

# Strategien zur Modulation der Immunogenität des HIV-1 Hüllproteins als Vakzinekomponente

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)  
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III –  
BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von

Veronika Wanninger aus Markt am Inn

Oktober 2007

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen März 2003 und Oktober 2007 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 17. Oktober 2007

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. G. Hauska

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer

Prof. Dr. R. Wagner

Prof. Dr. R. Warth

Tag der mündlichen Prüfung: 26. November 2007

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig und ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....  
Veronika Wanninger

„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern, die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben, während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.“

“What we know is just a drop, what we don't know an ocean”

*Isaac Newton*

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>A EINLEITUNG</b> .....	<b>8</b>
A.1 IMMUNSYSTEM .....	8
A.2 KOMPLEMENTSYSTEM .....	9
A.2.1 <i>Das Komplementsystem verbindet die angeborene mit der adaptiven Immunantwort</i> .....	10
A.2.1.1 B-Zell-Signaltransduktion nach Bindung von C3d an CD21 .....	10
A.2.1.2 Effekt der Bindung C3d-bedeckter Antigene an follikuläre dendritische Zellen .....	12
A.2.1.3 Andere Wirkmöglichkeiten C3d-bedeckter Antigene .....	14
A.2.2 <i>C3d als natürliches Adjuvans</i> .....	14
A.2.3 <i>Die Komplexität der C3d-CD21 Interaktion und ihre Relevanz für den Adjuvanseffekt in vivo</i> .....	16
A.2.4 <i>C3d und die Beeinträchtigung der Immunantwort</i> .....	18
A.3 DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV-1) .....	19
A.3.1 <i>Aufbau von HIV-1</i> .....	19
A.3.2 <i>Replikation von HIV-1</i> .....	21
A.3.3 <i>Glykoprotein Env als Antigen</i> .....	22
A.3.3.1 Die Bedeutung Env-neutralisierender Antikörper .....	25
A.3.4 <i>Entwicklung von HIV-Impfstoffen</i> .....	26
A.3.4.1 DNA-Immunisierung .....	29
A.3.4.2 Virusähnliche Partikel (VLP) .....	31
A.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....	34
<b>B MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>35</b>
B.1 KLONIERUNGEN UND GENTECHNISCHE ARBEITEN .....	35
B.1.1 <i>Bakterien</i> .....	35
B.1.2 <i>Oligonukleotide</i> .....	36
B.1.3 <i>Plasmide</i> .....	36
B.1.3.1 Herstellung der DNA-Konstrukte .....	36
B.1.3.2 Herstellung der Luciferase-Reporterstrukture .....	37
B.1.3.3 Herstellung der VLP-Konstrukte .....	37
B.1.3.4 Herstellung der Flp-In-Konstrukte .....	38
B.1.4 <i>PCR-Techniken</i> .....	39
B.1.4.1 Standard-PCR .....	39
B.1.4.2 Gradienten-PCR .....	40
B.1.4.3 PCR zur Synthese der HIV-Env-Signalsequenz .....	40
B.1.5 <i>Isolierung und Analyse genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen</i> .....	41

B.2	ZELLKULTURTECHNIKEN .....	41
B.2.1	Kultivierung eukaryontischer Zelllinien.....	41
B.2.2	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	42
B.2.3	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen .....	42
B.2.3.1	Calciumphosphat-Transfektionen .....	42
B.2.3.2	Fugene-Transfektionen.....	43
B.2.4	Herstellung stabiler eukaryontischer Zellen (Flp-In <sup>TM</sup> -System).....	43
B.2.4.1	Stabile Transfektion der Flp-In <sup>TM</sup> -Zellen.....	43
B.2.4.2	Kultivierung der stabil transfizierten Flp-In <sup>TM</sup> -Zellen.....	43
B.2.4.3	Überprüfung der stabilen Integration .....	44
B.2.5	Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC).....	44
B.2.5.1	Präparation humaner PBMC.....	44
B.2.5.2	Präparation von PBMC aus Kaninchenblut.....	45
B.2.6	Isolierung von humanen B-Lymphozyten.....	45
B.2.7	Stimulation von humanen B-Zellen und B-Zellklonen .....	45
B.3	ANALYSE UND AUFREINIGUNG DER TRANSIENTEN UND DER STABILEN PROTEIN- EXPRESSION.....	46
B.3.1	Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate .....	46
B.3.2	Quantifizierung des HIV-1-Hüllproteins im ELISA.....	46
B.3.3	Analyse der transienten Proteinexpression.....	47
B.3.3.1	Western Blot .....	47
B.3.3.2	Luciferasereporter-Assay .....	48
B.3.4	FACS-Analysen.....	48
B.3.4.1	Quantifizierung der Expression von Oberflächenantigenen.....	48
B.3.4.2	Nachweis der Bindung von hC3d an CD21 auf Raji-B-Zellen.....	49
B.3.4.3	Lebendfärbung.....	49
B.4	IMMUNISIERUNGEN.....	50
B.4.1	Versuchstiere und Haltung.....	50
B.4.2	Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA .....	50
B.4.3	DNA-Immunisierung der Balb/C-Mäuse.....	50
B.4.4	Immunisierung der New-Zealand-White-Kaninchen .....	50
B.4.5	Analyse der humoralen Immunantwort .....	51
B.4.5.1	Serumgewinnung.....	51
B.4.5.2	Bestimmung Env-spezifischer Antikörpertiter .....	51
B.4.5.3	Bestimmung hC3d-spezifischer Antikörper.....	52
B.4.5.4	Analyse von B-Gedächtniszellen immunisierter Kaninchen.....	52
B.4.5.4.1	In vitro-Restimulation der peripheren mononukleären Blutzellen.....	52
B.4.5.4.2	ELISPOT zur Bestimmung der B-Gedächtniszellen.....	53
B.4.6	Bestimmung der zellulären Immunantwort bei Mäusen .....	53
B.4.6.1	Präparation und Isolierung von Milzzellen immunisierter Mäuse.....	53
B.4.6.2	Kultivierung primärer Splenozyten.....	54
B.4.6.3	Verwendete Peptide.....	54
B.4.6.4	Nachweis zytotoxischer T-Zellen .....	55
B.4.6.4.1	Quantifizierung IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen im ELISPOT-Assay.....	55

B.4.6.4.2	Quantifizierung der intrazellulären IFN $\gamma$ -Produktion stimulierter CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	55
<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>57</b>
C.1	GESAMTKONZEPT .....	57
C.1.1	<i>Bedeutung von HIV-1 gp120 für die Impfstoffentwicklung</i> .....	57
C.1.2	<i>Wahl von hC3d<sub>3</sub> als molekulares Adjuvans</i> .....	57
C.2	HERSTELLUNG DER KODONOPTIMIERTEN GP120HC3D <sub>3</sub> -DNA-FUSIONSKONSTRUKTE .....	58
C.2.1	<i>Design und Herstellung unterschiedlicher gp120-Konstrukte</i> .....	58
C.2.2	<i>Herstellung von gp120-Konstrukten mit einem endogenen Luciferase-Reportersystem</i> .....	60
C.3	BEDEUTUNG DER C-TERMINALEN HC3D <sub>3</sub> -FUSION FÜR DIE EXPRESSIONS- UND SEKRETIONSEFFIZIENZ VON GP120 .....	60
C.3.1	<i>Erfolgreiche Expression und Sekretion der gp120-Varianten</i> .....	60
C.3.1.1	Maximale Expression von gp120 zu einem früheren Zeitpunkt als höchste Sekretion .....	60
C.3.1.2	<i>tpa-</i> und <i>HIV</i> -Signalsequenz ermöglichen die gp120-Sekretion in gleichem Maße .....	61
C.3.1.3	Erniedrigung der Expression und Sekretion von gp120 nach hC3d <sub>3</sub> -Fusion .....	63
C.3.1.4	Erhöhte Sekretion von gp120 im Vergleich zu gp120hC3d <sub>3</sub> .....	64
C.3.2	<i>gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte verringern die Expression eines endogenen Luciferasereportergens</i> .....	65
C.3.2.1	Herstellung von tpa1gp120ShC3d <sub>3</sub> .....	65
C.3.2.2	Maximale Expression von gp120 zu einem früheren Zeitpunkt als höchste Sekretion .....	65
C.3.2.3	Niedrigere Expression und Sekretion von gp120hC3d <sub>3</sub> -Fusionsproteinen .....	67
C.3.2.4	gp120hC3d <sub>3</sub> -Fusionskonstrukte führen zu einer verringerten Expression des endogenen Luciferasereportergens .....	69
C.3.3	<i>Zusammenfassung</i> .....	71
C.4	NACHWEIS DER BINDUNG VON HC3D AN DEN REZEPTOR CD21 AUF HUMANEN B-ZELLEN .....	72
C.4.1	<i>Stimulation von B-Zellen und B-Zellklonen hat keinen Einfluss auf die Expression von CD21</i> .....	72
C.4.2	<i>hC3d<sub>3</sub>- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine binden effizient an CD21</i> .....	75
C.4.3	<i>Zusammenfassung</i> .....	77
C.5	IMMUNOGENITÄT VERSCHIEDENER GP120HC3D <sub>3</sub> -FUSIONSKONSTRUKTE IM BALB/C-MAUSMODELL .....	77
C.5.1	<i>Niedrigere humorale Immunantwort nach Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten</i> .....	77
C.5.1.1	Geringfügige Verbesserung der humoralen Immunantwort bei Verwendung der HIV-1 Env Signalsequenz .....	78

C.5.1.2	Verringerte Induktion gp120-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von gp120hC3d <sub>3</sub> -Fusionskonstrukten .....	79
C.5.1.3	Immunisierung von gp120-Konstrukten führt zu einer T <sub>H</sub> 1-Polarisierung der humoralen Immunantwort .....	80
C.5.1.4	Induktion einer hC3d-spezifischen Immunantwort in Mäusen .....	82
C.5.2	<i>Vergleichbare zelluläre Immunantwort nach Immunisierung von gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten</i> .....	83
C.5.2.1	Die Verwendung der HIV-Signalsequenz führt zu einer höheren Anzahl IFN <sub>γ</sub> -sezernierender Milzzellen .....	83
C.5.2.2	Verwendung der HIV-Signalsequenz führt zu einer erhöhten intrazellulären IFN <sub>γ</sub> -Produktion in CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	84
C.5.3	<i>Zusammenfassung</i> .....	85
C.6	IMMUNOGENITÄT DER GP120HC3D <sub>3</sub> -FUSIONS-KONSTRUKTE IM <i>NEW-ZEALAND-WHITE-RABBIT</i> -MODELL .....	86
C.6.1	<i>Verschlechterung der humoralen Immunantwort nach Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten</i> .....	86
C.6.1.1	Verringerte Induktion gp120-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von <i>HIVgp120hC3d<sub>3</sub></i> .....	86
C.6.1.2	Keine Induktion hC3d-spezifischer Antikörper im Kaninchen .....	88
C.6.1.3	Kein Nachweis gp120-spezifischer B-Gedächtniszellen möglich .....	89
C.6.2	<i>Zusammenfassung</i> .....	89
C.7	DESIGN UND AUFBAU GAG <sub>IIIB</sub> -BASIERTER VIRUSÄHNLICHER PARTIKEL .....	90
C.7.1	<i>Herstellung verschiedener VLP-Varianten</i> .....	90
C.7.1.1	Herstellung verschiedener gp120- und gp140-VLP-Varianten .....	90
C.7.1.2	Herstellung von oberflächenexponiertem humanem und murinem C3d .....	92
C.7.1.3	Vergleich zweier verschiedener Transmembrandomänen .....	92
C.7.2	<i>Erfolgreiche Expression und VLP-Formation nach transienter Transfektion der VLP-DNA-Konstrukte</i> .....	92
C.7.3	<i>Effiziente Expression von gp140<sup>TM</sup> und hC3d<sup>TM</sup> in stabilen Zelllinien</i> .....	95
C.7.3.1	Herstellung der stabilen Zelllinien .....	95
C.7.3.2	Transiente Transfektion der stabilen Zelllinien führt zu einer Verringerung der Transgenexpression .....	99
C.7.4	<i>Zusammenfassung</i> .....	100
<b>D</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>101</b>
D.1	ANFORDERUNGEN AN EINE ERFOLGVERSPRECHENDE HIV-1- <i>VAKZINE</i> .....	101
D.2	KODONOPTIMIERTE GP120-KONSTRUKTE WEISEN EINE GUTE EXPRESSION UND SEKRETION IM ZELLKULTURSYSTEM AUF .....	101
D.2.1	<i>Verwendung unterschiedlicher Signalpeptidvarianten führt zu einer gleichmäßig hohen gp120-Sekretion</i> .....	102
D.2.2	<i>C3d<sub>3</sub>-Fusion führt zu einer geringeren Expression und Sekretion von gp120 in Säugerzellen</i> .....	106
D.2.3	<i>gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte verringern die Expression eines endogenen Luciferasereportergens</i> .....	107

D.3	EFFIZIENTE BINDUNG DER GP120HC3D <sub>3</sub> -FUSIONSKONSTRUKTE AN CD21 AUF HUMANEN B-ZELLEN .....	109
D.4	VERRINGERTE IMMUNOGENITÄT DER HC3D <sub>3</sub> -FUSIONIERTEN GP120-DNA-VAKZINE-KONSTRUKTE IM BALB/C-MAUSMODELL .....	111
D.4.1	<i>Effektivere humorale Immunantwort von nicht hC3d<sub>3</sub>-fusionierten gp120-DNA-Konstrukten.....</i>	<i>111</i>
D.4.2	<i>Zelluläre Immunantworten von C3d-fusionierten und nicht fusionierten gp120-DNA-Konstrukten sind vergleichbar .....</i>	<i>114</i>
D.5	VERLANGSAMTE BILDUNG VON ANTIKÖRPERN NACH IMMUNISIERUNG C3D-GEKOPPELTER GP120-DNA-VAKZINEKONSTRUKTE IM <i>NEW-ZEALAND-WHITE-RABBIT</i> -MODELL	116
D.6	ENTWICKLUNG EINES VLP-BASIERTEN IMPFSTOFFS UNTER EINBEZIEHUNG DES ADJUVANS C3D .....	119
D.6.1	<i>Gute Expressionsraten nach transienter Transfektion einzelner VLP-Vakzinekonstrukte .....</i>	<i>119</i>
D.6.2	<i>Niedrigere hC3d-Expression nach Kotransfektion stabiler gp140-Zellen...</i>	<i>123</i>
D.7	AUSBlick .....	124
<b>E</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>126</b>
	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>160</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>162</b>
	<i>Posterpräsentationen bei Fachtagungen:.....</i>	<i>162</i>
	<i>Artikel in Fachzeitschriften:.....</i>	<i>164</i>
	<b>DANK .....</b>	<b>165</b>
<b>F</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>166</b>
F.1	OLIGONUKLEOTIDE.....	166
F.2	SEQUENZEN.....	168
F.3	SEQUENZEN EUKARYONTISCHER EXPRESSIONSPASMIDE .....	173
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>180</b>

# Zusammenfassung

---

Angesichts von bislang 20 Millionen Todesopfern und einer jährlichen Zahl von über vier Millionen Neuinfektionen ist ein prophylaktischer Impfstoff gegen das humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) dringend notwendig, um die AIDS-Pandemie zu kontrollieren. Für einen effektiven Impfstoff gegen HIV-1 ist eine Induktion von humoralen und zellulären Immunantworten erforderlich. Insbesondere neutralisierende Antikörper sind dabei von Bedeutung, da sie Viren bereits beim Eintritt in den Körper abfangen bzw. deren Ausbreitung im Verlauf der Infektion verhindern können. Neutralisierende Antikörper sind ausschließlich gegen das virale Hüllprotein Env gerichtet, besonders gegen den externen Teil gp120, da Env als einziges virales Protein auf der Oberfläche des HI-Virus präsentiert wird. Eine Vakzinierungsstrategie, die sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induziert, ist die Verabreichung von Plasmid-DNA. Bei bisherigen Immunisierungen mit HIV-1 Env DNA zeigte sich jedoch, dass aufgrund der niedrigen Expression und Sekretion bei Verwendung der Env-Wildtypsequenzen und der geringen immunstimulatorischen Eigenschaften des Env-Proteins nur eine schwache Immunantwort generiert wurde.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Immunogenität des HIV-1 Hüllproteins gp120 im Rahmen eines DNA-Impfstoffs zu verbessern. Folgende Strategien wurden dabei angewandt: (i) Zur Steigerung der Expressionsrate wurden an den Kodongebrauch von hochexprimierenden Säugetiergenen angepasste Sequenzen verwendet, (ii) zur Verbesserung der Sekretion und einer dadurch erhöhten Stimulation von B-Zellen erfolgte die Überprüfung verschiedener Signalpeptide und (iii) wurde zur natürlichen Adjuvierung dreimal die Sequenz der humanen Komplementkomponente C3d (hC3d<sub>3</sub>) an die gp120-Sequenz fusioniert. Die immunstimulatorische Wirkung von C3d beruht auf dessen Bindung an den Rezeptor CD21, der sich auf B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen befindet. Diese Bindung hat eine verbesserte Aktivierung der B-Zellen und eine verstärkte Präsentation des Antigens zur Folge.

Die kodonoptimierten DNA-Konstrukte erzielten eine hohe und langanhaltende Expression von gp120-Proteinen in 293T-Zellen. Die Sekretionsrate der gp120-Proteine war dabei unabhängig von den verwendeten Signalpeptiden. Nach Fusion von hC3d<sub>3</sub> wurde eine Verringerung der Expressions- wie auch der Sekretionsraten des gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteins gegenüber dem nicht fusionierten gp120-Protein festgestellt. Die niedrige Expression war nicht auf die Transfektionseffizienz zurückzuführen, was mit einem Fusionskonstrukt, das zwischen gp120 und hC3d<sub>3</sub> zwei Stopkodons enthielt, gezeigt werden konnte. Ferner wurden die gp120-DNA-Konstrukte mit einem endogenen Luciferasegen versehen und nach Transfektion die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Luciferaseaktivität korrelierte mit der jeweiligen Länge des translatierten gp120-Konstrukts, was darauf hindeutet, dass vorwiegend die Fusion der langen hC3d<sub>3</sub>-Sequenz zu einer Verringerung der Sekretionseffizienz führte.

Die für die immunstimulatorische Wirkung notwendige Bindung von C3d an CD21 konnte für die sezernierten gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine mit Raji-B-Zellen nachgewiesen werden. Die Bindung von humanem C3d ist sowohl an humanem als auch an murinem CD21 funktionell, daher konnte die Austestung der Fusionskonstrukte in Mäusen erfolgen.

Diese gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte wurden in Mäusen und Kaninchen auf ihre Immunogenität hin überprüft. In Analogie zu den *in vitro*-Daten induzierten gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte nach Immunisierung niedrigere Antikörpertiter als gp120-Konstrukte. Die verringerte Antikörperbildung wurde auf die im Vergleich mit gp120 geringeren Expressions- und Sekretionsraten der hC3d<sub>3</sub>-fusionierten gp120-Proteine zurückgeführt. Zelluläre Immunantworten wurden jedoch durch die hC3d<sub>3</sub>-Kopplung nicht beeinflusst. Die Kodonoptimierung von gp120 führte zu einer sehr effizienten Expression und damit zu guten humoralen und zellulären Immunantworten. Die Fusion des Adjuvans hC3d<sub>3</sub> konnte diese Immunantworten jedoch nicht weiter steigern.

Um die Verringerung der *in vivo*-Expression nach Fusion von hC3d<sub>3</sub> zu umgehen, wurden Konstrukte generiert, die eine Präsentation von Env- sowie C3d-Proteine auf der Oberfläche von virusähnlichen Partikeln (VLP) ermöglichten. Diese VLP-Konstrukte basieren auf einer kodonoptimierten Gag-Sequenz und den zuvor generierten DNA-Konstrukten, an die zur Verankerung von Env bzw. C3d in der VLP-Membran entweder die autologe HIV-1 Env Transmembrandomäne oder die des baculoviralen Oberflächenproteins gp64 fusioniert wurde. Im 293T-Zellkultursystem konnte eine effiziente Expression und Sekretion der VLP nachgewiesen werden. Um diese HIV-1 VLP in großem Maßstab in eukaryontischen Zellen zu produzieren, wurden gp140- und hC3d-stabile Zelllinien etabliert. In weiterführenden Mausstudien sollen diese VLP-Konstrukte auf Ihre Immunogenität hin überprüft werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die Verwendung unterschiedlicher Signalpeptide noch hC3d<sub>3</sub>-Fusion die Sekretion oder die Immunogenität kodonoptimierter gp120-DNA-Konstrukte verbessert. Die aufgrund der Größe der Fusionsproteine eingeschränkte Sekretion kann durch die neu generierten VLP umgangen und dadurch eventuell das Potential des immunstimulatorischen Faktors C3d<sub>3</sub> genutzt werden.

# A Einleitung

---

## A.1 Immunsystem

In unserer Umwelt befindet sich eine Vielzahl an Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, die teils lebensgefährliche Infektionen hervorrufen können. Um solche Infektionen zu verhindern oder zu bekämpfen, besitzt der Körper eine Immunabwehr. Diese besteht aus einem System von Zellen und Organen, das der Unterscheidung von „eigen“ und „fremd“ dient, und uns aufgrund dieser Fähigkeit und einer Reihe verschiedener Effektor-mechanismen wirksam vor Infektionen schützt. Eine typische Immunreaktion, z.B. gegen die Infektion eines Pathogens, wird aufgrund ihres zeitlichen Verlaufs in eine frühe unspezifische, eine frühe induzierte, und eine spätere adaptive Phase unterteilt.

In der frühen unspezifischen Phase bilden Makrophagen und neutrophile Zellen des angeborenen Immunsystems eine erste Verteidigungslinie gegen Pathogene, indem sie Mikroben phagozytieren und Parasiten durch Freisetzung ihres Lysosomeninhalts zerstören. Zudem initiieren sie die spätere Immunreaktion durch Ausschüttung von Zytokinen und Expression von Korezeptoren. Diese unspezifischen zellulären Mechanismen werden durch lösliche Faktoren des Immunsystems, wie z.B. dem Komplementsystem, unterstützt (siehe Kapitel A.2). In der frühen induzierten Phase der Immunantwort überbrücken Lymphozyten mit Antigenrezeptoren limitierter Diversität die Zeitspanne bis zur spezifischen adaptiven Immunantwort. Zu ihnen gehören die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), die  $\gamma\delta$ -T-Zellen, die B1-Zellen und die Marginalzonen-B-Zellen, die als Träger der frühen T-Zell-unabhängigen Immunantwort (*thymus independent*, TI) gelten.

Das adaptive Immunsystem teilt sich in den humoralen, von B-Zellen ausgeführten Zweig und in den zellulären, der von T-Zellen kontrolliert wird. Sowohl T- als auch B-Zellen weisen eine sehr große Diversität und Spezifität ihrer Antigenrezeptoren auf. Durch Antigenkontakt werden einzelne Zellen mit Spezifität für das jeweilige Pathogen zunächst zur Proliferation angeregt und differenzieren schließlich zu Effektor- bzw. Gedächtniszellen. T-Zellen benötigen eine direkte Präsentation von Fremdpeptiden durch *major histocompatibility complex class* (MHC) I- und II- Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC) zusammen mit kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86. Zu den professionellen APC zählen Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und B-Zellen. T-Zellen werden nach ihren Korezeptoren in  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -T-Zellen unterteilt.  $CD8^+$ -T-Zellen differenzieren nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen (CTL), die infizierte Zellen abtöten.  $CD4^+$ -T-Zellen dagegen entwickeln sich zu T-Helfer-Zellen ( $T_H$ -Zellen) zweier verschiedener Subtypen.  $T_H1$ -Zellen aktivieren Makrophagen und beeinflussen über die Ausschüttung von Zytokinen, z.B. Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ), andere Zellen des Immunsystems.  $T_H2$ -Zellen aktivieren B-Zellen in thymusabhängigen Immunantworten (*thymus dependent*, TD). Bei TD-Antworten wird zunächst das an den B-Zell-Rezeptor (BCR) gebundene Antigen internalisiert, und Peptide des Antigens werden mittels MHC II-

Molekülen präsentiert. T<sub>H</sub>2-Zellen erkennen diese Peptid-MHC-Komplexe und geben der B-Zelle Proliferationssignale über kostimulatorische Moleküle und Zytokine. Diese Vorgänge finden in sogenannten Keimzentren (*germinal centers*; GC) statt. Das gilt auch für die Affinitätsreifung, bei der durch Mutation bereits rearrangierter variabler Domänen bessere antigenbindende Immunglobulinvarianten erzeugt werden. Nach Aktivierung der B-Zellen durch T<sub>H</sub>2-Zellen erfolgt die Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen. Die gebildeten Antikörper (Immunglobuline; Ig) binden mit ihrer variablen Domäne an Antigene und können diese neutralisieren. Die konservierten Anteile (Fc-Teile) der verschiedenen Immunglobulintypen (IgM, IgG, IgE, IgA) dienen als Adaptoren und vermitteln die Bindung an unterschiedliche Effektorzellen mit verschiedenen Funktionen. Bei allen eben beschriebenen Vorgängen nehmen Signale, die über den BCR vermittelt werden, eine zentrale Rolle ein. Einen Überblick über die Aktivierung des BCR gibt der Abschnitt A.2.1.1. Nach (Janeway, Jr., 2002).

## **A.2 Komplementsystem**

Das Komplementsystem ist der älteste Teil des Immunsystems. Teile des Komplements wurden in fast allen Tierstämmen entdeckt, darunter auch bei Reptilien, Amphibien und Knochenfischen (Nonaka & Kimura, 2006; Nonaka & Yoshizaki, 2004). Ein C3/C4-ähnliches Protein wurde in Seegurken und Korallen, und sogar in Arthropoden entdeckt (Dishaw *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2005).

Das Komplementsystem setzt sich aus insgesamt ca. 35 Proteinen im Plasma und auf Zelloberflächen zusammen, die Teil des angeborenen Immunsystems sind. Das humane Komplementsystem wurde erst 1890 entdeckt, als Nuttall *et al.* eine hitzesensitive Komponente in humanem Serum fanden, die essentiell für die Abtötung von Bakterien war. Der Name Komplementsystem wurde erstmals von Paul Ehrlich 1899 verwendet, der annahm, dass diese Bestandteile Antikörper bei der Lyse von Bakterien unterstützen („komplementierten“). Erst 1950 wurde durch Pillemer *et al.* bekannt, dass die Aktivierung des Komplementsystems nicht unbedingt Antikörper benötigt, sondern auch über den so genannten „Alternativen Aktivierungsweg“ funktionieren kann (Mayer, 1984).

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei verschiedenen Wegen erfolgen, dem klassischen, dem Lektin- und dem alternativen Weg. Alle drei Wege führen zur Bildung einer C3-Konvertase, die C3-Moleküle spaltet. Dabei entsteht u.a. C3b, das kovalent an Pathogene binden kann. C3b wird sodann von Komplementrezeptoren erkannt, die sich auf Phagozyten und anderen Immunzellen befinden. Diese Interaktion löst schließlich verschiedene Effektormechanismen aus. Beispielsweise entsteht der *membrane attac complex* (MAC) oder es werden verschiedene Chemoattraktoren ausgeschüttet (Holers, 2005; Walport, 2001a; Walport, 2001b). Das Komplementsystem kann folglich Zielzellen direkt lysieren, durch Opsonisierung für die Phagozyten markieren und sich zusätzlich an der Bildung der Entzündungsreaktion beteiligen. Übersicht in (Morgan *et al.*, 2005).

### **A.2.1 Das Komplementsystem verbindet die angeborene mit der adaptiven Immunantwort**

In den letzten Jahren zeigte sich, dass das Komplementsystem nicht nur eine wichtige Rolle im angeborenen Immunsystem spielt, sondern auch das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem verbindet. Die wichtigsten Proteine für diese Funktion sind die Spaltprodukte der dritten Komplementkomponente C3: C3b, iC3b und C3d (Toapanta & Ross, 2006). Neuere Studien legen nahe, dass das Spaltprodukt C5a ähnliche Funktionen erfüllen könnte (Guo & Ward, 2005). Aktiviertes C3b kann entweder zur Bildung der C5-Konvertase führen oder kovalent an Protein-Amingruppen oder Hydroxylgruppen von kohlenhydrathaltigen Glykoproteinen der eindringenden Mikroorganismen binden. Nach der Anheftung auf der Oberfläche der Pathogene interagiert C3b mit dem Komplementrezeptor 1 (CR1/ CD35) und wird über die Zwischenstufe iC3b zu C3d(g) gespalten. Diese Spaltung führt zu C3d-bedeckten Pathogenen, die an den Komplementrezeptor 2 (CR2/ CD21) binden können (Rickert, 2005). Der C3d-Rezeptor CD21 wird auf der Oberfläche von folliculären dendritischen Zellen (FDC), reifen B-Zellen und einigen T-Zellen exprimiert (Braun *et al.*, 1998; Croix *et al.*, 1996; Fingerroth *et al.*, 1988; Fischer *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1999; Reynes *et al.*, 1985; Tsoukas & Lambris, 1993). CD21 ist nicht nur der Rezeptor für C3d, sondern bindet auch  $\text{IFN}\alpha$ , CD23 und gp350 von EBV (Asokan *et al.*, 2006; Aubry *et al.*, 1992; Carel *et al.*, 1990; Delcayre *et al.*, 1991; Frade *et al.*, 1985; Holers & Kulik, 2007; Martin *et al.*, 1991). Übersicht siehe (Holers, 2005). Die Interaktionen von C3b und C3d mit den auf der Oberfläche von Immunzellen vorkommenden Komplementrezeptoren CD35 und CD21, die Teil des adaptiven Immunsystems sind, verbinden so das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem (Bergmann-Leitner *et al.*, 2006; Hawlisch & Kohl, 2006). Auf die Interaktion der Komplementkomponente C3d mit dem Rezeptor CD21 wird im nachfolgenden Abschnitt näher eingegangen.

#### A.2.1.1 B-Zell-Signaltransduktion nach Bindung von C3d an CD21

Im Normalfall resultiert die Bindung eines spezifischen Antigens an den B-Zell-Rezeptor (entweder IgM oder IgG) in der Aktivierung einer Reihe von Kinasen, Phosphatasen und Adaptorproteinen, und letztlich zu einer durch Transkriptionsfaktoren vermittelten Änderung der Genexpression. Die Antwort auf ein Antigen wird dabei durch vier extrazelluläre Bedingungen bestimmt: (i) die Antigenkonzentration, (ii) die Avidität der Bindung, (iii) das Zeitintervall und die Dauer der Antigenbegegnung sowie (iiii) die Assoziation des Antigens mit Kostimuli von Pathogenen, des angeborenen Immunsystems oder anderer Lymphozyten.

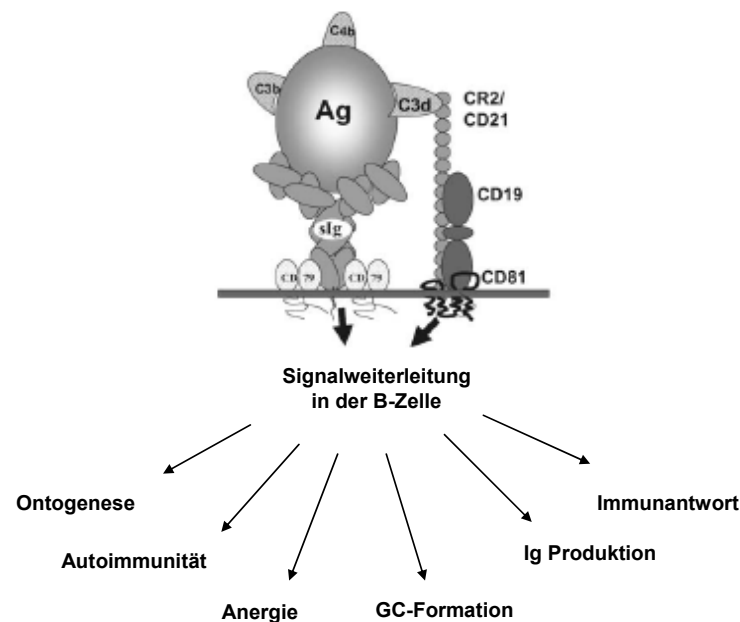
In den letzten Jahren wurde klar, dass viele verschiedene Korezeptoren, wie  $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ , CD22 und der CD21/CD19/CD81-Komplex, sowohl die Quantität als auch die Qualität des BCR-Signals regulieren (Healy *et al.*, 1998). Die parallele Ligation der Korezeptoren und des BCR führt dabei je nach Antigen und Antigenumgebung zu einer unterschiedlich

starken Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domänen der Korezeptoren, die entweder inhibitorische oder aktivierende Wirkung entfalten (Kurosaki, 1999). Die Koligation von BCR und CD21 führt allerdings nur bei antigenspezifischen B-Zellen zur Aktivierung (Thornton *et al.*, 1996). Eine gute Übersicht über die BCR-Signaltransduktion bieten folgende Artikel: (Carroll, 1998a; Gold *et al.*, 1991; Gold, 2002; Kurosaki, 1999; Reth & Wienands, 1997; Wienands, 2000).

Für die Signalweiterleitung nach der Bindung von C3d an CD21 aggregieren die Oberflächenmoleküle CD21, CD19, CD81 in *lipid rafts* zum BCR-Komplex (Cheng *et al.*, 2001; Cherukuri *et al.*, 2001b; Cherukuri *et al.*, 2004). In diesem Komplex wirkt CD21 als alleiniges Rezeptormolekül von C3d und CD19 dient der Signalweiterleitung von CD21 zur Zellaktivierung (Sato *et al.*, 1997; Sato, 1999; Tedder *et al.*, 2002). Die Funktion von CD81 ist bislang ungeklärt, allerdings kommt es nach genetischer Deletion zu einem verringerten Membrantransport von CD19 an die Oberfläche der B-Zellen (Fearon & Carroll, 2000; Levy *et al.*, 1998). Neuere Studien gehen davon aus, dass die Signaltransduktion von C3d nicht allein über CD19 läuft, sondern auch der zytoplasmatische Anteil von CD21 daran beteiligt ist (Barrault & Knight, 2004). In der Literatur gibt es ferner Hinweise darauf, dass C3d auch über einen CD21-unabhängigen Weg wirken kann (Haas *et al.*, 2004).

Die gleichzeitige und ortsnahe Bindung von BCR und Komplementrezeptor CD21 verstärkt die Aktivierung der Signalkaskade und senkt den Signalschwellenwert für ankommende Signale des BCR. Somit ist eine geringere Antigenmenge für die Zellaktivierung notwendig. Infolge der Kreuzvernetzung kommt es normalerweise zu einer verstärkten Ausbildung von Keimzentren, die den intensiven Austausch von B- und T-Zellen fördern, und zur B-Zell-Proliferation (Carter *et al.*, 1988; Lyubchenko *et al.*, 2005; Mongini *et al.*, 1997; Morgan *et al.*, 2005). Zudem werden inhibitorische Signale verringert, die Apoptose gehemmt und sogar anergische B-Zellen reaktiviert (Barrington *et al.*, 2005; Holers, 2005; Kozono *et al.*, 1995; Lyubchenko *et al.*, 2007; Mongini *et al.*, 2003; Tedder *et al.*, 2002). Je nach Stärke der ankommenden Signale und des jeweiligen Antigens kann die Quervernetzung aber auch zur Anergie der B-Zelle oder zu einer Autoimmunantwort führen (Rickert, 2005; Tsubata, 1999). In Abbildung A.1 sind die verschiedenen Wirkungen der Signalweiterleitung dargestellt.

Im Zuge der Aktivierung kommt es zu einer erhöhten Präsentation der kostimulatorischen Rezeptoren CD80 und CD86 sowie MHC II-Molekülen (Kozono *et al.*, 1998; Mongini *et al.*, 2002). Die Bindung von Antigen-C3d-Komplexen an spezifische B-Zellen erhöht zudem sowohl die Ig-Synthese (Thornton *et al.*, 1996), als auch die IL-6 Produktion (D'Addario *et al.*, 2000; Tanner *et al.*, 1996). In den letzten Jahren wurde die Genexpression von reifen B-Zellen nach der Aktivierung genau erforscht und aufgeschlüsselt. Die folgenden Artikel bieten einen guten Überblick über die Veränderung der Genexpression nach der Aktivierung: (Glynne, 2000; Lee *et al.*, 2006).



**Abbildung A.1: Struktur und Wirkung des BCR-Komplexes.** Illustration der Bindung eines C3d-opsonierten Antigens an BCR und CD21. Durch die Kreuzvernetzung kommt es zu einer verstärkten Signalweiterleitung und führt zu einer gesteigerten Antwort in der B-Zelle. Nach (Morgan *et al.*, 2005)

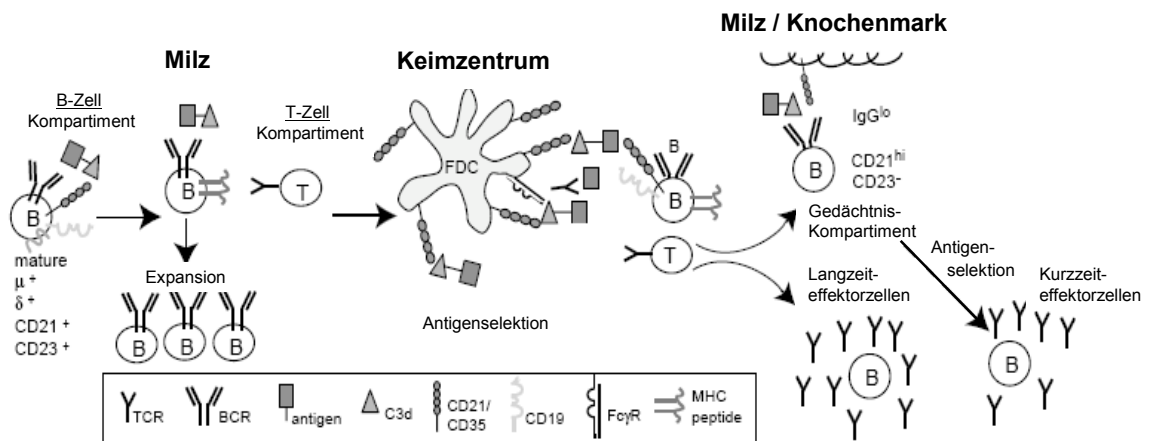
Die Antigenaufnahme, -prozessierung und -präsentation zur Aktivierung von T-Zellen wird ebenfalls durch BCR-Quervernetzung sowie -Signaltransduktion reguliert (Lankar *et al.*, 2002; Siemasko *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1996). Die Antigenaufnahme und -präsentation hängt dabei von der Affinität des Antigens an den BCR und von beteiligten Korezeptoren ab (Aluvihare *et al.*, 1997; Batista & Neuberger, 1998). Die zusätzliche Bindung von C3d an CD21 erhöht die Antigenaufnahme (Barrault & Knight, 2004; Boackle *et al.*, 1997; Boackle *et al.*, 1998) und verbessert die Antigenpräsentation durch selektives Schleusen zu den MHC II-Molekülen (Hess *et al.*, 2000; Prechl *et al.*, 2002; Thornton *et al.*, 1994). In einer Studie wurde allerdings festgestellt, dass die CD21-BCR-Kreuzvernetzung keine Internalisierung bewirkt, sondern nur eine verstärkte und verlängerte Signaltransduktion zur Folge hat (Cherukuri *et al.*, 2001b).

