteil für den Ansatz von diesen Vektoren als Impfstoffkandidaten gegen HIV-Infektion und AIDS ausgenutzt werden.

Um eine starke spezifische Immunantwort zu erreichen, ist es besonders wichtig ein richtiges Immunisierungsschema zu wählen. Bisherige Untersuchungen zeigen, dass die größten Impferfolge mit den so genannten Prime-Boost-Verfahren erreicht werden können (Amara et al., 2001; Robinson, 2003; Robinson et al., 2000). Zweck des Verfahrens ist es, die Nachteile einer alleinigen Immunisierung mit einer Kombination aus einzelnen Komponenten auszugleichen. Dabei werden Immunogene, die neutralisierende Antikörper induzieren können (zum Beispiel Proteinimpfstoffe), gerne mit Vakzinekandidaten kombiniert, die besonders gut eine zelluläre Immunantwort generieren (z. B. virale Vektorimpfstoffe) (Malkevitch et al., 2003). Eine Prime-Boost-Strategie ist beim Einsatz von viralen Vektoren

zwingend erforderlich, da bereits nach der erstmaligen Anwendung der Vektoren das Immunsystem massiv auf das Trägervirus reagiert. Bei einer zweiten Applikation verringert sich die Wirksamkeit rapide, da die Immunantwort die transportierten HIV-Proteine überlagert. In diesem Fall handelt es sich allerdings bei dem Trägervirus um HIV-Vektor. Die Reaktion des Immunsystems bei der zweiten Applikation des Vektors würde deshalb als Vorteil angesehen.

Zuerst wurde die Immunisierung nach einem Protokoll durchgeführt, in dem als Primärimmunisierung die Vektoren appliziert wurden. Dabei wurden die Vektoren mit der EGFP-Expressionskassette als Negativkontrolle benutzt, um die Unterschiede zwischen der Immunantwort, die durch die Transgenexpression (synthetisches Gag - hgag) und der von Virus-enthaltenem Kapsid-Protein (p24) hervorgerufen wird, festzustellen. Sehr erfolgreich wurde inzwischen ein Prime-Boost-Verfahren, bei dem die DNA-Immunisierung mit der Applikation von viralen Vektoren kombiniert wird. Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass durch die Kombination der beiden Konstrukte eine stärkere CTL-Antwort erzeugt werden kann als mit nur einem der beiden Impfstoffkandidaten (Amara et al., 2002a; Amara et al., 2001). Deshalb wurde neben der Boosterimmunisierung mit dem gleichen lentiviralen Vektor auch die hgag-kodierende Plasmid-DNA appliziert.

Die Analyse der Gag-spezifischen T-Zellimmunantwort wurde mit ELISpot durchgeführt (Miyahira et al., 1995). ELISpot wurde mittlerweile die Methode der Wahl für die Analyse der HIV-Impfstoff-induzierten zellulären Immunantwort in zahlreichen klinischen Studien (Mwau et al., 2002). Die frisch isolierten Milzzellen wurden mit dem Peptid AMQMLKETI restimuliert (Doe and Walker, 1996). Es konnte bei den restimulierten Zellen keine IFN- γ -Freisetzung nachgewiesen werden. Die Analyse der Gag-spezifischen Antikörper hat allerdings gezeigt, dass Anti-p55-Antikörper vorhanden sind. Die zweimalige Gabe der lentiviralen Vektoren verstärkte nur diese Immunantwort. Der gleiche Titer von VSV-G-neutralisierenden Antikörper bei den Gruppen, die entweder zweimal mit den lentiviralen Vektoren oder einmal mit dem Vektor und einmal mit DNA immunisiert wurden, bestätigt, dass bei den Mäusen gleiche Virustiter von pGJ2egfp/VSV-G- und pGJ2hgag/VSV-G-Vektoren appliziert wurden. Die Titer von neutralisierenden Antikörpern unterscheiden sich zwischen den Versuchsgruppen jedoch kaum. Dieser Fakt signalisiert, dass VSV-G als Hüllprotein so stark immunogen ist, dass die Boosterimmunisierung völlig durch die humorale Immunantwort neutralisiert werden kann. Das könnte dann auch die Ursache für die fehlende zelluläre Immunantwort sein. Ein ähnliches Problem mit der Vektor-spezifischen Immunantwort wurde bei den replikationsdefekten Adenoviren beschrieben. Die viermalige

Immunisierung mit dem Adenovirus konnte nicht bessere Immunantwort induzieren als die einmalige Gabe von gleichem Virus (Juillard et al., 1995). Um die Rolle der DNA-Immunisierung in dem Immunisierungsschema zu beurteilen, wurde eine Kontrollgruppe zweimal mit der Plasmid-DNA immunisiert. Überraschenderweise wurde auch bei dieser Gruppe keine zelluläre und ebenfalls keine humorale Immunantwort induziert. Die Immunisierung mit den DNA-Impfstoffen kann normalerweise eine starke CTL- und HTL-Reaktion induzieren und ebenfalls zur Bildung neutralisierender Antikörper führen (Barouch and Letvin, 2000; Peters, 2002). Bei den Versuchen in Schimpansen führte die Applikation von DNA sogar zu einer protektiven Immunantwort gegen ein apathogenes HIV-Isolat (Boyer et al., 1997). Die Rhesusaffen konnten allerdings nicht oder nur teilweise gegen die Infektion mit pathogenen SIVmac oder SHIV geschützt werden (Barouch et al., 2000; Kim et al., 2001; Shen and Siliciano, 2000). Bei allen diesen Studien wurde die DNA-Immunisierung bis zu viermal durchgeführt. Nur zweimalige Gabe, wie es bei diesen Experimenten der Fall war, hat nur eine minimale Immunantwort induziert (Shiver et al., 1996; Vinner et al., 1999).

Da nach der Primärimmunisierung mit den lentiviralen Vektoren und anschließendem Boostern mit DNA bzw. mit gleichen Vektoren die zelluläre Immunantwort nicht nachgewiesen wurde, wurde das Immunisierungsschema geändert. In einem alternativen Prime-Boost Immunisierungsschema wird mit der DNA Primärimmunisierung und mit den rekombinanten Vektoren Boosting durchgeführt. Diese Kombination konnte sich mittlerweile bei den präklinischen und klinischen Studien durchsetzen. Bei den Versuchen in Rhesusaffen führte die Applikation von DNA und rekombinanten Pockenvirus (rMVA) sogar zu einer protektiven Immunantwort gegen die Infektion mit dem pathogenen chimerischen SHIV (Amara et al., 2001).

Die Primärimmunisierung wurde deshalb mit der Gag-exprimierenden Plasmid-DNA durchgeführt und drei Wochen später wurde intraperitoneal Gag- oder EGFP-exprimierender lentiviraler Vektor injiziert. In diesem Verfahren konnte mit Hilfe des IFN- γ -ELISpots eine Gag-spezifische T-Zellimmunantwort festgestellt werden. Die höchste Zahl der Gag-antigenspezifischen T-Zellen wurde erwartungsgemäß in der Versuchsgruppe nachgewiesen, in welcher die Mäuse mit dem Vacciniavirus vAbT141 geboostert wurden. Diese Versuchsgruppe diente als Positivkontrolle, da es bekannt ist, dass die Immunisierung mit dem Vacciniavirus zu einer starken Immunantwort führt. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die lentiviralen Vektoren auch ohne synthetisches gag-Transgen (hgag) eine zelluläre Immunantwort induzieren können. Diese Beobachtung spiegelt vorherige Arbeiten mit

nichtinfektiösen HIV-Pseudopartikeln wider, die ebenfalls starke humorale und zelluläre Immunantwort erzeugen (Deml et al., 2005; Wagner et al., 1998). Die Boostermunisierung mit dem lentiviralen Vektor pGJ2hgag führte jedoch zu einer höheren zellulären Immunantwort als sie die Booster-Immunisierung mit dem Vektor pGJ2egfp induzierte. Diese Erhöhung in der Immunogenität ist mit höchster Wahrscheinlichkeit der hgag-Expression zuzuschreiben. Die Analyse der Gag-spezifischen Antikörper konnte allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, die mit den lentiviralen Vektoren immunisiert wurden, feststellen. Sowohl die Immunisierung nach dem DNA-Prime- und Vacciniavirus-Boost-Protokoll als auch die kombinierte Immunisierungen mit der DNA und den lentiviralen Vektoren führte zu gleichem Titer der Gag-spezifischen Antikörper. Bei den Mäusen, die nur mit Plasmid-DNA immunisiert worden sind, konnte keine humorale und zelluläre Immunantwort nachgewiesen werden. Auch die einmalige Gabe von den lentiviralen Vektoren hat sehr hohe Titer von VSV-G-neutralisierenden Antikörpern induziert.

Die Immunisierungsexperimente haben gezeigt, dass die lentiviralen Vektoren in der Lage sind, eine starke Immunantwort gegen das Transgen und eine besonders starke Immunantwort gegen eigene virale Proteine zu induzieren. Dabei wurde festgestellt, dass die Gag-Proteine, die ein Strukturbestandteil von Viruspartikeln sind, sich deutlich an der Induktion von humoralen und auch zellulären Immunantwort beteiligen. Um besser die Rolle der Transgenexpression für die Induktion der zellulären Immunität festzustellen, wurde es notwendig, die zelluläre Immunantwort gegen das Transgen zu untersuchen, das nicht ein Bestandteil des Viruspartikels ist. Dafür wurden die Balb/c Mäuse mit den gfp-exprimierenden Vektoren, die bisher in den Kontrollen eingesetzt worden sind, immunisiert. Anschließend wurde die gfp-spezifische CTL-Immunantwort analysiert. Für die Stimulation der T-Zellen ex vivo wurde ein EGFP-spezifisches Peptid benutzt, das in den Balb/c-Mäusen an MHC-Klasse I-Moleküle bindet (Gambotto et al., 2000). Interessanterweise induzierte die kombinierte Immunisierung mit der DNA und der lentiviralen Vektoren eine stärkere GFP-spezifische CTL-Immunantwort als bei der Immunisierung mit Vacciniavirus. Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur die Expression des Transgens nach der Immunisierung mit den lentiviralen Vektoren sondern verdeutlicht dessen Rolle für die Verstärkung der Immunantwort.

Frühere Studien demonstrierten, dass die Immunisierung mit lentiviralen Vektoren eine humorale und proliferative Immunantwort in Mäusen und Rhesusaffen induzieren konnte

(Kuate et al., 2003; Tung et al., 1998). Es war allerdings unklar, ob pseudotypisierte HIV-Vektoren die zytotoxische T-Zell-Antwort in vivo veranlassen.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit dem pseudotypisierten HIV-Vektor signifikant eine humorale und CTL-Immunantwort induziert. Sowohl Strukturbestandteile des lentiviralen Vektors als auch Transgenexpression trugen zur Aktivierung der Immunantwort bei. Vor allem die Induktion von CTL-Antworten durch die Expression eines Transgens ist für weitere Studien der HIV-Pathogenese und Impfdesigns relevant. Zum Beispiel, im Gegensatz zu vielen anderen Immunisierungskandidaten, können lentivirale Vektoren so generiert werden, dass sie die natürlichen Zielzellen des Lentiviruses infizieren. Als ein besonderer Vorteil können die HIV-Vektoren mit dendritischen Zellen über das DC-SIGN interagieren, was zu der Aktivierung der Immunprozessen führen kann, die für die protektive Immunantwort gegen HIV besonders relevant sind. So machen die einzigartigen biologischen und immunologischen Eigenschaften der replikationsdefizienten HIV-Vektoren aus diesen Konstrukten wertvolle Werkzeuge, um weiter die Immunmechanismen, die für die Schutz gegen HIV-Infektion und Krankheit bedeutsam sind, zu studieren.