#### A.2.1.2 Effekt der Bindung C3d-bedeckter Antigene an folliculäre dendritische Zellen

C3d-konjugierte Antigene können nicht nur an CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen binden, sondern auch an CD21 auf folliculären dendritischen Zellen (FDC). FDC sind in den Keimzentren der Lymphknoten lokalisiert und haben eine wichtige Funktion bei der Antigenpräsentation, die nicht über MHC I oder II vermittelt wird, sondern über den Fc-Rezeptor  $\gamma$ II oder den Komplementrezeptor CD21 (Park & Choi, 2005; Reynes *et al.*, 1985). Diese Rezeptoren binden und sammeln Ig- oder C3d-opsonierte Antigene und können intaktes unprozessiertes Antigen auf ihrer Oberfläche zurückhalten (Qin *et al.*, 1998; Roozendaal & Carroll, 2007; Yoshida *et al.*, 1993). Die daraus resultierende wiederholte Stimulation antigenspezifischer B-Zellen nach einer überstandenen Infektion schützt diese vor Apoptose (Lindhout *et al.*, 1993; Mongini *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*,

1999), begünstigt den Isotypwechsel (Qin *et al.*, 1998) und die somatische Hypermutation (Chen *et al.*, 2000) und fördert schließlich die Reifung zu langlebigen B-Gedächtniszellen, die hochaffine Immunglobuline exprimieren (Aydar *et al.*, 2005; Fearon & Carroll, 2000; Nielsen *et al.*, 2000; Nielsen & Leslie, 2002; Zinkernagel, 2002). Murine FDC können Antigen für bis zu drei Monate (Mandel *et al.*, 1981), humane FDC für Jahre zurückhalten und damit B-Zellen stimulieren (Hlavacek *et al.*, 2002). Für effiziente B-Zell-Antworten sind die Komplementrezeptoren auf den FDC nötig (Ahearn *et al.*, 1996; Molina *et al.*, 1996), obwohl diese Rezeptoren auch auf B-Zellen exprimiert werden (Fang *et al.*, 1998).

FDC sind folglich bei der Induktion sekundärer IgG-Antworten stark beteiligt. Einerseits sind sie die Quelle des Antigens, andererseits stellen sie die antigenunabhängige stimulatorische Aktivität bereit (Wu *et al.*, 1996), die sicherstellt, dass B-Zellen während ihrer Entwicklung und später Überlebenssignale erhalten. Die von B-Zellen sezernierten Zytokine TNF $\alpha/\beta$  sichern im Gegenzug das Überleben der FDC (Mackay & Browning, 1998). C3d-bedeckte Mikroorganismen können so durch die Interaktion mit CD21 bei der Antigenpräsentation wie auch bei der Erhaltung des immunologischen Gedächtnisses unterstützend wirken (siehe Abbildung A.2). Zusätzlich können an CD21 gebundene Immunkomplexe die Signalweiterleitung vereinfachen, die für das Überleben reifer B-Zellen und für die Selektion hochaffiner B-Zellen nötig sind (Fang *et al.*, 1998; Fischer *et al.*, 1998; Holers & Kulik, 2007; Lyubchenko *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2000; Qin *et al.*, 1998).



**Abbildung A.2: Interaktion C3d-gekoppelter Antigene mit CD21 auf der Oberfläche von FDC und B-Zellen.** C3d-gekoppelte Antigene aktivieren naive B-Zellen durch Kreuzvernetzung von BCR und Korezeptor CD21, die mittels T-Zell-Hilfe zu Plasmazellen heranreifen oder die Bildung von Keimzentren (GC) initiieren. CD21-Rezeptoren auf FDC halten C3d-opsonisierte Antigene zurück und stimulieren wiederholt B-Zellen, die schließlich hochaffine spezifische Antikörper ausbilden oder zu langlebigen Gedächtniszellen heranreifen. (Carroll, 2004).

### A.2.1.3 Andere Wirkmöglichkeiten C3d-bedeckter Antigene

Obwohl die Mehrheit der T-Zellen kein CD21 auf der Oberfläche tragen, gibt es eine Untergruppe von T-Zellen des T<sub>H</sub>1-Typs, die den C3d-Rezeptor exprimieren (Fischer *et al.*, 1991; Fischer *et al.*, 1999; Tsoukas & Lambris, 1988). In mehreren Studien wurde bestätigt, dass C3d-Proteine so nicht nur die humorale, sondern auch die zelluläre Immunantwort verändern können (Cutler *et al.*, 1998; Kaya *et al.*, 2001). Fusion von C3d kann so die Ausrichtung der T-Zellantwort zu einem T<sub>H</sub>1-Phänotyp (Bergmann-Leitner *et al.*, 2005) aber auch zu einem T<sub>H</sub>2-Typ (Bower *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006) verlagern. Neben der Bindung an CD21 auf FDC, B- und T-Zellen kann die Fusion von C3d auch zu einer Erhöhung der Antigenstabilität beitragen, die unabhängig von der Bindung an den Komplementrezeptor CD21 zu einer verstärkten Immunstimulation führt (Haas *et al.*, 2004).

### A.2.2 C3d als natürliches Adjuvans

Nachdem die Koligation von IgM oder IgG und CD21 zu einer intensiveren B-Zell-Aktivierung und Antigenpräsentation sowie zu einer erhöhten Antikörperproduktion führt, wurde vermutet, dass C3d als molekulares Adjuvans genutzt werden kann. Dempsey *et al.* zeigten erstmals, dass die Fusion von *Hen egg lysozyme (HEL)* mit drei Kopien von murinem C3d die sekundären Immunantworten 1.000-10.000 fach verstärkt (Dempsey *et al.*, 1996). Ähnliche Ergebnisse wurden nach C3d-Fusion an virale, bakterielle, parasitäre und zelluläre (Selbst-) Antigene erreicht. Dabei kamen verschiedenste Konjugationsmechanismen zum Einsatz: Genfusionen, die Antigen-C3d Proteine produzieren (Bower *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2000), kovalente Konjugation (Test *et al.*, 2001) und Biotinylation von C3d (Del Nagro *et al.*, 2005; Haas *et al.*, 2004; Henson *et al.*, 2001). Grundsätzlich wurde festgestellt, dass drei C3d-Proteine die beste Adjuvanswirkung zeigen und eine Reduzierung auf ein oder zwei C3d-Proteine einen inhibitorischen Effekt bewirkt (Suradhat *et al.*, 2001; Toapanta & Ross, 2006; Tolnay & Tsokos, 1998). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass auch die Kopplung an C3b immunstimulatorisch wirken kann (Devaux *et al.*, 2004; Villiers *et al.*, 1999; Villiers *et al.*, 2003).

Für die Untersuchung der Adjuvanswirkung von C3d in Vakzinen wurden verschiedene Antigene aus infektiösen Mikroorganismen verwendet. Nach Konjugation von Gensequenzen des löslichen Hämagglutinins (sHA) eines Influenzavirus an drei murine C3d-Kassetten (mC3d<sub>3</sub>) und nachfolgender DNA-Immunisierung von Mäusen wurde festgestellt, dass die Höhe der induzierten anti-HA Antikörpertiter denen ähnlich waren, die durch das immunogenere transmembrane HA (tmHA) ausgelöst wurden. Allerdings wurde nur bei der Immunisierung der mC3d<sub>3</sub>-fusionierten Konstrukte eine verbesserte Antikörperaviditätsreifung und eine verstärkte Hämagglutinininhibition ermittelt, korrelierend mit einer erhöhten IL-4 Produktion und einer schnelleren protektiven Immunantwort nach einem tödlichen Viruschallenge (Mitchell *et al.*, 2003; Ross *et al.*,

2000). In einer anderen Studie von Watanabe *et al.* wurden Proteinimmunisierungen intranasal mit tmHA, sHA oder sHA-mC3d<sub>3</sub> in Mäusen durchgeführt. Als Adjuvans wurde eine Untereinheit des Cholera-toxins B (CTB) und eine geringe Menge des Holotoxins (CTB-H) verwendet. Alle Immunisierungen mit den Adjuvantien CTB und CTB-H lösten IgA- und IgG-Antikörper gegen HA aus, die vor einer tödlichen Virusmenge schützten. Ohne diese Adjuvantien waren nur Tiere geschützt, die mit mC3d<sub>3</sub>-konjugiertem Antigen immunisiert waren (Watanabe *et al.*, 2003). Die Vakzinierung mit anderen C3d-gekoppelten Hämagglutininen, u.a. der löslichen Form des Masernhämagglutinins, bestätigte die erhöhten Antikörpertiter und die beschleunigte Bildung neutralisierender Antikörper im Vergleich zu Konstrukten ohne mC3d<sub>3</sub> (Green *et al.*, 2001).

T-Zell unabhängige (TI) Antigene, z.B. das Kapselpolysaccharid des Serotyps 14 von *Streptococcus pneumoniae* (PPS14), induzierte signifikant erhöhte anti-PPS-Konzentrationen nach mC3d-Fusion im Vergleich zu nativem PPS14 oder PPS14-Glycin-Konjugaten (Mitsuyoshi *et al.*, 2005; Test *et al.*, 2001). In diesen Studien wurde festgestellt, dass die Interaktion mit CD21 zwar zu einer Verstärkung der primären Immunantwort führt, es aber nach der zweiten Immunisierung mit PPS14-mC3d<sub>3</sub> zu einer Verminderung der Gedächtnisantwort kommt. In einer weiteren Untersuchung mit PPS14-mC3d<sub>3</sub> und PPS14-OVA wurde die Qualität der induzierten Antikörper überprüft und festgestellt, dass die mit OVA-Konjugation ausgelösten Antikörper eine stärkere Avidität und eine effektivere Opsonisierung aufwiesen als die an C3d gekoppelten Varianten (Hu & Test, 2004). Bei TI-Antigenen scheint folglich die Fusion von C3d weniger effektiv zu sein als bei T-Zell abhängigen Trägerproteinen. Diese Beurteilung kann sich aber durchaus wieder ändern, denn bei Untersuchungen des tumorassoziierten Antigens hCGβ (*human chorionic gonadotropin β*) konnte in früheren Studien eine verbesserte Immunantwort nach mC3d<sub>3</sub>-Fusion festgestellt werden (Wang *et al.*, 2004c; Wang *et al.*, 2006d), die allerdings in einer nachfolgenden Arbeit widerlegt wurde (Guan *et al.*, 2007).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde das Selbstantigen Kollagen-Typ II (CII) an mC3d<sub>3</sub> konjugiert und im Mausmodell untersucht, um zu sehen, ob damit eine Kollagen-induzierte Arthritis ausgelöst wird. Alle Mäuse, die mit CII-mC3d<sub>3</sub> vakziniert wurden entwickelten Rheumatoide Arthritis. Tiere, die mit CII und Complete Freund's Adjuvans (CFA) immunisiert wurden, entwickelten hingegen keine Arthritis (Del Nagro *et al.*, 2005). Diese Studie zeigt, dass C3d pathogene Autoantikörper auslösen kann, und folglich bei B-Zell-abhängigen Autoimmunerkrankungen eine größere Rolle spielt. Dies bedeutet aber auch, dass C3d die natürliche Toleranz gegenüber Selbstproteinen überwinden kann und für die Induktion von Immunantworten gegen Tumorantigene als Immunisierungsadjuvans genutzt werden kann.

Inzwischen wird die Adjuvanswirkung von C3d auch für veterinärmedizinische Impfungen verwendet. Das Bovine Diarrhoe Virus Typ II (BVDV) ist weltweit für hohe Mortalitätsraten in Rinderbeständen verantwortlich. Das E2-Glykoprotein von BVDV ist ein wichtiges Ziel für neutralisierende Antikörper bei infizierten Tieren. Die Untersuchung von Wang *et al.* zeigte, dass sich gereinigte E2-Proteine, die an murines oder bovines C3d<sub>3</sub> fusioniert waren, 10.000-fach immunogener erwiesen als E2-Protein alleine und die dabei

gebildeten anti-E2-Antikörper die Virusinfektion neutralisieren konnten (Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2005a). Ähnliche Resultate wurden bei Konjugation des VP1-Proteins des Maul-und Klauenseuchevirus an C3d<sub>3</sub> erreicht. Die Bindung von VP1 an C3d<sub>3</sub> oder an eine CD21-bindende C3d-Domäne führte zur Bildung neutralisierender Antikörper, die 85% der Tiere vor der Infektion schützten (Fan *et al.*, 2007).

Eine große Schwierigkeit bei der Induktion von HIV-1-spezifischen Antikörpern ist die lange Reifungszeit von Hüllproteinspezifischen Antikörpern, die zu einer verzögerten Immunantwort führt (Cole *et al.*, 1998). Der Einsatz von C3d wäre folglich ein Vorteil bei Impfungen gegen HIV-1, da auf diese Weise schnell hochtitrige und kreuzreagierende Antikörper gegen Env generiert werden könnten. DNA-Plasmide, die das HIV-1 Hüllprotein (Env)-gp120-Gen mit zwei oder drei murinen C3d-Kassetten kodieren, sind bereits in mehreren Studien für die Immunisierung von Mäusen verwendet worden (Green *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2001). Vakzinierungen mit diesen DNA-Plasmiden zeigten, dass C3d nicht nur die sekundären humoralen Immunantworten (IgG) verstärkt, sondern auch die Reifung der Antikörperaviditäten verbessert. Auch die Neutralisation gegenüber HIV-1 und die B-Zell-Stimulation wurden erhöht (Bower *et al.*, 2004a; Green *et al.*, 2003; Toapanta & Ross, 2004). Dabei erwiesen sich drei C3d-Kassetten an eine lösliche trimere Form von HIV-1 Env gekoppelt stets effektiver bei der Induktion neutralisierender Antikörper gegen Primärisolate von HIV-1, als Plasmide, die Env-Glykoproteine ohne C3d enthielten (Bower *et al.*, 2004b).

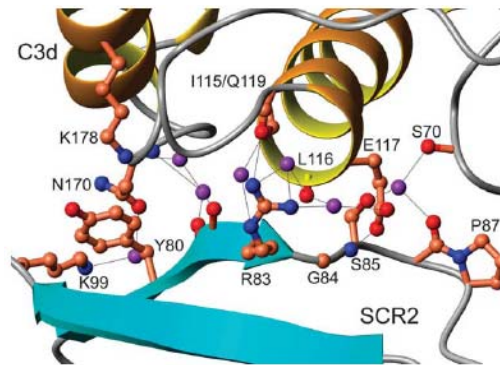
Generell lässt sich sagen, dass C3d eine hochspezifische Immunantwort auf das daran konjugierte Antigen hervorruft (Lou & Kohler, 1998) und somit für die Verbesserung der Immunreaktion von schwach immunogenen Antigenen bestens geeignet ist (Ross *et al.*, 2000).

### **A.2.3 Die Komplexität der C3d-CD21 Interaktion und ihre Relevanz für den Adjuvaneffekt *in vivo***

Die Verstärkung der Immunantwort durch C3d kommt durch die Bindung und die nachfolgende Signaltransduktion von CD21 auf der Oberfläche der B-Zellen zustande. Einige Aspekte dieser Interaktion sind allerdings noch unklar. Studien mit synthetischen Peptiden ergaben, dass sich die minimale CD21-Bindungsregion von C3d zwischen den Aminosäuren (aa) 1199 und 1210 (Nummerierung des reifen C3) befindet (Lambris *et al.*, 1985). Ein synthetisches Peptid das diese Region beinhaltet (P28) kann sowohl CD21 binden, als auch B-Zellen stimulieren (Esparza *et al.*, 1991; Frade *et al.*, 1992; Sarrias *et al.*, 2001). Nach Fusion von vier P28-Peptiden an das PreS2/S-Antigen des Hepatitis B Virus konnten erhöhte Titer und die Reifung von hochaviden Antikörpern festgestellt werden (Wang *et al.*, 2004b). Allerdings zeigt die Studie von Diefenbach *et al.*, dass extensive Mutagenese des Segments 1199-1210 von humanem C3 nur zu einer 20%igen Reduktion der Bindung von iC3b und C3d an CD21 führt (Diefenbach & Isenman, 1995). Aufgrund von Röntgenstrukturanalysen wurde daraufhin eine negativ geladene Tasche im C3d-Molekül als Bindungsstelle von CD21 vermutet (Nagar *et al.*, 1998). Dies bestätigte sich nach dem Austausch von negativ geladenen Aminosäuren, der zur Inhibition der

Interaktion mit CD21 führt (Clemenza & Isenman, 2000). Aus verschiedenen Studien ergibt sich, dass die Bindung von C3d an CD21 hauptsächlich am *short consensus repeat* (SCR) 2 des aus 15-16 SCR aufgebauten Rezeptors stattfindet (Kalli *et al.*, 1991; Prodingler *et al.*, 1998; Prota *et al.*, 2002), allerdings stören Mutationen in SCR1 die Interaktion sehr (Hannan *et al.*, 2005). Die Untersuchung der Bindungskinetiken von iC3b, C3d und P28 an CD21 mit *Surface plasmon resonance* (SPR) ergab, dass weitere Regionen von CD21 an der Interaktion beteiligt sind (Sarrias *et al.*, 2001). Bei Vergleich von SCR1-SCR2 und SCR1-SCR15 in SPR-Studien zeigte sich, dass die Bindungsaffinität zwar gleich hoch war, aber die Assoziations- und Dissoziationsraten von SCR1-15 ungefähr zehnfach niedriger waren als die von SCR1-2 (Guthridge *et al.*, 2001; Hannan *et al.*, 2002). Die Aufklärung der Kristallstruktur von SCR1-2 im Komplex mit C3d offenbarte weitere Rezeptorkontaktstellen auf C3d. Damit wurde die Hypothese widerlegt, dass die negativ geladene Tasche die einzige Bindungsregion von C3d darstellt. Desweiteren wurde die Bildung eines CD21-CD21-Dimers durch Interaktion der SCR1-Domänen vermutet (Hannan *et al.*, 2002; Szakonyi *et al.*, 2001). In neueren Analysen stellte sich allerdings heraus, dass CD21 sowohl im freien als auch im gebundenen Zustand (an C3d) als Monomer vorliegt (Gilbert *et al.*, 2005; Hannan *et al.*, 2005). Die Röntgenkristallstrukturanalyse des gesamten CD21-Rezeptors von Gilbert *et al.* legt zudem den Schluss nahe, dass die große Flexibilität des CD21-Moleküls es zulässt, größere C3d-gekoppelte Antigenkomplexe zu binden (Gilbert *et al.*, 2006). Ein Modell, das auf dem theoretischen elektrostatischen Potential und Kalkulationen der Assoziationskonstanten beruht, versucht die widersprüchlichen Ergebnisse zu interpretieren und kommt zu dem Schluss, dass die Assoziation von C3d mit CD21 hauptsächlich elektrostatisch sei. Dieses Modell geht davon aus, dass die Erkennung und Bindung der beiden Moleküle aufgrund der Anziehung von Ladungen erfolgt und Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoff (H)-Brücken für die Bindung verantwortlich sind (Morikis & Lambris, 2004). Bei den Berechnungen wurde das gesamte Molekül miteinbezogen, und nicht ausschließlich die Bindungsstellen an SCR1-2, wie in den vorigen Studien. Veränderungen von geladenen Aminosäuren in C3d können daher aufgrund neuer Assoziationsstellen durchaus einen Einfluss auf die Bindung an CD21 haben (Morikis & Lambris, 2004). Kürzlich veröffentlichte Modellberechnungen bestätigen die Bedeutung elektrostatischer Interaktionen bei der Bindung von C3d an CD21 (Zhang *et al.*, 2007a). Eine Möglichkeit der CD21-C3d-Interaktion ist in Abbildung A.3 dargestellt.

Doch trotz der Informationen aus den Röntgenstrukturanalysen, Mutationsanalysen und theoretischen Modellen konnte bisher nicht vollständig geklärt werden, wie die Interaktion von C3d und CD21 genau abläuft und welche Konsequenzen dies für *in vivo*-Modelle hat.



**Abbildung A.3: Detaillierte Struktur der CD21-C3d Interaktion.** Gezeigt sind nur die Wechselwirkungen zwischen SCR2 und C3d. Aminosäurereste, die mit Sauerstoff-(rot) oder Stickstoff-(blau) Atomen der Seiten- oder Hauptketten bei der Ausbildung der Wasserstoffbrücken (schwarze Linien) untereinander oder über Wassermoleküle (lila) beteiligt sind, wurden gekennzeichnet. Nach (Hannan *et al.*, 2005)

#### A.2.4 C3d und die Beeinträchtigung der Immunantwort

Im Gegensatz zu den vorher erwähnten Studien, die eine Verbesserung der Immunantwort nach Fusion von C3d zeigen (A.2.2), weisen andere Befunde darauf hin, dass C3d als Immunsuppressor wirken kann. Überblick in (Bennett & Leanderson, 2003). Die Antikörperbildung gegen das Diphterietoxin B (DT) (Lee *et al.*, 2005), das humane chorionische Gonadotropin (hCG $\beta$ ) (Guan *et al.*, 2007; Terrazzini *et al.*, 2004), das bovine Rotavirus VP7, das bovine Herpes-Virus Typ 1 Glykoprotein D (Suradhat *et al.*, 2001) und das Zirkumsporozoitenprotein des Malariaerregers (CSP) (Bergmann-Leitner *et al.*, 2005) wurde nach Konjugation an C3d gehemmt. Sowohl die Dosis als auch die immunogenen Eigenschaften der Antigene spielen eine wichtige Rolle bei der Verstärkung oder Hemmung der Immunantwort durch C3d. Niedrige Mengen von Antigen-C3d-Fusionsproteinen verbessern die Immunantwort, hohe Dosen dagegen scheinen sie zu verschlechtern (Lee *et al.*, 2005). Die individuellen Gegebenheiten der Antigene haben ebenfalls einen wichtigen Einfluss auf die Adjuvanswirkung von C3d. Die Fusion von C3d an CSP hemmt die Ausbildung von Antikörpern wahrscheinlich durch die Maskierung der immunogenen Epitope mit den C3d-Molekülen (Bergmann-Leitner *et al.*, 2005). Bei hCG $\beta$  hingegen kommt es vermutlich nach Fusion von C3d<sub>3</sub> zu einer verringerten Antigenpräsentation, da hCG $\beta$  in Mäusen als Selbstantigen erkannt wird und zur Immuntoleranz führt (Guan *et al.*, 2007). Der positive Effekt von C3d auf die Immunantwort scheint auch von der Antigenumgebung abzuhängen. Nach Verwendung von starken Proteinadjuvantien wie z.B. Ribi bei der Immunisierung von C3d-gekoppelten Env-Proteinvarianten ließ sich kein synergistischer Effekt von mC3d<sub>3</sub> feststellen (Koch *et al.*, 2005).

Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde ein HIV-1 Hüllprotein als Antigen gewählt, da die Fusion von C3d<sub>3</sub> an gp120 bislang stets zur Verstärkung der Immunreaktion führte (Bower *et al.*, 2004b; Bower *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2001).

### **A.3 Das Humane Immundefizienzvirus (HIV-1)**

Im Jahr 1983 gelang es der Forschergruppe um Montagnier in Paris erstmals, den Erreger des Erworbenen Immunschwächesyndroms (*acquired immune deficiency syndrome, AIDS*), ein bis dato unbekanntes Retrovirus, zu isolieren (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Kurz darauf entdeckte auch die Arbeitsgruppe um Gallo in den USA das Humane Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) (Gallo *et al.*, 1984; Gelmann *et al.*, 1984). Das verwandte Retrovirus HIV-2 wurde erst 1986 in Westafrika aus AIDS-Patienten isoliert (Clavel *et al.*, 1986). Als Grundlage für die systematische Nomenklatur von HIV-1 und HIV-2 dient die Sequenzanalyse des *env*-Gens, welches für das virale Hüllprotein kodiert. HIV-1 wird infolgedessen in die Gruppen M (main), O (outlier) und N (non-main, non-outlier) unterschieden. Die Gruppe M, deren Isolate die globale Epidemie dominieren, wird nochmals in die Subtypen (*clades*) A bis K unterteilt. In Europa und den USA ist Subtyp B prävalent, während Subtyp E in Afrika und Subtyp C auf dem indischen Subkontinent überwiegt. HIV-2 ist in Westafrika endemisch und wird in die fünf Subtypen A bis E unterteilt (Myers *et al.*, 1994). Zu Beginn der neunziger Jahre wurden erstmals Varianten von HIV-1 isoliert, deren Genom aus Teilen mehrerer Subtypen zusammengesetzt ist, bei denen es sich also um rekombinante Formen der zuvor definierten Subtypen handelt (Negroni & Buc, 2000).

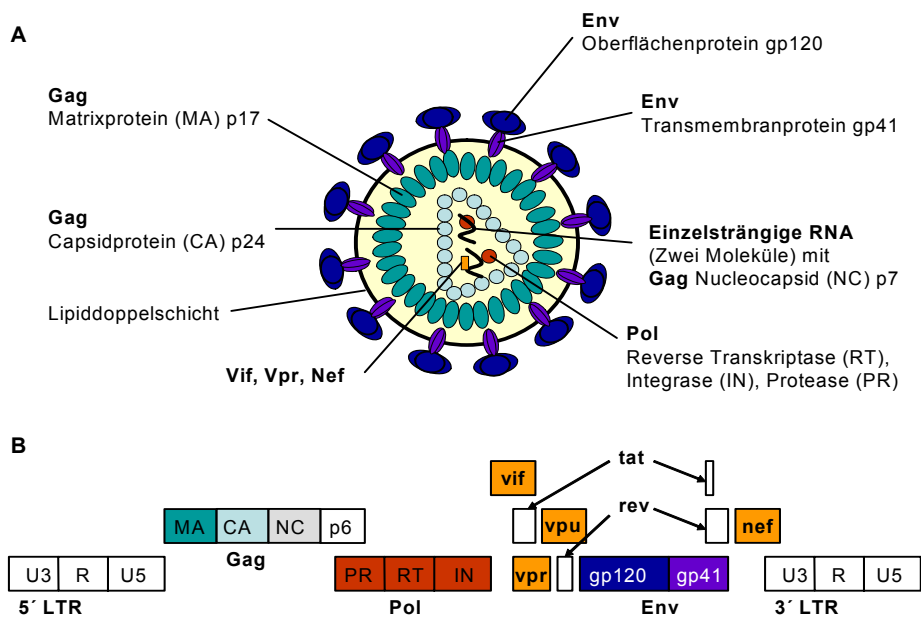
Das HI-Virus infiziert hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die als zentrale Schaltstelle die Immunantwort regulieren (siehe A.1). Die virusbedingte Abnahme der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen führt nach zehn bis fünfzehn Jahren zu einer Schwächung des Immunsystems, aufgrund der schließlich opportunistische Infektionen auftreten, die bei schlechter medizinischer Versorgung schnell zum Tod führen (Dal Maso *et al.*, 2001). Inzwischen hat sich AIDS zu einer weltweiten Pandemie entwickelt und führt vor allem in Entwicklungsländern zu einer hohen Mortalitätsrate (Piot *et al.*, 2001). Das HI-Virus wird hauptsächlich durch Geschlechtsverkehr sowie durch Blut und Blutprodukte übertragen. Im Moment sind weltweit über 40 Millionen Menschen mit HIV-1 infiziert und pro Jahr kommt es zu ca. 4,3 Millionen Neuinfektionen (WHO-Bericht, 2006). Die Entwicklung eines Impfstoffs, der zu einer starken humoralen und zellulären Immunantwort gegen unterschiedliche Subtypen von HIV-1 führt, ist daher ein wichtiges Anliegen der virologischen Forschung.

#### **A.3.1 Aufbau von HIV-1**

Der grundsätzliche sphärische Aufbau der Immundefizienzviren aus Membranhülle, äußerer Proteinhülle, Capsidproteinhülle und RNA/Enzymkomplex entspricht dem aller Retroviren (siehe Abbildung A.4A). Reife HIV-1 Virionen haben einen Durchmesser von 100-120 nm und sind von einer Lipiddoppelschicht umhüllt, die sich von der Wirtszellmembran ableitet. In die Virushülle sind virale Glykoproteine eingelagert, die aus drei externen (gp120) und drei transmembranen (gp41) Proteinen bestehen. Durch die Bindung von gp120 an die Rezeptoren der Wirtszelle kommt es zu einer Konformationsänderung von Env, wodurch der N-terminale Teil des Transmembranproteins gp41

exponiert und die Fusion der viralen Lipiddoppelschicht mit der Wirtszellmembran vermittelt wird (Eckert & Kim, 2001; Freed & Martin, 1995; Gallo *et al.*, 2003; Roux & Taylor, 2007; Wyatt & Sodroski, 1998). Im Inneren der mit Matrixproteinen ausgekleideten Membran befindet sich das Capsid, welches zwei identische, ca. 9,2 kb große einzelsträngige RNA-Moleküle enthält, die mit Nucleoproteinen komplexiert sind. Wie eukaryontische mRNA tragen sie am 5'-Ende eine 7-Methylguanin-Kappe und am 3'-Ende eine Polyadenylierung. Neben den genomischen RNA-Molekülen befinden sich die viralen enzymatischen (RT, IN, PR) und akzessorischen (Vif, Vpr, Vpu, Nef) Proteine sowie einige Wirtszellfaktoren im Capsid (Coffin, 1997; Hirsch MS, 1990; Modrow, 1997) (siehe Abbildung A.4A).

Die RNA enthält die drei Genbereiche *gag* (*group-specific antigens*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*). Dabei kodiert der *gag*-Bereich für die Matrix-, Capsid- und Nucleocapsidproteine, *pol* enthält die Gene für Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, und aus den *env*-Genen entstehen die viralen Hüllproteine (siehe Abbildung A.4B). Zudem kodiert das HIV-1 Genom für weitere Gene, die regulatorischen Einfluss auf die Virusreplikation nehmen (Vif, Vpu, Vpr, Nef) (Cullen & Garrett, 1992). Die flankierenden repetitiven Sequenzen der viralen DNA nach der reversen Transkription (*long terminal repeats*; LTR) sind für die Integration ins Wirtszellgenom essentiell und enthalten den viralen Promotor, der die Transkription der viralen Gene kontrolliert.



**Abbildung A.4: Aufbau eines reifen HIV-1 Viruspartikels und die provirale Genomorganisation.** **(A) Schematische Darstellung eines reifen HI-Virions.** Gag und Env sind die wichtigsten Strukturproteine für die Ausbildung der sphärischen Morphologie. Die Gag-Genprodukte beinhalten das Capsid- (CA), das Matrix- (MA) und das Nucleocapsidprotein (NC). Die Env-Glykoproteine sind eingefügt in die Lipiddoppelschicht, die von der Wirtszelle bei der Abknospung des Virus mitgenommen wurde. Ferner enthält das reife Virion drei enzymatische (RT, PR, IN) und vier akzessorische (Vpu, Vpr, Vif, Nef) Proteine. Das einzelsträngige RNA-Genom liegt in zwei Kopien im reifen Viruspartikel vor. **(B) Schematische Darstellung der HIV-1 Genomorganisation.** Das Provirusgenom ist ca. 9,2 kb lang und wird von zwei langen repetitiven Sequenzen (long terminal repeats, LTR) flankiert. Nach Initiation der Transkription am 5'-LTR-Promotor werden insgesamt 15 verschiedene Genprodukte exprimiert. Nach (Sierra *et al.*, 2005).

### A.3.2 Replikation von HIV-1

Nach der Anheftung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle kommt es zur Fusion und schließlich zum *Uncoating*, wobei der Nukleoproteinkomplex (*core*) in das Zytoplasma entlassen wird. Daraufhin wird die vom Virus mitgebrachte RNA von der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT) in DNA umgeschrieben. Diese reverse Transkription ist sehr fehlerbehaftet, da kein „proof reading“ erfolgt und trägt somit zur Variabilität von HIV bei (Preston *et al.*, 1988). Nach dem Transport in den Zellkern wird die virale DNA in das Wirtszellgenom integriert und mittels zellulärer Enzyme und Faktoren transkribiert. In der frühen Phase der Replikation werden ausschließlich mehrfach gespleißte mRNA produziert, ins Zytoplasma transportiert und die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef exprimiert. Sobald Rev in ausreichender Menge vorliegt, werden einfach- oder ungespleißte mRNA generiert und ins Zytoplasma transportiert, um dort die restlichen Virusproteine und die genomische RNA zu produzieren (Pollard & Malim, 1998). Rev bindet an die RNA-Sekundärstruktur RRE (*rev responsive element*) von einfach- und ungespleißten mRNA, schützt diese so vor vorzeitigem Abbau und vereinfacht den Transport der mRNA durch die Kernmembran ins Zytoplasma, wo sie translatiert werden können (Battiste *et al.*, 1996). Ferner enthält Rev eine Kernlokalisationssequenz, mit der das Protein wieder in den Zellkern transportiert wird und beeinflusst so als „shuttle“-Protein die zeitliche Regulation der viralen Transkription (Greene & Peterlin, 2002).

Die Gag- und Gag-Pol-Polyproteine werden in der späteren Phase der HIV-1-Replikation von ungespleißter Rev-abhängiger mRNA translatiert. Der Gag-Polyproteinvorläufer (Pr55<sup>Gag</sup>) wird während der Virusreifung zu vier Strukturproteinen (p17(MA), p24(CA), p7(NC), p6) prozessiert, die nach Umlagerung die reife Virusgestalt bilden. Die translatierten Gag- und Gag-Pol-Polyproteine lagern sich an die Zellmembran an und beginnen mit dem Zusammenbau der Virionen (*assembly*) (Briggs *et al.*, 2003; Derdowski *et al.*, 2004; Finzi *et al.*, 2007; Perlman & Resh, 2006), die schließlich durch die Plasmamembran knospen (*budding*) (Freed & Mouland, 2006; Freed, 2002; Gould *et al.*, 2003; Morita & Sundquist, 2004).

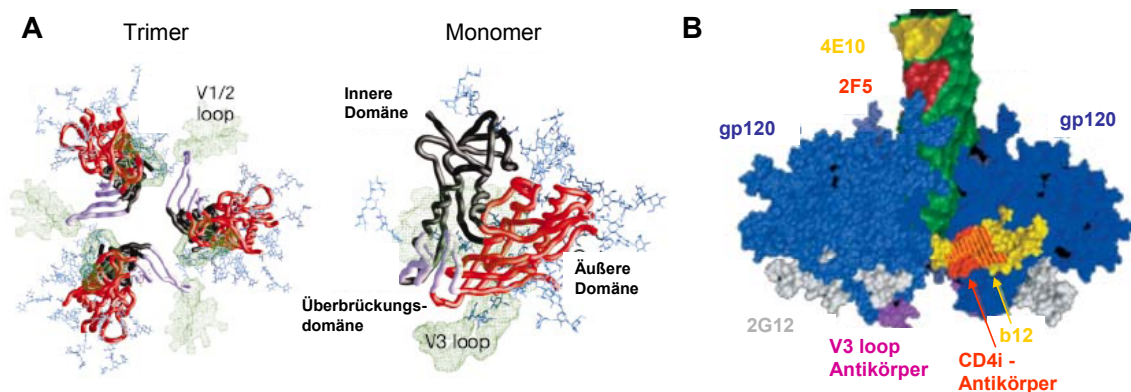
Die einfach gespleißte mRNA des *env*-Gens wird in einem späten Stadium der viralen Replikation synthetisiert und ist aufgrund negativer Sequenzelemente Rev-abhängig. Die Prozessierung von Env geschieht auf dessen sekretorischem Weg zur Zelloberfläche. Während des Transfers in das endoplasmatische Retikulum (ER) wird das für die Ausschleusung des Proteins notwendige Signalpeptid entfernt und Oligosaccharidketten - vor allem Mannosereste - angehängt. Im Golgi-Apparat werden die Mannoseeinheiten getrimmt und andere Zuckerreste wie Fucose, Galaktose und N-Acetylglucosamin angehängt, so dass das virale Glykoprotein sowohl komplexe als auch hybride Kohlenhydratseitenketten aufweist (Scanlan *et al.*, 2007). Das Vorläuferprotein Env<sub>gp160</sub> wird im TGN-Kompartiment (*trans-golgi network*) durch die zellulären Proteasen Furin und PC7 in die Oberflächenkomponente gp120 und das Transmembranprotein gp41 prozessiert (Decroly *et al.*, 1994; Gu *et al.*, 1995; Moulard *et al.*, 1999; Wouters *et al.*, 1999). Anschließend binden gp120 und gp41 nicht-kovalent aneinander und bilden ein

Heterodimer aus. Diese Heterodimere lagern sich zu trimeren Komplexen auf der Zellmembran Env-exprimierender Zellen zusammen, wobei die Multimerisierung über die gp41-Transmembranuntereinheit erfolgt (Burton, 2006; Roux & Taylor, 2007; Zhu *et al.*, 2006). Der Transport des Env-Proteins über den sekretorischen Weg ist ineffizient, so dass nur 5–15% der Proteine an die Zelloberfläche gelangen (Willey *et al.*, 1988). Limitiert wird der Transport sowohl durch die Effizienz der Signalpeptidprozessierung (Li *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1996), als auch durch die Glykosylierung und durch die korrekte Faltung und Oligomerisierung im ER (Earl *et al.*, 1991; Fenouillet & Jones, 1995; Land & Braakman, 2001; Otteken *et al.*, 1996). Neben der Glykosylierung kann das Env-Protein auch sulfatiert (Bernstein & Compans, 1992) und palmitoyliert werden (Yang *et al.*, 1995). Der lange zytoplasmatische Anteil der Transmembranuntereinheit bindet im Viruspartikel an das Gag-Protein. Er beeinflusst neben Partikelbildung und Infektiosität die Knospungsseite („*budding*“) in polarisierten Zellen und die Oberflächenexpression (Freed & Martin, 1996; Lambele *et al.*, 2007; Lodge *et al.*, 1994; Lodge *et al.*, 1997; Murakami & Freed, 2000; Salzwedel *et al.*, 1998). Neueste Studien zeigen, dass die Deletion dieser zytoplasmatischen Domäne sowohl den Proteintransport als auch die Prozessierung von Env steigert (Devitt *et al.*, 2007; Holtkotte *et al.*, 2006). Eine Übersicht über die Replikationsereignisse von HIV-1 gibt nachfolgende Literatur (Freed & Mouland, 2006; Sierra *et al.*, 2005).

### **A.3.3 Glykoprotein Env als Antigen**

*In vivo* ist die HIV-1-Antikörperantwort gegen fast alle viralen Proteine gerichtet. Neutralisierende Antikörper sind allerdings ausschließlich gegen die viralen Env-Glykoproteine gerichtet, insbesondere gegen den externen Teil gp120 (Klasse, 2007; Pantophlet & Burton, 2006; Parren *et al.*, 1997; Wyatt & Sodroski, 1998). Dieser ist durch das Env-Transmembranprotein gp41 in der Virushülle verankert (Roux & Taylor, 2007; Wyatt *et al.*, 1998). Das Hüllprotein von HIV-1 ist das zwingende Ziel für neutralisierende Antikörper, da Env das einzige virale Protein auf der Oberfläche des Viruspartikels ist und zudem die Anheftung des Virus an die Zielzellen vermittelt. Env wurde daher bereits in vielen verschiedenen Vakzinestrategien verwendet. In früheren Studien mit Env-Immunsierungen in Mäusen und Affen konnte festgestellt werden, dass neutralisierende Antikörper gebildet wurden (Haigwood *et al.*, 1992; Hu *et al.*, 1991) und sogar einige Schimpansen vor der Infektion mit HIV-1 geschützt waren (Berman *et al.*, 1990; Bruck *et al.*, 1994). Aufgrund dieser positiven Resultate wurde rekombinantes Env<sub>gp120</sub> auf die Sicherheit und Immunogenität im Menschen getestet. Dabei wurden bei fast allen immunisierten Personen neutralisierende Antikörper entdeckt (Gorse *et al.*, 1994; Kovacs *et al.*, 1993). Nach weiteren Studien zeigte sich, dass die gebildeten Antikörper kurzlebig waren und nur bei wenigen Laborstämmen von HIV-1 neutralisierend wirkten (Mascola *et al.*, 1996; Wrin *et al.*, 1994). Zudem induzierte die Immunisierung mit Env-Untereinheiten auch nicht immer CTL-Antworten (Graham *et al.*, 1996). Die Immunogenität von Env allein reicht meist nicht aus, da HIV-1 verschiedene Abwehrmechanismen besitzt, um der Antikörperantwort zu entgehen (Abbildung A.5). HIV-1-Env besteht größtenteils aus hochvariablen Regionen, die weiter innenliegende konservierten Bereiche vor dem Zugriff

von Antikörpern schützen (Chen *et al.*, 2007; Kwong *et al.*, 2000). Diese konservierten Domänen werden erst dann für Antikörper angreifbar, wenn durch die Anheftung an die Wirtszelle eine Konformationsänderung erfolgt (Ashish *et al.*, 2006; Kwong *et al.*, 2002; Myszka *et al.*, 2000). Die starke und variable Glykosylierung von Env (50% des Moleküls) kann zudem Bereiche von Env maskieren, an die die neutralisierenden Antikörper binden (Dacheux *et al.*, 2004; Manrique *et al.*, 2007; Wei *et al.*, 2003). Ferner führt die Präsentation nicht-funktioneller Env-Epitope auf den Virionen zur Bildung von Antikörpern, die HIV nicht neutralisieren können (Moore *et al.*, 2006).



**Abbildung A.5: Modell des HIV-1-Env-Proteins.** Die Glykoproteine gp120 und gp41 verbinden sich zu einem trimeren Heterodimer auf der Oberfläche von HIV-1. **(A) Atomstruktur von gp120.** Auf der linken Seite ist die trimere Struktur auf der Oberfläche der Hüllmembran gezeigt, auf der rechten Seite das korrespondierende Monomer. Bei dieser Darstellung ist die virale Membran oberhalb der abgebildeten Modelle. Die innere Domäne ist schwarz, die äußere Domäne rot und die Bindedomäne violett dargestellt. Die Glykosylierung wurde blau und die voraussichtliche Position der variablen Domänen (loops) grün gekennzeichnet. Nach (Kwong *et al.*, 2002). **(B) HIV-1-Env-Proteinmodell mit Bereichen, die von neutralisierenden Antikörpern erkannt werden.** Gezeigt ist der gesamte gp120/gp41-Trimerkomplex, dabei ist gp120 blau und gp41 grün dargestellt. Die Bindestellen der neutralisierenden Antikörper sind in verschiedenen Farben veranschaulicht: die gp41-spezifischen Antikörper 4E10 in gelb und 2F5 in rot, die gp120-spezifischen Antikörper, die gegen die V3-Domäne gerichtet sind (447-52D) in violett. Antikörper, die an die glykosylierten Bereiche binden (2G12) in grau, und Antikörper, die spezifisch für die CD4-Bindedomäne sind (b12, 17b, X5) in gelb beziehungsweise in rot. Nach (Burton *et al.*, 2004). Übersicht Env-Struktur (Burton, 2006; Moore *et al.*, 2006; Roux & Taylor, 2007; Zhu *et al.*, 2006).

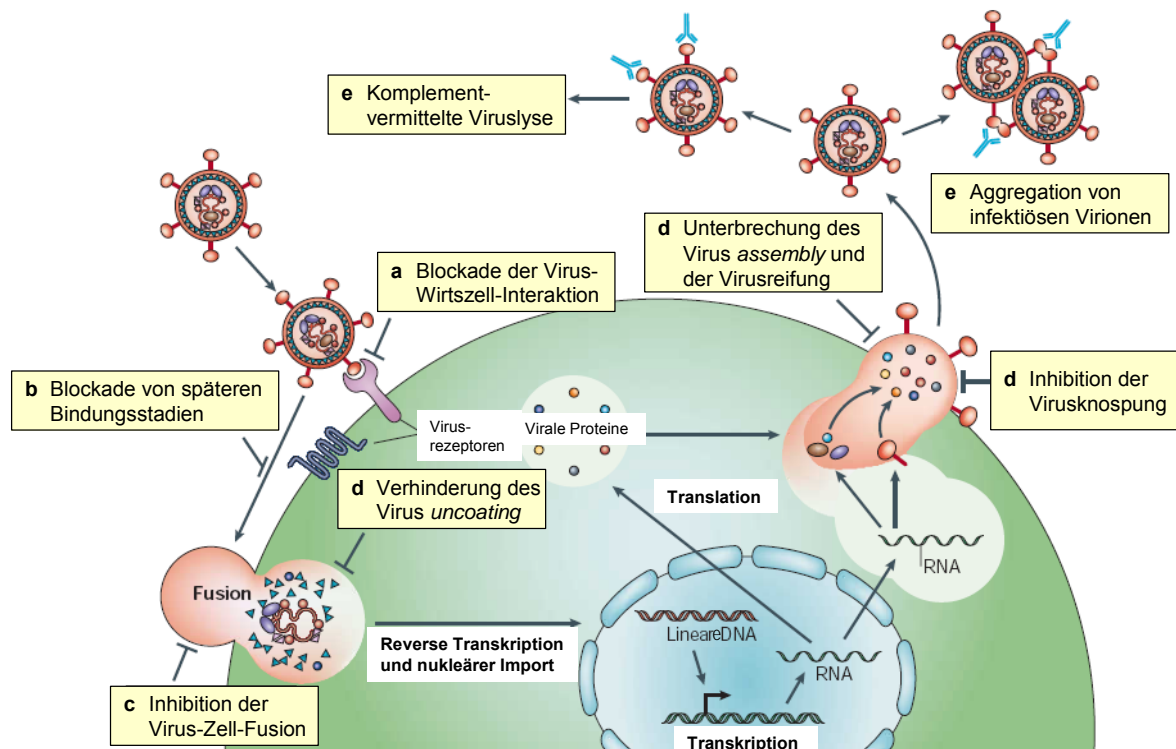
Verschiedene Ansätze in der Vakzineherstellung versuchen die native Form von Env<sub>gp160</sub> möglichst gut zu imitieren: durch Stabilisierung von gp120/gp41-Untereinheiten (Binley *et al.*, 2000; Chakrabarti *et al.*, 2002), rekombinanten gp140- und gp160-Oligomeren (Derby *et al.*, 2006; Earl *et al.*, 2001; Staropoli *et al.*, 2000; VanCott *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2001) und trimerem Env (Beddows *et al.*, 2007; Farzan *et al.*, 1998; Grundner *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Die gängigste Methode zur Verbesserung der Immunogenität ist die Simulation der nativen oligomeren Form mit der Env-Variante gp140, deren zytoplasmatischer Anteil direkt vor der Transmembrandomäne deletiert ist (Chakrabarti *et al.*, 2002; Jeffs *et al.*, 2004; Sanders *et al.*, 2002; Srivastava *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2001). Das C-terminal verkürzte Env-Protein wird in höherer Anzahl exprimiert, da es bestimmte Motive, die für die Verringerung der gp41-Expression verantwortlich sind, nicht mehr besitzt (Abrahamyan *et al.*, 2005; Berlioz-Torrent *et al.*,

1999; Bultmann *et al.*, 2001; Devitt *et al.*, 2007). Lösliches trimerisiertes Env<sub>gp140</sub> zeigte sowohl mit als auch ohne Stabilisierung eine geringe Erhöhung der neutralisierenden Antikörpertiter im Gegensatz zur Antikörpermenge, die nach Immunisierung durch monomere Formen von Env gebildet wurden (Beddows *et al.*, 2007; Bower *et al.*, 2004b; Kim *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007b). Eine andere Antigenstrategie zielte darauf ab, die Env-Glykoproteine in ihrer nativen Umgebung zu präsentieren. Dabei zeigte sich, dass virusähnliche Partikel (VLP) mit gp120/gp41-Komplexen gute humorale und zelluläre Immunantworten auslösen. Allerdings konnten bisher noch keine hohen Titer an kreuzneutralisierenden Antikörpern generiert werden (Buonaguro *et al.*, 2002; Dale *et al.*, 2002; Doan *et al.*, 2005; Montefiori *et al.*, 2001). Ein möglicher Grund für die niedrigen Antikörpertiter könnte die gemeinsame Expression funktionaler und nicht-funktionaler Env-Formen sein, die eine gezielte Bildung neutralisierender Antikörper verhindert (Crooks *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006; Poignard *et al.*, 2003). Um die konservierten Bereiche von Env besser zugänglich zu machen, wurden in verschiedenen Studien Env-Bereiche deletiert oder verändert (Barnett *et al.*, 2001; Gzyl *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2003; Koch *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 1998; Phogat & Wyatt, 2007; Yang *et al.*, 2004). Diese Änderungen führten zwar teilweise zu einem höheren Titer an neutralisierenden Antikörpern, aber für den Einsatz als wirksame Immunogene waren noch weitere Modifikationen nötig. In kürzlich veröffentlichten Studien konnte gezeigt werden, dass HIV-1 VLP grundsätzlich bessere Immunantworten induzieren, als lösliche Antigene (Buonaguro *et al.*, 2007; McBurney *et al.*, 2007; Quan *et al.*, 2007; Sailaja *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). Gleichwohl können Immunisierungen mit DNA-Env-Konstrukten auch effiziente humorale und zelluläre Immunantworten induzieren (Barouch & Letvin, 2000; Estcourt *et al.*, 2004). Bei der Verwendung des gp120-Wildtypgens stellte sich allerdings heraus, dass die Immunogenität aufgrund der geringen Expression in Säugetierzellen für eine ausreichende Antikörperbildung zu gering war (Peet *et al.*, 1997; Ross *et al.*, 2001). Um die Immunogenität von Env zu steigern, wurden verschiedene Versuche durchgeführt, darunter die Verwendung von molekularen Adjuvantien (Zytokine und C3d) (Abaitua *et al.*, 2006; Agadjanyan *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2000a; Bolesta *et al.*, 2006; Egan *et al.*, 2006; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2001). Andere Ansätze optimierten den Kodongebrauch der Gensequenz, um eine optimale Expression in Säugerzellen zu erreichen (Andre *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2004; Muthumani *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2006b).

Das virale Hüllprotein Env wurde bereits in vielen verschiedenen Impfstudien als Antigen verwendet und die jeweilige Antikörperbildung in Tiermodellen und im Menschen genauestens untersucht. HIV-1-Vakzinestudien mit Meerschweinchen und Primaten zeigten, dass Env bei der Induktion einer protektiven Immunantwort eine kritische Rolle spielt (Amara *et al.*, 2002; Chakrabarti *et al.*, 2005; Letvin *et al.*, 2004; Seaman *et al.*, 2005). In einer Multikomponentenvakzine konnte durch die Verwendung von Env eine niedrigere Viruslast und eine höhere CD4<sup>+</sup>-T-Zellzahl erreicht werden verglichen mit Vakzinen ohne Env.

### A.3.3.1 Die Bedeutung Env-neutralisierender Antikörper

Die zellvermittelte Immunantwort ist äußerst wichtig für die Kontrolle und die Eliminierung einer Virusinfektion. Antikörper aber haben eine Schlüsselrolle beim initialen Schutz und beim weiteren Verlauf der Infektion (Robbins *et al.*, 1995; Humbert & Dietrich, 2006; Pantophlet & Burton, 2006; Phogat *et al.*, 2007). Neutralisierende Antikörper können in der frühen Phase der Infektion die Viruslast deutlich verringern und die Infektion so verlangsamen, dass zwischenzeitlich die zelluläre Immunantwort aufgebaut werden kann und die virusinfizierten Zellen schließlich eliminiert werden können (Huber & Trkola, 2007; Letvin *et al.*, 2002; Mascola *et al.*, 2000; Pitt *et al.*, 2000; Yamamoto, 2007). Antikörper können durch verschiedene Mechanismen vor Virusinfektionen schützen (siehe Abbildung A.6). Übersicht: (Pantophlet & Burton, 2006; Srivastava *et al.*, 2005; Zolla-Pazner, 2004).

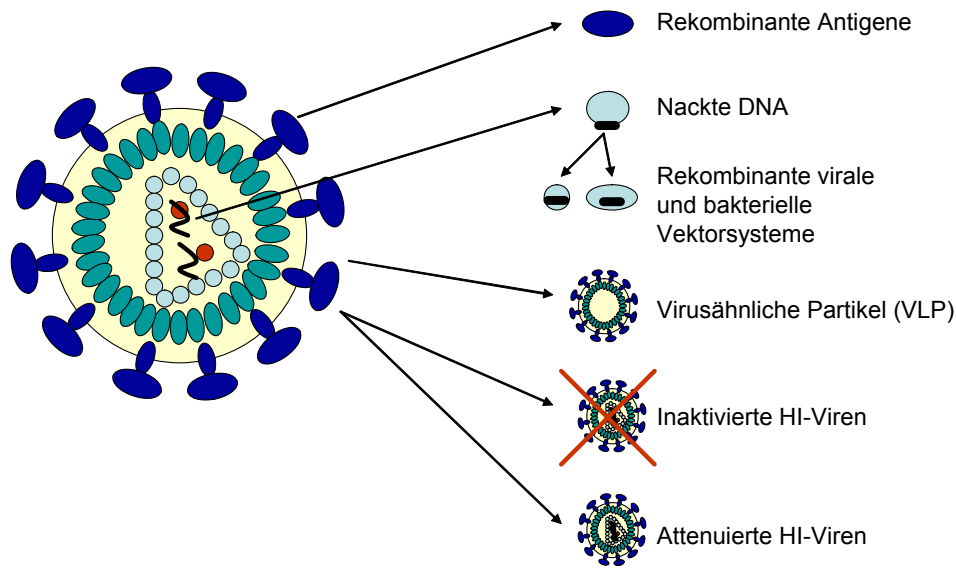


**Abbildung A.6: Schematische Darstellung der Schritte, bei denen neutralisierende Antikörper die HIV-1 Virusreplikation beeinträchtigen können.** (a) Antikörper können die Virus-Wirtszellinteraktion durch verschiedene Mechanismen stören: 1) Inhibition der Wechselwirkung von zellulären Molekülen (darunter Adhäsionsmoleküle und Lektine) in der Virushülle mit deren Liganden auf der Zielzelle, 2) Inhibition der Bindung von Virionen an CD4 und Korezeptoren auf der Zelloberfläche und 3) Unterdrückung von ersten Konformationsänderungen der viralen Env-Glykoproteine, die für die Fusion mit der Wirtszellmembran nötig sind. (b) Nach der Anheftung des Virus an der Zielzelle können Antikörper weitergehende Konformationsänderungen der Env-Glykoproteine unterbinden und die Domänen für die Fusion exponieren. (c) Antikörper können auch die Proteindomänen blockieren, die direkt in der Virus-Zell-Fusion involviert sind. (d) In späteren Phasen der Virusreplikation sind Antikörper möglicherweise beteiligt bei: 1) der Verhinderung des *Uncoating* nach Viruseintritt, 2) der Behinderung des *Assembly*, 3) der Blockade der Virusreifung sowie 4) der Inhibition der Virusknospung. (e) Zusätzliche Mechanismen der antikörpervermittelten Neutralisation beinhalten 1) Komplement-induzierte Virolyse und 2) Aggregation von infektiösen Partikeln. Nach (Zolla-Pazner, 2004).

Den größten Anteil am Schutz vor Virusinfektionen haben neutralisierende Antikörper, die die Infektiosität von Viruspartikeln durch Beeinträchtigung verschiedener Schritte in der Virusreplikation reduzieren. Diese können an die viralen Env-Glykoproteine binden oder an zelluläre Moleküle, die in der Virushülle eingelagert sind. So können sie verhindern, dass es zur Anheftung des Virus oder zur Fusion kommt (Binley *et al.*, 2006; Burton, 2002; Phogat *et al.*, 2007; Scanlan *et al.*, 2002; Ugolini *et al.*, 1997). Die Virus-Zell-Fusion kann selbst späteren Stadien verhindert werden (Chan & Kim, 1998; Golding *et al.*, 2002; Gorny & Zolla-Pazner, 2000; Heap *et al.*, 2005; Holl *et al.*, 2006b; Holl *et al.*, 2006a; Peleraux *et al.*, 1998). Neutralisation in späteren Stadien des Virusreplikationszyklus (*assembly* und Reifung) konnte bisher nur bei Influenza A-Viren gezeigt werden, aber nicht bei HIV-1 (Reading & Dimmock, 2007). Exzessive Bindung von Antikörpern führt zur Aggregation reifer Viruspartikel und schließlich zu erhöhter Phagozytose und komplementabhängiger Lyse (Spear *et al.*, 1994). Mittels antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*; ADCC) können Antikörper HIV-1-infizierte Zellen sogar direkt attackieren (Aasa-Chapman *et al.*, 2005; Huber & Trkola, 2007; Tyler *et al.*, 1990). Bisher konnten allerdings nur wenige breitneutralisierende Antikörper aus HIV-1-Patienten isoliert werden, die entweder an gp41 (2F5, 4E10 und Z13) oder an gp120 (b12 und 2G12) binden (siehe Abbildung A.5) (Karwowska *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 2007; Scanlan *et al.*, 2002; Stiegler *et al.*, 2001; Trkola *et al.*, 1995; Trkola *et al.*, 1996; Zwick *et al.*, 2001). Diese können nach passiver Immunisierung vor einer Übertragung von HIV-1 schützen und die Viruslast senken (Armbruster *et al.*, 2002; Gros *et al.*, 2006; Joos *et al.*, 2006; Stiegler *et al.*, 2002; Trkola *et al.*, 2005). Allerdings entstehen teilweise resistente HIV-1-Mutanten, die nicht mehr neutralisiert werden können (Manrique *et al.*, 2007; Nakowitsch *et al.*, 2005; Parren *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2003). In einer Makaken-Studie ist es bereits gelungen, neutralisierende Antikörper, die mit dem simianen Immundefizienzvirus (SIV) in einer Makakengruppe induziert wurden, auf andere Makaken zu übertragen und eine Infektion zu verhindern, beziehungsweise die Viruslast stark zu vermindern (Yamamoto, 2007). Die Induktion breitneutralisierender Antikörper mittels eines prophylaktischen Impfstoffs wäre daher optimal, um eine HIV-Infektion zu verhindern.

#### **A.3.4 Entwicklung von HIV-Impfstoffen**

Auch über zwei Jahrzehnte nach Beginn der HIV-Epidemie konnte bislang trotz intensiver Forschung kein Impfstoff gegen HIV entwickelt werden, der die beiden wichtigsten Anforderungen an eine Vakzine erfüllt: Effektivität und Sicherheit. In Hinblick auf die Effektivität wäre es erstrebenswert, einen Impfstoff zu entwickeln, der sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induziert, die sämtliche eingedrungene Viren und alle in die zelluläre DNA integrierten viralen Genome (Proviren) eliminieren (Letvin, 2002). Bisher sind hauptsächlich Impfstoffkandidaten in der klinischen Erprobung, deren im Tiermodell erzeugte Immunantwort die Replikation des Virus kontrollieren kann und so lediglich die Krankheitsprogression verlangsamt. Den Anforderungen an die Sicherheit werden retrovirale Vakzinen allerdings nur gerecht, wenn einzelne Viruskomponenten ohne Erbgut verabreicht werden.



**Abbildung A.7: Überblick über aktuelle HIV-Impfstoffstrategien (modifizierte Abbildung vom NIH).**

Inzwischen wurden viele Versuche zur Entwicklung einer HIV-Vakzine unternommen, um effektive Immunantworten gegen HIV zu induzieren. Übersicht in (Girard *et al.*, 2006; Johnston & Fauci, 2007; Titti *et al.*, 2007). Eine der ersten Strategien beruhte auf der Immunisierung inaktivierter Viruspartikel, die jedoch keine starken HIV-spezifischen Antikörperantworten generierten (Murphey-Corb *et al.*, 1989; Nilsson *et al.*, 1998; Raviv *et al.*, 2005). Eine andere, oft angewendete Immunisierungsmethode besteht in der Impfung mit einer lebenden, jedoch abgeschwächten (attenuierten) Form des Erregers. In Makaken konnte durch die Immunisierung mit attenuierten Simianen Immundefizienz (SI) Viren ein guter Schutz vor Infektion mit SIV vermittelt werden (Daniel *et al.*, 1992; Johnson *et al.*, 1999; Stahl-Hennig *et al.*, 2003). Allerdings erzeugen diese abgeschwächten Viren in neugeborenen Makaken simianes AIDS und auch adulte, zunächst geschützte Affen zeigten später durch das Impfvirus eine langsame Krankheitsprogression (Baba *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 1999). In einer australischen Patientengruppe, der *Sydney Blood Bank Cohort*, konnte eine natürliche *nef*-deletierte Mutante von HIV-1 gefunden werden, welche gleichfalls eine stark verzögerte Krankheitsprogression bedingt (Deacon *et al.*, 1995). Die Verwendung attenuierter HI-Viren als Impfstoff ist jedoch ein zu großes Sicherheitsrisiko, da lebende Formen dieser Viren in das Genom ihrer Wirtszelle integrieren können und dadurch neben der Möglichkeit einer Insertionsmutagenese mit nachfolgender Tumorbildung vor allem die Gefahr der Reversion des persistierenden Provirus in die pathogene Wildtypform besteht.

Rekombinante Viren und Bakterien stellen eine Variante von Lebendimpfstoffen dar. Hierbei werden attenuierte virale oder bakterielle Vektoren als Träger für HIV-Immungene verwendet. Einige dieser Vektoren befinden sich als HIV-Impfstoffkandidaten bereits in Phase I/II-Studien. Diese Vektoren können große Bereiche des HIV-Genoms aufnehmen und sind für den Menschen nicht pathogen. Bei der Replikation solcher rekombinanter Vektoren in der Zielzelle werden HIV-Epitope über den MHC I-Weg dem

Immunsystem präsentiert, wodurch unter anderem eine starke zelluläre Immunantwort erzeugt wird (Casimiro *et al.*, 2003; Didierlaurent *et al.*, 2004; Natuk *et al.*, 1992; Xin *et al.*, 2007). Einer der am häufigsten in HIV-Impfstoffstudien verwendeten viralen Vektoren ist das rekombinante *Modified Vacciniavirus Ankara* (rMVA), ein stark attenuiertes Impfpockenvirus mit breitem Wirtsspektrum, das durch vielfache serielle Passagierung auf Hühnerembryofibroblasten große Teile seines Genoms eingebüßt hat und sich nur noch in wenigen Zelllinien vermehrt (Amara *et al.*, 2002; Barouch *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2007a). Weitere virale Trägersysteme beruhen auf rekombinantem Semliki Forest Virus (rSFV) (Nilsson *et al.*, 2001), Adenoviren (Barouch & Nabel, 2005), Coronaviren (Eriksson *et al.*, 2006) und Canarypoxviren (Evans *et al.*, 2004; Goepfert *et al.*, 2005). Neben den viralen Vektoren werden auch in Zellen replizierende Bakterien wie attenuierte Streptokokken, Listerien, Brucellen oder auch Salmonellen (Burnett *et al.*, 2000; Eller *et al.*, 2004; Oggioni *et al.*, 1999; Rayevskaya & Frankel, 2001) als Träger eingesetzt, um HIV-Gene in Körperzellen einzuschleusen und zu exprimieren. Bakterien besitzen als Trägersysteme den Vorteil, dass sie kostengünstig hergestellt, einfach gelagert und oral verabreicht werden können (Lieberman & Frankel, 2002).

*Subunit*-Impfstoffe bestehen aus aufgereinigten oder rekombinant hergestellten Proteinen oder Peptiden des Erregers. Diese sind gut verträglich und induzieren gute spezifische humorale Immunantworten, allerdings wird oft trotz hoher Titer an neutralisierenden Antikörpern kein Infektionsschutz erreicht (Xu *et al.*, 2006). In zwei kürzlich durchgeführten Phase III-Studien mit rekombinantem gp120 konnte weder ein verbesserter Schutz noch ein verlangsamter Krankheitsverlauf der geimpften Personen gegenüber den Nichtgeimpften festgestellt werden (Flynn *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2005; Graham & Mascola, 2005; Pitisuttithum *et al.*, 2006; Tonks, 2007). Inzwischen wird vermutet, dass die größte Herausforderung für die Entwicklung einer effizienten HIV-Vakzine, die neutralisierende Antikörper induziert, im Design neuer Env-Immunogene liegt (Phogat & Wyatt, 2007). In neueren Ansätzen wird daher versucht, lösliche Env-Antigene zu generieren, die der nativen, trimeren Konformation des Hüllproteins stärker ähneln (Beddows *et al.*, 2005; Beddows *et al.*, 2007; Bower *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006). Mit Hilfe von Bindungsintermediaten von Env an CD4 und verschiedenen Veränderungen des Hüllproteins wird versucht, Antikörper speziell gegen die konservierten Bindungsstellen zu induzieren (Bower *et al.*, 2004a; Jeffs *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2006; Srivastava *et al.*, 2003). Die Verwendung verschiedener HIV-1 Env-Antigene in einer Impfstoffgabe trägt zusätzlich zur Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern bei (Fischer *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2007). Die nächste Generation von antikörper-induzierenden Immunogenen wird bereits mit einer anderen Strategie entwickelt. Hierfür wird in Langzeitüberlebenden mit einer rigiden Kontrolle der Virusreplikation nach neutralisierenden Antikörpern gesucht. Das Epitop eines solchen Antikörpers wird versucht so nachzubilden, dass es als Immunogen eingesetzt den gleichen neutralisierenden Antikörper induziert, welcher ursprünglich gefunden wurde (Check, 2003). Der Antikörper 2G12, der 1995 aus einem Patienten isoliert wurde, bindet spezifisch an glykosylierte Stellen von Env und kann HIV-1-Isolate verschiedenster Subtypen neutralisieren (Calarese *et al.*, 2003; Trkola *et al.*, 1995). Daher wird überlegt,

solche Antikörper durch Gabe von spezifisch glykosylierten Antigenen zu induzieren (Pashov *et al.*, 2005; Pashov *et al.*, 2007; Reynard *et al.*, 2007; Scanlan *et al.*, 2007).

Zwei neue Wege, die Immunisierung mit DNA oder mit Virusähnlichen Partikeln (VLP), dominieren im Moment die Impfstoffforschung und werden in den folgenden beiden Unterkapiteln genauer besprochen.

#### A.3.4.1 DNA-Immunisierung

Eine neue Richtung in der Impfstoffentwicklung wurde mit der Entwicklung von rekombinanten Vektoren besprochen, die HIV-1-Proteine exprimieren. Der bekannteste Vertreter dieser neuen Impfstoffklasse ist die sogenannte DNA-Vakzine, die aus einem Expressionsplasmid mit Sequenzen viraler Gene unter Kontrolle eines eukaryontischen Promotors besteht. Derartige Impfstoffe haben unter Gesichtspunkten der Haltbarkeit und der Herstellungskosten große Vorteile. Sie sind darüber hinaus leicht zu applizieren und vermögen eine gute zelluläre Immunantwort zu induzieren, da ihre viralen Gene in Körperzellen exprimiert werden. Die entsprechenden viralen Epitope werden, ähnlich wie bei einer Infektion der Zelle, über den endogenen MHC I-Präsentationsweg dem Immunsystem dargestellt. Allerdings kommt es aufgrund der generell niedrigeren Antigenexpression bei DNA-Vakzinen verglichen mit Proteinimmunisierungen oder attenuierten Viren zu einem langsameren Anstieg der induzierten Antikörper (Donnelly *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2006; Ulmer *et al.*, 2006).

Immunisierungen mit HIV-1-DNA-Vakzinen induzierten in verschiedenen Tiermodellen sehr gute humorale und zelluläre Immunantworten sowie langlebige Gedächtniszellen (Estcourt *et al.*, 2004; Hokey & Weiner, 2006; Lu *et al.*, 1995; Rajcani *et al.*, 2005). Neben der fortgesetzten Expression des DNA-Vakzineplasmids in der Wirtszelle und der kontinuierlichen Präsentation des Antigens spielt auch die Immunisierungsrouten der DNA-Plasmide eine erhebliche Rolle bei der Induktion langlebiger Immunantworten (Boyle & Robinson, 2000; Luckay *et al.*, 2007). In den meisten HIV-1 Env-Immunisierungsstudien wurden die DNA-Plasmide entweder mit Hilfe der GeneGun-Technologie oder mittels intramuskulärer Injektion in die Tiere appliziert und hohe Antikörpertiter erreicht (Green *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 1999; Vinner *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006b; Wild *et al.*, 2004). Zwar waren die mit den beiden unterschiedlichen Methoden generierten Antikörpertiter vergleichbar, aber die dafür benötigte DNA-Menge war bei der GeneGun-Technologie geringer (Bower *et al.*, 2005; Green *et al.*, 2003). Allerdings wurde bei der einmaligen GeneGun-Applikation hämagglutinin-kodierender Plasmide festgestellt, dass die humorale Immunantwort bereits nach der ersten Woche stark abfiel. Nach intramuskulärer Immunisierung hingegen wurde erst nach einem Monat eine Verringerung des Antikörpertiters verzeichnet (Boyle & Robinson, 2000). Aus der Literatur ist bekannt, dass das gebildete Protein nach GeneGun-Immunisierung hauptsächlich in der Nähe der Applikationsstelle nachgewiesen werden kann. Nach intramuskulärer Immunisierung hingegen wandert die DNA durch den Körper und die immunologisch relevanten Transfektionen finden außerhalb der Applikationsstelle statt (Chattergoon *et al.*, 1998; Dupuis *et al.*, 2000; Sheets *et al.*, 2006; Torres *et al.*, 1997; Tuomela *et al.*, 2005). Um

möglichst viele Kompartimente durch die Immunisierung zu aktivieren, wurden den Tieren in dieser Studie die verwendeten Env-Konstrukte intramuskulär injiziert.

In Schimpansen konnte nach einer Immunisierung mit DNA-Plasmiden zur Expression von HIV-1 Env ein Schutz vor einem schwach replizierenden HIV-1-Virus erzielt werden (Boyer *et al.*, 1997). Makaken, die mit HIV-1 Env-DNA-Plasmiden immunisiert wurden, waren nach Infektion mit einem chimären SHIV (ein aus SIV und HIV durch Rekombination erzeugtes Virus) zum Teil (Boyer *et al.*, 1996) bzw. bei zusätzlicher Immunisierung mit HIV-1-Proteinen vollkommen vor einer Infektion mit homologem SHIV geschützt (Letvin *et al.*, 1997; Mooij *et al.*, 2004). Die erfolgreiche Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten im Tiermodell konnte bei Immunisierungen im Menschen nicht immer erzielt werden (Cebere *et al.*, 2006; Tavel *et al.*, 2007). Durch unmittelbare Aneinanderreihung von Sequenzen unterschiedlichster viraler Proteine aus verschiedenen Subtypen wurden DNA-Vakzinen mit multiplen Epitopen generiert (Burgers *et al.*, 2006; Kong *et al.*, 2003; Malm *et al.*, 2005; Rollman *et al.*, 2005), die in humanen Immunisierungsstudien gute T-Zell-Antworten und hohe Antikörpertiter erreichten (Catanzaro *et al.*, 2007; Graham *et al.*, 2006). Allerdings waren in einer anderen Impfstudie keine Antikörper detektierbar und nur geringe zelluläre Antworten vorhanden (Tavel *et al.*, 2007).

Nachfolgende *Boost*-Immunisierungen, die entweder mit löslichem Protein oder mit rekombinanten Viren (rMVA, Adenovirale Vektoren, Coronaviren) durchgeführt wurden, wiesen meist eine bessere Immunantwort auf als DNA-Vakzinen alleine. Der Erfolg verschiedener *Prime-Boost*-Schemata konnte sowohl im Tiermodell (Buonaguro *et al.*, 2007; Dale *et al.*, 2004; Dale *et al.*, 2006; Ellenberger *et al.*, 2006; Eriksson *et al.*, 2006; Shu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006c) als auch in ersten humanen Studien gezeigt werden (Goonetilleke *et al.*, 2006; Hanke *et al.*, 2007; Kent *et al.*, 2007; Mwau *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2007). Dabei können für die einzelnen Immunisierungen verschiedene Verabreichungsmethoden (z.B. oral, intravenös, subkutan usw.), verschiedene Adjuvantien und unterschiedliche Vektoren miteinander kombiniert werden. Die Schutzwirkung von DNA-Vakzinen lässt sich durch die Zugabe von immunstimulatorischen Molekülen wie Zytokinen oder der Komplementkomponente C3d nochmals deutlich steigern (Ahlers *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2000b; Chong *et al.*, 2007; Crooks *et al.*, 2007; Lori *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006a) (siehe auch A.2.2). Bei vielen HIV-Impfstoffexperimenten, die *Prime-Boost*-Strategien anwenden, werden DNA-Plasmide für die *Prime*-Immunisierung eingesetzt und für die *Boost*-Immunisierungen virale Trägersysteme wie rMVA. Dabei exprimiert jeder dieser Vektoren dieselben HIV- bzw. SIV-Gene (Ellenberger *et al.*, 2006; Hanke *et al.*, 2002; Shu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006c). Bisher konnten auf diesem Weg im Tiermodell die ausgeprägtesten zellulären und humoralen Immunantworten induziert werden, ohne die Antwort gegen Bestandteile der viralen Träger zu verstärken.

Eine andere Möglichkeit, die Expression von rekombinanten Immunogenen zu verbessern besteht in der Kodonoptimierung der viralen Sequenzen. Es ist gelungen, durch solche Änderungen das „*Rev responsive element*“ (RRE) in dem Bereich *gag-pol* und *env* zu

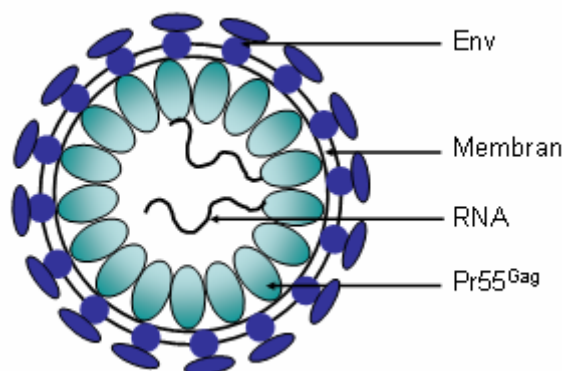
entfernen, um damit eine Rev-unabhängige, gesteigerte Expression zu ermöglichen (Andre *et al.*, 1998; Graf *et al.*, 2000; Kotsopoulou *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000). Dabei werden statt der Kodons der HIV-Sequenzen die von Säugetierzellen in stark exprimierten Genen am häufigsten vorkommenden Basentriplets verwendet, ohne dabei die Aminosäuresequenz der viralen Proteine zu beeinflussen. Zusätzlich werden bei der Kodonoptimierung die in HIV-Genen vorhandenen regulatorischen oder inhibitorischen Sequenzmotive eliminiert und die RNA-Stabilität verbessert. Die Ursache für die gesteigerte Expression findet sich in der erhöhten Verfügbarkeit von tRNA-Molekülen der korrespondierenden Kodons in Säugetierzellen. Mit derart veränderten HIV-Sequenzen kann die Expression von Gag- und Env-Proteinen in Säugetierzellen um das 10-100 fache erhöht, sowie die Immunogenität im Mäusemodell verbessert werden (Andre *et al.*, 1998; Deml *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 2006; Vinner *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2006b; zur Megede J. *et al.*, 2000; zur Megede *et al.*, 2003). Bei Vergleich der Immunogenität von kodonoptimierten Env und Wildtyp-Env nach DNA-Immunisierung von Mäusen wurde zudem festgestellt, dass die Höhe der Expression direkt mit der Höhe der Antikörpertiter gegen das HIV-1-Env-Antigen korreliert (Bower *et al.*, 2005).

#### A.3.4.2 Virusähnliche Partikel (VLP)

Virusähnliche Partikel (*virus-like particles*; VLP) weisen eine Reihe von Vorteilen beim Einsatz als Impfstoffkomponente auf (Grgacic & Anderson, 2006; Ulrich *et al.*, 1996). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass HIV-1 Impfstoffe, die aus mehreren Antigenen aufgebaut sind, höhere Antikörpertiter und bessere CTL-Antworten auslösen können (Graham *et al.*, 2006; Rollman *et al.*, 2005). Mit Hilfe von VLP kann gegen mehrere Antigene gleichzeitig immunisiert werden und es werden daher generell effizientere humorale und zellvermittelte Immunantworten induziert als bei der Verwendung von löslichen Proteinen (McBurney *et al.*, 2007; Schiller & Lowy, 2001; Wagner *et al.*, 1994c; Wagner *et al.*, 1996b; Young *et al.*, 2006). Zudem sind die Partikel im Gegensatz zu attenuierten Viren oder viralen Vektoren replikationsinkompetent und nicht infektiös.

Mittlerweile können über 30 VLP-Varianten auf der Basis von Kapsid- und Hüllproteinen verschiedener tier- und humanpathogener Viren produziert werden, die alle die Fähigkeit besitzen, sich selbst zu hochorganisierten partikulären Strukturen zusammenzulagern (Grgacic & Anderson, 2006; Noad & Roy, 2003). Die bekanntesten sind das Hepatitis-B-Virus (HBV) Capsid- und Oberflächenantigen (Deml *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1999; Newman *et al.*, 2003; Schlienger *et al.*, 1992), Hepatitis-C-Virus (HCV) (Elmowalid *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2004; Lechmann *et al.*, 2001), Papillomavirus L1 oder L1/L2 (Harro *et al.*, 2001; Kirnbauer, 1996; Koutsky *et al.*, 2002; Villa *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1991), Parvovirus VP2 (Rueda *et al.*, 1999; Sedlik *et al.*, 1997) und HIV-1-Gag-Proteine (Buonaguro *et al.*, 2005; Buonaguro *et al.*, 2007; Deml *et al.*, 1997b; Deml *et al.*, 2005; Kuate *et al.*, 2006; Quan *et al.*, 2007; Sailaja *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 1992; Young & Ross, 2003; Young *et al.*, 2006).