5.4 Herstellung von Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren

Als virale Vektoren werden in der experimentellen Gentherapie am häufigsten defekte Retroviren, Adenoviren und Adeno-Assoziierte Viren eingesetzt. Natürlich hat jede dieser Vektorgruppen ihre spezifischen Vor- und Nachteile für die Gentherapie, so dass die Auswahl, des für den jeweiligen therapeutischen Ansatz geeigneten Systems von vielen Faktoren, wie der Art und Größe des Transgens, von der Dauer, dem gewünschten Ort der Expression und der Regulation der Expression, abhängt. Durch die Herstellung der Vacciniavirus/HIV-Hybridvektoren sollten die Vorteile der Vaccinia- und lentiviralen Vektorsysteme kombiniert werden, um einen effizienten HIV-Impfstoffkandidaten zu entwickeln. Während die pockenvirale Vektoren mit hohem Titer (bis 10^{10} pfu/ml) hergestellt werden können und sich durch ihre Kapazität große Inserts (über 25 kB) aufzunehmen auszeichnen, integrieren die lentiviralen Vektoren stabil in das Genom der Zielzellen, was zu langfristiger Expression des Transgens führt. Falls sie nicht mit einem stabilen Hüllglykoprotein, wie VSV-G, pseudotypisiert sind, sind die retroviralen Vektoren sehr instabil und nur im sehr niedrigen Titer herstellbar. Außerdem wurde festgestellt, dass

retrovirale Vektoren in vivo vom Komplement-System inaktiviert werden können, wenn diese mit Hilfe eine Verpackungszelllinie hergestellt worden sind, die sich genetisch vom Therapieempfänger (allogenetisch) unterscheiden (DePolo et al., 2000; Pensiero et al., 1996). Damit ist die Anwendung der retroviralen Vektoren für die In-vivo-Therapie oder als effizienter Vakzine begrenzt.

Die Pockenviren transportieren alle Enzyme, die für die Replikation notwendig sind, als Bestandteile des Virus in die infizierte Zelle. Das ermöglicht eine vom Zellkern unabhängig stattfindende Transkription. Diese Eigenschaft ist für die Herstellung der auf pockenviralen Vektoren basierten Impfstoffkandidaten besonders vorteilhaft, da die Expression der HIV-Gene nicht vom Rev-Protein abhängt. Das ermöglicht die kräftige Expression auch ohne Kodon-optimierte Sequenzen, die zur Induktion einer starken Immunantwort führt.

Für HIV-Impfstudien wurden schon mit gewissem Erfolg verschiedene Pockenviruskonstrukte (Amara et al., 2002b; Cao et al., 2003) eingesetzt und besonders die Verfügbarkeit eines stark attenuierten, modifizierten Vacciniavirus, den Stamm Ankara (MVA), spricht für weitere Entwicklung der HIV-Impfstoffe auf der Basis von Pockenviren.

Es wurden mehrere virale Vektoren konstruiert, die Bestandteile retroviraler Vektoren exprimieren und deren Transduktion zur Herstellung kompletter retroviraler Partikel führt. Es wurden bereits chimerische Adenovirus-Retrovirus- (MuLV und Foamy Virus) (Feng et al., 1997; Picard-Maureau et al., 2004) und Vacciniavirus-Retrovirus (MuLV)-Systeme (Konetschny et al., 2002; Konetschny et al., 2003) beschrieben.

Pockenviren kodieren und verpacken ihr eigenes Transkriptionssystem, das zu ihrer Fähigkeit beiträgt, innerhalb des Zytoplasmas von Zellen zu replizieren (Moss, 1990). Die Genexpression wird durch verschiedene cis- und trans- Faktoren in frühen und späten Phasen der Infektion reguliert. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass die Nukleotidfolge TTTTNT (T5NT; auch Konsensussequenz genannt) für eine Terminierung der Transkription etwa 50 Nukleotide nach diesem Signal verantwortlich ist (Yuen and Moss, 1987). Die Anwesenheit von T5NT Folgen in Fremdgenen, die durch Vacciniavirus-Vektoren exprimiert werden soll, würde deshalb fatal sein. Zwei solche Stopp-Sequenzen wurden bereits früher innerhalb des HIV-env-Genes gefunden (Earl et al., 1990). Um die Generierung von vollständigen RNA, die als Genom für lentiviralen Vektor dienen soll, zu gewährleisten, wurde es deshalb notwendig die gesamte Sequenz der lentiviralen Vektor-Kassette zu analysieren und mögliche Konsensussequenzen zu entfernen. Dabei wurde für die Herstellung des Vaccinia/HIV Hybridvektors der lentivirale Vektor pGJ3egfp ausgewählt. Dieser Vektor enthält die

Sequenzen des HIV-Stammes HXB2. Die ursprüngliche 5'-U3-Region wurde durch den konstitutiv aktiven CMV-Promotor ersetzt, so dass *tat* deletiert werden konnte. Außerdem wurden aus dem HIV-Genom *env* und alle akzessorische Gene mit der Ausnahme von *rev*, sowie die Promotorsequenzen aus der 3'-U3-Region deletiert. Das gfp-Markergen ist ähnlich wie bei pGJ2-Vektoren unter der Kontrolle eines SFFV-Promotors (Jarmy et al., 2001). Alternativ wurde auch ein Vektor hergestellt, wo die gesamte *env*-Sequenz entfernt wurde. Dieses Konstrukt kann ohne Gefahr der homologen Rekombination auch zusammen mit HIV-*env*-Gen in Vaccinia-Genom kloniert werden.

Da die Pockenviren einen eigenen Enzymapparat für die Transkription verwenden, benötigt man für die Transgenexpression auch Pockenvirus-eigene Promotorsequenzen. Die Zeit und Stärke der Expression ist reguliert durch die Wahl eines frühen oder späten Promotors (Moss, 1990; Moss, 1996). Die frühen viralen Genprodukte bereiten die Replikation der viralen DNA vor. Nach der DNA-Replikation werden die späten Gene exprimiert, die für die Strukturproteine kodieren, welche zu reifen Viruspartikeln zusammengefügt werden. Aus unserer Erfahrung werden die neuen viralen Partikel bereits 16 bis 20 Stunden nach der Vacciniavirus-Infektion produziert. Zu diesem Zeitpunkt sind auch erste Zeichen des zytopathischen Effekts zu beobachten. Die früheren Arbeiten haben gezeigt, dass die optimale Produktion von retroviralen Vektoren zwischen 6 und 8 Stunden nach der Retrovirus/MVA-Hybridvektor-Infektion erfolgt. Spätestens aber nach 20 Stunden ist die Virusproduktion fast gestoppt (Holzer et al., 1999). Deshalb wurde es unbedingt notwendig, dass die lentivirale Vektor-Kassette unter die Kontrolle des frühen Vaccinia-Promotor gebracht ist, obwohl es bekannt ist dass die stärkste Expression von natürlichen oder synthetischen späten- oder früh/späten Promotoren erreicht werden kann (Chakrabarti et al., 1997; Davison and Moss, 1990; Patel et al., 1988).

Frühe Promotoren sind ungefähr 30 bp lang und bestehen aus drei Regionen: eine 16 bp kritische Region, in dem die Substitution von einzelnen Nukleotiden eine bedeutende Wirkung auf die Stärke der Expression hat, getrennt durch eine „Spacer“-Region von 11 bp von einem 5-7 bp Region, die vor allem aus den Purinbasen entsteht und wo die Transkription initiiert ist. Es gibt keine Hinweise auf die Anwesenheit von Enhancer-Elementen vor der Promotorsequenz (Davison and Moss, 1989a). Für die Konstruktion von Vaccinia-Vektoren wird am häufigsten der frühe p7.5-kD Promotor verwendet. Die Mutationsanalyse von p7.5-kD Promotor hat die Möglichkeiten der Optimierung der natürlichen viralen Sequenz von kritischen Regionen gezeigt, die bis zu einer 20-fach stärkeren Expression führten (Davison and Moss, 1989a). Diese optimierte Sequenz (AAAAATTGAAAATA) wurde auch in

unserem Ansatz verwendet. Die Sequenzen der „spacer“- und „initiation“-Region ist mit der Sequenz der HIV-1 HXB2 identisch.

Um die Transkription der lentiviralen Vektor-Kassette durch das Vacciniavirus zu ermöglichen, war es notwendig vor dem Transkriptionsstart einen Vaccinia-Promotor zu setzen. An das 3'-Ende, hinter das Poly-A-Signal der lentiviralen Vektor-Kassette, wurde im nächsten Schritt die Konsensussequenz TTTTNT angehängt. Dabei ist es notwendig, dass die synthetische Promotorsequenz so lokalisiert ist, dass der Transkriptionsstart mit dem ersten Nukleotid der R-Region der lentiviralen Vektor-Kassette positioniert ist. Die Reverse Transkription beginnt mit der DNA-Synthese an der Primerbindungsstelle (PBS) im 5'-Bereich der genomischen RNA. Ausgehend von Lysin-tRNA, die als Primer dient, synthetisiert die RT in 5' - 3'-Richtung einen zu den U5- und R-Sequenzen komplementären DNA-Strang. Dieses Strang wird an das 3'-Ende der genomischen RNA transloziert und dient nach Hybridisierung mit der vorliegenden R-Region als Primer des zum RNA-Genom komplementären DNA-Stranges (Coffin et al., 1997; Gotte et al., 1999). Es wurde gezeigt, dass zusätzliche Nukleotide vor der R-Region eine fehlerhafte Reverse Transkription verursachen und damit bei der Herstellung von lentiviralen Vektoren zu niedrigen Titern führen (Holzer et al., 1999; Konetschny et al., 2003). Um mögliche Probleme bei der Reversen Transkription zu vermeiden, wurde die Sequenz der „Initiation“-Region so gewählt, dass sie identisch mit der Sequenz von HIV-1 HXB2 ist. Falls die RNA-Transkripte dann um ein Nukleotid länger werden, wie es bei dem hergestellten Konstrukt der Fall sein kann, wird der synthetisierte DNA-Abschnitt komplementär zur 3'-LTR Sequenzen. Da die 5'-R-Region nicht genau am Transkriptionsstart des CMV-Promotors liegt, sondern sich erst hinter der Sequenz des eingebauten Vaccinia-Promotors befindet, konnte allerdings nicht überprüft werden, ob die hinzugefügten Sequenzen am Anfang und am Ende der lentiviralen Kassette die Verpackung und die Integration nach der Transduktion beeinflussen. Die Expression von enthaltenen Strukturproteinen und lentiviralen Enzymen wurde durch den „Umbau“ der lentiviralen Kassette jedoch nicht beeinträchtigt, was durch Western Blot nachgewiesen werden konnte. Durch die Deletion des gesamten env-Genabschnitts wurde gleichzeitig auch das Rev-Gen entfernt, was die Rev-abhängige Expression der HIV-Gene erwartungsgemäß unmöglich gemacht hat (Pollard and Malim, 1998). Da die Transkription von Pockenviren unabhängig vom Zellkern stattfindet, wird für die Expression der HIV-Gene nicht Rev-Protein benötigen. Diese Eigenschaft ist für die Herstellung der auf pockenviralen Vektoren basierten Impfstoffkandidaten besonders vorteilhaft, da eine kräftige Expression auch ohne Kodon-optimierte Sequenzen möglich ist.

Die homologe Rekombination *in vivo* ist die Standardmethode gewesen, fremde DNA-Abschnitte in die Genome von großen DNA-Viren wie Herpesviren, Pockenviren und Baculoviren einzuführen (Moss, 1991). Da mit den DNA-Molekülen von 100 bis 200 kbp schwer zu arbeiten ist und da die Frequenz von Restriktionsschnittstellen mit der Länge der DNA ebenfalls steigt, wurde die direkte In-Vitro-Ligation der DNA in solchen großen Genomen nicht verwendet. Diese Methode ist allerdings nur bei der Insertion von relativ kleinen DNA-Fragmenten effizient. In den Fällen, wo große DNA-Abschnitte integriert werden sollen, ist die Frequenz der homologen Rekombination niedrig. Ein anderer potenzieller Nachteil von homologer Rekombination ist der übliche Schritt der Klonierung und Propagation der DNA in Bakterien, in denen Deletionen oder nicht erwünschte Rekombinationen vorkommen können, wenn die DNA eine ungewöhnliche Struktur hat oder sehr groß ist (Merchlinisky and Moss, 1992).