Diese VLP können entweder als DNA-Vakzine oder direkt als aufgereinigte Partikel verabreicht werden. Die Applikation von DNA hat den Vorteil, dass die Produktion der Partikel länger aufrecht erhalten wird und so das Immunsystem über einen längeren Zeitraum stimuliert werden kann. Allerdings ist die Anzahl an gebildeten VLP meist nicht sehr hoch und die Immunantwort dementsprechend gering (Akahata *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2004). VLP werden daher meist mit Baculovirus-, Adenovirus-, Vacciniavirus-, Hefe- und Zellkultur-Expressionssystemen produziert (Ramqvist *et al.*, 2007). Je nach Partikel erfolgt die Aufreinigung entweder über eine CsCl-Gradientenzentrifugation oder mittels Ultrazentrifugation, so dass sie in definierter Menge appliziert werden und eine stärkere Immunantwort induzieren können (Doan *et al.*, 2005). Neuere Erkenntnisse innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass baculoviral hergestellte HIV-1-VLP zwar eine sehr gute Immunantwort generieren, aber diese hauptsächlich auf der baculoviralen Verunreinigung der aufgereinigten VLP beruhen. In eukaryontischen Zellkultursystemen können ins Genom integrierte oder plasmidbasierte VLP hingegen ohne Fremdverunreinigungen hergestellt werden und gute Immunantworten induzieren (Bellier *et al.*, 2006; McBurney *et al.*, 2007). Der erste zugelassene Impfstoff aus Hefe-exprimierten Papillomavirus-VLP (Gardasil®) zeigte bereits gute Immunantworten in verschiedenen Studien (Shi *et al.*, 2007). Dieser kann Infektionen mit den humanen Papillomaviren HPV-6/-11/-16 und HPV-18 verhindern, die als Hauptursache für Gebärmutterhalskrebs gelten (Gnanamony *et al.*, 2007; Rambout *et al.*, 2007; Stanley, 2006; Villa, 2006). In Abbildung A.8 ist ein VLP schematisch dargestellt.



**Abbildung A.8: Schema eines Env-tragenden HIV-1-VLP.** Env (Hüllprotein von HIV-1), RNA (unspezifische Ribonukleinsäure), Pr55Gag (Gag Antigen), (Zell-)Membran. Nach (Deml *et al.*, 2005).

Das gesamte HIV-1-Gag-Vorläuferprotein kann *in vitro* spontan VLP bilden (Campbell & Vogt, 1995; Campbell *et al.*, 2001; Campbell & Rein, 1999; Doan *et al.*, 2005; Morikawa *et al.*, 1999; Perlman & Resh, 2006). Das unprozessierte Gag-Vorläuferprotein (Pr55<sup>Gag</sup>) lagert sich dabei an die Plasmamembran an und bildet nach Knospung von der Zelloberfläche Partikel mit der Größe von 100-120 nm (Buonaguro *et al.*, 2001). Um diese Selbstassemblierung durchführen zu können, benötigt der Gag-Vorläufer eine N-terminale Myrestilierungsstelle (Gottlinger *et al.*, 1989), eine transportvermittelnde Domäne im Matrixproteinbereich (p17) (Bergmann *et al.*, 1993) und drei Assemblierungsdomänen im Matrixbereich sowie im C-terminalen Bereich von p24 (Mammano *et al.*, 1994; Niedrig *et al.*, 1994). Enzymatische Proteine werden für die Knospung nicht benötigt. Selbst die

Fusion zusätzlicher Proteine oder Epitope an Pr55<sup>Gag</sup> verändern weder die Assemblierung, die Knospung, die Struktur, biophysikalische Eigenschaften noch die Ausbeute (Deml *et al.*, 2005; Tobin *et al.*, 1996; Wagner *et al.*, 1994a; Wagner *et al.*, 1996b).

Viele neutralisierende Antikörper sind gegen konformationelle Epitope gerichtet, die nur in der nativen Form des Antigens zu finden sind (Ellenberger *et al.*, 2005; Montefiori *et al.*, 2001; Roux & Taylor, 2007). Eine trimere Env-Konformation (z.B. gp140<sup>TM</sup>), die der natürlichen Anordnung bei einer HIV-1-Infektion entspricht, kann somit eher neutralisierende Antikörper induzieren (Barnett *et al.*, 2001; Beddows *et al.*, 2005; Beddows *et al.*, 2007; Binley *et al.*, 2000; Bower *et al.*, 2004b; Sharma *et al.*, 2006; VanCott *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2007b). Im Gegensatz zu löslichen, monomeren Antigenformen können partikuläre Immunogene bei niedrigeren Affinitäten besser und spezifischer von Antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgenommen werden und durch Kreuzpräsentation über MHC I und II zusätzlich zur humoralen auch die zelluläre Immunantwort verstärken (Batista & Neuberger, 2000). Die Produktion von HIV-1-VLP eröffnet folglich die Gelegenheit für einen Env-vermittelten Zutritt der Partikel in professionelle APC wie Makrophagen und dendritische Zellen, da beide Zelltypen den Rezeptor CD4 auf ihrer Oberfläche tragen. Infolgedessen können die viralen Proteine prozessiert und präsentiert werden und somit die humorale Immunantwort gegen Env verstärken. Die Anordnung von Antigenen auf der Oberfläche von Zellen oder VLP ist daher ein sehr effizienter Weg, B-Zellen spezifisches Antigen zur Affinitätsreifung zu präsentieren. Ferner können B-Zellen eine Art Synapse mit den antigentragenden Zellen formieren und über den BCR Antigen akquirieren (Batista *et al.*, 2001). Mit VLP können folglich verschiedene HIV-1-Proteine über eine große Anzahl von MHC I- und II-Molekülen dem Immunsystem präsentiert werden. Dadurch ist es möglich, eine breitere Immunantwort zu generieren, als mit einer Vakzine, die nur wenige Epitope enthält (Lockey *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006c; Zhan *et al.*, 2003). In verschiedenen Studien zeigte sich, dass die Mehrzahl der HIV-VLP neben einer effizienten humoralen Immunantwort auch eine effiziente CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren kann (Buonaguro *et al.*, 2007; Deml *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1996b; Young *et al.*, 2006).

VLP-Vakzinen sind aufgrund ihrer partikulären Antigenstruktur besonders für eine mukosale Applikation geeignet, da sie eine effektivere mukosale Immunantwort als lösliche Proteine auslösen können. VLP können durch die M-Zellen der Schleimhäute phagozytiert werden und mittels Transcytose über das schleimhautassoziierte lymphoide Gewebe (*mucosa-associated lymphoid tissue*; MALT) in die peripheren Lymphknoten weitergeleitet werden und dort starke Immunantworten auslösen. Lösliche Antigene dagegen umgehen das MALT-System und werden über APC im Nasallumen direkt in die Lymphknoten weitergeleitet, wo sie nur eine geringere Immunantwort generieren (Young *et al.*, 2006). HIV-1-VLP können so mittels der induzierten Antikörper einen optimalen Schutz vor der Infektion und der Bildung viraler Reservoirs direkt an der Eintrittspforte vermitteln.

## **A.4 Zielsetzung der Arbeit**

Die Immunschwächekrankheit AIDS hat bis heute über 20 Millionen Todesopfer gefordert und jährlich kommt es zu über vier Millionen Neuinfektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1). Ein prophylaktischer Impfstoff ist daher dringend notwendig, um die AIDS-Pandemie unter Kontrolle zu bringen. Idealerweise sollte eine HIV-1 Vakzine sowohl eine starke zellvermittelte als auch humorale Immunantwort auslösen. Entscheidenden Anteil an der Immunabwehr haben dabei neutralisierende Antikörper, die allerdings nach einer HIV-1 Infektion nicht oder erst spät gebildet werden. Neutralisierende Antikörper sind ausschließlich gegen die viralen Hüllproteine (Env) gerichtet, insbesondere gegen den externen Teil gp120, da Env als einziges virales Protein auf der Oberfläche des Viruspartikels lokalisiert ist. Env wurde bereits in verschiedenen Immunisierungsstudien in Form von rekombinantem Protein, integriert in virusähnliche Partikel (VLP) oder als Plasmid-DNA eingesetzt. Bislang verwendete HIV-1 Env DNA-Vakzinen induzierten dabei allerdings nur schwache Immunantworten aufgrund (i) der schwachen Expression der Env-Wildtypsequenzen in Säugetierzellen und (ii) der eingeschränkten immunstimulatorischen Kapazität der sezernierten Env-Moleküle.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Verbesserung der Immunogenität von gp120 im Rahmen einer DNA-Vakzine. Eine starke und stabile Expression in Säugetierzellen sollte durch Verwendung von kodonoptimierten gp120-Konstrukten erreicht werden, welche die komplexe virale Regulation umgehen können. Um die Sekretion von gp120, und damit die Induktion von B-Zell-Antworten zu verbessern, sollten verschiedene Signalpeptide ausgetestet werden. Die immunstimulatorische Kapazität sollte durch Fusion von drei Expressionskassetten der humanen Komplementkomponente C3d (hC3d<sub>3</sub>) erreicht werden. Die immunstimulierende Wirkung von C3d<sub>3</sub> beruht auf der Bindung an den C3d-Rezeptor CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen und folliculären dendritischen Zellen, die zu einer verstärkten B-Zell-Aktivierung führt. Daher sollten die gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte nicht nur hinsichtlich ihrer gp120-Expression und -Sekretion ausgetestet, sondern auch deren Bindung an den Rezeptor CD21 nachgewiesen werden. Im Anschluss daran sollten in weiterführenden Maus- und Kaninchenstudien die expressionsstärksten DNA-Vakzinekonstrukte bezüglich ihrer Immunogenität getestet werden.

Neben der DNA-Vakzine sollten virusähnliche Partikel (VLP) basierend auf den zuvor entwickelten Konstrukten und einem kodonoptimiertem syngag generiert und im 293T-Zellkultursystem getestet werden. Die Etablierung von gp120- und hC3d-stabilen eukaryontischen Zelllinien sollte zur effizienten Herstellung der VLP genutzt werden, um schließlich in weiterführenden Mausstudien die Immunogenität der VLP zu überprüfen.

## B Material und Methoden

---

### B.1 Klonierungen und gentechnische Arbeiten

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für Klonierungen in *Escherichia coli* (*E. coli*) Standardmethoden angewendet (Sambrook *et al.*, 1989). Restriktionsenzyme und T4 DNA-Ligase wurden von Roche (Mannheim) und New England Biolabs (NEB, Frankfurt) bezogen. Für die Amplifikation von DNA-Abschnitten aus Plasmid-DNA sowie zum Reamplifizieren von *Polymerase chain reaction* (PCR)-Produkten wurden die *TaqPlus*<sup>®</sup> Precision-DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) oder die *Deep Vent*<sub>R</sub><sup>TM</sup> (NEB) und Nukleotide von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet. Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden über *Nucleobond-Tip AX500*- oder *AX100*-Säulen (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurde der *QIAquick Purification Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits Mini* (Qiagen). Sequenzierungen zur Verifizierung von DNA-Abschnitten erfolgten nach der Methode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung eines automatischen Sequenziergerätes der Firma Geneart AG (Regensburg). Alle übrigen Chemikalien waren kommerzielle Reagenzien von höchster Reinheit.

#### B.1.1 Bakterien

Zu Klonierungszwecken und zur Amplifikation von *High-copy*-Plasmiden wurde hauptsächlich der *E. coli* K-12 Stamm **DH5 $\alpha$**  (Life Technologies, Karlsruhe) verwendet. Beim Einsatz von *dam*-sensitiven Enzymen wie z.B. *Apal* erfolgte die Amplifikation der jeweiligen Plasmide im Stamm **GM2163** (NEB). Chemisch transformationskompetente Bakterien wurden nach der RbCl-Methode hergestellt. Die verwendeten Bakterienstämme weisen den wie folgt angegebenen Genotyp auf:

**DH5 $\alpha$ :** F<sup>-</sup> *supE44*  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) *hsdR1* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*; (Blau-Weiß-Screening (Hanahan & Meselson, 1983)).

**GM2163:** F<sup>-</sup> *dam-13::Tn9* *dcm-6* *hsdR2* *leuB6* *his-4* *thi-1* *ara-14* *lacY1* *galK2* *galT22* *xyl-5* *mtl-1* *rpsL136* *tonA31* *tsc-78* *supE44* *McrA*<sup>-</sup> *McrB*<sup>-</sup>; (Dieser Stamm wurde für Klonierungsarbeiten mit *dam*- und *dcm*-sensitiven Restriktionsenzymen verwendet.)

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in Luria Bertani (LB-) oder Terrific Broth (TB-) Flüssigmedium beziehungsweise auf LB-Agarplatten über Nacht bei 37°C. Zur Selektion der positiven Transformanten wurde Ampicillin (100  $\mu$ g/ ml) zugesetzt.

### B.1.2 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind im Anhang (siehe F.1) angegeben. Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried), Invitrogen (Leek, Niederlande) und Geneart AG bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Gensequenzprogramm *DNAMAN* (Lynnon BioSoft, Quebec, Kanada, Version 5.2.9) entworfen. Zudem wurden an den am Genanfang oder Genende liegenden Oligonukleotiden für die nachfolgenden Klonierungen passende singuläre Schnittstellen sowie zwei zusätzliche, beliebige Nukleotide angefügt, um die Effektivität der Restriktionsenzyme bei den nachfolgenden Klonierungsarbeiten zu gewährleisten.

### B.1.3 Plasmide

Detaillierte Gensequenzen sind im Anhang unter Punkt F.1 und F.3 angegeben.

Die Grundlage der verwendeten gp140- und gp120-Sequenzen bildete die Genbank-Sequenz des HIV-1 Isolates CN54 („*Genbank accession number*“ (*acc no*): AX149771), die innerhalb der Arbeitsgruppe an den Gebrauch von Säugetierkodons angepasst wurde. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sequenzen waren *CD5gp120* und *CD5gp140TM<sub>HIV</sub>*. Zur Herstellung der Expressions- und Reporterplasmide wurden die jeweiligen Gene mit spezifischen PCRs amplifiziert und unter Verwendung der 5' *NheI*- sowie der 3' *PmeI*-Restriktionsschnittstellen in den multiplen Klonierungsbereich (*multiple cloning site, MCS*) der eukaryontischen Expressionsvektoren pcDNA3.1 (+), pcDNA3.1luc und pcDNA/5FRT umgesetzt. Die Klonierung von gp120 in pDisplay erfolgte mit 5' *XmaI* und 3' *AccI* in den *MCS* des Vektors. Die resultierenden Ligationsansätze wurden in kompetente Zellen des *E. coli* K-12 Stammes DH5 $\alpha$  transformiert. Die Verwendung des *E. coli*-Stamm GM2163 erfolgte bei nachfolgender DNA-Aufreinigung und anschließendem Verdau mit *dam*-sensitiven Enzymen (z.B. *ApaI*). Positive Klone wurden nach alkalischer Schnelllyse durch Spaltung der gewonnenen Plasmid-DNA mit *NheI* und *PmeI* identifiziert und schließlich durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden 741f und 1141r (siehe F.1) bestätigt.

#### B.1.3.1 Herstellung der DNA-Konstrukte

Der Vergleich der Sekretion bei Verwendung verschiedener Signalsequenzen wurde durch Einsatz der autologen HIV-Env-Signalsequenz (*HIV*) sowie dreier unterschiedlicher *tpa* (*tissue plasminogen activator*) Signalsequenzen erreicht. Alle Signalsequenzen wurden von Geneart AG kodonoptimiert. Die Firma stellte auch die *tpa*-Signalsequenz her. Die *HIV*-Signalsequenz wurde selbst synthetisiert (B.1.4.3). Um den Einfluss der Spaltstelle auf die Sekretion zu charakterisieren, wurde eine *tpa*-Variante generiert, die keine der Spaltstelle folgende Aminosäure Serin enthält (*tpa1*), eine mit Serin (*tpa2*) und eine mit Serin und vier weiteren Aminosäuren nach der Spaltstelle (*tpa3*). Diese zusätzlichen Sequenzen wurden durch PCR mit den Oligonukleotiden *cenvF1\_A* (*HIV*), *cenvF1* (*tpa1*), *cenvF2* (*tpa2*) und *cenvF3* (*tpa3*) direkt an gp120 fusioniert und mit *cenvB*

amplifiziert. Über die Schnittstellen *BsmBI* und *ApaI* erfolgte die Klonierung nach den Signalsequenzen von *HIV* und *tpa* und vor den zwei Stopkodons oder vor drei humanen C3ds (hC3d<sub>3</sub>). Die drei aufeinander folgenden hC3d-Sequenzen wurden von Geneart AG absteigend kodonoptimiert, um homologe Rekombinationen zu vermeiden, über einen (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>-*linker* miteinander verbunden und als fertige Sequenz geliefert. Die Optimierung auf Säugetierkodons wurde unter Verwendung der Software Geneoptimizer™ durchgeführt. Pro Signalsequenz wurde je ein Stopkonstrukt und je ein Konstrukt mit drei fusionierten C3d-Sequenzen kloniert. Die Sequenz *tpa1hC3d<sub>3</sub>* ohne gp120 wurde als Kontrolle verwendet. Alle DNA-Konstrukte wurden über die Schnittstellen *NheI* und *PmeI* in den MCS des Vektors pcDNA3.1 (+) von Invitrogen (Leek, Niederlande) gesetzt. Die Transkription der Gene erfolgt in der MCS unter der Kontrolle des hCMV (humanes Cytomegalievirus) *immediate early*-Promotors, welcher im Folgenden als CMV-Promotor bezeichnet wird.

Zur Expression von gp120 auf der Oberfläche von RK13-Zellen wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden *cenvFXma* und *cenvBAcc* und der Matrize gp120 durchgeführt, diese mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *AccI* verdaut und anschließend mit dem entsprechend linearisierten Vektor pDisplay (Invitrogen) ligiert.

#### B.1.3.2 Herstellung der Luciferase-Reporterkonstrukte

Sämtliche Luciferase-Reporterkonstrukte für eine quantitative Analyse der Expressionseffizienz basieren auf dem Vektor pcDNA3.1(+) von Invitrogen. Es erfolgte ein Austausch des Neomycingens durch das „firefly“-Luciferasegen des pGL2-Vektors von Promega (Mannheim). Den so entstandenen Vektor pcDNA3.1luc generierte Geneart AG. Alle bereits klonierten DNA-Konstrukte (siehe B.1.3.1) wurden an den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *PmeI* verdaut und anschließend mit dem entsprechend linearisierten pcDNA3.1luc-Vektor ligiert. Die Klonierung des *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*-Konstrukts erfolgte mit dem Konstrukt *tpa1gp120*, in das über die Restriktionsschnittstellen 5' *EcoRV* und 3' *PmeI* das Fragment hC3d<sub>3</sub> direkt nach den beiden Stopkodons von *tpa1gp120* ligiert wurde.

#### B.1.3.3 Herstellung der VLP-Konstrukte

Für die Herstellung der VLP-Konstrukte wurde *syngag<sub>III B</sub>* (Bojak *et al.*, 2002; Graf *et al.*, 2004; Kofman *et al.*, 2003) durch PCR mit den Oligonukleotiden *syngagB\_fwd* und *syngagB\_rev* amplifiziert und über *NheI* und *PmeI* in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) kloniert. Auf der Oberfläche der VLP sollen gp120-, gp140-, hC3d-, mC3d- und EnvhC3d-Proteine präsentiert werden. Zur Verankerung von gp120, gp140, hC3d und mC3d in der Membran sind Transmembrandomänen (TM) nötig. Die Transmembrandomänen TM<sub>HIV</sub> und TM<sub>gp64</sub> wurden mit Hilfe der Oligonukleotidpaare TM<sub>fwd</sub>/ TM<sub>backStop</sub> und TM<sub>gp64fwd</sub>/ TM<sub>gp64back</sub> (siehe F.1) mit den kodonoptimierten Matrizen gp140TM<sub>HIV</sub> (siehe B.1.3) beziehungsweise gp64TM<sub>gp64</sub> (Geneart AG) amplifiziert und an den eingeführten Restriktionsschnittstellen *ApaI* und *PmeI* nach den Inserts einkloniert. Durch

PCR mit den Oligonukleotiden hC3dfwd und hC3drev\_linkerb wurde die erste der drei humanen C3d-Kassetten amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *BsmBI* sowie *Apal* nach der *tpa1*-Signalsequenz und vor die autologe Transmembrandomäne TM<sub>HIV</sub> von HIV-1 Env oder die Transmembrandomäne von gp64 kloniert. Neben der humanen C3d-Sequenz wurde eine auf humanen Kodongebrauch optimierte murine C3d-Sequenz (Geneart AG) für die VLP-Konstrukte verwendet. Die Optimierung auf Säugetierkodons wurde unter Verwendung der Software Geneoptimizer™ durchgeführt. Die Amplifikation der murinen C3d-Sequenz erfolgte mit den Oligonukleotiden mC3dfwd und mC3drev\_linkerb. Nach PCR mit den Oligonukleotiden cenvF1 oder cenvF1\_A und TMbackStop wurde das neu generierte Fragment gp140TM<sub>HIV</sub> über die Restriktionsschnittstellen *BsmBI* und *PmeI* vor die *tpa1*- oder die *HIV*-Signalsequenz kloniert. Über die Schnittstellen *NheI* und *PmeI* erfolgte die Ligation in den MCS des Vektors pcDNA3.1 (+). Fusionskonstrukte von hC3d und gp140 wurden mit den Oligonukleotiden cenvF5, cenvBlinker, hC3dfwdlinker und hC3drevlinkerb generiert.

Um zu analysieren, ob die Formation von VLP effektiv funktioniert, wenn sich die Genabschnitte von HIV-1 Gag, Env und/oder C3d auf einem einzigen Plasmid befinden, wurden alle fertiggestellten gp120, gp140 und C3d VLP-Sequenzen über die Schnittstellen *XmaI* und *BstBI* an die Stelle des Neomycingens des Vektors pcDNA3.1 (+) gesetzt. Durch die Verwendung der Oligonukleotide *tpa\_fwd* und TMbackStop oder TM<sub>gp64</sub>back waren die Schnittstellen bereits eingefügt. Die gp120-, gp140- und C3d-VLP-Sequenzen wurden direkt nach dem SV40-Promotor (SV40, *simian virus*) einkloniert und durch Sequenzierung überprüft. Das für die Bildung der VLP notwendige HIV-1 Gag (*syngag<sub>III</sub>B*) wurde mit den Schnittstellen *NheI* und *PmeI* nach dem CMV-Promotor eingefügt.

#### B.1.3.4 Herstellung der Flp-In-Konstrukte

Für die Herstellung rekombinanter 293T- und CHO-Zelllinien, die die Proteine gp140TM bzw. hC3dTM stabil exprimieren, wurde das Flp-In™-System (Invitrogen) verwendet. Ihr Genom enthält ein lacZ-Zeocin-Fusionsgen, das stabil integriert unter der Kontrolle des SV40-Promotors steht. Dem SV40-Promotor und dem ATG-Startkodon folgt eine FRT-Site, die als Bindungs- und Insertionsstelle für die Rekombinase fungiert. Der pcDNA5/FRT-Expressionsvektor (5.1 kb) enthält ebenfalls eine FRT-Site. Bei Kotransfektion dieses Vektors mit dem pOG44-Flp-Rekombinase-Expressionsplasmids in Flp-In-Säugerzellen wird so das Transgen durch homologe Rekombination gezielt in das Genom der Wirtszelle integriert. Zur Selektion stabil transfizierter Zellklone enthält der pcDNA5/ FRT-Vektor ein Hygromycinresistenzgen. Um rekombinante Zelllinien zu generieren, die stabil gp140TM bzw. hC3dTM auf der Oberfläche präsentieren, wurden die Konstrukte *tpa1gp140TM<sub>HIV</sub>*, *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>*, *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* und *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* über die Restriktionsschnittstellen 5' *NheI* und 3' *PmeI* in den Vektor pcDNA5/FRT ligiert und die fertigen Konstrukte in die Flp-In-Säugerzellen transfiziert (siehe B.2.4).

### B.1.4 PCR-Techniken

Mit Hilfe von Startermolekülen (Primern) wurden gezielt DNA-Fragmente amplifiziert (Saiki *et al.*, 1985), gewünschte Stopkodons in Plasmid-DNA eingeführt, synthetische Gene kloniert sowie *E. coli*-Kolonien nach der Transformation auf positive Transformanden getestet. Die Durchführung der PCR-Analysen erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (Mastercycler Gradient Eppendorf) bzw. einem *iCycler* der Firma BioRad (München). Für alle in der Arbeit durchgeführten PCR-Analysen wurde entweder die *Deep Vent<sub>R</sub><sup>TM</sup>*-DNA-Polymerase (NEB) oder die *TaqPlus<sup>TM</sup> Precision*-DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet.

#### B.1.4.1 Standard-PCR

Für Plasmid-DNA wurden folgende PCR-Standardbedingungen zur Amplifizierung von Fragmenten sowie zum Anfügen von Restriktionsstellen an den 5'- bzw. 3'-Bereichen der gewünschten Sequenz verwendet.

**Tabelle B.1: Standard-PCR-Protokoll**

Komponenten	Volumen	PCR-Bedingungen:	Temperatur	Zeit
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	40,0 µl	1. Denaturierung	95°C	5 min
dNTPs (10 mM , viermal je 2,5 mM)	1,0 µl			
5'Primer fwd (10 µM)	1,5 µl	2. Amplifizierung*	95°C	30 sec
3'Primer rev (10 µM)	1,5 µl	(„Annealing“)	55-68°C	30 sec
Matrize (1 µg/µl); Kontrolle H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	0,5 µl		72°C	30 sec-
10-fach Puffer	5,0 µl			1 min 20 sec
<i>Deep Vent</i> Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl			
Endvolumen	50,0 µl	3. Elongation	72°C	5 min

\* Schritt 2: 30 Zyklen

Die „Annealing“-Temperatur der Oligonukleotide wurde mit dem Programm *GeneRunner* (Version 3.0) bestimmt und je nach eingesetztem Oligonukleotidpaar variiert. Je nach Länge der zu amplifizierenden Gensequenz wurde der dritte Abschnitt der Amplifizierung bei 72°C zeitlich angepasst. Als Faustregel wurde eine Minute pro 1000 Basenpaare veranschlagt.

Der Test auf positive Transformanden wurde gemäß dem oben beschriebenen Standard-PCR-Ansatz durchgeführt. Der Test erfolgte mit dem *Qiagen-Mastermix* (Qiagen, Hilden) und mit halbiertem Endvolumen (25 µl).

## B.1.4.2 Gradienten-PCR

Die Analyse von schwierig amplifizierbaren DNA-Fragmenten mit zwei spezifischen Primern erfolgte mittels Gradienten-PCR-Analysen. Dabei wurde die *Primer-Annealing*-Temperatur bei jedem Zyklus um 0,3°C verringert und somit der geeignete Temperaturbereich zur Amplifikation des jeweiligen DNA-Fragments ermittelt.

Tabelle B.2: Gradienten-PCR-Protokoll

Komponenten	Volumen	PCR-Bedingungen:	Temperatur	Zeit
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	40,0 µl	1. Denaturierung	95°C	4 min
dNTPs (10 mM , viermal je 2,5 mM)	1,0 µl			
5'Primer fwd (10 µM )	1,5 µl	2. „Gradienten-PCR“	95°C	30 sec
3'Primer rev (10 µM)	1,5 µl	Amplifizierung*	65°C-56°C	30 sec
Matrize (1 µg/µl); Kontrolle H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	0,5 µl		72°C	1 min
10-fach Puffer	5,0 µl			
<i>Deep Vent</i> Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	3. Elongation	72°C	10 min
Endvolumen	50,0 µl			

\* Schritt 2: 30 Zyklen

## B.1.4.3 PCR zur Synthese der HIV-Env-Signalsequenz

Die Optimierung der Ausgangssequenz wurde von der Firma Geneart AG durchgeführt. Die Herstellung der synthetischen HIV-Env-Signalsequenz erfolgte in einer PCR-Reaktion durch Verbindung von partiell überlappenden Oligonukleotiden (siehe F.1) mit Hilfe der *TaqPlus<sup>TM</sup> Precision Polymerase* (Stratagene). Die Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes und die Reaktionsbedingungen für die PCR-Zyklen sind in Tabelle B.3 angegeben.

Tabelle B.3: PCR-Protokoll für die Herstellung der HIV-1 Env-Signalsequenz

Komponenten	Volumen	PCR-Bedingungen:	Temperatur	Zeit
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	18,5 µl	1. Denaturierung	95°C	3 min
dNTPs (10 mM , viermal je 2,5 mM)	1,0 µl			
5'Primer pf (100 µM )	10,0 µl	2. „Gradienten-PCR“	95°C	30 sec
3'Primer pb (100 µM)	10,0 µl	Amplifizierung*	55°C	1 min
Primer AL1-3, Am1-2 (10µM)	1,0 µl		72°C	45 sec
10-fach Puffer	5,0 µl			
<i>TaqPlus<sup>TM</sup> Prec</i> Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	3. Elongation	72°C	5 min
Endvolumen	50,0 µl			

\* Schritt 2: 30 Zyklen

### **B.1.5 Isolierung und Analyse genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen**

Zur Untersuchung integrierter Plasmide wurde die genomische DNA aus stabil transfizierten Säugerzellen (siehe B.2.4) mit dem *QIAamp Blood Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Dabei wurde das Protokoll für kultivierte Zellen verwendet. Anschließend wurde der Bereich des integrierten Transgens mit den Oligonukleotiden *cenv981f/TMbackStop* für *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>*, *hC3d1fwd/ TM<sub>gp64</sub>back* für *tpaC3dTM<sub>gp64</sub>* und *hC3d1fwd/ TMbackStop* für *tpaC3dTM* (siehe F.1) in einer Standard PCR-Analyse mit 30 Zyklen amplifiziert. Die erhaltenen 1000 bp PCR-Fragmente konnten bezüglich ihrer Sequenz verifiziert werden. In alle PCR-Analysen zum Nachweis genomischer DNA wurde jeweils ein Fünftel der aufgereinigten genomischen DNA als Matrize eingesetzt.

## **B.2 Zellkulturtechniken**

Sämtliche Zellkulturmedien und Zusätze stammten von PAN Biotech GmbH (Aidenbach), Invitrogen (GIBCO™) oder Sigma (Deisenhofen). Alle verwendeten Chemikalien sind speziell für Zellkulturen getestet. Kulturgefäße für Zellen wurden von BD Biosciences (Heidelberg) bezogen.

### **B.2.1 Kultivierung eukaryontischer Zelllinien**

Alle Säugerzelllinien wurden bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert sowie nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:10 subkultiviert (Ausubel, 1987).

Die adhärent wachsende Kaninchen-Nierenzelllinie **RK13** wurden ebenso wie die adhärent wachsenden Ad5/SV40-transformierten humanen Nierenepithelzellen **293T** in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) gezogen. Weiterhin wurden **Flp-In™-293T-Zellen** (Invitrogen, R750-07) verwendet. Diese adhärent wachsenden Ad5/SV40-transformierten, humanen Nierenepithelzellen besitzen eine Kopie des Vektors *pFRT/lacZeo*, der stabil in ihr Genom integriert ist und exprimieren stabil das *lacZ*-Zeocin-Fusionsgen. Die Kultivierung der Flp-In-293T-Zelllinie erfolgte in DMEM mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Als Selektionsmarker wurde dem Medium Zeocin™ (Invitrogen, Leek, Niederlande) mit einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben. Bei den **Flp-In™-CHO-Zellen** (Invitrogen, R758-07) handelt es sich um Zellen aus dem Ovar eines Hamsterweibchens der Gattung *Cricetulus griseus* (Chinesischer Hamster), in deren Genom eine Kopie des Vektors *pFRT/lacZeo2* stabil verankert ist. Die adhärent wachsende Zelllinie wurde unter Verwendung des HAM's F12 Mediums mit L-Glutamin, 10% inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml) sowie mit Zeocin™ (100 µg/ml) als Selektionsmarker gezogen. Die adhärent wachsenden Zelllinien **RK13** und **Flp-In™-CHO-**

**Zellen** wurden mittels Trypsin/EDTA vom Zellboden gelöst und nach Abstoppen der enzymatischen Reaktion in neue Kulturgefäße überführt. Die semiadhärent wachsenden **293T-** und **Flp-In<sup>TM</sup>-293T-Zellen** wurden vom Zellboden abgeklopft und nach Zugabe von neuem Medium in neue Zellkulturgefäße pipettiert.

Die humanen B-Lymphom-Zelllinien **Raji**, **Ramos** und **Em-LCL** wurden in RPMI-1640 Medium (PAN, Heidenheim) mit FKS (10%), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Diese eukaryontischen Suspensionszellen wurden freundlicherweise von Fritz Schwarzmann (RIMMH) zur Verfügung gestellt.

### **B.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl**

Die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierzu wurden 50 µl einer gründlich resuspendierten Zellkultur mit dem gleichen Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung vermischt. Tote Zellen waren bei der nachfolgenden Mikroskopie durch eine deutliche Blaufärbung erkennbar.

### **B.2.3 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen**

Die transiente Expression viraler Proteine in eukaryontischen Zellen wurde in der Regel durch Transfektion diverser eukaryontischer Expressionsplasmide auf der Basis von pcDNA3.1-Vektoren (Invitrogen) erzielt. Die Expression der in den Polylinker von pcDNA3.1 (5,4 kb) inserierten Fremdgene stehen hierbei unter der Kontrolle des konstitutiven hCMV-*immediate early* Promotors (hCMV, *human cytomegalie virus*). Die Polyadenylierung der Transkripte wird durch eine BGHpolyA-Signalsequenz (BGH, *bovine growth hormone*) initiiert. Zusätzlich trägt dieser Vektor ein Neomycin-Resistenzgen (Neo<sup>R</sup>), welches von einem SV40-Promotor und einem SV40-Polyadenylierungssignal flankiert wird. Im Vektor pcDNA3.1luc wurde das Neomycin-Resistenzgen durch ein *firefly*-Luciferase-Gen aus dem Vektor pGI2 (Promega) ersetzt.

#### **B.2.3.1 Calciumphosphat-Transfektionen**

$1 \times 10^6$  bzw.  $2,5 \times 10^5$  293T-Zellen wurden in Petrischalen (Fläche: 58,95 cm<sup>2</sup>) bzw. 6-Napf-(well)-Schalen (Fläche: 9,6 cm<sup>2</sup>) ausgesät und 24 Stunden später durch Calciumphosphat (CaP)-Präzipitation (Graham & Eb, 1973) mit max. 45 µg (Petrischalen) bzw. mit max. 15 µg (6-well-Schalen) Plasmid-DNA transfiziert. Nach 8-12 Stunden wurde das Zellkulturmedium erneuert. Dabei wurde entweder DMEM (siehe B.2.1) für nachfolgende Western Blot-Analysen verwendet oder Ultraculture<sup>TM</sup>-Medium (Cambrex, Walkersville, Maryland, USA) mit Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) für anschließende Bindungsversuche (siehe B.3.4.2). Zellen und Kulturüberstände wurden 48 Stunden *post transfectionem* geerntet. Bei Zeitverlaufexperimenten wurden Zellen und Zellüberstände in regelmäßigen Abständen zwischen 24 h und 72 h nach Transfektion geerntet. Die Details der Ernte sind im Abschnitt der Proteinexpressionsanalysen beschrieben (B.3).

Für die Herstellung gp120-präsentierender RK13-Zellen zur Immunisierung der Kaninchen (B.4.4) wurden  $1,8 \times 10^6$  RK13-Zellen in acht Petrischalen ausgesät und 24 h später durch Calciumphosphat-Präzipitation (Graham & Eb, 1973) mit  $45 \mu\text{g}$  *pDisplay\_tpa1gp120* transfiziert. Nach 14 Stunden wurde das Zellkulturmedium DMEM erneuert. Achtundvierzig Stunden *post transfectionem* wurden die Kulturüberstände verworfen, die Zellen pro Petrischale mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst und nach zweimaligem Waschen in DMEM wurden jeweils die Zellen von zwei Petrischalen in 1 ml DMEM aufgenommen. Nach Überprüfung im FACS trugen 20% der RK13-Zellen nach der Transfektion gp120 auf ihrer Oberfläche (B.3.4.1). Pro Kaninchen wurden 1 ml Zellen in DMEM für die Immunisierung verwendet (B.4.4).

#### B.2.3.2 *Fugene*-Transfektionen

$2 \times 10^5$  293T-Zellen in 6-well-Schalen wurden mit Hilfe von *Fugene<sup>TM</sup> 6 transfection reagent* (Boehringer, Mannheim) mit 3-6  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA nach Herstellerangaben transfiziert. Zellen und Kulturüberstände wurden 48 Stunden nach Transfektion geerntet.

### **B.2.4 Herstellung stabiler eukaryontischer Zellen (Flp-In<sup>TM</sup>-System)**

#### B.2.4.1 Stabile Transfektion der Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen

Zunächst wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen (für CHO Flp-In<sup>TM</sup>) bzw.  $2,5 \times 10^5$  Zellen (für 293T Flp-In<sup>TM</sup>) in 6-well-Schalen (Fläche: 9,6 cm<sup>2</sup>) ausgesät und die Zellen in dem jeweiligen Medium (siehe B.2.1) mit Zeocin-Zusatz (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) über Nacht kultiviert. Eine Stunde vor Transfektion wurde das Zeocin-enthaltende Kulturmedium der Zellen abgesaugt und gegen Zeocin-freies Medium ausgetauscht. 24 Stunden nach dem Aussäen wurden die ca. 80% konfluenten Zellen durch *Fugene<sup>TM</sup> 6* (Boehringer) mit 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA transfiziert. Dabei wurden das Flp-Rekombinase-Expressionsplasmid *pOG44* und der das Transgen beinhaltende Vektor pcDNA5/FRT im Verhältnis 9:1 in die Transfektion eingesetzt, um einen Überschuss an Flp-Rekombinase zu gewährleisten. Die Integration des Expressionsvektors pcDNA5/FRT ins Genom der Wirtszelllinie erfolgt an die Stelle des *lacZ*Zeocin-Fusionsgens. Dies führt zum Funktionalitätsverlust des *lacZ*Zeocin-Gens. Daher wurde nachfolgend nur Zeocin-freies Medium verwendet. Zwölf bis 14 Stunden (Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen) bzw. 8 Stunden (Flp-In<sup>TM</sup>-293T-Zellen) nach Transfektion erfolgte ein weiterer Medienwechsel auf Zeocin-freiem Kulturmedium.

#### B.2.4.2 Kultivierung der stabil transfizierten Flp-In<sup>TM</sup>-Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die stabil transfizierten Zellen parallel in Zeocinfreiem Medium sowie in Standardmedium mit HygromycinB (PAA, Pasching, Austria) kultiviert. Dabei wurde für Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen eine Anfangskonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HygromycinB gewählt. Für *Flp-In<sup>TM</sup>*-293T-Zellen wurden dem Medium anfangs

12,5 µg/ml HygromycinB zugegeben. Die Zellen wurden erstmals mit dem Hygromycin-medium überschichtet, nachdem die Zellen sich am Boden der 6-well-Schale abgesetzt hatten. Durch schrittweise Erhöhung der Hygromycinkonzentration (jeweils um 100 µg/ml bei CHO- bzw. 12,5 µg/ml bei Flp-In<sup>TM</sup>-293T-Zellen) wurden die Zellen auf über 90% Env- bzw. C3d-positive Zellen selektioniert. Dabei wurde für Flp-In<sup>TM</sup>-CHO-Zellen eine Endkonzentration von 500 µg/ml HygromycinB im Medium ermittelt während Flp-In<sup>TM</sup>-293T-Zellen bei einer Hygromycinkonzentration von 100 µg/ml stabil kultiviert wurden. Die unterschiedliche Hygromycintoleranz der beiden Zelllinien ist dabei laut Hersteller auf das Vorliegen des Resistenzgens in transkriptionell unterschiedlich aktiven Bereichen des Genoms zurückzuführen. Die Zelllinien wurden in dem jeweiligen Standardmedium mit 500 µg/ml bzw. 100 µg/ml Hygromycin gezogen und nach Erreichen der Konfluenz zweimal pro Woche im Verhältnis 1:10 subkultiviert.