Die lentivirale Kasette, die als Genom für die replikationsinkompetente HIV-1-Vektoren dienen sollte, wurde in den Vacciniavirusstamm Copenhagen (vCph wt) und vPE16 hineinkloniert. Der vPE16 Stamm enthält die Sequenz, die für HIV-1 gp160 kodiert, und ursprünglich aus dem Stamm Copenhagen hergestellt wurde (Earl et al., 1990; Heinkelein et al., 1997). Für die Klonierung ins Vaccinia-Genom wurde neben der homologen Rekombination auch eine Methode entwickelt, die auf direkte In-Vitro-Ligation basiert. Dabei wurde die Erkenntnis genutzt, dass das Genom des Vaccinia-Stammes „Copenhagen“ nur eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym NotI enthält. Diese Schnittstelle liegt in der Position 45477 nt und wurde bereits für die Klonierung eines Transgens verwendet (Merchlinisky et al., 1997; Merchlinisky and Moss, 1992; Pfeleiderer et al., 1995; Scheiflinger et al., 1992). Einziger Nachteil dieser Methode ist eine Abwesenheit von einem Selektionsmarker, wie Thymidin-Kinase, der Propagation nur von Viren mit einem Insert ermöglichen würde. Deshalb wurde die lentivirale Kasette mit den Restriktionsschnittstellen EagI flankiert. Die Überhänge die nach dem Verdau mit den NotI- und EagI-Enzymen entstehen, sind gegenseitig komplementär und können zusammenligiert werden. Durch Anwesenheit von dem NotI-Enzym bei der Ligation konnte allerdings gewährleistet werden, dass nur das Vaccinia-Genom vervollständigt wurde, das auch zwischen den beiden NotI-Schnittstellen die lentivirale Vektorkasette enthält. Diese einzigartige Methode konnte bereits bei der Herstellung von Hybridvektoren erfolgreich angewendet werden (Thiel et al., 2001). Die Entstehung der korrekten Ligationsprodukte konnte mittels Pulsfeldgelelektrophorese später bestätigt werden.

Um Vacciniavirus aus der DNA herzustellen, wurden CV-1-Zellen mit Hühnerpockenvirus infiziert und anschließend mit rekombinanter DNA transfiziert (Thiel et al., 2001). Ein Vacciniavirus konnte dabei nur aus den Ligationsprodukten hergestellt werden, die das komplette Genom des Vacciniavirus enthielten, das heißt sowohl das kürzere als auch das längere Fragment nach dem NotI-Verdau. Die Hühnerpockenviren gehören zu der Familie Avipockenvirus und haben unterschiedliche Wirtsspezifität von Vacciniaviren. Die Infektion von Säugertierzellen ist nicht permissiv, kann allerdings die Verpackung der Vacciniavirus-DNA vermitteln (Somogyi et al., 1993). Die Cross-Hybridisierung zwischen Hühnerpocken- und Vacciniavirus-DNA wurde dabei nicht beobachtet (Scheiflinger et al., 1992). Insgesamt wurden 23 Klone von dem rekombinanten Vacciniavirus gewonnen (23/96), das ursprünglich aus dem Stamm Copenhagen hergestellt wurde (vTR1). Vier Klone wurden nach der Klonierung in vPE16 erhalten (vTR2) (4/96). Um festzustellen, welche Klone der Vacciniaviren die inserierte lentivirale Kasette tragen, wurden zuerst die viralen DNAs aller Klone mittels PCR analysiert. Für die PCR-Analyse wurden zuerst die Primer gag5 und gag3 benutzt, die ein Fragment aus dem gag-Bereich des lentiviralen Vektors amplifizieren. Für 16 Klone des rekombinanten Vacciniavirus vTR1 (70%) und für 2 Klone des rekombinanten Vacciniavirus vTR2 (50%) wurde die PCR positiv. Diese Klone enthielten die lentivirale Vektor-Kasette im Vaccinia-Genom. Weitere PCR-Analyse konnte allerdings einige Klonen als Gemisch von rekombinanten Vacciniavirus und Vacciniavirus WT (Cph WT oder vPE16) enttarnen. So konnten nur acht Klone von dem Konstrukt vTR1 und ein Klon von vTR2 als Vacciniavirus/HIV-1 Hybridvektoren gelten. Die Integrität der lentivirale Vektorkasette in dem Vaccinia-Genom konnte ebenfalls mittels Southern-Blot nachgewiesen werden.

Die relativ niedrige Effizienz der Herstellung von vTR2-Viren kann durch Mängel in der Klonierung und bei dem Ligationsverfahren verursacht werden. Außerdem waren bei der Klonierung die Vektor-Arme nicht dephosphoryliert und die Nebenreaktionen, in denen allein Vektor-Arme zusammenligiert werden, sind trotz der Präsenz des NotI-Enzyms bei der Ligation nicht auszuschließen. Auf die Dephosphorylierung wurde deshalb verzichtet, weil zusätzlichen Manipulationen mit den sehr großen Vaccinia-Vektor-Armen (150 beziehungsweise 40 kb) zu deren Degradation führen könnte. Andere Faktoren, die die Verpackungseffizienz beeinflussen (außer der Integrität der Virenvektor-Arme, Transfektionseffizienz und Zustand der Zellenkultur) können die Interferenzen zwischen den Helfervirus und verpacktem Virus in der Zelle sein.

Da die Pockenviren ihren eigenen Enzymapparat für die Transkription verwenden, wurde vor die lentivirale Vektor-Kassette eine Pockenvirus-eigene Promotorsequenz eingebaut. Ob die Transkription von dieser Sequenz gestartet werden kann, konnte allerdings erst nach der Klonierung ins Vaccinia-Genom überprüft werden. Obwohl die DNA-Analysen eindeutig die volle Integrität der lentiviralen Vektorkassette bestätigt haben, konnten durch die Expressionsanalysen nach der Infektion mit vTR1 und vTR2 keine oder nur sehr schwache Expression der Gag-Proteine nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass von dem eingebauten Vaccinia-Promotor zwar die Transkription gestartet wurde, die Expression verläuft allerdings nicht optimal. Das könnten viele Faktoren verursachen. Am wahrscheinlichsten scheint die extreme Unstabilität des Vacciniavirus/HIV-1 Hybridvektors. Die lentivirale Vektorkassette ist auf beiden Seiten mit HIV-R-Regionen flankiert. Diese Regionen sind zwar relativ kurz (ca 50 bp), können allerdings das genetische Konstrukt destabilisieren und zu dem Verlust des Inserts führen. Holzer et al. (1999) beschreiben ein Vacciniavirus/Retrovirus-Hybridvektor, wo die Anwesenheit von retroviralen R-Regionen nicht zur Instabilität des Konstrukts geführt hat. Die Retrovirale Vektorkassette hat in diesem Fall allerdings nur die essenziellen Vektorsequenzen (Kim et al., 1998a). Dadurch wurde dieses Insert wesentlich kleiner und das Risiko der Rekombination und des Insert-Verlustes geringer. Die lentivirale Vektorkassette in den Hybridvektoren vTR1 und vTR2 enthält vollständige Sequenzen von gag und pol-Gen, dadurch ist der Insert 7,7 kB groß, was die unerwünschte Rekombinationsfrequenz erhöht.

Durch die Infektion mit vTR1- und vTR2-Hybridvektoren konnte keine Bildung infektiöser lentiviraler Vektoren festgestellt werden. Die Faktoren, die vor allem die Generierung der infektiösen lentiviralen Partikel und deren Integration beeinflussen, sind neben der stabilen Expression der Virusbestandteile auch die Position des Transkriptionsstarts und die Position der terminatorischen Sequenz. Die Promotorsequenz muss so lokalisiert sein, dass der Transkriptionsstart mit dem ersten Nukleotid der R-Region von der lentiviralen Vektor-Kassette positioniert ist. Es wurde gezeigt, dass zusätzliche Nukleotide vor der R-Region eine fehlerhafte Reverse Transkription verursachen und damit bei der Herstellung von lentiviralen Vektoren zu niedrigen Titern führen (Holzer et al., 1999; Konetschny et al., 2003). Um mögliche Probleme bei der Reversen Transkription zu vermeiden, wurde die Sequenz der „Initiation“-Region so gewählt, dass sie identisch mit der Sequenz der HIV-1 HXB2 ist. Falls die RNA-Transkripte dann um ein Nukleotid länger werden, wie es bei dem hergestellten Konstrukt der Fall ist, wird der synthetisierte DNA-Abschnitt komplementär zur 3'-LTR Sequenzen. Ob diese Faktoren die Verpackung des lentiviralen Vektors und die Integration

nach der Transduktion beeinflussen, konnte allerdings nicht untersucht werden. Viel wichtiger scheint die Optimierung der Größe von der lentiviralen Vektorkassette. Konetschny et al. (2003) konnten einen Vacciniavirus/Retrovirus-Hybridvektor herstellen, der ebenfalls alle Bestandteile des retroviralen Vektors enthalten hat. Die Strukturproteine wurden allerdings nicht ein Bestandteil der retroviralen Vektor-Kassette, sondern wurden von zwei getrennten Expressionskassetten durch Vacciniavirus exprimiert. Diese Maßnahmen würden nicht nur die Stabilität des Hybridvektors sondern auch seine Sicherheit erhöhen.

Möglicher Vorteil könnte auch die Klonierung der lentiviralen Vektorkassette ins replikations-defiziente Vacciniavirus wie MVA sein. Defekte Vaccinia-Vektoren, die exklusiv frühe Gene exprimieren, sind besonders als Träger für kleine RNA-Viren geeignet (Ober et al., 2002). Nur die korrekt prozessierte und dimerisierte lentivirale RNA, die bei der frühen Transkription entsteht, bildet funktionelle Vektor-Partikel. Späte Transkripte des Vacciniavirus haben variable Größe; dadurch können zwar die späteren RNAs mit der richtigen Größe und Verpackungsmotiv in lentivirale Vektoren verpackt werden, verursachen aber vermutlich die Bildung von Pseudopartikeln (Holzer et al., 1999). Replizierende Pockenviren induzieren auf der anderen Seite eine stärkere zelluläre Immunität. Gerade die Kombination von replizierenden Vacciniaviren und replikationsinkompetenten HIV-Vektoren könnte ein neuartiges Impfkonzepnt darstellen. Die Expression von HIV-Strukturgenen würde in der ersten Phase der Infektion mit dem Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektor zu einer starken humoralen und zellulären Immunantwort führen. Die Bildung von lentiviralen Vektoren würde diese Immunantwort weiter boosten, und falls die lentivirale Vektorkassette dann ein therapeutisches Transgen enthalten würde, würde dies weiter die Immunantwort verstärken und vor allem könnte diese Art des Impfstoffes langzeitige falls nicht dauerhafte HIV-spezifische Immunantwort erzeugen.

6 Zusammenfassung

Immunogenität von retroviralen und lentiviralen Vektoren wurde als ein Haupthindernis für deren Applikation in der Gentherapie betrachtet worden. Dies kann jedoch als Vorteil für den Einsatz dieser Vektoren als Impfstoffkandidaten gegen HIV-Infektion und AIDS genutzt werden. Um das Potenzial von lentiviralen Vektoren eine humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren zu prüfen, wurde eine Reihe VSV-G-pseudotypisierter replikations-inkompetenter HIV-1-Vektoren hergestellt, die entweder ein Kodon-optimiertes HIV-p17/p24 (hgag)- oder das Grün fluoreszierende Protein (GFP)-Transgen enthalten. Die Infektion mit dem VSV-G pseudotypisierten HIV-1-Vektor pGJ2 führte in allen getesteten Zelllinien und auch in primären humanen und murinen Zellen zur Transgenexpression. Ebenfalls konnte eine direkte Expression des Transgens *in vivo* nachgewiesen werden.