#### B.2.4.3 Überprüfung der stabilen Integration

Bei erfolgreicher Integration des Expressionsvektors pcDNA5/FRT ins Zellgenom kommt es zur Zerstörung des *lacZ*-Gens. Das Genprodukt des *lacZ*-Gens, die β-Galaktosidase, kann das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) spalten und in das tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzen. Mit dieser Färbung kann so die Zerstörung des *lacZ*-Gens und die erfolgreiche Rekombination nachgewiesen werden. Für die Färbung wurden die adhärenenten Zellen in 6-wells bis zur Konfluenz kultiviert, mit ca. 1 ml PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und mit 1 ml 4%igem Formaldehyd (in PBS) fixiert. Nach zehnmütiger Inkubation wurden die Zellen erneut vorsichtig mit PBS gewaschen, mit 1 ml frisch hergestellter Färbelösung (5 mM K<sub>3</sub>(Fe-III-(CN)<sub>6</sub>), 5 mM K<sub>4</sub>(Fe-II-(CN)<sub>6</sub>), 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 mg/ml X-Gal in PBS) überschichtet und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen, die Zellen mit PBS überschichtet und die Blaufärbung unter dem Mikroskop beobachtet und protokolliert (Lim & Chae, 1989). Die Mikroskopie wurde an einem *LEICA-DMR*-Mikroskop (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim) mit einer *Canon PowerShot-S45*-Kamera (Canon, Amsterdam) durchgeführt (Vergrößerung: 40-100fach). Dabei wurde eine Belichtungszeit von 0,1 sec und eine Blende von 8,0 gewählt.

### **B.2.5 Präparation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)**

#### B.2.5.1 Präparation humaner PBMC

Zur Isolierung der PBMC (*peripher blood mononuclear cells*), einer Mischung der mononukleären Blutzellen (Monozyten, B- und T-Lymphozyten, NK-Zellen), wurden aus Blutkonserven (*buffy coats*) je 12,5 ml Blut in ein Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen) überführt, mit P2 (PBS, 2% FKS) auf 35 ml aufgefüllt und durch leichtes Schwenken vermischt. Parallel dazu wurden bei Raumtemperatur 15 ml Ficoll (PAN Biotech, Aidenbach) in PBMC-Separations-Falcon-Röhrchen gegeben und eine Minute bei Raumtemperatur und 300 × g abzentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die

Ficollschicht im Röhrchen mit 30 ml des verdünnten Blutes überschichtet und zentrifugiert (30 Minuten, 1000 × g, ohne Bremse). Dabei sedimentierten die roten Blutkörperchen und die Granulozyten, während sich die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen direkt über der Ficollschicht sammelten. Das darüberliegende Plasma wurde verworfen und der Lymphozytenring abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 45 ml P2-Puffer (10 Minuten, 677 × g) wurde das Pellet in 1 ml MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, 2 mM EDTA) aufgenommen und die Lebendzellzahl bestimmt.

#### B.2.5.2 Präparation von PBMC aus Kaninchenblut

Zur Isolierung der PBMC aus Kaninchen wurden 10 ml des Blutes in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit P2 (PBS, 2% FKS) auf 35 ml aufgefüllt und durch leichtes Schwenken vermischt. Alle weiteren Schritte erfolgten wie in B.2.5.1 beschrieben. Siehe auch (Speck *et al.*, 1998).

#### **B.2.6 Isolierung von humanen B-Lymphozyten**

Die Isolierung von CD19-positiven B-Lymphozyten aus den aufgereinigten PBMC (siehe B.2.5.1) erfolgte mittels negativer Depletion. Dazu wurde für die magnetische Separation (*Magnetic Cell Separation*, MACS) das humane *B Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet, das ein Gemisch aus Antikörpern gegen Oberflächenmarker aller in PBMC vorkommenden Zelltypen außer den CD19-positiven Lymphozyten enthält.

#### **B.2.7 Stimulation von humanen B-Zellen und B-Zellklonen**

Die CD21-Expression nach unspezifischer Stimulation wurde an den Zelllinien Raji, Ramos, Em-LCL und den aufgereinigten B-Zellen (siehe B.2.6) getestet. Für die Stimulation wurden in jeden Napf einer 6-well-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Solingen)  $5-10 \times 10^5$  Zellen eingesetzt und diese für 60 Stunden mit IL-2/PHA, IL-2/PMA oder IL-2/SAC stimuliert. Pro well wurde mit 20 ng IL-2 (Interleukin-2, Roche) und 10 µg PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, Deisenhofen) bzw. PHA (Phytohämagglutinin, Sigma) oder 10 ng IL-2 und 0,625 µl SAC (Pansorbin Staphylococcus aureus cells, Sigma) (entspricht einer Verdünnung von 1:5000) stimuliert. Nach der Stimulation wurde die Expression von CD21 auf der Oberfläche der stimulierten B-Zellen mittels FACS-Messungen (*fluorescence activated cell sorting*) überprüft (B.3.4.1). Für die Messungen wurden die Zellen direkt von den 6-well-Platten in FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg) überführt, mit FACS-Puffer (PBS mit 1% FKS, 0,1% NaN<sub>3</sub>) gewaschen und anschließend mit dem hCD21-spezifischen Antikörper FR5A10 no. 09837 (Dianova, Hamburg) und einem PE-gekoppelten anti-Maus Antikörper no. R0439 (DAKO, Hamburg) gefärbt und im FACS vermessen. Mit den aufgereinigten humanen B-Zellen wurde nur eine Stimulation

(IL-2/ PHA) angesetzt, da der Hintergrund mit anti-Maus PE sehr hoch war und getestet werden sollte, ob sich die unspezifischen Signale nach Stimulation verringern.

### **B.3 Analyse und Aufreinigung der transienten und der stabilen Proteinexpression**

#### **B.3.1 Quantitative Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate**

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den aufbereiteten Zelllysaten (siehe B.3.2) erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) und wurde unter Verwendung des *Bio-Rad Protein Assay Reagent* (Bio-Rad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proteinmenge wurde mit Hilfe einer BSA-Standardkurve bestimmt.

#### **B.3.2 Quantifizierung des HIV-1-Hüllproteins im ELISA**

Um die Menge an HIV-1-Hüllprotein in Zelllysaten zu bestimmen, wurden die transfizierten 293T-Zellen einmal mit kaltem PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, mit kaltem PBS abgespült, 5 Minuten bei 300 × g abzentrifugiert und in *Radioimmunoprecipitation analysis* (RIPA)-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1% SDS (w/v), 1% Nonidet P-40 (w/v), 0,5% Natriumdesoxycholat (w/v)) nach Zusatz von Proteaseinhibitoren (*Complete Minis*, Roche) 20 Minuten auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile des Zelllysates wurden 3 Minuten bei 10.000 × g und 4°C abzentrifugiert und die so erhaltenen Zelllysate direkt in den HIV-1-ELISA eingesetzt. Um die Menge an HIV-1-Hüllprotein im Kulturmedium zu quantifizieren, wurden die Überstände 5 Minuten bei 300 × g zentrifugiert, in ein neues Gefäß überführt und in den HIV-1-Env-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) eingesetzt.

Zur Quantifizierung des gebildeten gp120-Proteins in Zelllysaten und Kulturüberständen wurden die Proben auf Trockeneis zum Kooperationspartner Simon Jeffs (Imperial College, London, UK) geschickt. Mit Hilfe eines rekombinanten gp140<sub>CN54</sub>-Proteinstandards wurden die Zelllysate und Überstände dort in einem spezifischen α-gp120 ELISA quantifiziert Methode nach (Sheppard *et al.*, 2007). Alle Proben wurden dabei so verdünnt, dass die Messwerte im linearen Bereich der Eichkurve lagen. Für den ELISA wurde entweder der polyklonale Antikörper ARP422 oder der monoklonale Antikörper 1006-15D eingesetzt (siehe Tabelle B.4).

### B.3.3 Analyse der transienten Proteinexpression

#### B.3.3.1 Western Blot

Die Kulturüberstände der transfizierten Zellen wurden vorsichtig abgenommen, Zellbestandteile bei 300 × g für 4 Minuten abzentrifugiert, in neue Gefäße überführt und schließlich bei 4°C gelagert. Die verbliebenen transfizierten 293T-Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, in kaltem PBS abgespült, 5 Minuten bei 300 × g abzentrifugiert und in RIPA-Puffer 20 Minuten auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile des Zelllysates wurden 3 Minuten lang bei 10 000 × g und 4°C abzentrifugiert. Die Gesamtproteinmenge des Kulturüberstandes und der Zelllysate wurde mit dem *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Proben wurden mit 5 × Probenpuffer (Laemmli, 1970), versetzt und 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Es wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein entsprechend ihrem Molekulargewicht über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Schagger & von Jagow, 1987) und auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm) (Schleicher & Schuell, Dassel) transferiert. Zur Kontrolle des Transfers und zum Anzeichnen des Molekulargewichtsstandards (Bio-Rad, München) wurden die Proteine reversibel mit Ponceau S (0,5 g Ponceau S, 25 ml Eisessig auf 500 ml H<sub>2</sub>O) angefärbt. Die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (5% Magermilchpulver in TBS (*Tris-buffered saline*: 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl)). Die aufgetrennten Proteine wurden daraufhin spezifisch mit Hilfe in TBS-Puffer verdünnten Primär-Antikörpern und anschließend mit alkalische-Phosphatase (AP)-konjugierten, sekundären Antikörpern (vgl. Tabelle B.4) nach herkömmlichen Methoden detektiert und analysiert (Sambrook *et al.*, 1989). Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf den Membranen wurden über AP-Färbung mit NBT/BCIP (Roche) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) nach Herstellerangaben detektiert.

**Tabelle B.4: Auflistung der verwendeten Western Blot-Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Beschreibung
<b>Primäre Antikörper</b>			
α-gp120, ARP422	MRC	1:5000	Kaninchen, polyklonal gp120 <i>C-clade</i>
α-gp120, 1006-D	Suzan Zolla-Pazner	1:500	Murin monoklonal gp120 <i>C-clade</i>
α-hC3d, ab17453	Abcam	1:1000	Murin monoklonal human C3d
13/5		1:1000	Murin monoklonal p24/55 <sub>III</sub> B
<b>Sekundäre Antikörper</b>			
α-Maus-AP	Biorad, München	1:1000	
α-Kaninchen-AP	DAKO, Hamburg	1:2000	

### B.3.3.2 Luciferasereporter-Assay

293T-Zellen wurden 48 Stunden *post transfectionem* mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit 200 µl  $1 \times$  CCLR lysis buffer (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben aufgeschlossen. Unlösliche Zellbestandteile wurden pelletiert ( $10.000 \times g$ , 1 Minuten,  $4^{\circ}C$ ). Der Gesamtproteingehalt des Zelllysates wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) bestimmt. Der Luciferase-Assay (Luciferase Assay System, Promega) wurde mit 50 µg Gesamtprotein nach Herstellerangaben durchgeführt und die Lichtreaktion durch Zugabe von je 100 µl Luciferin gestartet. Die Luciferaseaktivität wurde durch Messung der Lichtemission über einen Zeitraum von 10 sec im Luminometer Lumat 9501 (Berthold, Bad Wildbach) quantifiziert.

### B.3.4 FACS-Analysen

#### B.3.4.1 Quantifizierung der Expression von Oberflächenantigenen

Zum Nachweis der Expression von CD21 auf B-Zellen, hC3d auf stabil transfizierten 293T-Zellen bzw. CHO-Zellen und gp120 auf transient transfizierten RK13-Zellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dazu wurden ca.  $1-4 \times 10^6$  Zellen mit den jeweiligen Antikörpern für eine Stunde bei Raumtemperatur gefärbt. Für die Detektion von CD21 wurde ein monoklonaler  $\alpha$ -CD21 Antikörper (Dianova, Hamburg) in einer Verdünnung von 1:50 in FACS-Puffer (PBS, 1% FKS, 1 mg/ml  $NaN_3$ ) eingesetzt. Der Nachweis des exprimierten humanen C3d-Proteins erfolgte unter Verwendung des monoklonalen Mausantikörpers ab17453 (abcam, Cambridge, UK) ebenfalls in einer 1:50-Verdünnung. Als sekundärer Antikörper wurde jeweils ein PE-gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (BioRad, München) in einer Verdünnung von 1:50 verwendet. Nach der Aufreinigung der B-Zellen aus PBMC durch MACS-Separation (siehe B.2.6) wurde die erreichte Reinheit mittels eines PE-gekoppelten  $\alpha$ -CD19-Antikörpers (BD Pharmingen, Heidelberg) überprüft (1:50 Verdünnung). Für die Detektion von exprimiertem gp120 auf der Oberfläche von RK13-Zellen (B.2.3.1) wurde polyklonales Kaninchenserum ( $\alpha$ -gp120-Antikörper ARP422) 1:50 verdünnt in FACS-Puffer als Primärantikörper und  $\alpha$ -Kaninchen-Antikörper PE-gekoppelt (DAKO) in einer 1:50 Verdünnung als Sekundärantikörper eingesetzt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde jeweils zweimal mit 250 µl FACS-Puffer gewaschen. Nach den Färbungen wurden die Zellen in je 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und vermessen. Die Experimente wurden an einem FACScalibur-Gerät der Firma BD Bioscience Clontech (Heidelberg) durchgeführt, wobei insgesamt 20.000 Zellen gemessen wurden. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe des Programmes WinMDI, Version 2.8, ausgewertet. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle B.4 aufgelistet.

#### B.3.4.2 Nachweis der Bindung von hC3d an CD21 auf Raji-B-Zellen

Für den Nachweis der Bindung von hC3d<sub>3</sub> und dem Fusionsprotein gp120hC3d<sub>3</sub> an den Rezeptor CD21 auf Raji B-Zellen wurden für jede Färbung ca.  $3 \times 10^6$  Zellen pelletiert (300 × g, 5 Minuten), zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 50 µl FACS-Bindungspuffer (50 mM Phosphatpuffer mit 75 mM NaCl, pH7,4 aus (Guthridge *et al.*, 2001) und persönliche Kommunikation mit Michael Holers, University of Colorado, Colorado, USA) aufgenommen. Für die Bindung wurden 150 µl von frisch gewonnenen FKS-freien 293T-Zellkulturüberständen, je nach Transfektion mit *tpa1hC3d<sub>3</sub>*, *tpa1gp120* und *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, bei 300 × g für 5 Minuten geklärt und direkt eingesetzt. Nach einer Inkubationsphase von 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT) wurden die Zellen abzentrifugiert (600 × g, 1 Minute), zweimal mit 200 µl FACS-Bindungspuffer gewaschen und in 50 µl FACS-Bindungspuffer aufgenommen. Die Detektion des gebundenen hC3d<sub>3</sub> und gp120hC3d<sub>3</sub> erfolgte durch Zugabe des α-hC3d-Antikörpers ab17453 (Abcam) im Verhältnis 1:50 in FACS-Bindungspuffer für eine Stunde bei RT. Die Detektion des gebundenen gp120hC3d<sub>3</sub> erfolgte durch Zugabe des vorbehandelten α-gp120-Antikörpers ARP422 (MRC, USA) im Verhältnis 2:1 für eine Stunde bei RT. Für die Vorbehandlung wurde der α-gp120-Antikörper für 2 Stunden bei RT mit  $1 \times 10^7$  Raji-B-Zellen in PBS in einem Volumenverhältnis von 1:10 inkubiert, um unspezifisch bindende Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen bei 300 × g für 2 Minuten abzentrifugiert und der Überstand für die Färbung eingesetzt. Nach weiteren zwei Waschschritten (siehe oben) wurde der sekundäre PE-gekoppelte α-Maus-Antikörper (BioRad) für die Detektion des α-hC3d-Antikörpers und der sekundäre PE-gekoppelte α-Kaninchen-Antikörpers (DAKO) für die Detektion des α-gp120-Antikörpers im Verhältnis 1:50 in FACS-Bindungspuffer eingesetzt. Nach Inkubation von einer Stunde bei RT im Dunkeln wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen und sofort im FACS vermessen. Neben dem Kulturüberstand der mit *tpa1gp120*-transfizierten Zellen wurden die einzelnen Antikörper und eine Isotypkontrolle als Negativkontrollen eingesetzt. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle B.4 aufgelistet.

#### B.3.4.3 Lebendfärbung

Zunächst wurden  $3-5 \times 10^6$  Zellen pelletiert (300 × g, 5 Minuten) und in 1 ml FACS-Puffer ohne Natriumazid (PBS, 1% FKS) aufgenommen. Der Ansatz wurde geteilt und 0,5 ml der Zellsuspension mit 1 ml Propidiumjodid (Prl)-Arbeitslösung (1 µg/ml) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (300 × g, 2 Minuten) wurde der Überstand abgesaugt, und die Propidiumjodid gefärbten Zellen in 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert. Als Vergleich dienten 0,5 ml der ungefärbten, im FACS-Puffer gelösten Zellen. In nachfolgenden FACS-Analysen konnte mit Hilfe Prl-gefärbter, toter Zellen die Population lebender Zellen bestimmt werden.

## **B.4 Immunisierungen**

### **B.4.1 Versuchstiere und Haltung**

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden weibliche Mäuse (Charles River, Sulzfeld) der Inzuchtrasse Balb/C im Alter von 40-45 Tagen verwendet. Zudem wurden weibliche Kaninchen der Rasse New Zealand White im Alter von 6-8 Wochen und mit 1,5 kg Gewicht immunisiert. Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage H4 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten. Die Fa. Davids Biotechnologie (Burgweinting) pflegte die Kaninchen und führte die Immunisierungen durch.

### **B.4.2 Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA**

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), wurde die bakterielle Plasmid-DNA für die *in vivo*-Studien im Mega- bzw. Giga-Maßstab unter Verwendung des „*Endotoxin-free DNA preparations*“-Kit nach Angaben des Herstellers präpariert (Qiagen) und in einer Konzentration von 1 µg/µl in sterilem PBS (ohne Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-Ionen) aufgenommen.

### **B.4.3 DNA-Immunisierung der Balb/C-Mäuse**

Die Versuchstiere wurden im Alter von 8 Wochen immunisiert. Zur intramuskulären Immunisierung (i.m.) wurden die Tiere zunächst mittels des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) betäubt. Nach Rasur der Einstichstelle wurden je 50 µl der entsprechend konzentrierten Plasmid-DNA in PBS langsam in beide Hinterbeinmuskeln (*tibialis anterior*) injiziert. Nach der Grundimmunisierung wurden die Mäuse nach 5 und nach 12 Wochen erneut immunisiert (Auffrischimpfung bzw. *Boost*-Immunisierung).

### **B.4.4 Immunisierung der New-Zealand-White-Kaninchen**

Die Versuchstiere wurden im Alter von 6-8 Wochen bei einem Gewicht von ca. 1,5 kg immunisiert. Dazu wurde den Tieren intramuskulär 0,5 ml der entsprechend konzentrierten Plasmid-DNA (2 mg/ml in PBS) langsam in einen Hinterfußmuskel injiziert. Nach der Grundimmunisierung wurden die Kaninchen nach 3, 6 und 9 Wochen erneut mit DNA immunisiert. Die intramuskulären Immunisierungen erfolgten abwechselnd in den rechten bzw. linken Hinterfußmuskel. Nach 20 Wochen erfolgte die erste Proteinimmunisierung mit  $1 \times 10^6$  gp120-exprimierenden RK13-Zellen (1 ml pro Kaninchen, siehe B.2.3.1). Nach 40 Wochen erfolgte die zweite mit 45 µg und nach 42 Wochen die dritte Proteinimpfung mit 5 µg gereinigtem gp140<sub>CN54</sub> (Simon Jeffs, London, UK) zusammen mit dem Adjuvans TiterMax® (Norcross, Georgia, USA) subkutan an der gleichen Stelle.

## **B.4.5 Analyse der humoralen Immunantwort**

### **B.4.5.1 Serumgewinnung**

Den immunisierten Mäusen wurde eine Woche vor der Grundimmunisierung und jeweils eine Woche nach der ersten und der zweiten Auffrischimpfung durch Anritzen der Schwanzvene mit einem sterilen Skalpell 100-500 µl Blut entnommen. Die Blutentnahme wurde dabei durch Erwärmen der Mäuse mittels einer Rotlichtlampe (5-10 Minuten) erleichtert. Den immunisierten Kaninchen wurde sofort (Präimmunseren) und nach 14, 24, 45, 49 und 63 Wochen durch Anritzen der Ohrvenen mit einem sterilen Skalpell 0,5-1 ml Blut entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut zunächst eine Stunde bei 37°C inkubiert, dann 30 min zur Agglutination der Blutzellen auf Eis gestellt. Der Überstand wurde nach einmaliger Zentrifugation (20.800 x g, 4°C, 10 Minuten) als Serum gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **B.4.5.2 Bestimmung Env-spezifischer Antikörpertiter**

Zur Bestimmung der absoluten Env<sub>CN54</sub>-spezifischen Ig-Antikörpertiter wurden mitteladsorbierende 96-well-Platten (Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4°C mit 50 µl pro Vertiefung in einer Konzentration von je 1 µg rekombinant hergestelltem Envgp140<sub>CN54</sub> Protein (Simon Jeffs, Imperial College, London, UK) in 1 ml 0,1 M Karbonatpuffer (pH 8,3) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS) wurden die Platten mit je 100 µl Blockierlösung (PBS, 2% BSA) pro Vertiefung eine Stunde bei RT inkubiert. Die Verdünnung der Tierseren erfolgte seriell in Verdünnungspuffer (PBS, 1% BSA) von 1:100 bis 1:102.400. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 50 µl der entsprechenden Verdünnungen in die Vertiefungen der 96-well-Platten pipettiert und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3 × mit Waschpuffer gewaschen und mit je 50 µl eines in Verdünnungspuffer verdünnten HRP-Antikörpers eine Stunde bei RT inkubiert. Für die Detektion wurden die in Tabelle B.5 beschriebenen Antikörper in den angegebenen Verdünnungen verwendet. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden je 50 µl TMB-Substratlösung (BD Pharmingen) zugegeben. Nach ca. 15 Minuten Farbentwicklung bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurde die Reaktion mit je 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Adsorption bei einer Wellenlänge von 450 nm im Photometer gemessen. Der Antikörpertiter des jeweiligen immunisierten Versuchstieres wurde als Endpunkt derjenigen reziproken Verdünnung definiert, deren OD um den zwei- bis dreifachen Wert eines parallel gemessenen Wertes des Negativserums (z.B. Präimmunserum) dergleichen Verdünnung auf derselben Mikrotiterplatte erhöht war. Die Bestimmung der absoluten anti-gp120 Antikörpertiter im Mausexperiment übernahm Simon Jeffs, die der Kaninchen und die spezifische Bestimmung der IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter wurde selbst durchgeführt.

Tabelle B.5: Auflistung der verwendeten ELISA-Antikörper

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Beschreibung
<b>Kaninchen</b>			
$\alpha$ -Kaninchen Ig gesamt	Pierce, Illinois, USA	1:1000	HRP-gekoppelt
<b>Maus</b>			
$\alpha$ -Maus Ig gesamt	DAKO, Hamburg	1:2000	HRP-gekoppelt
$\alpha$ -Maus IgG1	Pharmingen, Heidelberg	1:1000	HRP-gekoppelt
$\alpha$ -Maus IgG2a	Pharmingen, Heidelberg	1:1000	HRP-gekoppelt

#### B.4.5.3 Bestimmung hC3d-spezifischer Antikörper

Die Bestimmung von hC3d-spezifischen Antikörpern im Serum erfolgte durch Inkubation der Seren mit membrangebundenem hC3d<sub>3</sub>. Vom Zelllysate oder vom Kulturüberstand *tpa1hC3d<sub>3</sub>*-transfizierter 293T-Zellen wurde 50 µg Gesamtprotein oder 30 µl Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und ein Western Blot durchgeführt (siehe B.3.3.1). Der Blot wurde in einzelne Streifen zerschnitten, wobei jeder Streifen ca. 50 µg Gesamtprotein von hC3d<sub>3</sub> enthielt und einer Auftragungstasche entsprach. Diese Streifen wurden dann für eine Stunde bei RT mit 5% Milchpulver in TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 500 mM NaCl) blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS wurden die Blotstreifen mit den vereinigten Seren der Mausgruppen (jeweils 6 Mäuse) in einer Verdünnung von 1:20 in TBS und den einzelnen Kaninchenserum in einer Verdünnung von 1:80 in TBS für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Färbung erfolgte durch 1:2.000 in TBS verdünnte sekundäre Antikörper anti-Maus AP (Biorad) und anti-Kaninchen AP (DAKO). Die Antikörper-Antigen-Komplexe auf den Membranen wurden über AP-Färbung mit NBT/BCIP (Roche) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) nach Herstellerangaben detektiert.

#### B.4.5.4 Analyse von B-Gedächtniszellen immunisierter Kaninchen

##### B.4.5.4.1 *In vitro*-Restimulation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

B-Gedächtniszellen liegen in Säugetieren in der Regel nur in geringem Maß im Blut vor und differenzieren erst nach Stimulation zu stark antikörpersezernierenden Plasmazellen (Crotty *et al.*, 2004). Um B-Gedächtniszellen zu stimulieren wurde den Kaninchen jeweils 10 ml Blut entnommen und wie in B.2.5.2 beschrieben PBMC isoliert.  $2 \times 10^6$  PBMC wurden pro 24-well-Schale ausgesät und mit Hilfe von IL-2 (10 ng) und SAC (1:5.000) 5 Tage lang bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre stimuliert. Für die Stimulation wurden mehrere Protokolle als Vorlage verwendet: (Corcoran *et al.*, 2004; Crotty *et al.*, 2004; Malaspina *et al.*, 2005; Nanan *et al.*, 2002).

#### B.4.5.4.2 ELISPOT zur Bestimmung der B-Gedächtniszellen

Zur Bestimmung der Anzahl IgG-sezernierender Zellen nach *in vitro*-Restimulation der PBMC mit IL-2 und SAC wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-well-Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100 µl eines 1:1.000 in PBS verdünnten Anti-rabbit IgG *capture*-Antikörpers R96 mit der Konzentration 5 µg/ml (Sigma, Deisenhofen) über Nacht (ÜN) bei 4°C inkubiert. Zur Bestimmung der Anzahl  $\alpha$ -gp120-sezernierenden Zellen wurde eine zweite Platte mit rekombinantem gp140<sub>CN54</sub> der Konzentration 10 µg/ml (Simon Jeffs) beschichtet. Nach dreimaligem, sterilem Waschen mit PBS/ 1% FKS wurde die Platte 6 Stunden bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre mit 200 µl sterilem RPMI/ 10% FKS blockiert. Anschließend wurden je 100 µl einer entsprechenden Verdünnung der stimulierten PBMC (0,5- 5 × 10<sup>5</sup> Zellen pro well) zugegeben und 15 Stunden bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS/ 0,05% Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100 µl einer 1:5.000 in PBS verdünnten Lösung des sekundären, AP-gekoppelten anti-rabbit *detection*-Antikörpers RG16 der Konzentration 2 µg/ml (Sigma) zugegeben und weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde zehnmal gewaschen und die Antikörper-Komplexe durch Zugabe von 50 µl AP-Färbelösung pro well nach Angaben des Herstellers (Roche) 15-30 min inkubiert und die Spots (SFC, *spot forming cell*) nach wiederholtem Waschen mit H<sub>2</sub>O und Trocknung (ÜN, Raumtemperatur) mit Hilfe einer Lupe ausgezählt. Als Vorlage für den ELISPOT diente die Veröffentlichung von Bauer *et al.* (Bauer *et al.*, 2002).

### B.4.6 Bestimmung der zellulären Immunantwort bei Mäusen

#### B.4.6.1 Präparation und Isolierung von Milzzellen immunisierter Mäuse

Zur Entnahme der Milz wurden die Versuchstiere eine Woche nach der letzten Immunisierung durch Genickbruch getötet. Die entnommenen Organe einer Immunisierungsgruppe (bestehend aus sechs Mäusen) wurden in 25 ml Waschpuffer (PBS/ 1% FCS) vereint. Anschließend wurden die Milzen mitsamt der Flüssigkeit in Petrischalen überführt und zur Gewinnung von Einzelzellsuspension mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze in einem Nylonfilter (100 µm Porengröße) zerrieben. Nachfolgend wurden die Zellen in ein 50 ml Gefäß gegeben und pelletiert (300 × g, RT, 5 min). Zur Entfernung der Erythrozyten durch Hämolyse wurden die Zellen in Lysepuffer (5 ml/ Milz) (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7,2) resuspendiert und sofort die Splenozyten pelletiert (300 × g, RT, 5 Minuten). Diese wurden daraufhin in zwei Schritten (300 × g, RT, 5 Minuten, Bremse auf 5) in je 10 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde ein 10 µl-Aliquot der Splenozyten mit 90 µl Trypanblau (0,4% Trypanblau/ PBS) gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zellen wurden mit Kulturmedium auf die jeweilige Arbeitskonzentration (ELISA: 2 × 10<sup>6</sup> Zellen/ ml; ELISPOT

und FACS:  $2 \times 10^7$  Zellen/ ml) verdünnt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank gehalten.

#### B.4.6.2 Kultivierung primärer Splenozyten

Die Zellpopulation (Splenozyten), die aus der Milz immunisierter Mäuse präpariert wurde ( $\sim 1-2 \times 10^8$  Zellen/ Milz), besteht zu einem großen Anteil aus B-Lymphozyten (60–70%), CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (15–20%) sowie Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (10%). Die restlichen Zellen setzen sich aus neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten zusammen. Die isolierten Splenozyten wurden in RPMI-1640-Medium, supplementiert mit 10% inaktiviertem FKS, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml), 20 mM HEPES und 50 µM β-Mercaptoethanol bei einer Temperatur von 37°C und einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Da die primären Zellen ohne Zusatz von Zytokinen, wie z.B. IL-2, innerhalb von 2-3 Tagen absterben, wurden alle Versuche unverzüglich direkt nach der Präparation der primären Zellen angesetzt.

#### B.4.6.3 Verwendete Peptide

Die für die Bestimmung der zellulären Immunantwort verwendeten HIV-1-spezifischen, murinen MHC Klasse I-restringierten Peptide (vgl. Tabelle B.6) wurden von der Firma Biosyntan (Berlin) hergestellt. Die lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-grade DMSO gelöst (10 mM) und bei 4°C gelagert. Das Peptid A9I<sup>p24</sup> (aa197-205) ist bereits als murines Gag p24 zytotoxisches T-Zell (CTL)-Epitop beschrieben worden (Nakamura *et al.*, 1997; Selby *et al.*, 1997). Die Peptide T15V<sup>CN54</sup> und V15V<sup>CN54</sup> (gp120: aa61-75 und aa65-79) stellen murine Env<sub>CN54</sub>-spezifische CTL-Epitope dar (Wild J., unpublizierte Daten).

**Tabelle B.6: Auflistung der verwendeten Peptide**

Bezeichnung	Sequenz
T15V <sup>CN54</sup>	THACVPADPNPQEMV
V15V <sup>CN54</sup>	VPADPNPQEMVLENV
A9I <sup>III B</sup>	AMQMLKETI

#### B.4.6.4 Nachweis zytotoxischer T-Zellen

##### B.4.6.4.1 Quantifizierung $IFN\gamma$ -sezernierender Zellen im ELISPOT-Assay

Zur Bestimmung der Anzahl Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ )-sezernierender Zellen nach *in vitro*-Restimulation der Splenozyten mit spezifischen „recall“-Antigenen wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-well-Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100  $\mu$ l eines 1:1.000 in PBS verdünnten Anti- $IFN\gamma$  capture-Antikörpers R4-6A2 (anti-Maus  $IFN\gamma$ , BD Pharmingen) der Konzentration 5-10  $\mu$ g/ml ÜN bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem, sterilem Waschen mit PBS/ 10% FKS wurde die Platte eine Stunde bei 37°C mit 200  $\mu$ l PBS/ 10% FKS blockiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l einer entsprechenden Verdünnung der Splenozyten ( $1 \times 10^5$  Zellen pro well) und je 100  $\mu$ l des stimulierenden Reagenz (10  $\mu$ M Peptid (2  $\mu$ g) oder 0,1-1  $\mu$ g PMA (1  $\mu$ l/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma, Deisenhofen) und Iono (1  $\mu$ l/ml Ionomycin, Sigma) zugegeben und 24 Stunden bei 37°C und 5%iger  $CO_2$ -Atmosphäre kultiviert. Nach der *in vitro*-Restimulation wurden die Zellen durch sechsmaliges Waschen mit Waschpuffer (PBS/ 0,05% Tween-20) lysiert. Anschließend wurden je 100  $\mu$ l einer auf 1  $\mu$ g/ml in PBS verdünnten Lösung des sekundären, biotinylierten *detection-IFN $\gamma$* -Antikörpers XMG1.2 (Biotin-anti-Maus  $IFN\gamma$ , BD Pharmingen; Verdünnung 1:1.000) zugegeben und weitere 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde zehnmals gewaschen und die Antikörper-Antigen-Komplexe durch Zugabe eines 1:5.000 in Verdünnungspuffer verdünntem Streptavidin-AP-Konjugats (Roche) detektiert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei RT wurde die Platte wieder zehnmals gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 50  $\mu$ l AP-Färbelösung nach Angaben des Herstellers (Roche) 15-30 Minuten inkubiert und die Spots, (SFC, *spot forming cell*) nach wiederholtem Waschen mit  $H_2O$  und Trocknung, (ÜN, Raumtemperatur) mit Hilfe einer Lupe ausgezählt.

##### B.4.6.4.2 Quantifizierung der intrazellulären $IFN\gamma$ -Produktion stimulierter $CD8^+$ -T-Zellen

Zur Bestimmung der  $CD8^+$ - und  $IFN\gamma$ -produzierenden Zellen in der Splenozytenpopulation wurde intrazellulär  $IFN\gamma$  gefärbt. Dazu wurden je 100  $\mu$ l der Milzzellsuspension ( $2 \times 10^7$  Zellen/ ml) pro well in eine 96-well-Zellkulturplatte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Milzzellen je 100  $\mu$ l RPMI-1640 mit 0,2  $\mu$ l Blockierungslösung BFA (Brefeldin A, Sigma) zugegeben. Die Stimulation der Splenozyten erfolgte durch Zugabe von spezifischem Peptid (T15V und V15V, 2  $\mu$ l/ml). Als Negativkontrolle wurde das unspezifische Peptid A9I (2  $\mu$ l/ml) verwendet (Nakamura *et al.*, 1997). Als Positivkontrolle wurden die Splenozyten mit den unspezifischen Stimulationsreagenzien PMA (1  $\mu$ l/ml) und Iono (1  $\mu$ l/ml) aktiviert. Anschließend wurde der Ansatz für 6 Stunden bei 37°C und 5%iger  $CO_2$ -Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Die Platten wurden danach zentrifugiert (300 x g, 5 Minuten, RT), der Überstand verworfen und die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 200  $\mu$ l FACS-Puffer (PBS, 1% FKS, 1 mg/ml  $NaN_3$ ) in eine 96-well-Rundbodenplatte überführt. Um die Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurde je 100  $\mu$ l FACS-

Puffer mit 1  $\mu$ l CD16/32-Antikörper (CD16/32- $\alpha$ -mouse, BD Pharmingen) pro well zu den Splenozyten pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 4°C wurden pro well 10  $\mu$ l einer 1:20 Antikörperverdünnung von CD4-FITC (CD4-FITC- $\alpha$ -mouse, BD Pharmingen) und/oder CD8-APC (CD8a-APC- $\alpha$ -mouse, BD Pharmingen) zugeben und für 25 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer-II (PBS/ 1 mg/ml NaN<sub>3</sub>) wurden je 250  $\mu$ l Cytotfix/Cytoperm (4% PFA, 1% Saponin, Sigma) zugegeben und die Zellen für 20 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200  $\mu$ l Perm/Wash (PBS, 0,1% Saponin, BD Pharmingen) erfolgte die intrazelluläre Färbung mit IFN $\gamma$ -PE- $\alpha$ -mouse (BD Pharmingen). Dazu wurden je 100  $\mu$ l Perm/Wash-Puffer vorgelegt, 10  $\mu$ l einer 1:20 Verdünnung des IFN $\gamma$  PE-gekoppelten  $\alpha$ -mouse-Antikörpers zugegeben und für 25 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit Perm/Wash (2 x 200  $\mu$ l) wurden die Zellen in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die anschließende Analyse auf IFN $\gamma$ -Produktion erfolgte durch *fluorescence activated cell sorting* (FACScalibur, BD Biosciences, Heidelberg).

# C Ergebnisse

---

## C.1 Gesamtkonzept

### C.1.1 Bedeutung von HIV-1 gp120 für die Impfstoffentwicklung

Da sämtliche HIV-1 neutralisierende Antikörper Epitope von gp120 oder gp41 erkennen, sind während einer HIV-Infektion nur Antikörper gegen das Env-Protein von Bedeutung, (Klasse, 2007; Pantophlet & Burton, 2006; Phogat *et al.*, 2007). Antikörper HIV-infizierter Patienten zeigen allerdings nur eine geringe Neutralisationseffizienz gegenüber primären HIV-1-Isolaten (Cham *et al.*, 2006; Crooks *et al.*, 2005) und sind nicht in der Lage, das im Patienten zirkulierende Virus zu neutralisieren (Deeks *et al.*, 2006; Moog *et al.*, 1997; Rodriguez *et al.*, 2007), obwohl diese in hohen Titern vorkommen. Antikörper können folglich bei einer natürlichen Infektion nicht vor HIV schützen, bei einer passiven Immunisierung in Versuchstieren jedoch verhindern Serumantikörper oder ein Gemisch monoklonaler, neutralisierender Env-Antikörper eine HIV-Infektion oder verringern zumindest hohe Virustiter (Baba *et al.*, 2000; Eda *et al.*, 2006; Ferrantelli *et al.*, 2004; Ferrantelli *et al.*, 2007; Mascola, 2002; Mc Cann *et al.*, 2005; Nabel, 2005). Das Vorkommen neutralisierender Antikörper zeigt, dass durch die Induktion dieser oder ähnlicher Antikörper ein effizienter prophylaktischer Impfstoff generiert werden könnte.

### C.1.2 Wahl von hC3d<sub>3</sub> als molekulares Adjuvans

C3d ist das finale Degradationsprodukt der Komplementkomponente C3. Bei der Entwicklung einer normalen Immunantwort kommt es zu einer intensiven Beschichtung des Pathogens mit C3d. Diese Anhäufung von C3d ermöglicht eine Interaktion infektiöser Mikroorganismen mit dem Rezeptor CD21, welche zu einer vermehrten B-Zell-Aktivierung und zu einer verstärkten Antigenaufnahme und –prozessierung führt. C3d verbindet so das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem und kann als natürliches Adjuvans wirken. Diese immunstimulierenden Eigenschaften konnten bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, in denen murines C3d an verschiedene Antigene fusionierten und im Mausmodell überprüften (Bower *et al.*, 2004b; Dempsey *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2003; Mitsuyoshi *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006d). Im Hinblick auf weiterführende Untersuchungen im Menschen wurde in dieser Arbeit humanes C3d gewählt, das in verschiedenen Tiermodellen ausgetestet wurde.