Balb/c-Mäuse wurden in einem Vektoren- oder DNA-Prime und Vektoren-Boost-Verfahren immunisiert und die humorale und zelluläre Immunantwort wurde untersucht. Die Primärimmunisierung mit DNA und Boosting mit den lentiviralen Vektoren induzierte eine Gag-spezifische humorale Immunantwort, hohe Titer von VSV-G-neutralisierenden Antikörpern und eine Gag- und EGFP-spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort. Dabei wurde festgestellt, dass sowohl Strukturbestandteile des lentiviralen Vektors als auch die Transgenexpression zur Aktivierung der Immunantwort beitragen. So machen die einzigartigen biologischen und immunologischen Eigenschaften der replikationsdefizienten HIV-Vektoren aus diesen Konstrukten wertvolle Werkzeuge, um weiter die Immunmechanismen, die für den Schutz gegen HIV-Infektion und Krankheit bedeutsam sind, zu studieren.

Im Rahmen der hierzu durchgeführten Arbeiten wurden außerdem Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektoren hergestellt und analysiert. Um die Transkription der lentiviralen Vektor-Kassette durch das Vacciniavirus zu ermöglichen, wurde vor den Transkriptionsstart ein Vaccinia-Promotor gesetzt und an das 3'-Ende das Transkription-Stoppsignal angehängt. Obwohl die genomische Analyse eine erfolgreiche Herstellung der Hybridvektoren bestätigen konnte, muss die Produktion der lentiviralen Vektoren nach der Vaccinia-Infektion weiter optimiert werden.

Nichtsdestotrotz könnte die Kombination von replizierenden Vacciniaviren und replikationsinkompetenten HIV-Vektoren ein neuartiges Impfkonzep darstellen. Die Expression von HIV-Strukturgenen würde in der ersten Phase der Infektion mit dem Vacciniavirus/HIV-1-Hybridvektor zu einer starken humoralen und zellulären Immunantwort führen. Die Bildung von lentiviralen Vektoren würde diese Immunantwort weiter boosten, und falls die lentivirale Vektorkassette dann ein entsprechendes Transgen enthalten würde, würde dies weiter die Immunantwort verstärken und vor allem könnte diese Art des Impfstoffes eine langzeitige falls nicht dauerhafte HIV-spezifische Immunantwort erzeugen.

7 Summary

Immunogenicity of retroviral and lentiviral vectors has been regarded as a major impediment to the use of these constructs in gene therapy. However, this may be exploited for the design of vaccine candidates against HIV infection and AIDS. To test the specific potential to induce antibody and cytotoxic T lymphocyte responses to HIV-derived vectors, a set of VSV-G-pseudotyped replication-defective vectors that contain a codon-optimized p17/p24 HIV-1 Gag or the green fluorescent protein (GFP) gene as transgene were constructed. Infection with the gag or gfp gene-containing vector particles resulted in transgene expression in cell lines and primary human and murine cells. Moreover, the direct transgene expression mediated by this lentiviral vector was also detected after *in vivo* application.

Balb/c mice were immunised in a vector or DNA prime vector boost fashion and humoral and cellular immune responses were examined. Immunisation with DNA as prime, and the lentiviral vectors as boost, induced a Gag-specific antibody response, high titers of neutralising antibodies directed against the VSV-G protein and Gag- and EGFP-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses. CTL responses were induced by both structural proteins contained in the vector preparation and through expression of the transgene. Thus, the unique biological and immunologic properties of single-cycle HIV vectors make the constructs valuable tools to further study immune mechanisms relevant to protection from HIV infection and disease.

Moreover, to develop a novel HIV vaccine strategy, recombinant vaccinia viruses that express functional HIV-based vector genomes, were constructed. For this purpose, the proviral lentiviral genome, engineered into the vaccinia virus, was subjected to several modifications, including the replacement of retroviral promoter sequences by vaccinia virus sequences and the precise fusion of the transcription stop signal downstream of the transcription unit, allowing cytoplasmic transcription of distinct full-length lentiviral transcripts. The developed chimeric vector should be able to produce the transduction-competent lentiviral particles after single infection of the host cells. However, the genome analysis confirm the successful construction of vaccinia/HIV hybrid vector, the generation of lentiviral particles after vaccinia infection have to be optimized. Nevertheless, due to the favorable properties of vaccinia vectors, including high coding capacity, stability, and wide host range, vaccinia viral/HIV chimeric vectors can be promising HIV vaccine candidate. The expression of HIV-structural genes would lead in the first phase of the infection with the vaccinia/HIV-1 hybrid vector to strong humoral and cellular immunity. The generation of lentiviral vectors would boost this immune response, especially if the lentiviral vector cassette will contain an appropriate transgene. This kind of the vaccine could induce strong long-term or lasting HIV-specific immune response.

8 Literaturverzeichnis

- Ahlers, J.D., Belyakov, I.M. and Berzofsky, J.A. (2003) Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Curr Mol Med*, **3**, 285-301.
- Akbari, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D. and Stockinger, B. (1999) DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med*, **189**, 169-178.
- Alam, J. and Cook, J.L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, **188**, 245-254.
- Amara, R.R., Smith, J.M., Staprans, S.I., Montefiori, D.C., Villinger, F., Altman, J.D., O'Neil, S.P., Kozyr, N.L., Xu, Y., Wyatt, L.S., Earl, P.L., Herndon, J.G., McNicholl, J.M., McClure, H.M., Moss, B. and Robinson, H.L. (2002a) Critical role for Env as well as Gag-Pol in control of a simian-human immunodeficiency virus 89.6P challenge by a DNA prime/recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccine. *J Virol*, **76**, 6138-6146.
- Amara, R.R., Villinger, F., Altman, J.D., Lydy, S.L., O'Neil, S.P., Staprans, S.I., Montefiori, D.C., Xu, Y., Herndon, J.G., Wyatt, L.S., Candido, M.A., Kozyr, N.L., Earl, P.L., Smith, J.M., Ma, H.L., Grimm, B.D., Hulsey, M.L., McClure, H.M., McNicholl, J.M., Moss, B. and Robinson, H.L. (2002b) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine*, **20**, 1949-1955.
- Amara, R.R., Villinger, F., Altman, J.D., Lydy, S.L., O'Neil, S.P., Staprans, S.I., Montefiori, D.C., Xu, Y., Herndon, J.G., Wyatt, L.S., Candido, M.A., Kozyr, N.L., Earl, P.L., Smith, J.M., Ma, H.L., Grimm, B.D., Hulsey, M.L., Miller, J., McClure, H.M., McNicholl, J.M., Moss, B. and Robinson, H.L. (2001) Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*, **292**, 69-74.
- Andino, R., Silvera, D., Suggett, S.D., Achacoso, P.L., Miller, C.J., Baltimore, D. and Feinberg, M.B. (1994) Engineering poliovirus as a vaccine vector for the expression of diverse antigens. *Science*, **265**, 1448-1451.
- Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A. and Haas, J. (1998) Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol*, **72**, 1497-1503.
- Arai, T., Matsumoto, K., Saitoh, K., Ui, M., Ito, T., Murakami, M., Kanegae, Y., Saito, I., Cosset, F.L., Takeuchi, Y. and Iba, H. (1998) A new system for stringent, high-titer vesicular stomatitis virus G protein-pseudotyped retrovirus vector induction by introduction of Cre recombinase into stable prepackaging cell lines. *J Virol*, **72**, 1115-1121.
- Baba, T.W., Jeong, Y.S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M.F. and Ruprecht, R.M. (1995) Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science*, **267**, 1820-1825.
- Baba, T.W., Liska, V., Khimani, A.H., Ray, N.B., Dailey, P.J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M.F., McClure, H.M., Martin, L.N. and Ruprecht, R.M. (1999) Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med*, **5**, 194-203.
- Barouch, D.H. and Letvin, N.L. (2000) DNA vaccination for HIV-1 and SIV. *Intervirology*, **43**, 282-287.
- Barouch, D.H., Santra, S., Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Fu, T.M., Wagner, W., Bilska, M., Craiu, A., Zheng, X.X., Krivulka, G.R., Beaudry, K., Lifton, M.A., Nickerson, C.E., Trigona, W.L., Punt, K., Freed, D.C., Guan, L., Dubey, S., Casimiro, D., Simon, A., Davies, M.E., Chastain, M., Strom, T.B., Gelman, R.S., Montefiori, D.C., Lewis,

- M.G., Emini, E.A., Shiver, J.W. and Letvin, N.L. (2000) Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science*, **290**, 486-492.
- Barrette, S., Douglas, J., Orlic, D., Anderson, S.M., Seidel, N.E., Miller, A.D. and Bodine, D.M. (2000) Superior transduction of mouse hematopoietic stem cells with 10A1 and VSV-G pseudotyped retrovirus vectors. *Mol Ther*, **1**, 330-338.
- Bartz, S.R. and Vodicka, M.A. (1997) Production of high-titer human immunodeficiency virus type 1 pseudotyped with vesicular stomatitis virus glycoprotein. *Methods*, **12**, 337-342.
- Betts, M.R., Krowka, J., Santamaria, C., Balsamo, K., Gao, F., Mulundu, G., Luo, C., N'Gandu, N., Sheppard, H., Hahn, B.H., Allen, S. and Frelinger, J.A. (1997) Cross-clade human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in HIV-infected Zambians. *J Virol*, **71**, 8908-8911.
- Birx, D.L., Loomis-Price, L.D., Aronson, N., Brundage, J., Davis, C., Deyton, L., Garner, R., Gordin, F., Henry, D., Holloway, W., Kerkering, T., Luskin-Hawk, R., McNeil, J., Michael, N., Foster Pierce, P., Poretz, D., Ratto-Kim, S., Renzullo, P., Ruiz, N., Sitz, K., Smith, G., Tacket, C., Thompson, M., Tramont, E., Yangco, B., Yarrish, R. and Redfield, R.R. (2000) Efficacy testing of recombinant human immunodeficiency virus (HIV) gp160 as a therapeutic vaccine in early-stage HIV-1-infected volunteers. rgp160 Phase II Vaccine Investigators. *J Infect Dis*, **181**, 881-889.
- Blanco, J.C., Pletneva, L., Boukhvalova, M., Richardson, J.Y., Harris, K.A. and Prince, G.A. (2004) The cotton rat: an underutilized animal model for human infectious diseases can now be exploited using specific reagents to cytokines, chemokines, and interferons. *J Interferon Cytokine Res*, **24**, 21-28.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B.H., Shaw, G.M. and Oldstone, M.B. (1994) Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, **68**, 6103-6110.
- Boyer, J.D., Ugen, K.E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M.L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W.V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R.B., McCallus, D., Coney, L. and Weiner, D.B. (1997) Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med*, **3**, 526-532.
- Brander, C. and Walker, B.D. (1999) T lymphocyte responses in HIV-1 infection: implications for vaccine development. *Curr Opin Immunol*, **11**, 451-459.
- Buchsacher, G.L., Jr. and Wong-Staal, F. (2000) Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood*, **95**, 2499-2504.
- Burns, J.C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M. and Yee, J.K. (1993) Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 8033-8037.
- Burton, D.R., Desrosiers, R.C., Doms, R.W., Koff, W.C., Kwong, P.D., Moore, J.P., Nabel, G.J., Sodroski, J., Wilson, I.A. and Wyatt, R.T. (2004) HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*, **5**, 233-236.
- Camaur, D. and Trono, D. (1996) Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation. *J Virol*, **70**, 6106-6111.
- Cao, H., Kaleebu, P., Hom, D., Flores, J., Agrawal, D., Jones, N., Serwanga, J., Okello, M., Walker, C., Sheppard, H., El-Habib, R., Klein, M., Mbidde, E., Mugenyi, P., Walker, B., Ellner, J. and Mugerwa, R. (2003) Immunogenicity of a recombinant human immunodeficiency virus (HIV)-canarypox vaccine in HIV-seronegative Ugandan volunteers: results of the HIV Network for Prevention Trials 007 Vaccine Study. *J Infect Dis*, **187**, 887-895.