## C.2 Herstellung der kodonoptimierten gp120hC3d<sub>3</sub>-DNA-Fusionskonstrukte

### C.2.1 Design und Herstellung unterschiedlicher gp120-Konstrukte

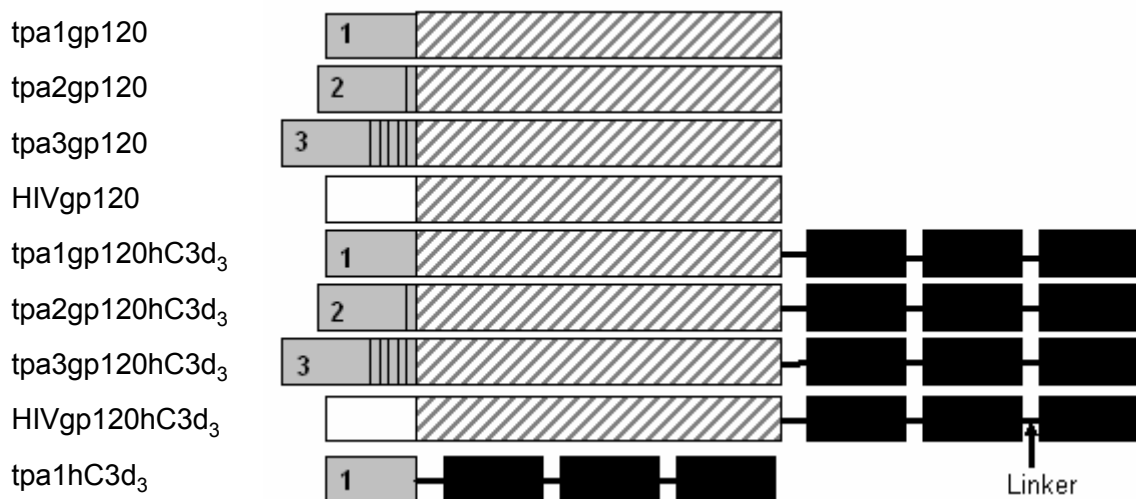
Als Basis für die Herstellung der unterschiedlichen gp120-Konstrukte diente die auf Säugetierkodons optimierte Nukleinsäuresequenz von gp120 des *C-clade* Isolats CN54 (*acc no*: AX149771) (Su *et al.*, 2000). Es wurden gp120-Konstrukte sowohl mit als auch ohne drei synthetisch hergestellte humane C3d Kassetten hergestellt, welche durch eine Multiparameter-Optimierung unterschiedlich stark optimiert wurden um Rekombinationen zu vermeiden. Die Sekretion der Konstrukte erfolgte mittels verschiedener Signalsequenzen, die vor gp120 kloniert wurden. Alle Sequenzen erhielten sowohl ein Startkodon am Beginn der Signalsequenz als auch zwei Stopkodons am Sequenzende um die Translation abubrechen. Eine schematische Übersicht über den modularen Aufbau der Expressionskonstrukte gibt Abbildung C.1.



**Abbildung C.1: Modularer Aufbau der Expressionskonstrukte zur Expression und Sekretion von gp120hC3d<sub>3</sub>.** Die Signalsequenz ist durch eine weiße Box repräsentiert, die Antigensequenz (gp120) durch ein diagonal gestreiftes Feld und die humanen C3d Kassetten werden durch schwarze Boxen dargestellt.

Als Grundkonstrukt wurde das Plasmid pGA2\_ *tpa1hC3d<sub>3</sub>* verwendet. Die Optimierung auf Säugetierkodons der Signalsequenz *tpa* und der durch einen (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>-Linker verbundenen hC3d-Kassetten ist unter Verwendung der Software Geneoptimizer™ durchgeführt worden. Für die Expression in Säugetierzellen wurde die Sequenz *tpa1hC3d<sub>3</sub>* mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *PmeI* aus dem Ursprungsvektor entfernt und in den multiplen Klonierungsbereich (*MCS*) des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1 eingesetzt. Um die hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte auch mit den jeweiligen Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub> zu vergleichen, wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *tpa\_Nhe* und *tpa\_Stop* durch PCR zwei Stopkodons nach dem *MCS* eingeführt und der Bereich der Signalsequenz und des *MCS* amplifiziert. Die neu generierte Sequenz *tpa(MCS)Stop* wurde über *NheI* und *PmeI* ebenfalls in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Desweiteren wurde die kodonoptimierte gp120-Sequenz als Matrize mit den Oligonukleotiden *cenvF1,2,3/ cenvB* für mehrere spezifische PCR-Reaktionen verwendet und die Amplifikate mit Hilfe der Schnittstellen *BsmBI* und *Apal* direkt zwischen die Signalsequenz des *tissue plasminogen activators* (*tpa*) und den drei hC3d-Kassetten beziehungsweise der Stopkodons kloniert. Dabei wurden verschiedene Oligonukleotide (*cenvF1*, *cenvF2*, und *cenvF3*) benutzt, mit denen im ersten Fall keine, im zweiten Fall eine (S) und im dritten Fall fünf (SYQVI) Aminosäuren nach der Spaltstelle der *tpa* Signalsequenz eingeführt werden konnten. So

konnte überprüft werden, ob die erste oder weitere Aminosäuren nach der Spaltstelle einen Einfluss auf die Spalteffizienz und somit auf die Sekretion haben. Die daraus generierten Signalsequenzen sind nach den verwendeten Oligonukleotiden *tpa1*, *tpa2* und *tpa3* benannt. Die Signalsequenz *tpa* wurde aufgrund der hohen Sekretionsrate ausgewählt (Golden *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006b). Darüber hinaus wurde durch PCR eine kodonoptimierte HIV-1 Env-Signalsequenz (*HIV*) synthetisiert, um die Sekretionseffizienz der autologen Signalsequenz mit der von *tpa* zu vergleichen. Diese *HIV*-Signalsequenz wurde über die Schnittstellen *NheI* und *HindIII* mit der von *tpa* in den Vektoren pcDNA3.1\_*tpa1Stop* und pcDNA3.1\_*tpa1hC3d<sub>3</sub>* ausgetauscht und so die Vektoren pcDNA3.1\_*HIVStop* bzw. pcDNA3.1\_*HIVhC3d<sub>3</sub>* generiert. Für diese Vektoren diente das Oligonukleotidpaar *cenvF1\_A/ cenvB* zur Amplifikation von gp120. Das fertige PCR-Fragment wurde anschließend über die Schnittstellen *BsmBI* und *ApaI* in die Vektoren pcDNA3.1\_*HIVStop* und pcDNA3.1\_*HIVhC3d<sub>3</sub>* kloniert. Eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte gibt Abbildung C.2.



**Abbildung C.2: Schema der RNA- und kodonoptimierten gp120-Plasmidkonstrukte.** Detaillierte Beschreibung der Konstrukte im Text. Die Sequenz von gp120 ist als schräg gestreiftes Feld gezeigt, die Signalsequenz von *tpa* ist grau, die von *HIV* weiß dargestellt. Die unterschiedlichen Signalsequenzlängen von *tpa* sind durch 1, 2 und 3 und durch die Länge des Feldes gekennzeichnet. Die drei C3d-Kassetten werden durch drei schwarze Felder repräsentiert; die Sequenz der (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>-Linker durch eine schwarze Linie.

### **C.2.2 Herstellung von gp120-Konstrukten mit einem endogenen Luciferase-Reportersystem**

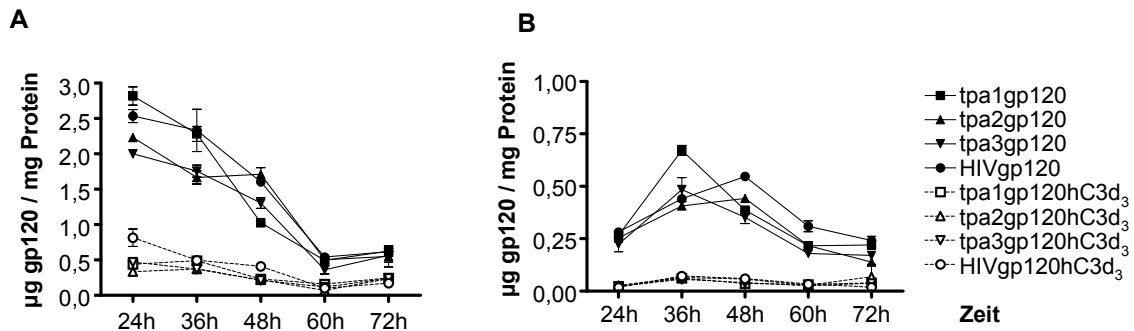
Um die Auswirkung der Plasmidgrößen der Konstrukte auf die Expression eines endogenen Reportergens zu überprüfen, wurden alle verwendeten DNA-Konstrukte mit den Enzymen *NheI* und *PmeI* geschnitten und in den Vektor pcDNA3.1luc ligiert. Dieser Vektor enthält an Stelle des Neomycingens ein *firefly*-Luciferasegen aus dem Vektor pGL2 (Promega) unter dem Einfluss des SV40 Promotors. Diese Plasmidkonstrukte exprimierten konstitutiv unter dem CMV-Promotor die Genkonstrukte (siehe Abbildung C.2) und gleichzeitig Luciferase, die mit Hilfe eines Luciferase-Reporterassays vermessen werden konnte. Eine weitere Konstruktvariante wurde durch Einfügen zweier Stopkodons in das Konstrukt *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* zwischen gp120 und hC3d<sub>3</sub> generiert. Mit dieser Modifikation war es möglich zu testen, ob die Länge des Transkripts die Expression beeinflusst. Zudem konnte bei der transienten Transfektion überprüft werden, ob die Größe des Plasmids entscheidend für die Transfektionseffizienz ist. Das Konstrukt wurde ebenfalls in den Vektor pcDNA3.1luc kloniert und als *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* bezeichnet, wobei S die Lage der beiden Stopkodons bezeichnete.

## **C.3 Bedeutung der C-terminalen hC3d<sub>3</sub>-Fusion für die Expressions- und Sekretionseffizienz von gp120**

### **C.3.1 Erfolgreiche Expression und Sekretion der gp120-Varianten**

#### C.3.1.1 Maximale Expression von gp120 zu einem früheren Zeitpunkt als höchste Sekretion

Zur Bestimmung der optimalen Zeitpunkte zur Entnahme von Zellen und Kulturüberständen wurde ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt. Die Zellen wurden in 6-well Schalen ausgesät und mit 15 µg DNA von *tpa1gp120*, *tpa2gp120*, *tpa3gp120*, *HIVgp120*, *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa2gp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* durch Calciumphosphat (CaP)-Präzipitation transfiziert. Nach 24, 36, 48, 60 und 72 Stunden wurden Zellen und Kulturüberstände der Doppelansätze entnommen und durch einen Env-spezifischen ELISA auf Expression und Sekretion überprüft (Abbildung C.3).



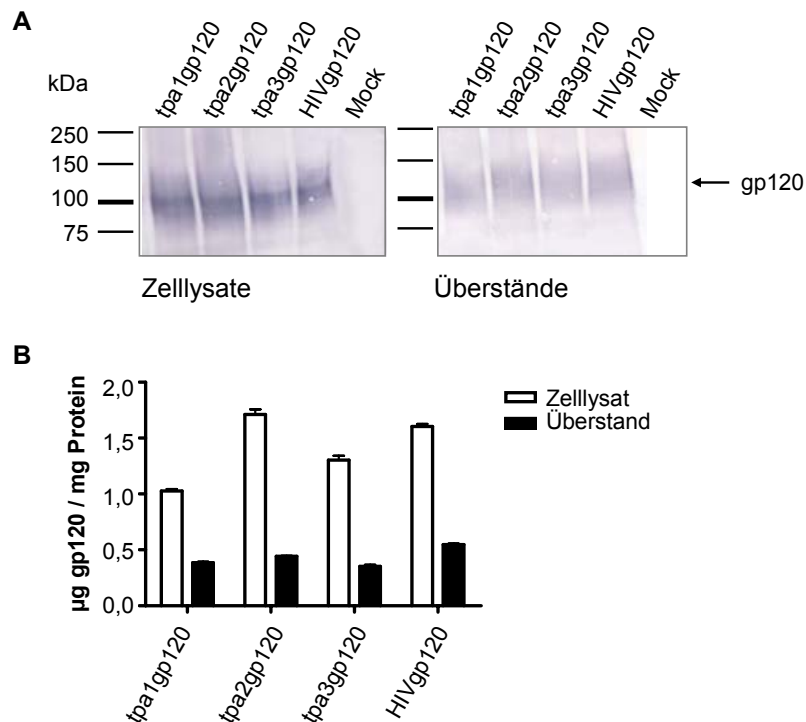
**Abbildung C.3:** Zeitverlaufsexperiment nach CaP-Transfektion von *tpa1gp120*, *tpa2gp120*, *tpa3gp120*, *HIVgp120*, *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa2gp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>*, und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*. Zellen wurden in Doppelansätzen mit je 15 µg DNA pro 6-well Schale mittels CaP-Präzipitation transfiziert und nach 24 h, 36 h, 48 h, 60 h und 72 h samt Zellüberständen geerntet. Die Quantifizierung von gp120 in den Zelllysaten und Kulturüberständen erfolgte durch einen gp120-spezifischen ELISA mit dem Antikörper ARP422. In (A) Auftrag der gp120-Mengen, die in den Zelllysaten gemessen wurden, in (B) die jeweils gemessenen Mengen in den Überständen. Auf der Y-Achse ist die in µg angegebene Menge an exprimiertem gp120 dargestellt, bezogen auf ein mg Gesamtprotein. Der Gesamtproteingehalt wurde durch einen Bradfordassay bestimmt.

In der Abbildung C.3 ist zu erkennen, dass die stärkste Expression zwischen 24 und 36 Stunden nach Transfektion stattfand und die Sekretion der Proteine nach ca. 48 Stunden ihren Höhepunkt erreichte. Dieses Ergebnis wurde bestätigt durch eine gp120-spezifische Western Blot-Analyse der Zelllysate und Zellüberstände (Daten nicht gezeigt). Da die Zellen nicht vor den Kulturüberständen geerntet werden konnten, wurden die Zellen zusammen mit den Zellüberständen 48 Stunden nach Transfektion abgenommen und aufgeschlossen.

### C.3.1.2 *tpa*- und *HIV*-Signalsequenz ermöglichen die gp120-Sekretion in gleichem Maße

Die Auswahl der Signalsequenz des *tissue plasminogen activators* (*tpa*) erfolgte aufgrund der in der Literatur beschriebenen effizienten Antigensekretion (Golden *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006b). Um zu überprüfen, ob die Spaltstelle der Signalsequenz durch nachfolgende endogene Aminosäuren beeinflusst wird, wurden drei verschiedene *tpa*-Sequenzen überprüft. Bei der Sequenz *tpa1* wurde keine, bei *tpa2* eine (S) und bei *tpa3* fünf (SYQVI) Aminosäure(n) zwischen Spaltstelle und gp120 eingefügt. Diese Aminosäuren sind der ursprünglichen Gensequenz des *tissue plasminogen activators* (*acc no*: EAW63234) entnommen worden. Eine Studie von Berg und Grinnell legte dar, dass der Austausch von Aminosäuren vor der Spaltstelle einen Einfluss auf die Spaltung und auf die Sekretion hat (Berg & Grinnell, 1991). In vorliegender Arbeit sollte überprüft werden, ob zusätzliche Aminosäuren nach der Spaltstelle einen Effekt auf die Sekretion der Konstrukte haben. Außer der *tpa*-Signalsequenz wurde die synthetisch generierte Signalsequenz von HIV-1 Env (*HIV*) verwendet. In mehreren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass *HIV* die Spaltung und somit die Sekretion von fusionierten Proteinen verlangsamt (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006b). Durch den Vergleich der *tpa*- und der *HIV*-Signalsequenz, die beide an den Kodongebrauch von Säugern

angepasst wurden, sollte nun untersucht werden, ob ein Unterschied bei der Sekretionseffizienz besteht. Dazu wurde die humane Zelllinie 293T mit den Plasmiden *tpa1gp120*, *tpa2gp120*, *tpa3gp120* und *HIVgp120* transfiziert. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zelllysate und die Kulturüberstände präpariert und die exprimierte gp120-Menge mittels Immunoblot-Analysen unter Verwendung Env-spezifischer Antikörper sowie quantitativ im ELISA bestimmt (siehe Abbildung C.4).

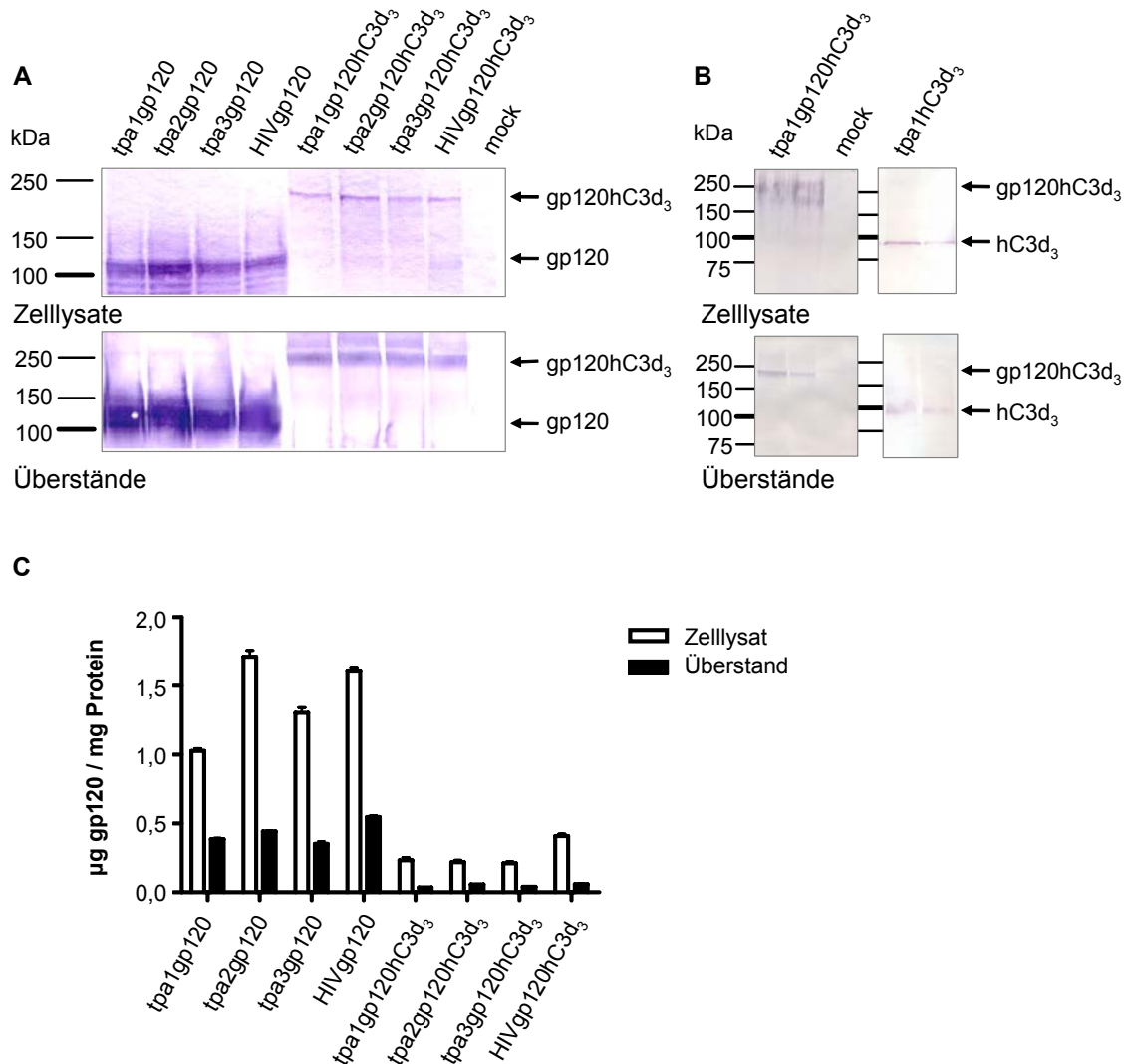


**Abbildung C.4: Vergleich der Expression und Sekretion von gp120 bei Verwendung von verschiedenen Signalsequenzen.** Jeweils 15 µg der angegebenen Konstrukte wurden in 293T Zellen durch CaP transient transfiziert, Zellen und Überstände nach 48 h geerntet und präpariert. **(A)** Fünfzig Mikrogramm Gesamtprotein der Zelllysate und 30 µl der zellfreien Überstände wurden auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die Detektion von gp120 erfolgte durch einen Env-spezifischen polyklonalen Antikörper (ARP422). Pro Konstrukt wurde eine repräsentative Transfektion aufgetragen. **(B)** Die Quantifizierung der Konstrukte wurde durch einen gp120-spezifischen ELISA erreicht, der ebenfalls mit dem Antikörper ARP422 durchgeführt wurde. Es erfolgte die Vermessung von jeweils zwei voneinander unabhängigen Transfektionen.

Wie in Abbildung C.4 dargestellt, konnte festgestellt werden, dass sich weder die Expression noch die Sekretion von gp120 bei Verwendung der verschiedenen Signalsequenzen wesentlich unterscheiden. Aufgrund der Glykosylierung von gp120 stellen sich die gp120-spezifischen Banden im Zellkulturüberstand etwas verschwommen dar. Weitere Transfektionen der verschiedenen gp120-Konstrukte mit und ohne fusioniertem hC3d<sub>3</sub> bestätigten diesen Befund. Durch Vergleich der Varianten von *tpa* und *HIV* konnte gezeigt werden, dass weder Anfügen endogener Aminosäuren an *tpa*, noch die Verwendung der HIV-1-Env-Signalsequenz einen Einfluss auf die Sekretion von gp120 hatte.

### C.3.1.3 Erniedrigung der Expression und Sekretion von gp120 nach hC3d<sub>3</sub>-Fusion

Im Zeitverlaufsexperiment war bereits ersichtlich, dass sowohl Expression als auch Sekretion von hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten niedriger waren als von gp120-Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub>. Um dies genauer zu überprüfen, wurden mehrere CaP-Transfektionen durchgeführt und die transiente gp120-Expression und Sekretion durch Western Blot-Analyse und einem Env-spezifischen ELISA analysiert (siehe Abbildung C.5).

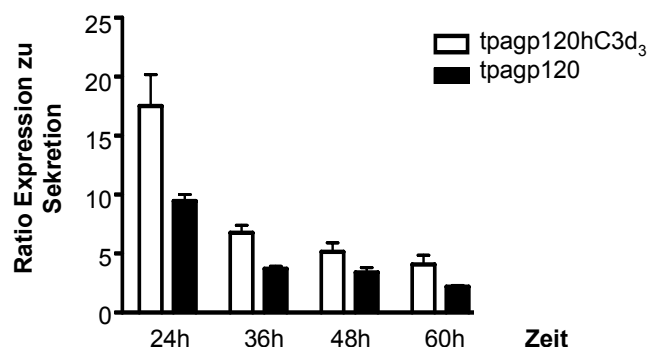


**Abbildung C.5: Expression und Sekretion von gp120 und gp120hC3d<sub>3</sub>.** 293T-Zellen wurden mit 15 µg der angegebenen Plasmid-DNA transient transfiziert und Zellen und Kulturüberstände nach 48 h geerntet. Als Kontrolle wurde der Vektor pcDNA3.1 verwendet (mock). Fünfzig Mikrogramm des Gesamtproteins der Zelllysate und 30 Mikroliter der zellfreien Überstände wurden auf ein 7,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Pro Konstrukt wurde eine repräsentative Transfektion aufgetragen. **(A)** Die Expression und Sekretion von gp120 wurde durch eine Western Blot Analyse mittels eines Env-spezifischen polyklonalen Antikörpers (ARP422) verifiziert. **(B)** Detektion der exprimierten gp120hC3d<sub>3</sub>- und hC3d<sub>3</sub>-Proteine mit einem hC3d-spezifischen Antikörper (ab17453). **(C)** Für eine genaue Quantifizierung der Expression von gp120 wurden die Zelllysate und Überstände in einem Env-spezifischen ELISA eingesetzt, der mit dem Antikörper ARP422 durchgeführt wurde. Es erfolgte die Vermessung von jeweils zwei voneinander unabhängigen Transfektionen.

Nach Transfektion der verschiedenen gp120-kodierenden Expressionsvektoren konnten durch die ELISA- und Western Blot-Analysen deutliche Unterschiede in der Expression und Sekretion von gp120 und gp120hC3d<sub>3</sub> festgestellt werden. Es zeigte sich, dass die Proteinmengen der nicht fusionierten Genprodukte stets höher waren als die der gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte. Die Menge an intrazellulärem gp120 war, verglichen mit den Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub>, in mit hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten transfizierten Zellen um durchschnittlich 70-80% erniedrigt. Die Fusion von hC3d<sub>3</sub> führte somit zu einer geringeren Expression und Sekretion von gp120 nach transients Transfektion in 293T-Zellen.

#### C.3.1.4 Erhöhte Sekretion von gp120 im Vergleich zu gp120hC3d<sub>3</sub>

Die auffällig niedrigen Expressions- und Sekretionsraten der hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte wiesen daraufhin, dass möglicherweise das Verhältnis der Expression gegenüber der Sekretion bei diesen Konstrukten verändert war. Für die Berechnung des Verhältnisses der Expression zur Sekretion von gp120hC3d<sub>3</sub> und gp120 wurden gp120-spezifische ELISA-Daten von jeweils zwei unabhängigen Transfektionsexperimenten verwendet. Da sich die Expressions- und Sekretionsraten der verschiedenen *tpa*-Signalsequenzen (*tpa1*, *tpa2* und *tpa3*) nicht unterschieden (siehe C.3.1.2), wurden für den Vergleich alle *tpa* Konstrukte für die Kalkulation verwendet. Als Berechnungsgrundlage dienten folglich die Ergebnisse sechs voneinander unabhängiger Transfektionsversuche. Für den Vergleich der Ratio von Expression zu Sekretion wurde ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt. Die Transfektionen erfolgten in 293T-Zellen. Nach 24, 36, 48 und 60 Stunden wurden Zellen und Kulturüberstände geerntet und aufbereitet. Nach Quantifizierung der exprimierten gp120-Menge in einem Env-spezifischen ELISA wurden die Expressions- und Sekretionsmengen jedes Abnahmezeitpunkts jeweils auf den an diesem Abnahmezeitpunkt festgestellten Gesamtproteingehalt bezogen, und anschließend wurde die Expressions- durch die Sekretionsrate geteilt. Das so berechnete Verhältnis wurde graphisch über die Zeit dargestellt (Abbildung C.6).



**Abbildung C.6: Verhältnis von Expression zu Sekretion bei gp120 und gp120hC3d<sub>3</sub> im Zeitverlauf.** Die Verhältnisse der Expressions- zu den Sekretionsraten beziehen sich auf den jeweiligen Gesamtproteingehalt. Die Zeitachse gibt den Entnahmezeitpunkt nach Transfektion an. Detaillierte Beschreibung im Text.

Das Verhältnis von Expression zu Sekretion ist bei den gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten zu allen Zeitpunkten höher als bei den gp120-Konstrukten. Die Sekretion der Fusionskonstrukte ist demnach gegenüber den gp120-Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub> deutlich verlangsamt. Ursache der verringerten Sekretionsrate können die Länge der Proteine, die Stabilität der RNA, aber unter Umständen auch fehlende Faktoren bei der Translation sein.

### **C.3.2 gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte verringern die Expression eines endogenen Luciferasereportergens**

Um zu überprüfen, ob die Expression der gp120/ gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte unabhängig von der Transfektionseffizienz der einzelnen Konstrukte ist, wurden alle Konstrukte in Luciferasereporterplasmide umkloniert. Die gp120-Konstrukte wurden wie die in C.2.1 beschriebenen pcDNA3.1-Konstrukte unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt. Das *firefly*-Luciferasegen von Promega, welches sich auf dem gleichen Vektor befand, wurde unter die Kontrolle eines SV40-Promotors gestellt. Als Positivkontrolle diente das Luciferaseplasmid ohne eine zusätzliche Gensequenz. Die Normalisierung der Transfektionen sollte anhand der Luciferaseexpressionsrate erfolgen, da davon ausgegangen wurde, dass die Höhe der Luciferaseexpression bei gleicher Transfektionseffizienz in jeder Zelle gleich ist. In dieser Studie wurde die *firefly*-Luciferase des Vektors pGL2 von Promega verwendet, da diese eine gute und lang anhaltende Expression liefert (McNabb *et al.*, 2005).

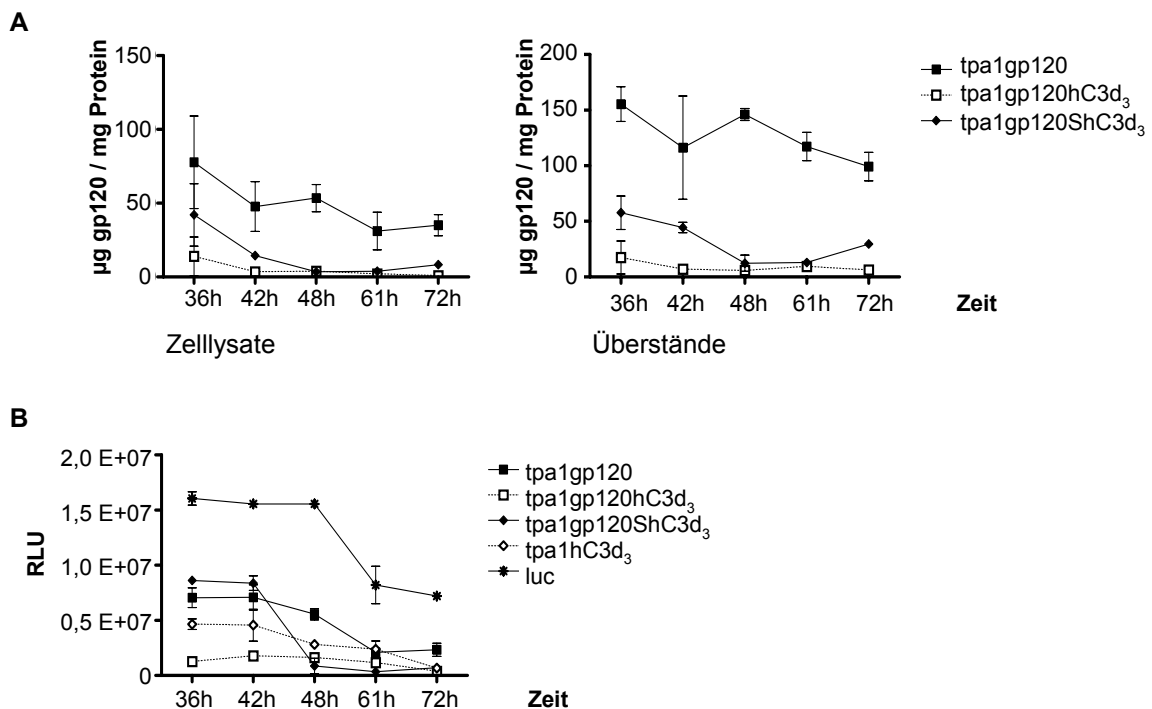
#### C.3.2.1 Herstellung von tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>

Um festzustellen, inwieweit die Größe der gp120-Expressionskonstrukte einen Einfluss auf die Expression und die Sekretion von gp120 beziehungsweise gp120hC3d<sub>3</sub> ausübt, wurde das neue Konstrukt *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* generiert. Hierfür wurden zwei Stopkodons zwischen gp120 und der ersten hC3d Kasette des bisher verwendeten Plasmids *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* eingefügt. Dieses Konstrukt wurde schließlich über die Restriktionsschnittstellen *NheI* und *PmeI* in den Vektor pcDNA3.1luc ligiert. Das Einfügen der beiden Translationsstopkodons veränderte die Größe des Plasmids nicht, und dementsprechend sollte sowohl die Länge des mRNA-Transkripts als auch die RNA-Stabilität in etwa gleich bleiben. Folglich beziehen sich alle Expressions- und Sekretionsunterschiede entweder auf die Transfektionseffizienz, auf die Translation oder die Sekretion.

#### C.3.2.2 Maximale Expression von gp120 zu einem früheren Zeitpunkt als höchste Sekretion

Ein Zeitverlaufexperiment diente der Bestimmung der optimalen Zeitpunkte zur Entnahme von Zellen und Kulturüberständen nach transientscher Transfektion der Luciferasekonstrukte. Die Zellen wurden in 6-well Schalen ausgesät und durch CaP-Präzipitation transfiziert. Hierzu wurden 15 µg DNA von *luc-tpa1gp120*, *luc-tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*, *luc-tpa1hC3d<sub>3</sub>* und Vektor pcDNA3.1luc (luc) verwendet. Nach 36, 42,

48, 60 und 72 Stunden wurden Zellen und Kulturüberstände der Doppelansätze entnommen und mittels Env-spezifischem ELISA auf Expression und Sekretion überprüft. In Abbildung C.7A ist zu erkennen, dass die stärkste Expression 36 Stunden nach der Transfektion nachweisbar war und die Sekretion der Proteine zwischen 36 und 48 Stunden ihren Höhepunkt erreichte. Einzig bei dem Konstrukt *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* war die Proteinsekretion bereits nach 48 Stunden stark reduziert. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu den vorher gewonnenen Expressions- und Sekretionsergebnissen zu gewährleisten, wurden die Zellen zusammen mit den Zellüberständen 48 Stunden nach Transfektion abgenommen.



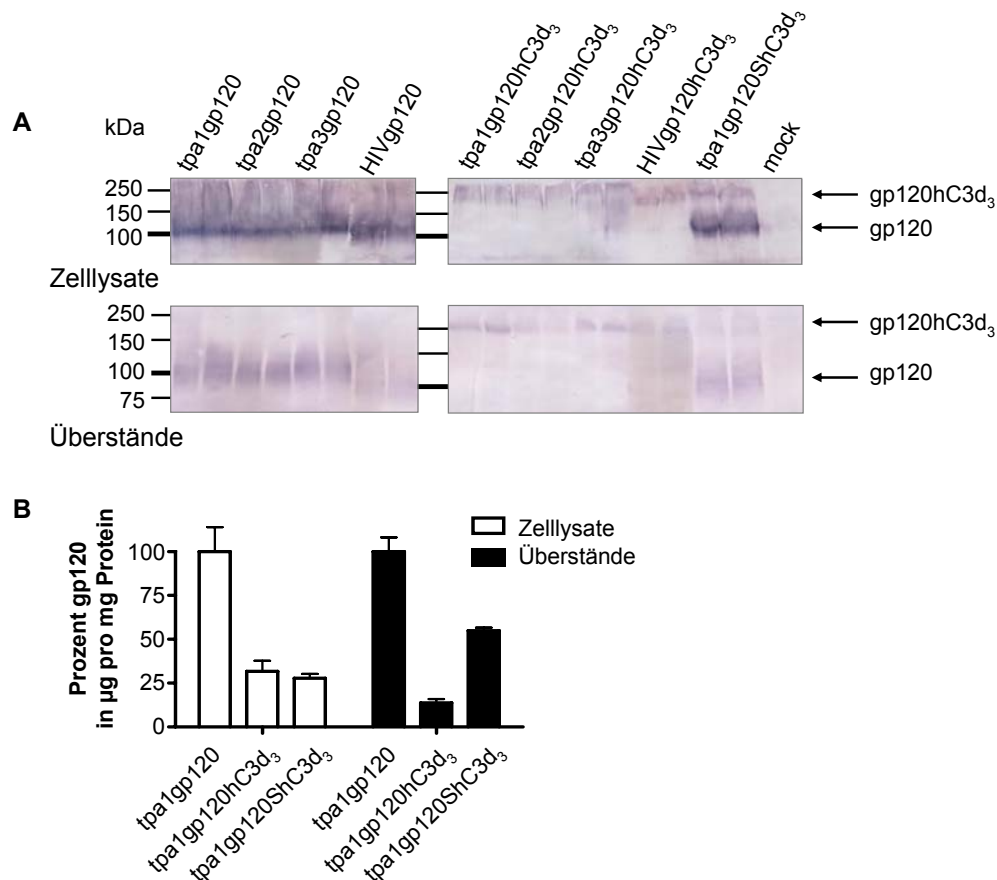
**Abbildung C.7: Zeitverlaufsexperiment nach CaP-Transfektion von *tpa1gp120*, *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*, *tpa1hC3d<sub>3</sub>* und Vektor *luc*.** (A) Quantifizierung der gp120-Menge der angegebenen Konstrukte im Zeitverlauf mittels eines Env-spezifischen ELISAs, der mit einem monoklonalen  $\alpha$ -gp120-Antikörper (1006-15D) durchgeführt wurde. (B) Messung der Luciferaseaktivität der Zellysate nach Zugabe des Substrats Luciferin in relativen Lichteinheiten (RLU). Daten wurden von jeweils zwei voneinander unabhängigen Transfektionen gewonnen.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen aufgeschlossen und je 50 µg Gesamtprotein für die Untersuchung eingesetzt. Die Luciferaseexpression aller transfizierten Konstrukte wurde nach Zugabe des Substrats Luciferin in relativen Lichteinheiten (RLU) in einem Luminometer bestimmt. Abbildung C.7B zeigt die Luciferaseexpression zu verschiedenen Entnahmezeitpunkten. Dabei war die Luciferaseaktivität der Konstrukte, die gp120 exprimierten, vier- bis fünffach höher, als die der gp120hC3d<sub>3</sub>-exprimierenden Plasmide. Das Konstrukt *luc-tpa1hC3d<sub>3</sub>* wies Expressionswerte auf, die zwischen den Werten von *luc-tpa1gp120* und *luc-tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* lagen. Bei *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* hingegen ergab sich zunächst eine hohe Luciferaseaktivität, die schließlich noch unter den Wert von *luc-tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* abfiel. Die Luciferaseexpression

des Vektors luc war ungefähr doppelt so hoch wie die der am höchsten exprimierenden gp120-Plasmide. Die Luciferaseaktivität aller Konstrukte war 36, 42 und 48 Stunden *post transfectionem* konstant. Eine Ausnahme bildete allerdings das Konstrukt luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*, dessen Luciferaseaktivität nach 42 Stunden einen deutlichen Abfall verzeichnete und sich nach 48 Stunden auf ein Fünftel des ursprünglichen Wertes verringerte. Einundsechzig Stunden nach transienter Transfektion reduzierte sich die Luciferaseexpression aller Konstrukte deutlich, und fiel nach 72 Stunden erneut stark ab. Die unterschiedliche Luciferaseexpression der Konstrukte legt nahe, dass die Größe der Plasmide nur einen geringen Einfluss auf die Expression hat. Die Luciferaseaktivität des langen Konstrukts luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* war schließlich ähnlich stark, wie die des kürzeren Konstrukts luc-*tpa1gp120*. Auffällig war der rapide Expressionsrückgang 48 Stunden nach Transfektion von luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*. Dieser könnte auf eine geringere RNA-Stabilität des längeren Konstrukts zurückzuführen sein. Der negative Einfluss der hC3d<sub>3</sub>-Fusion auf die Expression (siehe Abbildung C.5) bestätigte sich bei der Vermessung der Luciferaseaktivität. Die Transkription des Luciferasegens könnte aufgrund der Konkurrenz zwischen dem *luciferase*-Gen und den langen repetitiven hC3d-Sequenzen um die Transkriptions- oder Translationsfaktoren verlangsamt sein.