- Carroll, M.W. and Moss, B. (1995) E. coli beta-glucuronidase (GUS) as a marker for recombinant vaccinia viruses. *Biotechniques*, **19**, 352-354, 356.
- Casais, R., Thiel, V., Siddell, S.G., Cavanagh, D. and Britton, P. (2001) Reverse genetics system for the avian coronavirus infectious bronchitis virus. *J Virol*, **75**, 12359-12369.
- Casimiro, D.R., Chen, L., Fu, T.M., Evans, R.K., Caulfield, M.J., Davies, M.E., Tang, A., Chen, M., Huang, L., Harris, V., Freed, D.C., Wilson, K.A., Dubey, S., Zhu, D.M., Nawrocki, D., Mach, H., Troutman, R., Isopi, L., Williams, D., Hurni, W., Xu, Z., Smith, J.G., Wang, S., Liu, X., Guan, L., Long, R., Trigona, W., Heidecker, G.J., Perry, H.C., Persaud, N., Toner, T.J., Su, Q., Liang, X., Youil, R., Chastain, M., Bett, A.J., Volkin, D.B., Emini, E.A. and Shiver, J.W. (2003) Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of DNA plasmid, recombinant vaccinia virus, and replication-defective adenovirus vectors expressing a human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol*, **77**, 6305-6313.
- Chakrabarti, S., Brechling, K. and Moss, B. (1985) Vaccinia virus expression vector: coexpression of beta-galactosidase provides visual screening of recombinant virus plaques. *Mol Cell Biol*, **5**, 3403-3409.
- Chakrabarti, S., Sisler, J.R. and Moss, B. (1997) Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression. *Biotechniques*, **23**, 1094-1097.
- Chan, D.C. and Kim, P.S. (1998) HIV entry and its inhibition. *Cell*, **93**, 681-684.
- Chargelegue, D., Stanley, C.M., O'Toole, C.M., Colvin, B.T. and Steward, M.W. (1995) The affinity of IgG antibodies to gag p24 and p17 in HIV-1-infected patients correlates with disease progression. *Clin Exp Immunol*, **99**, 175-181.
- Chen, J.D., Yang, Q., Yang, A.G., Marasco, W.A. and Chen, S.Y. (1996) Intra- and extracellular immunization against HIV-1 infection with lymphocytes transduced with an AAV vector expressing a human anti-gp120 antibody. *Hum Gene Ther*, **7**, 1515-1525.
- Chen, Y.M., Lin, R.H., Lee, C.M., Fu, C.Y., Chen, S.C. and Syu, W.J. (1999) Decreasing levels of anti-Nef antibody correlate with increasing HIV type 1 viral loads and AIDS disease progression. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **15**, 43-50.
- Chinnasamy, D., Chinnasamy, N., Enriquez, M.J., Otsu, M., Morgan, R.A. and Candotti, F. (2000) Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins. *Blood*, **96**, 1309-1316.
- Clerici, M. and Shearer, G.M. (1996) Correlates of protection in HIV infection and the progression of HIV infection to AIDS. *Immunol Lett*, **51**, 69-73.
- Coffin, J.M., Hughes, J.P. and Varmus, H.E. (1997) *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- Costello, E., Munoz, M., Buetti, E., Meylan, P.R., Diggelmann, H. and Thali, M. (2000) Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors. *Gene Ther*, **7**, 596-604.
- Cui, Y., Iwakuma, T. and Chang, L.J. (1999) Contributions of viral splice sites and cis-regulatory elements to lentivirus vector function. *J Virol*, **73**, 6171-6176.
- Cui, Z. (2005) DNA vaccine. *Adv Genet*, **54**, 257-289.
- Dalglish, A.G., Beverley, P.C., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. and Weiss, R.A. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*, **312**, 763-767.
- Davidson, B.L. and Breakefield, X.O. (2003) Viral vectors for gene delivery to the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 353-364.
- Davis, N.L., Caley, I.J., Brown, K.W., Betts, M.R., Irlbeck, D.M., McGrath, K.M., Connell, M.J., Montefiori, D.C., Frelinger, J.A., Swanstrom, R., Johnson, P.R. and Johnston, R.E. (2000) Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency

- virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol*, **74**, 371-378.
- Davison, A.J. and Moss, B. (1989a) Structure of vaccinia virus early promoters. *J Mol Biol*, **210**, 749-769.
- Davison, A.J. and Moss, B. (1989b) Structure of vaccinia virus late promoters. *J Mol Biol*, **210**, 771-784.
- Davison, A.J. and Moss, B. (1990) New vaccinia virus recombination plasmids incorporating a synthetic late promoter for high level expression of foreign proteins. *Nucleic Acids Res*, **18**, 4285-4286.
- de Bruyn, G., Rossini, A.J., Chiu, Y.L., Holman, D., Elizaga, M.L., Frey, S.E., Burke, D., Evans, T.G., Corey, L. and Keefer, M.C. (2004) Safety profile of recombinant canarypox HIV vaccines. *Vaccine*, **22**, 704-713.
- de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **7**, 725-737.
- Deml, L., Bojak, A., Steck, S., Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H. and Wagner, R. (2001) Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, **75**, 10991-11001.
- Deml, L., Speth, C., Dierich, M.P., Wolf, H. and Wagner, R. (2005) Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol Immunol*, **42**, 259-277.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R.E., Hill, C.M., Davis, C.B., Peiper, S.C., Schall, T.J., Littman, D.R. and Landau, N.R. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, **381**, 661-666.
- DePolo, N.J., Reed, J.D., Sheridan, P.L., Townsend, K., Sauter, S.L., Jolly, D.J. and Dubensky, T.W., Jr. (2000) VSV-G pseudotyped lentiviral vector particles produced in human cells are inactivated by human serum. *Mol Ther*, **2**, 218-222.
- Doe, B. and Walker, C.M. (1996) HIV-1 p24 Gag-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in mice. *Aids*, **10**, 793-794.
- Donnelly, J.J., Liu, M.A. and Ulmer, J.B. (2000) Antigen presentation and DNA vaccines. *Am J Respir Crit Care Med*, **162**, S190-193.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H. and Calos, M.P. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, **7**, 379-387.
- Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, **72**, 8463-8471.
- Dupuis, M., Denis-Mize, K., Woo, C., Goldbeck, C., Selby, M.J., Chen, M., Otten, G.R., Ulmer, J.B., Donnelly, J.J., Ott, G. and McDonald, D.M. (2000) Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol*, **165**, 2850-2858.
- Durali, D., Morvan, J., Letourneur, F., Schmitt, D., Guegan, N., Dalod, M., Saragosti, S., Sicard, D., Levy, J.P. and Gomard, E. (1998) Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *J Virol*, **72**, 3547-3553.
- Earl, P.L., Hugin, A.W. and Moss, B. (1990) Removal of cryptic poxvirus transcription termination signals from the human immunodeficiency virus type 1 envelope gene enhances expression and immunogenicity of a recombinant vaccinia virus. *J Virol*, **64**, 2448-2451.

- Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., Radeke, R., Bukovsky, A., Consiglio, A. and Naldini, L. (2001) A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, **12**, 981-997.
- Fauci, A.S. (1996) Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature*, **384**, 529-534.
- Fauci, A.S. (2003) HIV and AIDS: 20 years of science. *Nat Med*, **9**, 839-843.
- Feng, M., Jackson, W.H., Jr., Goldman, C.K., Rancourt, C., Wang, M., Dusing, S.K., Siegal, G. and Curiel, D.T. (1997) Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol*, **15**, 866-870.
- Feng, Y.X., Copeland, T.D., Henderson, L.E., Gorelick, R.J., Bosche, W.J., Levin, J.G. and Rein, A. (1996) HIV-1 nucleocapsid protein induces "maturation" of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 7577-7581.
- Francis, D.P., Heyward, W.L., Popovic, V., Orozco-Cronin, P., Orelind, K., Gee, C., Hirsch, A., Ippolito, T., Luck, A., Longhi, M., Gulati, V., Winslow, N., Gurwith, M., Sinangil, F. and Berman, P.W. (2003) Candidate HIV/AIDS vaccines: lessons learned from the World's first phase III efficacy trials. *Aids*, **17**, 147-156.
- Frankel, A.D. and Young, J.A. (1998) HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*, **67**, 1-25.
- Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tuting, T., Robbins, P.D. and DeLeo, A.B. (2000) Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther*, **7**, 2036-2040.
- Gibbs, C.J., Jr., Peters, R., Gravell, M., Johnson, B.K., Jensen, F.C., Carlo, D.J. and Salk, J. (1991) Observations after human immunodeficiency virus immunization and challenge of human immunodeficiency virus seropositive and seronegative chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3348-3352.
- Gilbert, P.B., Chiu, Y.L., Allen, M., Lawrence, D.N., Chapdu, C., Israel, H., Holman, D., Keefer, M.C., Wolff, M. and Frey, S.E. (2003) Long-term safety analysis of preventive HIV-1 vaccines evaluated in AIDS vaccine evaluation group NIAID-sponsored Phase I and II clinical trials. *Vaccine*, **21**, 2933-2947.
- Goebel, S.J., Johnson, G.P., Perkus, M.E., Davis, S.W., Winslow, J.P. and Paoletti, E. (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology*, **179**, 247-266, 517-263.
- Gotte, M., Li, X. and Wainberg, M.A. (1999) HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys*, **365**, 199-210.
- Goulder, P.J., Rowland-Jones, S.L., McMichael, A.J. and Walker, B.D. (1999) Anti-HIV cellular immunity: recent advances towards vaccine design. *Aids*, **13 Suppl A**, S121-136.
- Greenough, T.C., Brettler, D.B., Somasundaran, M., Panicali, D.L. and Sullivan, J.L. (1997) 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*, **176**, 118-125.
- Gruters, R.A., van Baalen, C.A. and Osterhaus, A.D. (2002) The advantage of early recognition of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes. *Vaccine*, **20**, 2011-2015.
- Haas, J., Park, E.C. and Seed, B. (1996) Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol*, **6**, 315-324.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J.I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross,