#### C.3.2.3 Niedrigere Expression und Sekretion von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteinen

Die Verringerung der gp120-Expression und -Sekretion von *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* gegenüber *tpa1gp120* konnte wie erwartet in den neu klonierten Luciferasekonstrukten luc-*tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* und luc-*tpa1gp120* bestätigt werden. Die transiente Transfektion der humanen Zelllinie 293T erfolgte mit den Plasmiden luc-*tpa1gp120*, luc-*tpa2gp120*, luc-*tpa3gp120*, luc-*HIVgp120* sowie luc-*tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*, luc-*tpa2gp120hC3d<sub>3</sub>*, luc-*tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>*, luc-*HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*, luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* sowie dem Vektor pcDNA3.1 (*mock*). Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zellysate und die Kulturüberstände präpariert und gp120 mittels Immunoblot-Analysen unter Verwendung Env-spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die gp120-Proteinmenge wurde im ELISA quantitativ bestimmt (siehe Abbildung C.8).



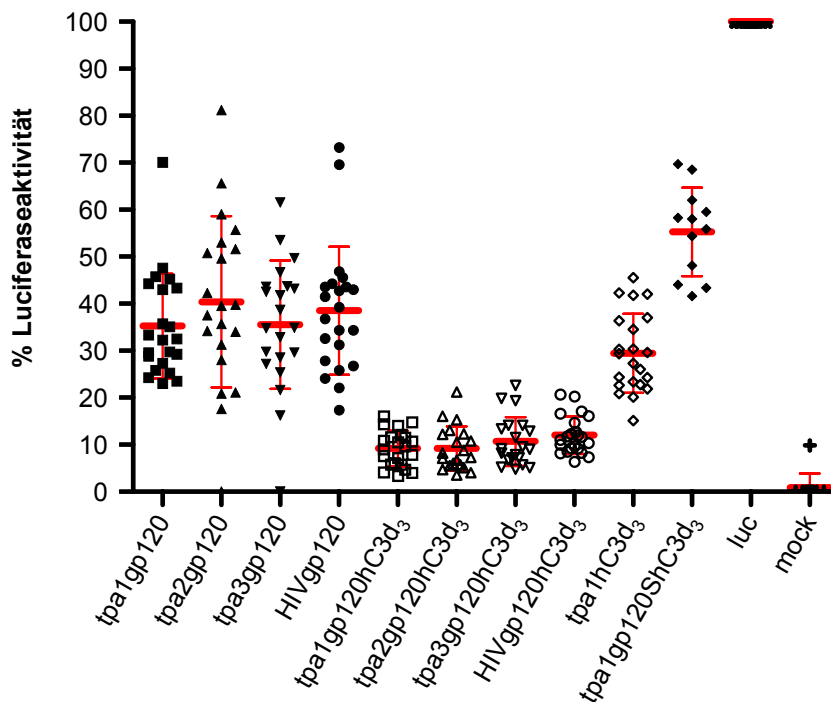
**Abbildung C.8: Expression und Sekretion der gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte im Vektor pcDNA3.1luc (A)** 293T-Zellen wurden mit 15 µg der angegebenen Plasmid DNA transient transfiziert und Zellen und Kulturüberstände nach 48 h abgenommen. Als Negativkontrolle diente der Vektor pcDNA3.1luc (mock). Fünfzig Mikrogramm Gesamtprotein der Zelllysate und 30 µl der zellfreien Überstände wurden auf ein 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Western Blot-Analyse mit einem Env-spezifischen polyklonalen Antikörper (ARP422) detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben. Pro Konstrukt sind zwei unabhängige repräsentative Transfektionen aufgetragen. **(B)** Für eine genaue Quantifizierung der Expression von luc-tpa1gp120, luc-tpa1gp120hC3d<sub>3</sub> und luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub> wurden Zelllysate und Überstände in einen ELISA eingesetzt. Die Env-spezifische Detektion erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (1006-15D). Es wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Transfektionen vermessen.

Die Expression und Sekretion von gp120 war in luc-tpa1gp120 transfizierten Zellen ca. 3-4 fach höher als in Zellen, die mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Luciferasekonstrukten transfiziert wurden. Das entspricht den mit pcDNA3.1-Plasmiden erzielten Ergebnissen (siehe C.3.1.3). Das neu klonierte Konstrukt luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub> zeigt in der Western Blot-Analyse (Abbildung C.8A) eine ähnlich gute Expression wie luc-tpa1gp120, allerdings stehen dem die niedrigen gp120-Expressionswerte gegenüber, die der ELISA ergab (Abbildung C.8B). Im Western Blot waren in der Spur von luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub> deutlich zusätzliche Banden bei 240 kDa zu erkennen. Diese weisen darauf hin, dass trotz der beiden nach der gp120-Sequenz eingefügten Stopkodons auch Durchleseproteine produziert wurden. Es ist möglich, dass die reduzierte gp120-Expression von luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub> durch die Länge des mRNA-Transkripts oder einer verringerten Stabilität der RNA bedingt war. Denkbar ist auch, dass bestimmte Translationsfaktoren

bei der Faltung und Ausschleusung der Proteine limitierend wirkten. Nichtsdestotrotz konnte festgestellt werden, dass die Sekretion des Stopkonstrukts gp120ShC3d<sub>3</sub> weitaus effektiver war, als die von gp120hC3d<sub>3</sub>. Allerdings wurde die Sekretionsrate von luc-*tpa1gp120* nicht erreicht. Möglicherweise führten die in der Western Blot-Analyse festgestellten Durchleseproteine zur Reduktion der Translationsrate.

#### C.3.2.4 gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte führen zu einer verringerten Expression des endogenen Luciferasereportergens

In luc-*tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* transfizierten Zellen wurden nicht nur geringere Expressions- und Sekretionsraten von gp120 festgestellt, sondern auch eine reduzierte Luciferaseexpression. Im verwendeten Reportersystem kann die Luciferaseaktivität direkt proportional zur Menge an Luciferase in den Zellen angenommen werden. Um die verschiedenen Transfektionen vergleichen zu können, wurde der Wert der Luciferaseaktivität des Vektors pcDNA3.1luc (luc) als 100% definiert und alle anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt (siehe Abbildung C.9).



**Abbildung C.9: Einfluss der gp120-Konstrukte auf die Expression eines endogenen Luciferaseregens.** 293T-Zellen wurden mit 15 µg der angegebenen Plasmid-DNA transient transfiziert und nach 48 h geerntet. Fünzig Mikrogramm Gesamtprotein wurden verwendet, um die Luciferaseaktivität in den Zelllysaten zu messen. Der Wert der Luciferaseaktivität des Vektors pcDNA3.1luc (luc) wurde als 100% definiert und alle anderen Werte ins Verhältnis dazu gesetzt. Als Negativkontrolle wurde Vektor pcDNA3.1 (mock) verwendet. Jede Transfektion ist durch ein Symbol repräsentiert. Mittelwert und Standardabweichung sind durch rote Linien gekennzeichnet.

Bei der Auswertung der endogenen Luciferaseexpression zeigte sich ein direkt proportionaler Zusammenhang mit der Expressionsrate der gp120-Konstrukte (siehe Abbildung C.9). Die Luciferaseexpression von Plasmiden, die gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte kodierten, war um 75% niedriger, als die von gp120-kodierenden Plasmiden. Dieses Phänomen ist erklärbar durch die Konkurrenz um Transkriptions- und Translationsfaktoren, die bei größeren Konstrukten wie gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionen stärker ist. Die Länge der Konstrukte spielte hierbei insofern eine Rolle, da sie ausschlaggebend für die Menge an gebundenen Faktoren ist (siehe Tabelle C.1). Die Gene standen unter der Kontrolle unterschiedlicher konstitutiver Promotoren (gp120-Konstrukte unter dem Einfluss des CMV-Promotors und Luciferase unter SV40) und sollten daher keiner Promotorkonkurrenz unterliegen. Aufgrund der Verwendung der gleichen RNA-Polymerase II und überwiegend gleicher Transkriptionsfaktoren könnte es aber trotzdem zur gegenseitigen Beeinflussung der Expressionsrate kommen (Schambach *et al.*, 2006). Erstaunlicherweise wurden bei Transfektion von luc-*tpa1hC3d<sub>3</sub>* Luciferaseaktivitäten von ca. 30% gemessen. Verglichen mit der durchschnittlichen Aktivität von 10% nach Transfektion der gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte ist zu vermuten, dass die Länge des Konstrukts bei der Konkurrenz um Transkriptions- oder Translationsfaktoren eine Rolle spielt.

Die Sequenzlänge des Luciferasegens entspricht in etwa den Sequenzlängen der gp120-Konstrukte. Die Konkurrenz um die Transkriptions- und Translationsfaktoren ist daher in etwa gleich. Demzufolge hätte die Luciferaseaktivität nach Transfektion der gp120-Luciferasekonstrukte bei 50% der maximalen Expression liegen sollen. Allerdings lag diese nur bei 40%. Ein Grund für die geringere Aktivität könnte die fehlende Kodonoptimierung des Luciferasegens sein, die zu einer verminderten Translation des Luciferasetranskripts im Vergleich zu den gp120-Konstrukten führt.

Nach Transfektion von luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* wurde eine Luciferaseaktivität von ca. 50% gemessen. Dieser Wert übertraf sogar die Luciferaseexpression der transfizierten gp120-Konstrukte. Die Sequenzlänge und die Länge des mRNA-Transkripts von *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* entspricht der von *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*. Dies weist darauf hin, dass die Konkurrenz um die Transkriptionsfaktoren keinen Einfluss auf die nachfolgende Expression hatte. Neben geringerer mRNA-Stabilität könnten auch die Konkurrenz um Translationsfaktoren oder Sekretionshemmnisse Gründe für die verminderte Expression des längeren Konstrukts *tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* sein. Die erhöhte Luciferaseaktivität bei luc-*tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* ist nur schwer erklärbar, da eigentlich eine Aktivität von 40% oder weniger zu erwarten wäre. Denn für die Durchleseproteine werden mehr Translationsfaktoren gebraucht und stehen somit nicht mehr für die Luciferaseexpression zur Verfügung.

Tabelle C.1: Längenvergleich der verwendeten DNA-Sequenzen

DNA-Sequenz vom Startkodon bis zum letzten Stopkodon	Länge in bp
tpa1hC3d <sub>3</sub>	2932
tpa1gp120hC3d <sub>3</sub> , tpa2gp120hC3d <sub>3</sub> , tpa2gp120hC3d <sub>3</sub>	4329 (tpa1), 4332 (tpa2), 4344 (tpa3)
HIVgp120hC3d <sub>3</sub>	4311
tpa1gp120, tpa2gp120, tpa3gp120	1551 (tpa1), 1554 (tpa2), 1566 (tpa3)
HIVgp120	1533
tpa1gp120ShC3d <sub>3</sub>	1551 (1.Stop), 4335 (2.Stop)
luc	1653

### C.3.3 Zusammenfassung

Alle gp120-Konstrukte zeigten nach transienter Transfektion eine gute Expression und Sekretion. Die Sekretion von gp120 und gp120hC3d<sub>3</sub> wurde durch die Verwendung verschiedener Signalsequenzen (*tpa1*, *tpa2*, *tpa3*, *HIV*) nicht beeinflusst. Es konnte beobachtet werden, dass sowohl Expressions-, als auch Sekretionsraten der gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte geringer waren als die der gp120-Konstrukte.

Alle Konstrukte wurden daraufhin in einen Luciferasereportervektor (*luc*) kloniert, um herauszufinden, ob die gp120- beziehungsweise gp120hC3d<sub>3</sub>-Sequenzen Einfluss auf die Expression eines endogenen Luciferasegens haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Länge des translatierten Bereichs der gp120-Konstrukte umgekehrt proportional zur Luciferaseaktivität in den Zellen und damit zur Luciferaseexpression war. Um sicherzustellen, ob die Sequenzlänge einen Einfluss auf die Transfektionseffizienz und folglich auf die Expression oder Sekretion hat, wurde das Konstrukt *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* kloniert. Damit konnte gezeigt werden, dass weder die Plasmidgröße, noch die Länge der mRNA die Sekretionsrate beeinflusst, es scheint vielmehr die Konkurrenz um Translationsfaktoren und die nachfolgende Sekretion problematisch zu sein.

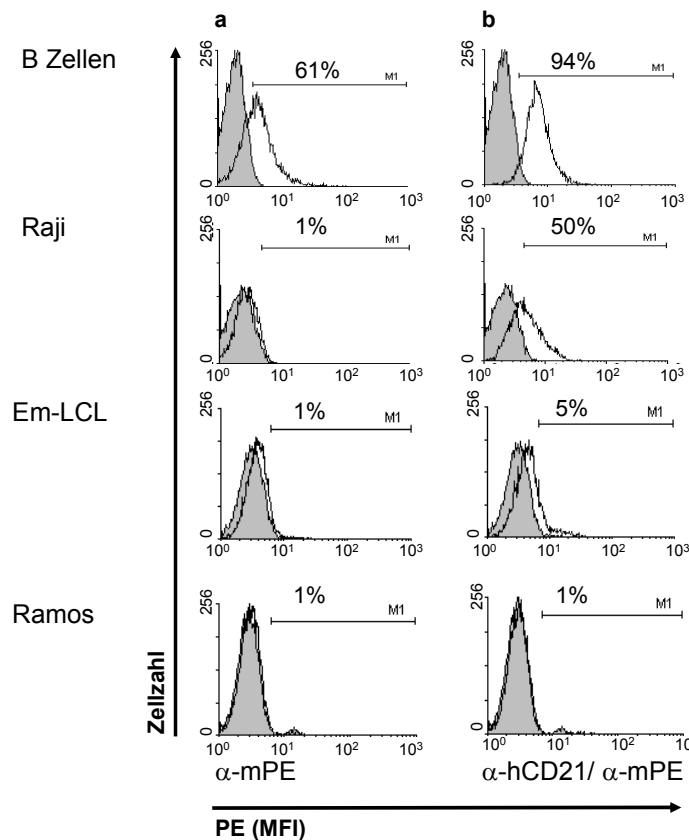
Im nächsten Schritt musste gezeigt werden, dass die an gp120 fusionierte immunstimulatorische Komponente hC3d<sub>3</sub> ihren Rezeptor CD21 auf B-Zellen binden kann, da es nur bei erfolgter Bindung zu einer Senkung des BCR-Signalschwellenwerts sowie zu einer verstärkten B-Zell-Aktivierung kommt (siehe A.2.1.1).

## **C.4 Nachweis der Bindung von hC3d an den Rezeptor CD21 auf humanen B-Zellen**

Bei Interaktion von hC3d mit dem Rezeptor CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen kommt es zu einer beschleunigten B-Zell-Aktivierung (siehe A.2.1.1). Diese Bindung kann nur bei funktioneller Faltung von hC3d stattfinden. Die verwendeten *Linker* müssen dabei den drei miteinander verknüpften hC3d-Proteinen ausreichend Bewegungsspielraum bieten, damit ein ungehinderter Zugang zu den Bindungsstellen gewährleistet wird. Um zu überprüfen, ob die exprimierten gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte an den Rezeptor CD21 auf B-Zellen binden können, wurden verschiedene FACS-Analysen durchgeführt.

### **C.4.1 Stimulation von B-Zellen und B-Zellklonen hat keinen Einfluss auf die Expression von CD21**

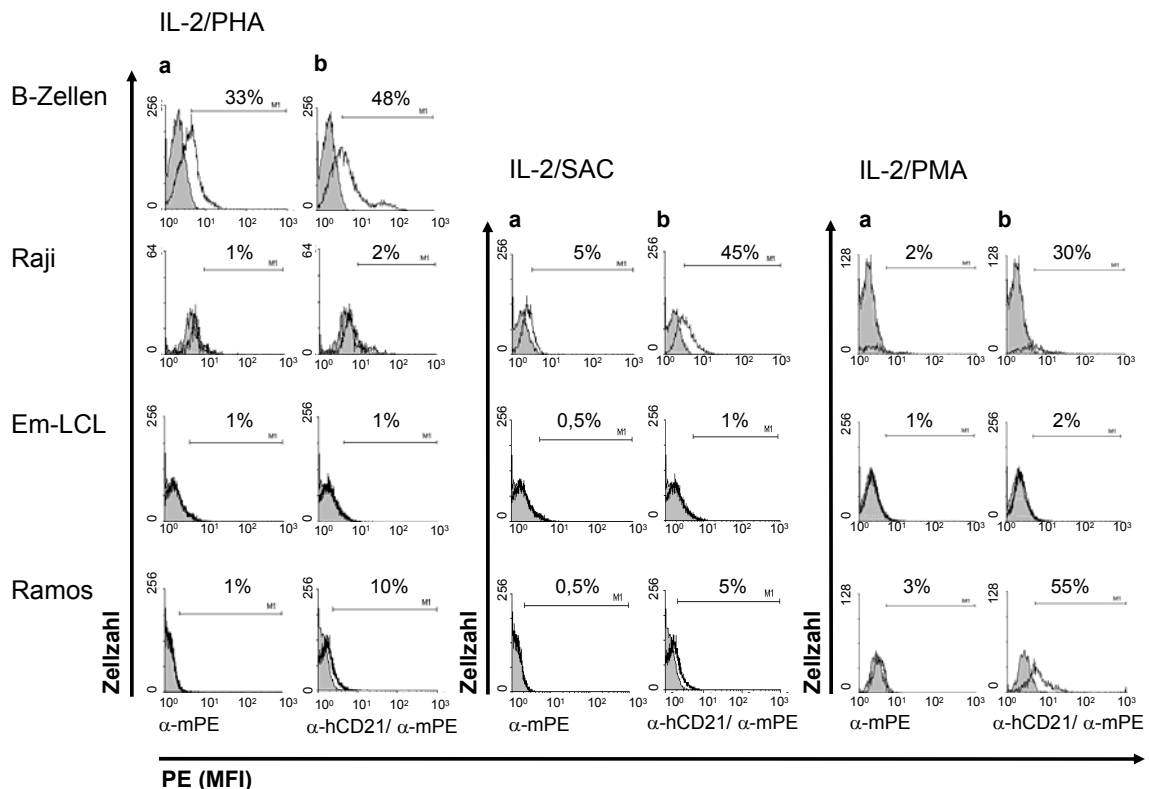
Der Rezeptor CD21 befindet sich hauptsächlich auf der Oberfläche von folliculären dendritischen Zellen (FDC) und B-Zellen (Croix *et al.*, 1996; Schwab & Illges, 2001). Für die FACS-Analysen sind daher verschiedene B-Zelllinien (Raji, Em-LCL und Ramos) und frisch aufgereinigte B-Zellen aus humanen PBMC (B-Zellen) auf ihre CD21-Expression hin überprüft worden. Es konnte gezeigt werden, dass aufgereinigte humane B-Zellen und die humane B-Zelllinie Raji detektierbares CD21 auf der Oberfläche präsentierten. Auf den beiden humanen B-Zelllinien Ramos und Em-LCL hingegen konnte kein oder nur wenig CD21 nachgewiesen werden (siehe Abbildung C.10). In der Arbeit von Braun *et al.* wurden bei den unstimulierten Zelllinien Raji ca. 80% und Ramos ca. 8% CD21-positive Zellen nachgewiesen (Braun *et al.*, 1998). Von den aufgereinigten B-Zellen waren bis zu 33% der Zellen positiv für CD21. Der verwendete anti-Maus-Antikörper zeigte jedoch einen hohen Hintergrund bei der Kontrollfärbung, daher waren frisch präparierte humane B-Zellen ungeeignet für die FACS-Analyse. Von der B-Zelllinie Raji hatten bis zu 50% der Zellen CD21 auf ihrer Oberfläche, ohne eine unspezifische Antikörperbindung aufzuweisen.



**Abbildung C.10: Überprüfung verschiedener B-Zellen auf ihre CD21-Expression.** Die B-Zelllinien Raji, Ramos und Em-LCL wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet, gewaschen und durch Zugabe des hCD21-spezifischen Antikörpers gefärbt. Die humanen B-Zellen wurden aus einer Blutkonserve durch PBMC-Präparation und anschließender MACS-Separation aufgereinigt. Sie wurden ebenfalls mit Hilfe des hCD21-spezifischen Antikörpers ( $\alpha$ -hCD21) detektiert. Für die FACS-Analyse wurde die Bindung des Antikörpers durch eine zweite Färbung mit anti-Maus Phycoerithrin ( $\alpha$ -mPE) sichtbar gemacht (**b**). Als Kontrollen wurden die Zellen nicht mit  $\alpha$ -hCD21, sondern nur mit  $\alpha$ -mPE behandelt (**a**). Nicht gefärbte Zellen sind als graue Fläche dargestellt. Für die FACS-Analyse wurden 20.000 Zellen aufgenommen. Auf der Y-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgetragen. Auf der X-Achse ist die *Mean fluorescence intensity* (MFI) abgebildet, die ein Maß für die Expressionsrate von CD21 darstellt.

Um die Mehrzahl der B-Zellen zur Expression von CD21 anzuregen und die Dichte des CD21-Rezeptors auf der Oberfläche zu erhöhen, wurden die verschiedenen B-Zellen mit IL-2/PMA, IL-2/PHA und IL-2/SAC unspezifisch stimuliert und danach im FACS vermessen. Es ist bekannt, dass B-Zellen bei Stimulation mit IL-2 oder PMA eine verstärkte Expression von CD21 auf ihrer Oberfläche zeigen (Hivroz *et al.*, 1991; Vereshchagina *et al.*, 2001). Stimulation mit PMA kann allerdings zur Scherung von CD21 auf der Zelloberfläche führen (Masilamani *et al.*, 2003). Daher wurde versucht, die B-Zellen auch mit IL-2/PHA und IL-2/SAC unspezifisch zur Proliferation anzuregen, um damit die CD21-Expression hochzuregulieren. Aufgereinigte B-Zellen aus PBMC sind mit IL-2/SAC bereits erfolgreich stimuliert worden (Corcoran *et al.*, 2004; Nanan *et al.*, 2002) und die stark mitogene Wirkung von PHA wurde schon früher bei der Proliferation von B- und T-Lymphocyten eingesetzt (El Barrawy *et al.*, 1991; van de Griend *et al.*, 1984; Weber *et al.*, 1972; Yachnin & Svenson, 1972).

Die B-Zellen wurden für die Stimulation in 6-wells ausgesät und pro well mit 20 ng IL-2 und 10 µg PMA bzw. PHA und 10 ng IL-2 und 0,625 µl SAC für 60 Stunden stimuliert. Nach der Stimulation der B-Zellen erfolgte die Färbung mit dem hCD21-spezifischen Antikörper und die Vermessung im FACS (siehe Abbildung C.11). Von den aufgereinigten humanen B-Zellen wurde nur eine Stimulation (IL-2/PHA) angesetzt, da der Hintergrund mit anti-Maus PE sehr hoch war und nur getestet werden sollte, ob sich der Hintergrund nach Stimulation abschwächt.



**Abbildung C.11: Überprüfung der stimulierten B-Zellen auf ihre CD21 Expression.** Die B-Zelllinien Raji, Ramos und Em-LCL wurden nach der Stimulation mit IL-2/PMA, IL-2/PHA und IL-2/SAC geerntet, gewaschen und durch Zugabe des hCD21-spezifischen Antikörpers gefärbt. Die humanen B-Zellen wurden nach der Stimulation mit IL-2/PHA abzentrifugiert, gewaschen und ebenfalls mit Hilfe des hCD21-spezifischen Antikörpers (α-hCD21) detektiert. Für die FACS-Analyse wurde die Bindung des Antikörpers durch eine zweite Färbung mit anti-Maus PE (α-mPE) sichtbar gemacht (b). Als Kontrollen wurden die Zellen nicht mit α-hCD21, sondern nur mit α-mPE behandelt (a). Nicht gefärbte Zellen sind als graue Fläche dargestellt. Für die FACS-Analyse wurden 20.000 Zellen aufgenommen. Bei der Stimulation der Raji-Zellen mit IL-2/PHA und IL-2/PMA und der Ramos Zellen mit IL-2/PMA konnten nur zwischen 2.000 und 5.000 Zellen aufgenommen werden, da viele Zellen bei der Stimulation abgestorben sind. Auf der Y-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgetragen. Auf der X-Achse ist die *Mean fluorescence intensity* (MFI) abgebildet, die ein Maß für die Expression von CD21 darstellt.

In der FACS-Analyse der stimulierten B-Zellen zeigte sich, dass die unspezifische Stimulation nicht den gewünschten Effekt hatte. Im Gegenteil, die Anzahl CD21-positiver Zellen verringerte sich eher nach der Stimulation (siehe Abbildung C.11). Nach Stimulation mit IL-2/PHA konnten bei den aufgereinigten B-Zellen nach Abzug des hohen Hintergrunds des anti-Maus-Antikörpers nur noch 15% CD21-positive Zellen festgestellt

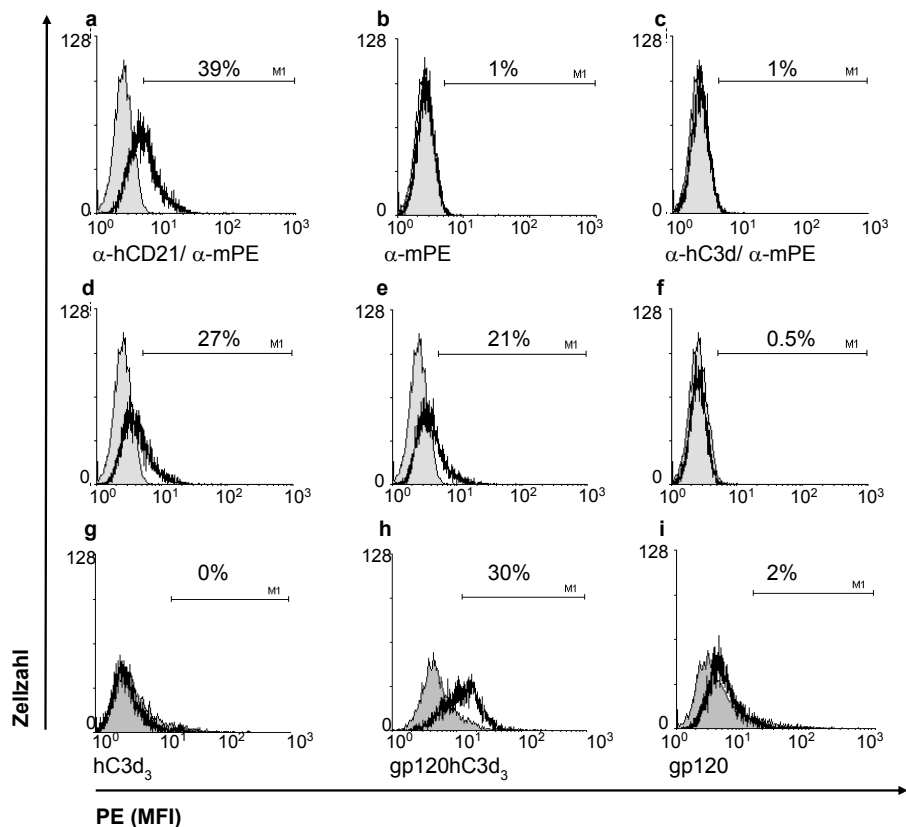
werden. Bei den B-Zelllinien Raji und Em-LCL war kein CD21 mehr auf der Oberfläche der Zellen detektierbar. Interessanterweise zeigte der B-Zellklon Ramos eine deutliche Erhöhung der CD21-Expression (10% CD21-positive Zellen), die allerdings immer noch deutlich unter der Expression lag, die von der B-Zelllinie Raji erreicht wurde. Nach Stimulation mit IL-2/SAC konnte ebenfalls nur bei der B-Zelllinie Ramos eine verbesserte Expression festgestellt werden (5% CD21-positive Zellen). Die anderen B-Zellklone Raji und Em-LCL zeigten eine verschlechterte oder keine CD21-Expression auf der Zelloberfläche. Die Stimulation mit IL-2/PMA resultierte sowohl bei der Zelllinie Raji als auch bei Em-LCL (30% bzw. 2% CD21-positive Zellen) in einer verschlechterten CD21-Expression im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (siehe Abbildung C.10). Lediglich der B-Zellklon Ramos zeigte nach der Stimulation eine deutlich verstärkte CD21-Expression mit bis zu 55% positiven Zellen. Allerdings führte die Stimulation mit IL-2/PMA partiell zu einem doppelt so hohen Zellverlust im Vergleich zu den anderen Stimulationen, so dass nur noch wenige Zellen vermessen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Beim Vergleich der verschiedenen B-Zellklonen stellte sich heraus, dass die unstimulierte Zelllinie Raji die höchste Anzahl an CD21-positiven Zellen (50%) aufwies (siehe Abbildung C.10). Für den Bindungsnachweis von hC3d<sub>3</sub> an den CD21-Rezeptor wurde daher die humane B-Zelllinie Raji verwendet.

#### **C.4.2 hC3d<sub>3</sub>- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine binden effizient an CD21**

Für den Nachweis der Bindung von hC3d<sub>3</sub> und gp120hC3d<sub>3</sub> an den CD21-Rezeptor wurden  $3 \times 10^6$  Raji B-Zellen abzentrifugiert, gewaschen und mit Zellkulturüberständen transfizierter 293T-Zellen für zwei Stunden inkubiert. Die Überstände wurden nach CaP-Transfektion von *tpa1gp120*, *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* und *tpa1hC3d<sub>3</sub>* nach 48 Stunden gewonnen und durch Zentrifugation bei  $300 \times g$  für 5 min geklärt. Nach Färbung mit  $\alpha$ -CD21 und  $\alpha$ -hC3d zeigte sich, dass 39% der Raji B-Zellen positiv für CD21 waren und 27% beziehungsweise 21% der gesamten B-Zellen hC3d<sub>3</sub> bzw. gp120hC3d<sub>3</sub> gebunden hatten. Demzufolge wiesen 69% der CD21-positiven Zellen eine Bindung von hC3d<sub>3</sub> auf und 54% eine Bindung von gp120hC3d<sub>3</sub> (Abbildung C.12d, e). Die höhere Anzahl der positiven Zellen bei Einsatz von hC3d<sub>3</sub> erklärt sich durch die höhere Expression von *tpa1hC3d<sub>3</sub>* gegenüber *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* (Abbildung C.9) und der fehlenden Normalisierung der hC3d-Mengen in den Überständen. Die Bindung von gp120hC3d<sub>3</sub> an CD21 könnte unter Umständen auch durch sterische Hinderungen vermindert sein. Als Negativkontrolle des Antikörpers  $\alpha$ -hC3d wurde mit dem Zellkulturüberstand der mit *tpa1gp120*-transfizierten Zellen inkubiert (Abbildung C.12f). Um zu verifizieren, dass gp120 keinen Einfluss auf die Bindung von C3d an CD21 hat, wurde nach der Inkubation mit den Zellkulturüberständen auch mit  $\alpha$ -gp120 gefärbt. Es zeigte sich deutlich, dass gp120 ohne fusioniertes hC3d<sub>3</sub> nicht an die B-Zellen binden konnte (Abbildung C.12i). Die Bindung des gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteins jedoch erwies sich mit  $\alpha$ -gp120 als gut nachweisbar. Circa 30% der B-Zellen hatten gp120hC3d<sub>3</sub> gebunden (siehe Abbildung C.12h). Demgemäß zeigten 76% der CD21-positiven B-Zellen eine Bindung von gp120hC3d<sub>3</sub>-

Fusionsproteinen. Aufgrund der Verwendung des polyklonalen  $\alpha$ -gp120-Antikörpers können mehrere Epitope von gp120 erkannt werden, und die Fluoreszenzintensität von  $\alpha$ -gp120 ist daher gegenüber dem monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -hC3d leicht erhöht. Als Negativkontrolle des Antikörpers  $\alpha$ -gp120 wurden die B-Zellen mit dem Zellkulturüberstand der mit *tpa1hC3d<sub>3</sub>*-transfizierten Zellen inkubiert (Abbildung C.12g). Bei Kontrollfärbungen mit dem gleichen Antikörperisotyp konnten keine positiven Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung C.12: Bindungsnachweis von gp120hC3d<sub>3</sub> und hC3d<sub>3</sub> an den Rezeptor CD21.**  $3 \times 10^6$  humane Raji B-Zellen wurden mit Zellkulturüberständen von 293T-Zellen nach Transfektion mit *tpa1gp120*, *tpa1hC3d<sub>3</sub>* und *tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>* für zwei Stunden inkubiert und mit den Antikörpern  $\alpha$ -hCD21,  $\alpha$ -hC3d und  $\alpha$ -gp120 gefärbt. Zum Nachweis der CD21-positiven Zellen wurden die Raji-Zellen zunächst mit  $\alpha$ -hCD21 und  $\alpha$ -mPE behandelt (a). Die Funktionalität der Bindung von hC3d an hCD21 wurde durch Inkubation mit hC3d<sub>3</sub> (d) und gp120hC3d<sub>3</sub> (e) und nachfolgender Färbung mit  $\alpha$ -hC3d und  $\alpha$ -mPE gezeigt. Als Kontrolle wurden Raji-B-Zellen mit  $\alpha$ -mPE allein (b) oder mit  $\alpha$ -hC3d und  $\alpha$ -mPE ohne Zellkulturüberstände (c) oder nach Inkubation mit dem Zellkulturüberstand *tpa1gp120*-transfizierter Zellen gefärbt (f). Die Detektion der gebundenen gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine wurde zusätzlich mit  $\alpha$ -gp120 und  $\alpha$ -rPE durchgeführt (h). Als Kontrolle von  $\alpha$ -gp120 erfolgte die Inkubation der B-Zellen mit den Zellkulturüberständen *tpa1hC3d<sub>3</sub>*- und *tpa1gp120*-transfizierter Zellen und die anschließende Färbung mit  $\alpha$ -gp120 und  $\alpha$ -rPE (g, i). Die Kontrollfärbung der B-Zellen mit Phycoerithrin-konjugiertem anti-Kaninchen-Antikörper ( $\alpha$ -rPE) sowie  $\alpha$ -gp120 mit  $\alpha$ -rPE war ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt). Nicht gefärbte Zellen sind als graue Fläche dargestellt. Für die FACS-Analyse wurden 20.000 Zellen aufgenommen. Auf der Y-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgetragen. Auf der X-Achse ist die *Mean fluorescence intensity* (MFI) dargestellt.

### **C.4.3 Zusammenfassung**

Die verstärkte Immunreaktion auf Antigene nach Kopplung von C3d beruht hauptsächlich auf der Bindung von C3d an den Rezeptor CD21 auf der Oberfläche von B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen mit nachfolgender Signalverstärkung und B-Zell-Stimulierung. Um zu zeigen, dass das in Säugetierzellen produzierte hC3d<sub>3</sub> und gp120hC3d<sub>3</sub> an CD21 binden kann, wurden zunächst verschiedene B-Zellen auf ihre CD21-Produktion hin getestet und schließlich die humane B-Zelllinie Raji ausgewählt. Nach Inkubation von gp120, hC3d<sub>3</sub> und dem Fusionsprotein gp120hC3d<sub>3</sub> konnte die Bindungsfunktionalität von hC3d mit einem  $\alpha$ -hC3d- und einem  $\alpha$ -gp120-Antikörper nachgewiesen werden. Die Bindungsstellen von hC3d an humanes und murines CD21 stimmen laut Literatur überein (Hannan *et al.*, 2005; Szakonyi *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2006), (siehe auch Anhang F.2). Mehrere Studien zeigten bereits, dass die Bindung von humanem C3d eine verstärkte Ca<sup>2+</sup>-Antwort in murinen Splenozyten auslöst (Henson *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Lyubchenko *et al.*, 2005). Die Immunisierung von Mäusen mit Plasmiden, die für Fusionsproteine mit humanem C3d kodieren, sollte daher die Immunreaktion in gleicher Weise verstärken, wie eine Immunisierung mit DNA-Konstrukten, die auf murinem C3d basieren.

## **C.5 Immunogenität verschiedener gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte im Balb/C-Mausmodell**

In der folgenden immunologischen Studie sollte der Einfluss der hC3d<sub>3</sub>-Fusion auf die Induktion einer Env-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort untersucht werden. Um die Immunantworten zu vergleichen, wurden weibliche Balb/C-Mäuse intramuskulär (i.m.) mit jeweils 100  $\mu$ g Plasmid-DNA immunisiert. Für den Versuch wurden den Mäusen folgende Plasmide injiziert: *tpa3gp120*, *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>*, *HIVgp120*, *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*, *tpa1hC3d<sub>3</sub>* und der Expressionsvektor pcDNA3.1 (*mock*). Das Plasmid *tpa1hC3d<sub>3</sub>* und der pcDNA3.1 fungierten als Negativkontrollen. Die Mäuse wurden in Woche 0 grundimmunisiert (*prime*), in Woche fünf und zwölf wurde ihnen nochmals die gleiche DNA-Menge verabreicht (*boost*). Eine Woche vor der ersten DNA-Injektion und jeweils eine Woche nach den *Boost*-Immunisierungen erfolgten die Blutentnahmen.

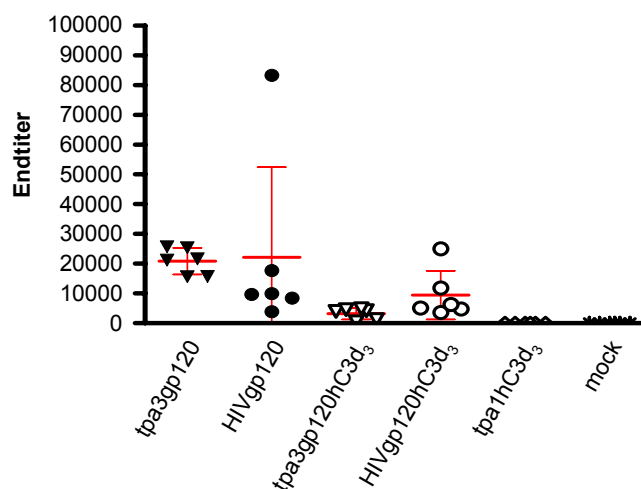
### **C.5.1 Niedrigere humorale Immunantwort nach Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten**

Die Bestimmung der humoralen Immunantwort erfolgte durch die Untersuchung der Seren einzelner Mäuse oder Serenpools der Mausgruppen mittels Antikörper-ELISA oder Immunoblot auf die Bildung gp120- oder hC3d-spezifischer Antikörper. Die Mäuse wurden vor Beginn der Studie auf das Vorhandensein etwaiger bestehender gp120-spezifischer humoraler Antworten getestet (Präimmunseren). Für die Immunisierungsexperimente wurden zum einen die DNA-Konstrukte mit der Signalsequenz *tpa3* verwendet, da kein

Expressions- oder Sekretionsunterschied zwischen den einzelnen *tpa*-Varianten festgestellt werden konnte. Außerdem die Konstrukte mit der *HIV*-Signalsequenz, da die autologe Signalsequenz in den Expressions- und Sekretionsversuchen geringfügig höhere Werte erzielte (Abbildung C.5C).