- F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L.E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T.H., Le Deist, F., Fischer, A. and Cavazzana-Calvo, M. (2003) LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, **302**, 415-419.
- Hanke, T. (2001) Prospect of a prophylactic vaccine for HIV. *Br Med Bull*, **58**, 205-218.
- Hanke, T. and McMichael, A.J. (2000) Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year-2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med*, **6**, 951-955.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S.A., Elbeik, T., Staprans, S.I., Feinberg, M.B., Cao, Y., Ho, D.D., Yilma, T., Caliendo, A.M., Johnson, R.P., Buchbinder, S.P. and Walker, B.D. (1996) 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*, **12**, 585-592.
- Heinkelein, M., Muller, M., Kutsch, O., Sopper, S. and Jassoy, C. (1997) Rapid and selective depletion of CD4+ T lymphocytes and preferential loss of memory cells on interaction of mononuclear cells with HIV-1 glycoprotein-expressing cells. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **16**, 74-82.
- Hel, Z., Nacsa, J., Tsai, W.P., Thornton, A., Giuliani, L., Tartaglia, J. and Franchini, G. (2002) Equivalent immunogenicity of the highly attenuated poxvirus-based ALVAC-SIV and NYVAC-SIV vaccine candidates in SIVmac251-infected macaques. *Virology*, **304**, 125-134.
- Hel, Z., Tsai, W.P., Thornton, A., Nacsa, J., Giuliani, L., Trynieszewska, E., Poudyal, M., Venzon, D., Wang, X., Altman, J., Watkins, D.I., Lu, W., von Gegerfelt, A., Felber, B.K., Tartaglia, J., Pavlakis, G.N. and Franchini, G. (2001) Potentiation of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T cell responses by a DNA-SIV and NYVAC-SIV prime/boost regimen. *J Immunol*, **167**, 7180-7191.
- Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Williams, A.L., Chenine, A.L., McClure, H.M., Anderson, D.C., O'Neil, S. and Ruprecht, R.M. (2003) Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *Aids*, **17**, 157-166.
- Hogervorst, E., Jurriaans, S., de Wolf, F., van Wijk, A., Wiersma, A., Valk, M., Roos, M., van Gemen, B., Coutinho, R., Miedema, F. and et al. (1995) Predictors for non- and slow progression in human immunodeficiency virus (HIV) type 1 infection: low viral RNA copy numbers in serum and maintenance of high HIV-1 p24-specific but not V3-specific antibody levels. *J Infect Dis*, **171**, 811-821.
- Holzer, G.W., Mayrhofer, J.A., Gritschenberger, W., Dorner, F. and Falkner, F.G. (1999) Poxviral/retroviral chimeric vectors allow cytoplasmic production of transducing defective retroviral particles. *Virology*, **253**, 107-114.
- Ikeda, Y., Collins, M.K., Radcliffe, P.A., Mitrophanous, K.A. and Takeuchi, Y. (2002) Gene transduction efficiency in cells of different species by HIV and EIAV vectors. *Gene Ther*, **9**, 932-938.
- Inubushi, R. and Adachi, A. (1999) Cell-dependent function of HIV-1 Vif for virus replication (Review). *Int J Mol Med*, **3**, 473-476.
- Iyasere, C., Tilton, J.C., Johnson, A.J., Younes, S., Yassine-Diab, B., Sekaly, R.P., Kwok, W.W., Migueles, S.A., Laborico, A.C., Shupert, W.L., Hallahan, C.W., Davey, R.T., Jr., Dybul, M., Vogel, S., Metcalf, J. and Connors, M. (2003) Diminished proliferation of human immunodeficiency virus-specific CD4+ T cells is associated with diminished interleukin-2 (IL-2) production and is recovered by exogenous IL-2. *J Virol*, **77**, 10900-10909.
- Jarmy, G., Heinkelein, M., Weissbrich, B., Jassoy, C. and Rethwilm, A. (2001) Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol*, **64**, 223-231.

- Jassey, C. and Wagner, R. (2002) Perspektiven für die Entwicklung einer HIV-Vakzine. *Dtsch Arztebl*, **99**, 1962-1971.
- Jeon, Y.H., Choi, Y., Kang, J.H., Chung, J.K., Lee, Y.J., Kim, C.W., Jeong, J.M., Lee, D.S. and Lee, M.C. (2006) In vivo monitoring of DNA vaccine gene expression using firefly luciferase as a naked DNA. *Vaccine*.
- Jin, X., Bauer, D.E., Tuttleton, S.E., Lewin, S., Gettie, A., Blanchard, J., Irwin, C.E., Safrit, J.T., Mittler, J., Weinberger, L., Kostrikis, L.G., Zhang, L., Perelson, A.S. and Ho, D.D. (1999) Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*, **189**, 991-998.
- Juillard, V., Villefroy, P., Godfrin, D., Pavirani, A., Venet, A. and Guillet, J.G. (1995) Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector. *Eur J Immunol*, **25**, 3467-3473.
- Kim, J.J., Yang, J.S., Nottingham, L.K., Lee, D.J., Lee, M., Manson, K.H., Wyand, M.S., Boyer, J.D., Ugen, K.E. and Weiner, D.B. (2001) Protection from immunodeficiency virus challenges in rhesus macaques by multicomponent DNA immunization. *Virology*, **285**, 204-217.
- Kim, S.H., Yu, S.S., Park, J.S., Robbins, P.D., An, C.S. and Kim, S. (1998a) Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol*, **72**, 994-1004.
- Kim, S.Y., Byrn, R., Groopman, J. and Baltimore, D. (1989) Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*, **63**, 3708-3713.
- Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1998b) Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, **72**, 811-816.
- Klein, M. (2001) Current progress in the development of human immunodeficiency virus vaccines: research and clinical trials. *Vaccine*, **19**, 2210-2215.
- Klein, M.R., van Baalen, C.A., Holwerda, A.M., Kerkhof Garde, S.R., Bende, R.J., Keet, I.P., Eeftinck-Schattenkerk, J.K., Osterhaus, A.D., Schuitemaker, H. and Miedema, F. (1995) Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: a longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *J Exp Med*, **181**, 1365-1372.
- Klein, M.R., van der Burg, S.H., Pontesilli, O. and Miedema, F. (1998) Cytotoxic T lymphocytes in HIV-1 infection: a killing paradox? *Immunol Today*, **19**, 317-324.
- Konetschny, C., Holzer, G.W. and Falkner, F.G. (2002) Retroviral vectors produced in the cytoplasmic vaccinia virus system transduce intron-containing genes. *J Virol*, **76**, 1236-1243.
- Konetschny, C., Holzer, G.W., Urban, C., Hammerle, T., Mayrhofer, J. and Falkner, F.G. (2003) Generation of transduction-competent retroviral vectors by infection with a single hybrid vaccinia virus. *J Virol*, **77**, 7017-7025.
- Kotsopoulou, E., Kim, V.N., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M. and Mitrophanous, K.A. (2000) A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *J Virol*, **74**, 4839-4852.
- Koup, R.A., Safrit, J.T., Cao, Y., Andrews, C.A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C. and Ho, D.D. (1994) Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, **68**, 4650-4655.
- Kresina, T.F. (ed.). (2001) *An introduction to molecular medicine and gene therapy*. Wiley-Liss, Inc., New York.
- Kuate, S., Stahl-Hennig, C., ten Haaf, P., Heeney, J. and Uberla, K. (2003) Single-cycle immunodeficiency viruses provide strategies for uncoupling in vivo expression levels

- from viral replicative capacity and for mimicking live-attenuated SIV vaccines. *Virology*, **313**, 653-662.
- Kuiken, C., Foley, B., Freed, E., Hahn, B., Marx, P., McCutchan, F., Mellors, J., Wolinsky, S. and Korber, B. (eds.). (2002) *HIV Sequence Compendium 2002*. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory.
- Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. and Hendrickson, W.A. (1998) Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, **393**, 648-659.
- Lam, P.Y. and Breakefield, X.O. (2000) Hybrid vector designs to control the delivery, fate and expression of transgenes. *J Gene Med*, **2**, 395-408.
- Lamhamedi-Cherradi, S., Culmann-Penciolelli, B., Guy, B., Kieny, M.P., Dreyfus, F., Saimot, A.G., Sereni, D., Sicard, D., Levy, J.P. and Gomard, E. (1992) Qualitative and quantitative analysis of human cytotoxic T-lymphocyte responses to HIV-1 proteins. *Aids*, **6**, 1249-1258.
- Langley, R.J., Prince, G.A. and Ginsberg, H.S. (1998) HIV type-1 infection of the cotton rat (*Sigmodon fulviventer* and *S. hispidus*). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14355-14360.
- Levy, J.A. (1994) HIV and the pathogenesis of AIDS. *ASM Press, Washington, DC*.
- Lifson, J.D., Piatak, M., Jr., Rossio, J.L., Bess, J., Jr., Chertova, E., Schneider, D., Kiser, R., Coalter, V., Poore, B., Imming, R., Desrosiers, R.C., Henderson, L.E. and Arthur, L.O. (2002) Whole inactivated SIV virion vaccines with functional envelope glycoproteins: safety, immunogenicity, and activity against intrarectal challenge. *J Med Primatol*, **31**, 205-216.
- Liu, M.A., McClements, W., Ulmer, J.B., Shiver, J. and Donnelly, J. (1997) Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine*, **15**, 909-912.
- Liu, M.L., Winther, B.L. and Kay, M.A. (1996) Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol*, **70**, 2497-2502.
- Lusso, P. (2002) HIV and chemokines: Implications for therapy and vaccine. *Vaccine*, **20**, 1964-1967.
- Mackett, M., Smith, G.L. and Moss, B. (1984) General method for production and selection of infectious vaccinia virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol*, **49**, 857-864.
- Maldarelli, F., Martin, M.A. and Strebel, K. (1991) Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J Virol*, **65**, 5732-5743.
- Malim, M.H., Hauber, J., Le, S.Y., Maizel, J.V. and Cullen, B.R. (1989) The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*, **338**, 254-257.
- Malkevitch, N., Patterson, L.J., Aldrich, K., Richardson, E., Alvord, W.G. and Robert-Guroff, M. (2003) A replication competent adenovirus 5 host range mutant-simian immunodeficiency virus (SIV) recombinant priming/subunit protein boosting vaccine regimen induces broad, persistent SIV-specific cellular immunity to dominant and subdominant epitopes in Mamu-A*01 rhesus macaques. *J Immunol*, **170**, 4281-4289.
- Marshall, E. (2002) Clinical research. Gene therapy a suspect in leukemia-like disease. *Science*, **298**, 34-35.
- Mascola, J.R., Snyder, S.W., Weislow, O.S., Belay, S.M., Belshe, R.B., Schwartz, D.H., Clements, M.L., Dolin, R., Graham, B.S., Gorse, G.J., Keefer, M.C., McElrath, M.J., Walker, M.C., Wagner, K.F., McNeil, J.G., McCutchan, F.E. and Burke, D.S. (1996) Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus

- type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J Infect Dis*, **173**, 340-348.
- McMichael, A.J. and Hanke, T. (2003) HIV vaccines 1983-2003. *Nat Med*, **9**, 874-880.
- McNeil, A.C., Shupert, W.L., Iyasere, C.A., Hallahan, C.W., Mican, J.A., Davey, R.T., Jr. and Connors, M. (2001) High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13878-13883.
- Menendez-Arias, L., Mas, A. and Domingo, E. (1998) Cytotoxic T-lymphocyte responses to HIV-1 reverse transcriptase (review). *Viral Immunol*, **11**, 167-181.
- Merchlinsky, M., Eckert, D., Smith, E. and Zauderer, M. (1997) Construction and characterization of vaccinia direct ligation vectors. *Virology*, **238**, 444-451.
- Merchlinsky, M. and Moss, B. (1992) Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology*, **190**, 522-526.
- Miller, A.D. (1997) Development and applications of retroviral vectors. In Coffin, J.M., Hughes, S.H. and Varmus, H.E. (eds.), *Retroviruses*. Plainview, NY 11803: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Rodrigues, M.M. and Zavala, F. (1995) Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J Immunol Methods*, **181**, 45-54.
- Modrow, S. and Falke, S. (1997) *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Mofenson, L.M., Harris, D.R., Rich, K., Meyer, W.A., 3rd, Read, J.S., Moye, J., Jr., Nugent, R.P., Korelitz, J., Bethel, J. and Pahwa, S. (1999) Serum HIV-1 p24 antibody, HIV-1 RNA copy number and CD4 lymphocyte percentage are independently associated with risk of mortality in HIV-1-infected children. National Institute of Child Health and Human Development Intravenous Immunoglobulin Clinical Trial Study Group. *Aids*, **13**, 31-39.
- Morand-Joubert, L., Bludau, H., Lerable, J., Petit, J.C. and Lefrere, J.J. (1995) Serum anti-p24 antibody concentration has a predictive value on the decrease of CD4 lymphocyte count higher than acid-dissociated p24 antigen. *J Med Virol*, **47**, 87-91.
- Moss, B. (1990) Regulation of vaccinia virus transcription. *Annu Rev Biochem*, **59**, 661-688.
- Moss, B. (1991) Vaccinia virus: a tool for research and vaccine development. *Science*, **252**, 1662-1667.
- Moss, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11341-11348.
- Moss, B., Ahn, B.Y., Amegadzie, B., Gershon, P.D. and Keck, J.G. (1991) Cytoplasmic transcription system encoded by vaccinia virus. *J Biol Chem*, **266**, 1355-1358.
- Moss, P.A., Rowland-Jones, S.L., Frodsham, P.M., McAdam, S., Giangrande, P., McMichael, A.J. and Bell, J.I. (1995) Persistent high frequency of human immunodeficiency virus-specific cytotoxic T cells in peripheral blood of infected donors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5773-5777.
- Moss, R.B., Giermakowska, W., Lanza, P., Turner, J.L., Wallace, M.R., Jensen, F.C., Theofan, G., Richieri, S.P. and Carlo, D.J. (1997) Cross-clade immune responses after immunization with a whole-killed gp120-depleted human immunodeficiency virus type-1 immunogen in incomplete Freund's adjuvant (HIV-1 immunogen, REMUNE) in human immunodeficiency virus type-1 seropositive subjects. *Viral Immunol*, **10**, 221-228.
- Murphey-Corb, M., Martin, L.N., Davison-Fairburn, B., Montelaro, R.C., Miller, M., West, M., Ohkawa, S., Baskin, G.B., Zhang, J.Y., Putney, S.D. and et al. (1989) A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science*, **246**, 1293-1297.

- Murphy, C.G., Lucas, W.T., Means, R.E., Czajak, S., Hale, C.L., Lifson, J.D., Kaur, A., Johnson, R.P., Knipe, D.M. and Desrosiers, R.C. (2000) Vaccine protection against simian immunodeficiency virus by recombinant strains of herpes simplex virus. *J Virol*, **74**, 7745-7754.
- Musey, L.K., Krieger, J.N., Hughes, J.P., Schacker, T.W., Corey, L. and McElrath, M.J. (1999) Early and persistent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T helper dysfunction in blood and lymph nodes following acute HIV-1 infection. *J Infect Dis*, **180**, 278-284.
- Mwau, M., Cebere, I., Sutton, J., Chikoti, P., Winstone, N., Wee, E.G., Beattie, T., Chen, Y.H., Dorrell, L., McShane, H., Schmidt, C., Brooks, M., Patel, S., Roberts, J., Conlon, C., Rowland-Jones, S.L., Bwayo, J.J., McMichael, A.J. and Hanke, T. (2004) A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol*, **85**, 911-919.
- Mwau, M., McMichael, A.J. and Hanke, T. (2002) Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **18**, 611-618.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A.S., Taberner, C., Solomin, L., Cunningham, C.P., Pavlakis, G.N. and Felber, B.K. (1994) Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J Virol*, **68**, 2986-2993.
- Ober, B.T., Bruhl, P., Schmidt, M., Wieser, V., Gritschenberger, W., Coulibaly, S., Savidis-Dacho, H., Gerencer, M. and Falkner, F.G. (2002) Immunogenicity and safety of defective vaccinia virus lister: comparison with modified vaccinia virus Ankara. *J Virol*, **76**, 7713-7723.
- Parolin, C., Dorfman, T., Palu, G., Gottlinger, H. and Sodroski, J. (1994) Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol*, **68**, 3888-3895.
- Parren, P.W. and Burton, D.R. (2001) The antiviral activity of antibodies in vitro and in vivo. *Adv Immunol*, **77**, 195-262.
- Patel, D.D., Ray, C.A., Drucker, R.P. and Pickup, D.J. (1988) A poxvirus-derived vector that directs high levels of expression of cloned genes in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9431-9435.
- Pensiero, M.N., Wysocki, C.A., Nader, K. and Kikuchi, G.E. (1996) Development of amphotropic murine retrovirus vectors resistant to inactivation by human serum. *Hum Gene Ther*, **7**, 1095-1101.
- Peters, B.S. (2002) The basis for HIV immunotherapeutic vaccines. *Vaccine*, **20**, 688-705.
- Pfleiderer, M., Falkner, F.G. and Dorner, F. (1995) Requirements for optimal expression of secreted and nonsecreted recombinant proteins in vaccinia virus systems. *Protein Expr Purif*, **6**, 559-569.
- Picard-Maureau, M., Kreppel, F., Lindemann, D., Juretzek, T., Herchenroder, O., Rethwilm, A., Kochanek, S. and Heinkelein, M. (2004) Foamy virus--adenovirus hybrid vectors. *Gene Ther*, **11**, 722-728.
- Picker, L.J. and Maino, V.C. (2000) The CD4(+) T cell response to HIV-1. *Curr Opin Immunol*, **12**, 381-386.
- Pietschmann, T., Heinkelein, M., Heldmann, M., Zentgraf, H., Rethwilm, A. and Lindemann, D. (1999) Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol*, **73**, 2613-2621.
- Pinto, L.A., Berzofsky, J.A., Fowke, K.R., Little, R.F., Merced-Galindez, F., Humphrey, R., Ahlers, J., Dunlop, N., Cohen, R.B., Steinberg, S.M., Nara, P., Shearer, G.M. and Yarchoan, R. (1999) HIV-specific immunity following immunization with HIV

- synthetic envelope peptides in asymptomatic HIV-infected patients. *Aids*, **13**, 2003-2012.
- Pollard, V.W. and Malim, M.H. (1998) The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol*, **52**, 491-532.
- Pollok, K.E., Hanenberg, H., Noblitt, T.W., Schroeder, W.L., Kato, I., Emanuel, D. and Williams, D.A. (1998) High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol*, **72**, 4882-4892.
- Pope, B. and Kent, H.M. (1996) High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **24**, 536-537.
- 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. and et al. (1985) Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature*, **313**, 277-284.
- Ratto-Kim, S., Sitz, K.V., Garner, R.P., Kim, J.H., Davis, C., Aronson, N., Ruiz, N., Tencer, K., Redfield, R.R. and Birx, D.L. (1999) Repeated immunization with recombinant gp160 human immunodeficiency virus (HIV) envelope protein in early HIV-1 infection: evaluation of the T cell proliferative response. *J Infect Dis*, **179**, 337-344.
- Re, M.C., Vignoli, M., Furlini, G., Gibellini, D., Colangeli, V., Vitone, F. and La Placa, M. (2001) Antibodies against full-length Tat protein and some low-molecular-weight Tat-peptides correlate with low or undetectable viral load in HIV-1 seropositive patients. *J Clin Virol*, **21**, 81-89.
- Redfield, R.R., Birx, D.L., Ketter, N., Tramont, E., Polonis, V., Davis, C., Brundage, J.F., Smith, G., Johnson, S., Fowler, A. and et al. (1991) A phase I evaluation of the safety and immunogenicity of vaccination with recombinant gp160 in patients with early human immunodeficiency virus infection. Military Medical Consortium for Applied Retroviral Research. *N Engl J Med*, **324**, 1677-1684.
- Rinaldo, C., Huang, X.L., Fan, Z.F., Ding, M., Beltz, L., Logar, A., Panicali, D., Mazzara, G., Liebmann, J., Cottrill, M. and et al. (1995) 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*, **69**, 5838-5842.
- Robbins, P.D., Tahara, H. and Ghivizzani, S.C. (1998) Viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol*, **16**, 35-40.
- Robinson, H.L. (2002) New hope for an AIDS vaccine. *Nat Rev Immunol*, **2**, 239-250.
- Robinson, H.L. (2003) Prime boost vaccines power up in people. *Nat Med*, **9**, 642-643.
- Robinson, H.L., Montefiori, D.C., Johnson, R.P., Kalish, M.L., Lydy, S.L. and McClure, H.M. (2000) DNA priming and recombinant pox virus boosters for an AIDS vaccine. *Dev Biol (Basel)*, **104**, 93-100.
- Robinson, H.L., Montefiori, D.C., Johnson, R.P., Manson, K.H., Kalish, M.L., Lifson, J.D., Rizvi, T.A., Lu, S., Hu, S.L., Mazzara, G.P., Panicali, D.L., Herndon, J.G., Glickman, R., Candido, M.A., Lydy, S.L., Wyand, M.S. and McClure, H.M. (1999) Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat Med*, **5**, 526-534.
- Rose, N.F., Marx, P.A., Luckay, A., Nixon, D.F., Moretto, W.J., Donahoe, S.M., Montefiori, D., Roberts, A., Buonocore, L. and Rose, J.K. (2001) An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell*, **106**, 539-549.
- Rosenberg, E.S., Billingsley, J.M., Caliendo, A.M., Boswell, S.L., Sax, P.E., Kalams, S.A. and Walker, B.D. (1997) Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*, **278**, 1447-1450.
- Rosenberg, E.S. and Walker, B.D. (1998) HIV type 1-specific helper T cells: a critical host defense. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **14 Suppl 2**, S143-147.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Sato, A., Yoshimoto, J., Isaka, Y., Miki, S., Suyama, A., Adachi, A., Hayami, M., Fujiwara, T. and Yoshie, O. (1996) Evidence for direct association of Vpr and matrix protein p17 within the HIV-1 virion. *Virology*, **220**, 208-212.
- Scheiflinger, F., Dorner, F. and Falkner, F.G. (1992) Construction of chimeric vaccinia viruses by molecular cloning and packaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 9977-9981.
- Schmitz, J.E., Kuroda, M.J., Santra, S., Sasseville, V.G., Simon, M.A., Lifton, M.A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Dalesandro, M., Scallon, B.J., Ghayeb, J., Forman, M.A., Montefiori, D.C., Rieber, E.P., Letvin, N.L. and Reimann, K.A. (1999) Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8⁺ lymphocytes. *Science*, **283**, 857-860.
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K. and Pavlakis, G.N. (1997) Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol*, **71**, 4892-4903.
- Schroder, A.R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J.R. and Bushman, F. (2002) HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, **110**, 521-529.
- Sharma, S., Cantwell, M., Kipps, T.J. and Friedmann, T. (1996) Efficient infection of a human T-cell line and of human primary peripheral blood leukocytes with a pseudotyped retrovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11842-11847.
- Shen, X. and Siliciano, R.F. (2000) Preventing AIDS but not HIV-1 infection with a DNA vaccine. *Science*, **290**, 463-465.
- Shiraishi, M., Tomori, H., Nagahama, M., Taira, K., Nozato, E., Sugawa, H., Ishida, A. and Muto, Y. (1999) Stable gene expression with VSV-G pseudotyped-retrovirus vector in the rat liver. *J Surg Res*, **84**, 168-173.
- Shiver, J.W., Davies, M.E., Perry, H.C., Freed, D.C. and Liu, M.A. (1996) Humoral and cellular immunities elicited by HIV-1 vaccination. *J Pharm Sci*, **85**, 1317-1324.
- Shiver, J.W., Fu, T.M., Chen, L., Casimiro, D.R., Davies, M.E., Evans, R.K., Zhang, Z.Q., Simon, A.J., Trigona, W.L., Dubey, S.A., Huang, L., Harris, V.A., Long, R.S., Liang, X., Handt, L., Schleif, W.A., Zhu, L., Freed, D.C., Persaud, N.V., Guan, L., Punt, K.S., Tang, A., Chen, M., Wilson, K.A., Collins, K.B., Heidecker, G.J., Fernandez, V.R., Perry, H.C., Joyce, J.G., Grimm, K.M., Cook, J.C., Keller, P.M., Kresock, D.S., Mach, H., Troutman, R.D., Isopi, L.A., Williams, D.M., Xu, Z., Bohannon, K.E., Volkin, D.B., Montefiori, D.C., Miura, A., Krivulka, G.R., Lifton, M.A., Kuroda, M.J., Schmitz, J.E., Letvin, N.L., Caulfield, M.J., Bett, A.J., Youil, R., Kaslow, D.C. and Emini, E.A. (2002) Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, **415**, 331-335.
- Singh, M. and Srivastava, I. (2003) Advances in vaccine adjuvants for infectious diseases. *Curr HIV Res*, **1**, 309-320.
- Somogyi, P., Frazier, J. and Skinner, M.A. (1993) Fowlpox virus host range restriction: gene expression, DNA replication, and morphogenesis in nonpermissive mammalian cells. *Virology*, **197**, 439-444.
- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. and Kingsman, A.J. (1995) A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res*, **23**, 628-633.
- Stevenson, M. (1999) Viral genens and their products. In Merigan, T., Bartlett, J. and Bolognesi, D. (eds.), *Textbook of AIDS medicine*. Williams and Williams, Baltimore, pp. 23-48.

- Sutter, G. and Moss, B. (1992) Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 10847-10851.
- Sutter, G. and Staib, C. (2003) Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord*, **3**, 263-271.
- Teeuwesen, V.J., Lange, J.M., Keet, R., Schattenkerk, J.K., Debouck, C., van den Akker, R., Goudsmit, J. and Osterhaus, A.D. (1991) Low number of functionally active B lymphocytes in the peripheral blood of HIV-1-seropositive individuals with low p24-specific serum antibody titers. *Aids*, **5**, 971-979.
- Thiel, V., Herold, J., Schelle, B. and Siddell, S.G. (2001) Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. *J Gen Virol*, **82**, 1273-1281.
- Tsoukas, C.M., Raboud, J., Bernard, N.F., Montaner, J.S., Gill, M.J., Rachlis, A., Fong, I.W., Schlech, W., Djurdjev, O., Freedman, J., Thomas, R., Lafreniere, R., Wainberg, M.A., Cassol, S., O'Shaughnessy, M., Todd, J., Volvovitz, F. and Smith, G.E. (1998) Active immunization of patients with HIV infection: a study of the effect of VaxSyn, a recombinant HIV envelope subunit vaccine, on progression of immunodeficiency. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **14**, 483-490.
- Tung, F.Y., Rinaldo, C.R., Jr. and Montelaro, R.C. (1998) Replication-defective HIV as a vaccine candidate. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **14**, 1247-1252.
- Turner, J.L., Kostman, J.R., Aquino, A., Wright, D., Szabo, S., Bidwell, R., Goodgame, J., Daigle, A., Kelley, E., Jensen, F., Duffy, C., Carlo, D. and Moss, R.B. (2001) The effects of an HIV-1 immunogen (Remune) on viral load, CD4 cell counts and HIV-specific immunity in a double-blind, randomized, adjuvant-controlled subset study in HIV infected subjects regardless of concomitant antiviral drugs. *HIV Med*, **2**, 68-77.
- UNAIDS. (2006) AIDS epidemic update. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS UNAIDS, Geneva.
- van Baalen, C.A., Pontesilli, O., Huisman, R.C., Geretti, A.M., Klein, M.R., de Wolf, F., Miedema, F., Gruters, R.A. and Osterhaus, A.D. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific cytotoxic T lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol*, **78** (Pt 8), 1913-1918.
- VanCott, T.C., Mascola, J.R., Loomis-Price, L.D., Sinangil, F., Zitomersky, N., McNeil, J., Robb, M.L., Birx, D.L. and Barnett, S. (1999) Cross-subtype neutralizing antibodies induced in baboons by a subtype E gp120 immunogen based on an R5 primary human immunodeficiency virus type 1 envelope. *J Virol*, **73**, 4640-4650.
- Vazquez-Blomquist, D., Quintana, D. and Duarte, C.A. (2003) Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) priming and Fowlpox Virus booster elicit stronger CD8+ T cell response in mice against an HIV-1 epitope than DNA-Poxvirus prime-booster approach. *Biotechnol Appl Biochem*.
- Verma, I.M. and Somia, N. (1997) Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*, **389**, 239-242.
- Vinner, L., Nielsen, H.V., Bryder, K., Corbet, S., Nielsen, C. and Fomsgaard, A. (1999) Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine*, **17**, 2166-2175.
- Wagner, R., Teeuwesen, V.J., Deml, L., Notka, F., Haaksma, A.G., Jhagjhoorsingh, S.S., Niphuis, H., Wolf, H. and Heeney, J.L. (1998) Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology*, **245**, 65-74.
- Wee, E.G., Patel, S., McMichael, A.J. and Hanke, T. (2002) A DNA/MVA-based candidate human immunodeficiency virus vaccine for Kenya induces multi-specific T cell responses in rhesus macaques. *J Gen Virol*, **83**, 75-80.

- Welsh, D.K. and Kay, S.A. (2005) Bioluminescence imaging in living organisms. *Curr Opin Biotechnol*, **16**, 73-78.
- Whitney, J.B. and Ruprecht, R.M. (2004) Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr Opin Infect Dis*, **17**, 17-26.
- WHO. (1980) The global eradication of smallpox. Final report of the global commission for the certification of smallpox eradication. *History of International Public Health*, **4**.
- Wilber, A., Frandsen, J.L., Wangensteen, K.J., Ekker, S.C., Wang, X. and McIvor, R.S. (2005) Dynamic gene expression after systemic delivery of plasmid DNA as determined by in vivo bioluminescence imaging. *Hum Gene Ther*, **16**, 1325-1332.
- Wolff, J.A., Malone, R.W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felgner, P.L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, **247**, 1465-1468.
- Wu, X., Li, Y., Crise, B. and Burgess, S.M. (2003) Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. *Science*, **300**, 1749-1751.
- Yuen, L. and Moss, B. (1987) Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 6417-6421.
- Zavada, J. (1972) Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses. *J Gen Virol*, **15**, 183-191.
- Zhang, Y., Huber, M., Euler-Konig, I., Sussmuth, R., Jung, G. and Jassoy, C. (2001a) Analysis of the proliferative responses to peptides in individuals with vigorous Gag protein-specific proliferation. *Immunol Lett*, **79**, 93-96.
- Zhang, Y., Huber, M., Weissbrich, B., Voss, G., Langmann, P., Klinker, H. and Jassoy, C. (2001b) Characterization of HIV-specific proliferative T cell responses in HIV-infected persons. *AIDS Res Hum Retroviruses*, **17**, 623-629.
- Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. and Trono, D. (1998) Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, **72**, 9873-9880.
- zur Megede, J., Chen, M.C., Doe, B., Schaefer, M., Greer, C.E., Selby, M., Otten, G.R. and Barnett, S.W. (2000) Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol*, **74**, 2628-2635.

9 Anhang

9.1 Erklärungen

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation „Entwicklung und Erprobung eines Impfkonstrukts für das Humane Immundefektvirus (HIV) auf der Basis eines replikationsinkompetenten HIV-Vektors“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Zudem erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 19. Oktober 2006

Tomas Racek

9.2 Lebenslauf

Name: Tomáš Racek
Anschrift: Budapester Str. 67, Rostock
Geburtsdatum: 26. Mai 1976
Geburtsort: Hodonín, Tschechische Republik
Staatsangehörigkeit: tschechisch
Familienstand: ledig

1990-1994 Besuch des Gymnasiums in Strážnice
Juni 1994 Abitur
1994 - 1996 Studium der Biologie an der Masaryk Universität in Brunn
1996 Bakkalaureusprüfung (Bc.); Bakkalaureus Arbeit: „*Filoviridae*“
1996 - 1999 Masaryk Universität in Brunn, Naturwissenschaftliche Fakultät, Fach Allgemeine Biologie – Mikrobiologie
Juni 1999 Magisterprüfung (Mgr. (gleichwertig dem MSc.))
 Thema der Diplomarbeit: „*Das Studium des chromatographischen Verhaltens von Plasmiden und viraler DNA.*“
1999 - 2000 Wissenschaftliche Arbeit an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Masaryk Universität in Brunn, Fach Mikrobiologie zum Thema „*Studium der Aktivität der immobilisierten Enzyme mit Metallionen.*“
2000 - 2003 Wissenschaftliche Arbeit im Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians Universität Würzburg (Prof. Dr. C. Jassoy)
 Thema der Arbeit: „*Entwicklung und Erprobung eines Impfkonstrukts für das Humane Immundefektvirus (HIV) auf der Basis eines replikationsinkompetenten HIV-Vektors.*“
seit Januar 2004 Postdoc in der Abteilung für Vektorologie und Experimentelle Gentherapie der Universität Rostock (Prof. Dr. Dr. B. Pützer)

Rostock, Oktober 2006

9.3 Publikationsliste

Scheller, C., Sopper, S., Chen, P., Flory, E., Koutsilieri, E., **Racek, T.**, Ludwig, S., ter Meulen, V. and Jassoy, C. (2002) Caspase inhibition activates HIV in latently infected cells. Role of tumor necrosis factor receptor 1 and CD95. *J Biol Chem*, **277**, 15459-64.

Schmidt, A., Böckmann, M., Stoll, A., **Racek, T.** and Pützer, B.M. (2005) Analysis of adenovirus gene transfer into adult neural stem cells. *Virus Res*, **144**, 45-53.

Racek, T., Miše, N., Li, Z., Stoll, A. and B.M. Pützer, B.M. (2005) C-terminal p73 isoforms repress transcriptional activity of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) promoter. *J Biol Chem*, **280**, 40402-5.

Tuve, S., **Racek, T.**, Niemetz, A., Schultz, J., Soengas, M.S. and Pützer, B.M. (2006) Adenovirus-mediated TA-p73beta gene transfer increases chemosensitivity of human malignant melanomas. *Apoptosis*, **11**, 235-43.

Scheller, C., Knoferle, J., Ullrich, A., Pröttengeier, J., **Racek, T.**, Sopper, S., Jassoy, C., Rethwilm, A., and Koutsilieri, E. (2006) Caspase inhibition in apoptotic T cells triggers necrotic cell death depending on the cell type and the proapoptotic stimulus. *J Cell Biochem*, **97**, 1350-61.

Mise, N., Drost, M., **Racek, T.**, Tannapfel, A. and Pützer, B.M. (2006) Evaluation of potential mechanisms underlying genotype-phenotype correlations in multiple endocrine neoplasia type 2. *Oncogene* [Epub ahead of print]

Racek, T., Jarmy, G. and Jassoy, C. (2006): Induction of Humoral and Cellular Immune Responses in Mice by HIV-Derived Infectious Pseudovirions. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Epub ahead of print]

Harmos, F., Frenzen, F., Bussmann, B.M., Reiche, S., Tartler, H., **Racek, T.**, Nagy, K. and Jassoy, C. (submitted) Entry Fitness of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains.

9.4 Danksagung

Ich möchte an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Christian Jassoy dafür danken, dass er mir das interessante Thema überlassen hat, immer am Fortgang meines Projektes interessiert war und es mit seinem fachkundigen Rat in die richtige Richtung gelenkt hat.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Carsten Scheller und Dr. Sieghart Sopper für ständige Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung in allen Situationen bedanken.

Ein großes Dankeschön an Inge Euler-König, die immer hilfsbereit war und immer aufmuntern konnte, wenn etwas nicht gut gelaufen ist.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Annette Tietz für ihre Hilfe innerhalb und außerhalb des Instituts, für die Anmerkungen zu dieser Arbeit und vor allem für ihre Freundschaft bedanken.

Natürlich gilt mein Dank auch allen Doktoranden und Diplomanden der Arbeitsgruppe Jassoy, der ganzen Besatzung der Arbeitsgruppe Niewiesk und vielen anderen in dem Institut für Virologie für ihre Hilfsbereitschaft, Kollegialität und die schöne Arbeitsatmosphäre.

Schließlich danke ich noch der Nikica Miše und meinen Eltern für ihr Vertrauen, ihren Rückhalt und die andauernde Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.