#### C.5.1.1 Geringfügige Verbesserung der humoralen Immunantwort bei Verwendung der HIV-1 Env Signalsequenz

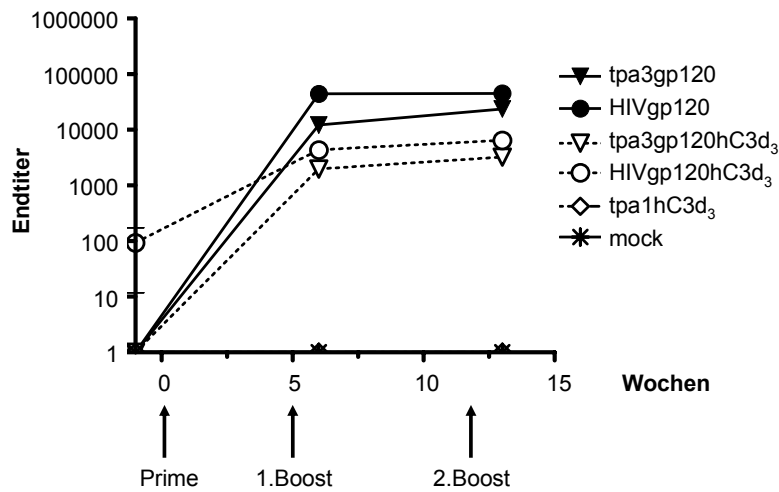
Der Einfluss der unterschiedlichen Signalsequenzen *tpa3* und *HIV* wurde nach der letzten Immunisierung anhand der  $\alpha$ -gp120-Titer der individuellen Mausseren bestimmt. Beim Vergleich der gp120-Konstrukte mit *tpa3* oder mit *HIV* als Signalsequenz zeigte sich, dass mit der HIV-1 Signalsequenz im Mittelwert scheinbar höhere gp120-spezifische Ig-Titer erzielt wurden. Bei der Auftragung der Einzelseren wird jedoch deutlich, dass die höheren Mittelwerte nur aufgrund des extrem hohen Titers einer einzelnen Maus zustande kommen (Abbildung C.13). Wenn der Wert dieser Maus nicht eingerechnet wird, ist der Mittelwert der Titer um fast die Hälfte niedriger (10.000) als der Gesamttiter der Mäuse, die mit *tpa3gp120* immunisiert wurden (21.000). Die Verwendung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten mit der Signalsequenz *HIV* erzielte jedoch höhere Ig-Titer (9.400) verglichen mit den Mäusen, die mit *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* immunisiert wurden (3.200).



**Abbildung C.13: Endpunkttiter individueller Mausseren nach der dritten DNA-Immunisierung.** Balb/C Mäuse wurden zum Zeitpunkt 0 sowie nach 5 und 12 Wochen mit je 100 µg der angegebenen Plasmid-DNA (mock entspricht pcDNA3.1) immunisiert. Für die Ermittlung der gp120-spezifischen Ig-Titer der einzelnen Mäuse nach der dritten Immunisierung wurden die Mausseren im ELISA vermessen. Die Titer korrespondierten mit dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, deren O.D. Wert dreimal höher war als der Wert der entsprechenden Verdünnung einer nicht-immunisierten Kontrolle.

### C.5.1.2 Verringerte Induktion gp120-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten

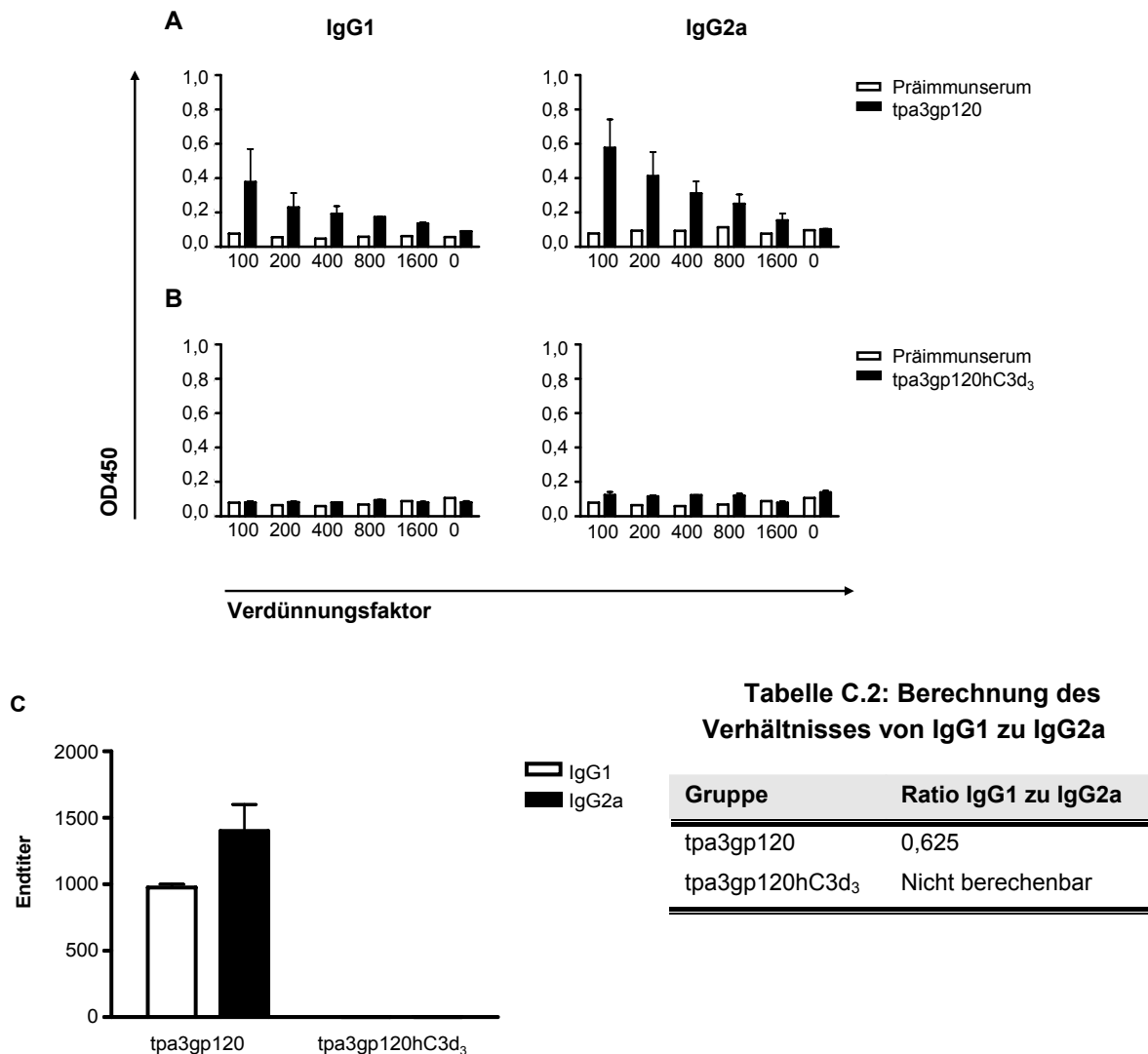
Der Einfluss der hC3d<sub>3</sub>-Fusion wurde durch Vermessung der gp120-spezifischen Ig-Titer jeweils eine Woche nach der zweiten und der dritten Immunisierung untersucht. Die Seren einer Mausgruppe wurden hierbei jeweils vereinigt und erst dann in den spezifischen ELISA eingesetzt. Die Immunisierung mit *tpa3gp120* und *HIVgp120* resultierte in hohen Env-spezifischen Antikörpertitern. In *tpa3gp120* immunisierten Tieren konnte nach sechs Wochen ein Titer von 12.000 und nach 13 Wochen ein Titer von 25.000 festgestellt werden. Nach Immunisierung mit *HIVgp120* wurde jedoch bereits nach sechs Wochen ein Titer von 45.000 erreicht, der sich auch nach der dritten Immunisierung nicht mehr veränderte (Abbildung C.14). Dieser ELISA erfolgte allerdings mit den vereinigten Seren der Mausgruppen. Es kann daher aufgrund der Vermessung der Einzelmausseren (Abbildung C.13) davon ausgegangen werden, dass der Wert einer einzelnen Maus für den hohen Gesamttiter verantwortlich war. Den Titer der *HIVgp120* immunisierten Tiere kann folglich mit dem der *tpa3gp120* vakzinierten Mäuse gleichsetzt werden. Die nach Injektion von *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* induzierten spezifischen Titer waren um den Faktor sieben beziehungsweise vier niedriger als die Titer der beiden gp120-kodierenden Konstrukte. Diese Reduktion entspricht auch der verringerten Expression und Sekretion der gp120-Konstrukte nach transienter Transfektion, die sich nach der Fusion mit hC3d<sub>3</sub> ergab (Abbildung C.5C). Es zeigte sich, dass die Titer *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* immunisierter Mäuse mit dem Wert 3.200 um die Hälfte geringer waren als die *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*-vakzinierten Mäuse mit dem Werte 6.400. Die Verwendung der HIV-1 Env Signalsequenz scheint folglich einen positiven Einfluss auf die Sekretionseffizienz zu haben, entgegen früheren Ergebnissen von Li *et al.* und Wang *et al.* (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006b). Allerdings wurde bei den entnommenen Präimmunsereen der mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisierten Tiere ein leicht erhöhter Grundtiter von 93 festgestellt, der durchaus die erhöhten Antikörpertiter nach den Immunisierungen beeinflusst haben kann. Die Abweichungen zu den ELISA-Ergebnissen in C.5.1.1 kamen dadurch zustande, dass die Vermessung der individuellen Mausseren unabhängig von den vereinigten Mausseren erfolgte.



**Abbildung C.14: Humorale Immunantwort nach intramuskulärer DNA-Immunisierung verschiedener gp120-Konstrukte.** Balb/C Mäuse wurden am Zeitpunkt 0, sowie nach fünf und zwölf Wochen mit je 100 µg der angegebenen Plasmid-DNA (*mock* entspricht pcDNA3.1) immunisiert. Jeweils eine Woche nach der zweiten und dritten Immunisierung wurden die Env-spezifischen Ig-Titer der immunisierten Versuchstiere im ELISA ermittelt. Die Titer korrespondierten mit dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, deren O.D.-Wert dreimal höher war als der Wert der entsprechenden Verdünnung einer nicht-immunisierten Kontrolle.

### C.5.1.3 Immunisierung von gp120-Konstrukten führt zu einer T<sub>H</sub>1-Polarisierung der humoralen Immunantwort

In mehreren Studien wird davon ausgegangen, dass die Immunantwort bei C3d<sub>3</sub>-gekoppelten Antigenen eher in Richtung T<sub>H</sub>2-Antwort tendiert (Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006d) Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Mausserenpools auf eine unterschiedliche Ausprägung der Immunglobulinantwort getestet. Die Expression der Immunglobulintypen IgG2a und IgG1 ist ein Indiz für die Ausrichtung der Immunantwort hin zu einer T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Antwort. Anhand des dominierenden Immunglobulintyps kann so die Ausrichtung der Immunantwort bestimmt werden. Verstärkte Expression von IgG2a steht dabei für die Verschiebung in Richtung T<sub>H</sub>1-Antwort, verstärkte Expression von IgG1 für eine Verschiebung zu einer T<sub>H</sub>2-Antwort. Die Mausserenpools *tpa3gp120* und *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* immunisierter Mäuse wurden auf ihren Gehalt an IgG2a- und IgG1-Antikörpern untersucht. Es stellte sich heraus, dass weder IgG2a-, noch IgG1-Antikörper in den Mausseren der mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten immunisierten Mäuse nachweisbar waren. Bei den Mäusen, die mit *tpa3gp120* immunisiert wurden, zeigte sich, dass IgG2a die Immunglobulinexpression dominierte (Abbildung C.15). Dies wies darauf hin, dass DNA-Immunisierung von gp120-Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub>-Fusion die humorale Immunantwort in Richtung T<sub>H</sub>1 verschiebt.

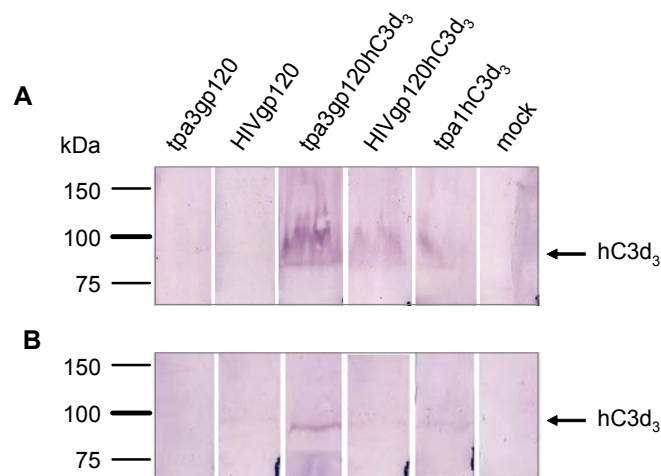


**Abbildung C.15: Bestimmung der  $T_H1$ -/ $T_H2$ -Polarisierung.** Die Mausserenpools wurden in mehreren Verdünnungen aufgetragen und auf ihren IgG2a und IgG1-Gehalt überprüft. Der ELISA wurde mit Streptavidin gebundenen  $\alpha$ -Maus IgG2a und  $\alpha$ -Maus IgG1 Antikörpern durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem HRP gekoppelten  $\alpha$ -Biotin Antikörper und dem Substrat TMB. Als Einheit ist die Optische Dichte bei 450 nm (OD450) angegeben. In **(A)** die Ergebnisse der mit tpa3gp120 immunisierten Mäuse und in **(B)** ELISA-Daten der mit tpa3gp120hC3d<sub>3</sub> immunisierten Mäuse. **(C)** Endpunkttiter der jeweiligen Isotypen in den vermessenen Mausserenpools. Die Endpunkttiter korrespondierten mit dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, deren O.D.-Wert zweimal höher war als der Wert der entsprechenden Verdünnung einer nicht-immunisierten Kontrolle.

Für die Bestimmung der Polarisierung der vorherrschenden Immunantwort wurde zudem das Verhältnis IgG1-Titer zu IgG2a-Titer berechnet. Ein Verhältnis IgG1 zu IgG2a  $\gg 1$  weist auf eine  $T_H2$  Antwort hin, ein Verhältnis  $< 1$  hingegen auf eine  $T_H0/T_H1$  basierende Immunreaktion. Die Untersuchungen bestätigten, dass tpa3gp120 mit einem IgG1/IgG2a Verhältnis von 0,625 eine  $T_H0/T_H1$ -vermittelte Immunantwort stimuliert. Die Immunisierung der Mäuse mit tpa3gp120hC3d<sub>3</sub> resultierte in so niedrigen Gesamt Titern, dass eine Bestimmung von IgG1 und IgG2a Titern nicht möglich war (siehe Tabelle C.2).

#### C.5.1.4 Induktion einer hC3d-spezifischen Immunantwort in Mäusen

In den Mausimmunisierungsexperimenten wurde im Gegensatz zu anderen Studien humanes und nicht murines C3d verwendet (Gor *et al.*, 2006; Mitsuyoshi *et al.*, 2005; Ross *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004a). Murines und humanes C3d weisen zwar eine hohe Homologie ihrer Aminosäuresequenz auf (71%), aber die Studie von Green *et al.* zeigt, dass die Verwendung speziefremder C3d-Proteine zu Antikörperbildung führen kann (Green *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob die Mäuse  $\alpha$ -hC3d Antikörper bildeten, wurden Zelllysate und Zellkulturüberstände von 293T-Zellen nach Transfektion von *tpa1hC3d<sub>3</sub>* auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen und eine Western Blot Analyse mit den vereinigten Mausseren durchgeführt (Abbildung C.16). Trotz der hohen Aminosäuresequenzhomologie ließen sich in den Seren der Mäuse, die mit *tpa1hC3d<sub>3</sub>*, *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* oder *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisiert wurden,  $\alpha$ -hC3d Antikörper nachweisen. Auf der erwarteten Laufhöhe des aufgetragenen hC3d<sub>3</sub> (ca. 100 kDa) wurden deutlich AP-gefärbte Banden sichtbar, folglich kam es zur Bildung von  $\alpha$ -hC3d Antikörpern. Als Negativkontrollen wurden auch Seren von Mäusen überprüft, die mit pcDNA3.1 (*mock*), *tpa3gp120* oder *HIVgp120* immunisiert wurden, hier zeigten sich wie erwartet keine Banden auf der Höhe von hC3d<sub>3</sub>.



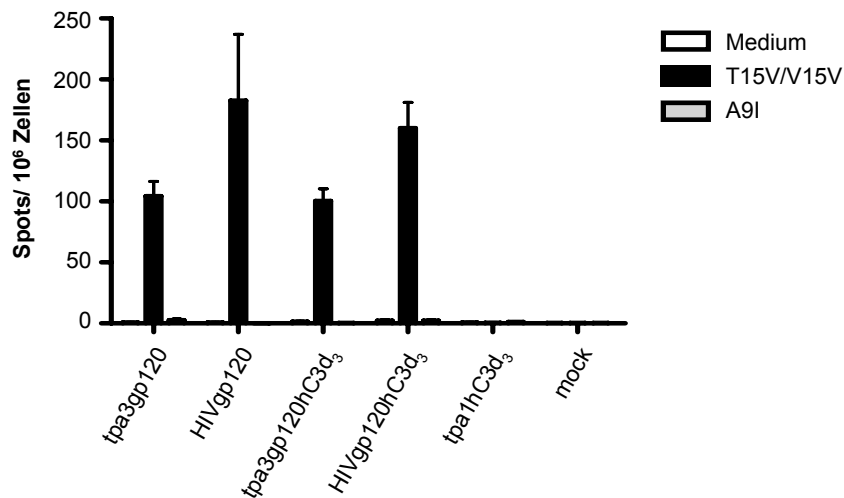
**Abbildung C.16: Überprüfung der gepoolten Mausseren auf hC3d-spezifische Antikörper mittels Western Blot-Analyse.** Für die Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  293T-Zellen ausgesät und mit 15  $\mu$ g Plasmid-DNA (*tpa1hC3d<sub>3</sub>*) transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Abnahme des Zellkulturüberstands mit anschließender Abzentrifugation der Zellbestandteile ( $300 \times g$  für 5 min) sowie die Ernte der Zellen mit nachfolgender Lyse durch 150  $\mu$ l RIPA-Puffer. Je 50  $\mu$ g Gesamtprotein des Zelllysats (**A**) beziehungsweise 30  $\mu$ l des Überstands (**B**) wurden pro Spur auf ein 7,5%iges SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Die nachfolgende Western Blot-Analyse wurde mit den angegebenen Mausserenpools durchgeführt. Die Entnahme der Seren erfolgte eine Woche nach der dritten Immunisierung. Die Seren der sechs Mäuse, die mit dem gleichen Konstrukt immunisiert wurden, wurden vereignet. Nach Inkubation der Serenpools mit den auf der Membran immobilisierten hC3d<sub>3</sub>-Proteinen wurden die gebundenen  $\alpha$ -hC3d Antikörper mit einem  $\alpha$ -Maus AP Antikörper nachgewiesen.

### **C.5.2 Vergleichbare zelluläre Immunantwort nach Immunisierung von gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten**

Zur Bestimmung der zellulären Immunantwort der Mäuse nach intramuskulärer DNA-Immunisierung wurden den Tieren eine Woche nach der letzten Immunisierung die Milz entfernt und daraus die Splenozyten präpariert. Die aus ENV<sub>CN54</sub> stammenden 15-mer Peptide (THACVPADPNPQEMV) und V15V (VPADPNPQEMVLENV), die als murine gp120 CTL-Epitope bekannt sind (Wild J., unpublizierte Daten) wurden für die Stimulation der T-Zellen und das Auslesen der spezifischen Immunantwort verwendet. Das 9-mer Peptid A9I (AMQMLKETI), ein bekanntes p24 CTL-Epitop (Nakamura *et al.*, 1997; Selby *et al.*, 1997), diente als Kontrollpeptid. Die Induktion einer starken zellulären Immunantwort wurde im Detail über die Messung der IFN $\gamma$ -Induktion mit verschiedenen Testmethoden bestimmt.

#### C.5.2.1 Die Verwendung der HIV-Signalsequenz führt zu einer höheren Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Milzzellen

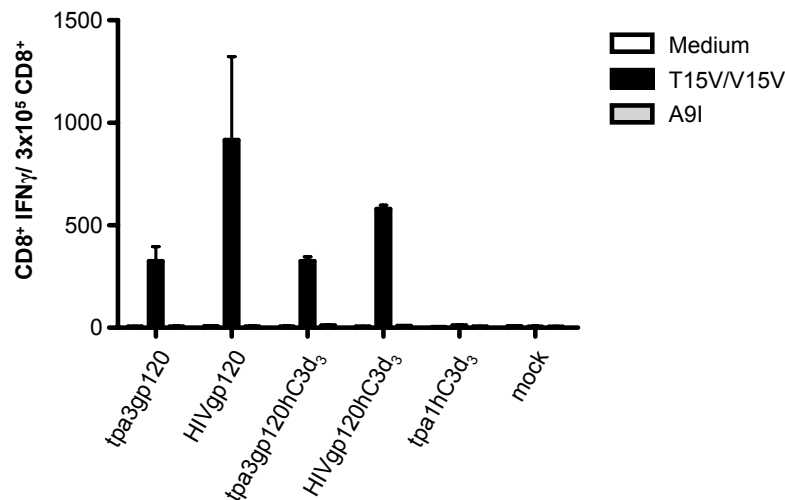
Mit einem ELISPOT konnte die Anzahl Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-sezernierender Zellen 24 Stunden nach *in vitro*-Restimulation der Splenozyten mit den Peptiden T15V und V15V quantifiziert werden. Die in Abbildung C.17 angegebenen Daten geben Mittelwerte aus drei Ansätzen wieder. Alle immunisierten gp120-Konstrukte zeigten eine erhöhte Anzahl an spezifisch stimulierbaren, IFN $\gamma$ -freisetzenden Zellen. Dabei war die Anzahl der spezifisch stimulierten Zellen nach Immunisierung mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten ebenso hoch wie bei der Immunisierung mit gp120-Plasmiden ohne hC3d<sub>3</sub>. Dies war unerwartet, da in vorherigen Ergebnissen die Expression (siehe C.3.1.3) und die humorale Immunantwort (siehe C.5.1.2) der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte schwächer war, als die der gp120-Konstrukte. Die Fusion von hC3d<sub>3</sub> scheint die verringerte Expression durch eine verstärkte Stimulation der zellulären Immunantwort auszugleichen. Eine Erklärung wäre die Bindung der hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine an CD21 auf follikulären dendritischen Zellen, die zu einer verstärkten Stimulation der T-Zellen beitragen (siehe A.2.1.2). Ein Anstieg an IFN $\gamma$ -freisetzenden Zellen um den Faktor 1,5 konnte nur bei der Verwendung der HIV-1 Env Signalsequenz beobachtet werden. Expression und Sekretion der verschiedenen Konstrukte zeigte keine signifikante Erhöhung bei Verwendung der Signalsequenz HIV (siehe C.3.1.2). Der Vergleich mit den humoralen Immunantworten zeigt, dass die Antikörpertiter nach Immunisierung der Konstrukte mit der HIV-Signalsequenz teilweise höher waren (siehe C.5.1.1). Die Maus, die bereits bei den humoralen Immunantworten der mit HIVgp120 immunisierten Mäuse zu einem erhöhten Mittelwert führte (siehe C.5.1.1), könnte auch für die hohe Standardabweichung dieser Gruppe im ELISPOT verantwortlich sein. Allerdings wurden die Milzen nach der Entnahme innerhalb der Gruppen vereinigt, so dass keine Einzeluntersuchung mehr möglich war. Die mit Vektor pcDNA3.1 (*mock*) oder *tpa1hC3d<sub>3</sub>* immunisierten Gruppen zeigten keine signifikante Anzahl an IFN $\gamma$ -freisetzenden Zellen. In diesen Mausgruppen lag die Anzahl der detektierten Zellen bei weniger als fünf.



**Abbildung C.17: Env-spezifische CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellantworten von Milzzellen.** Splenozyten wurden eine Woche nach der dritten Immunisierung präpariert und die Anzahl IFN $\gamma$ -sezernierender Zellen mit Hilfe der Env-spezifischen Peptide T15V und V15V im ELISPOT bestimmt. Die Balken geben den Mittelwert aus drei Ansätzen wieder. Weiße Balken repräsentieren nicht stimulierte Zellen, graue mit unspezifischen A9I Peptid restimulierte und schwarze spezifisch mit den Peptiden T15V und V15V stimulierte Zellen. Die Werte repräsentieren die Anzahl an positiven Zellen pro  $1 \times 10^6$  untersuchter Zellen. Als Kontrollen dienten pcDNA3.1 (mock) und tpa1hC3d<sub>3</sub> immunisierte Mäuse.

#### C.5.2.2 Verwendung der HIV-Signalsequenz führt zu einer erhöhten intrazellulären IFN $\gamma$ -Produktion in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnten verantwortliche IFN $\gamma$ -sezernierende Subpopulationen genauer analysiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden entnommen und präpariert. Durch die spezifische Oberflächenfärbung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sowie die intrazelluläre Färbung von IFN $\gamma$  konnte die Anzahl IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten quantifiziert werden. Wie auch schon im ELISPOT festgestellt, erzielten alle Gruppen, die mit gp120- oder gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten immunisiert wurden, eine hohe IFN $\gamma$ -Sekretion. Wiederum zeigten sich zwischen den mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten und den mit gp120-Konstrukten immunisierten Gruppen keine Unterschiede bei der Anzahl der IFN $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen. Der Grund hierfür dürfte, wie bereits bei den ELISPOT-Ergebnissen in C.5.2.1 beschrieben, in der Bindung von hC3d an CD21 follikulärer dendritischer Zellen liegen, die durch verstärkte Präsentation die zelluläre Immunantwort zusätzlich stimuliert. In der Gruppe mit HIVgp120hC3d<sub>3</sub> und HIVgp120 immunisierten Mäusen wurden 1,5 bis zweimal mehr IFN $\gamma$ -produzierende CD8<sup>+</sup>-Zellen festgestellt als in den mit tpa3gp120hC3d<sub>3</sub> und tpa3gp120 vakzinieren Gruppen. Die hohe Standardabweichung bei der Gruppe, die mit HIVgp120 immunisiert wurde, kann unter Umständen auf eine einzelne Maus zurückgeführt werden, die bereits bei der humoralen Immunantwort den Mittelwert erhöhte (siehe C.5.1.1). Die Milzen wurden allerdings nach der Entnahme innerhalb der Gruppen vereinigt, so dass keine Einzeluntersuchung mehr möglich war. Abbildung C.18 zeigt den Anteil der Interferon  $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, bezogen auf  $3 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.



**Abbildung C.18: Intrazelluläre IFN $\gamma$ -Färbung von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten restimuliert mit den Env-spezifischen Peptiden T15V und V15V.** Anteil IFN $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten von  $3 \times 10^5$  untersuchten CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (schwarze Balken). Zur Kontrolle der spezifischen Restimulation wurden nicht stimulierte (Medium) und unspezifisch stimulierte Zellen (Peptid A9I) mit vermessen (weiße und graue Balken).

### C.5.3 Zusammenfassung

Die zusätzliche Fusion von drei humanen C3d-Kassetten konnte weder die humoralen noch die zellulären Immunantworten gegen das kodonoptimierte HIV-1 Antigen (gp120) signifikant verbessern. Es konnte im Gegenteil gezeigt werden, dass die hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte einen negativen Einfluss auf die Höhe der Antikörpertiter hatten. Die Anzahl an IFN $\gamma$ -sezernierenden CD8<sup>+</sup>-Zellen hingegen veränderte sich nicht nach hC3d<sub>3</sub>-Fusion. Dieses Ergebnis ist vermutlich auf die Bindung an CD21 auf folliculären dendritischen Zellen und die damit verbundene zusätzliche Präsentation der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte zurückzuführen.

Frühere DNA-Immunisierungen zeigten, dass es nach Immunisierung von spezie-fremdem C3d zur Induktion von Antikörpern gegen dieses C3d kommt (Green *et al.*, 2003). Für die Versuche in dieser Arbeit wurde humanes C3d gewählt, da die Konstrukte später für den Einsatz in humanen Impfstudien verwendet werden sollen. Humanes und murines C3d besitzen zwar die gleichen Bindungsstellen für CD21 und sind in ihrer Aminosäuresequenz zu 71% identisch (Green *et al.*, 2003), (siehe auch Anhang F.2), aber die geringen Unterschiede reichten bereits für die Ausbildung von hC3d-spezifischen Antikörpern aus.

Der Vergleich der für die Immunisierung verwendeten Signalsequenzen ergab, dass Konstrukte mit *HIV* einen höheren Antikörpertiter und mehr IFN $\gamma$ -produzierende Zellen generierten als Konstrukte mit *tpa3*-Signalsequenzen. Die Verwendung von kodon-optimierten gp120-Plasmiden mit der Signalsequenz von HIV-1 Env (*HIV*) in Impfstudien ist demnach auch eine vielversprechende Strategie, um eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort gegen gp120 zu generieren. Die Fusion von hC3d hingegen

zeigte im Mausmodell keinen positiven Effekt hinsichtlich einer Erhöhung der Antikörpertiter.

Die Austestung im murinen System gab jedoch nur erste Anhaltspunkte bezüglich der Effektivität der verwendeten Konstrukte. Um sicherzustellen, dass das verwendete humane C3d *in vivo* funktionell ist, wurde für weitere Studien das Kaninchenmodell gewählt, da humanes C3d und C3d von Kaninchen eine höhere Homologie der Aminosäuresequenzen aufweisen (81%) als humanes und murines C3d (71%) (Green *et al.*, 2003), (siehe auch Anhang F.2).

## **C.6 Immunogenität der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte im New-Zealand-White-Rabbit-Modell**

In der folgenden immunologischen Studie wurde der Einfluss der hC3d<sub>3</sub>-Fusion auf die Induktion einer Env-spezifischen humoralen Immunantwort in Kaninchen untersucht. Für den Versuch wurden je zwei Kaninchen folgende Plasmide injiziert: *HIVgp120* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*. Als Negativkontrolle diente ein nicht immunisiertes Kaninchen. Um die Immunantworten zu vergleichen, wurden weibliche *New-Zealand-White*-Kaninchen viermal i.m. mit jeweils 1 mg Plasmid-DNA immunisiert. Der erste Protein-Boost wurde mit  $1 \times 10^6$  gp120-präsentierenden RK13-Zellen durchgeführt, zwei weitere Proteinimmunisierungen mit 45 µg und 5 µg gereinigtem gp140<sub>CN54</sub>. Die Kaninchen wurden in Woche 0 grundimmunisiert, in Woche 3, 6 und 9 mit DNA *geboostet* und in Woche 20, 40 und 42 erfolgten die Proteinimmunisierungen.

### **C.6.1 Verschlechterung der humoralen Immunantwort nach Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten**

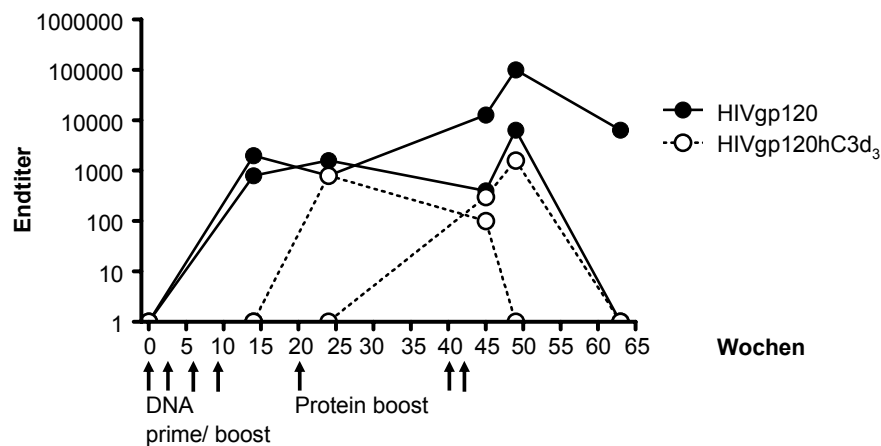
Die humorale Immunantwort nach Immunisierung wurde bestimmt, indem die Seren der Kaninchen einzeln mittels Antikörper-ELISA oder Immunoblot auf die Bildung gp120- oder hC3d-spezifischer Antikörper untersucht wurden. Die Kaninchen wurden vor Beginn der Studie auf das Vorhandensein etwaiger bestehender humoraler Antworten getestet. Für die Immunisierungsexperimente wurden die DNA-Konstrukte mit der *HIV*-Signalsequenz verwendet, da die autologe Signalsequenz in der vorhergehenden Mausimmunisierungsstudie bessere humorale und zelluläre Immunantworten generierte (siehe C.5).

#### **C.6.1.1 Verringerte Induktion gp120-spezifischer Antikörper nach Immunisierung von *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>***

Der Einfluss der hC3d<sub>3</sub> Fusion wurde durch Vermessung gp120-spezifischer Ig-Titer 14, 24, 45, 49 und 63 Wochen nach der Grundimmunisierung untersucht (Abbildung C.19). Die Seren wurden direkt in den spezifischen ELISA eingesetzt. Die Immunisierung mit *HIVgp120* resultierte dabei in hohen Env-spezifischen Antikörpertitern. Nach den DNA Immunisierungen wurde bei einem Kaninchen ein Titer von 2.000 erreicht, bei dem

zweiten Tier ein Titer von 800. Nach dem ersten Protein-Boost stagnierten die Werte und erst nach der zweiten und dritten Proteinimmunisierung mit gereinigtem gp140<sub>CN54</sub> wurden Env-spezifische Titer von bis zu 100.000 gemessen. Das Tier mit dem höchsten Antikörpertiter hatte sogar noch nach 63 Wochen einen Titer von 6.400. Bei einem Kaninchen, das durchgängig geringere Titer zeigte (maximaler Titer 8.000), konnte nach 63 Wochen keine gp120-spezifische Immunantwort mehr detektiert werden. Allerdings wurde vom Tierlabor mitgeteilt, dass dieses Tier Krankheitsanzeichen zeigte.

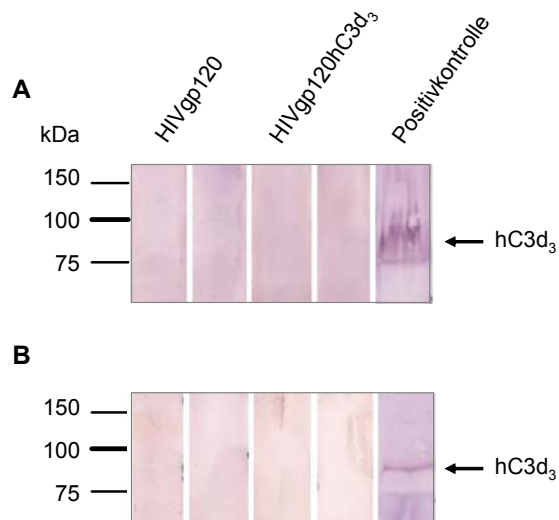
Die spezifischen Titer, die nach Injektion von *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* induziert wurden, waren, verglichen mit den beiden gp120-kodierenden Konstrukten, teilweise bis zu 60 fach niedriger. Es zeigte sich, dass die Titer *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*-immunisierter Kaninchen erst nach der ersten beziehungsweise dritten Proteinimmunisierung detektierbar waren (800 und 300) und auch keine größeren Steigerungen mehr erfolgten. Der höchste erreichte Titer war 800 bzw. 1.600. Unerwarteterweise konnten nach 63 Wochen gar keine gp120-spezifischen Antikörper mehr gemessen werden. Diese verminderte humorale Immunantwort der hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte entspricht der verringerten Expression und Sekretion der gp120-Konstrukte nach transients Transfektion, die nach Fusion mit hC3d<sub>3</sub> beobachtet wurde (Abbildung C.5C). Andererseits entspricht die schwache Immunantwort den Ergebnissen der Mausstudie (Abbildung C.14). Dieses Resultat zeigte, dass die Fusion von hC3d<sub>3</sub> auch bei der Immunisierung der Kaninchen einen negativen Einfluss auf die Höhe der Antikörpertiter hat und keinen Vorteil für kodonoptimierte DNA-Vakzinekonstrukte birgt.



**Abbildung C.19: Humorale Immunantwort nach intramuskulärer DNA-Immunsierung verschiedener gp120-Konstrukte.** Je zwei New-Zealand-White-Kaninchen wurden am Zeitpunkt 0, sowie nach 3, 6 und 9 Wochen mit je 1 mg der angegebenen Plasmid-DNA immunisiert. Nach 20 Wochen wurde mit gp120-exprimierenden RK13-Zellen geboostet, und in Woche 40 und 42 wurde mit gereinigtem gp140<sub>CN54</sub> Protein (45 µg und 5 µg) nochmals immunisiert. Nach 14, 24, 45, 49 und 63 Wochen wurden die Env-spezifischen Ig-Titer der immunisierten Versuchstiere im ELISA ermittelt. Die Titer korrespondierten mit dem reziproken Wert der höchsten Serumverdünnung, deren O.D.-Wert zweifach höher war als der Wert der entsprechenden Verdünnung des Präimmunserums.

### C.6.1.2 Keine Induktion hC3d-spezifischer Antikörper im Kaninchen

In den Kaninchenimmunisierungsexperimenten wurde wie in der Mausstudie humanes C3d verwendet. Im Gegensatz zu murinem weist Kaninchen-C3d mit humanem C3d eine höhere Homologie der Aminosäuresequenz auf (81%). Die Studie von Green *et al.* zeigt, dass sich trotzdem bei Verwendung humaner C3d-Proteine Antikörper im Kaninchen entwickeln können (Green *et al.*, 2003). Um zu überprüfen, ob sich  $\alpha$ -hC3d Antikörper in den Kaninchen gebildet hatten, wurden Zellkulturüberstände von 293T-Zellen nach Transfektion von *tpa1hC3d<sub>3</sub>* auf ein SDS-Acrylamidgel aufgetragen und eine Western Blot Analyse mit den einzelnen Kaninchenseren durchgeführt (Abbildung C.20). Bei den Proteinimmunisierungen wurde kein hC3d<sub>3</sub> mehr eingesetzt, daher wurden für die Überprüfung der  $\alpha$ -hC3d Antikörper die nach 14 Wochen abgenommenen Seren verwendet. Zu diesem Zeitpunkt sollten die hC3d-spezifischen Antikörperantworten am höchsten sein. In den Seren der Kaninchen, die mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisiert wurden, konnten keine  $\alpha$ -hC3d Antikörper nachgewiesen werden (Spur 3 und 4). Dies ist vermutlich in der hohen Aminosäuresequenzhomologie begründet. Auf der Laufhöhe des aufgetragenen hC3d<sub>3</sub> (ca. 100 kDa) wurden keine AP-gefärbten Banden sichtbar, folglich kam es nicht zur Bildung von  $\alpha$ -hC3d Antikörpern (siehe Abbildung C.20). Als Negativkontrollen wurden die Seren von Kaninchen überprüft, die mit *HIVgp120* immunisiert wurden (Spur 1 und 2).



**Abbildung C.20: Überprüfung der Kaninchenseren auf hC3d-spezifische Antikörper mittels Western Blot-Analyse.** Für die Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  293T-Zellen ausgesät und mit  $15 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA (*tpa1hC3d<sub>3</sub>*) transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte die Abnahme des Zellkulturüberstands mit anschließender Abzentrifugation der Zellbestandteile ( $300 \times g$  für 5 min) sowie die Ernte der Zellen mit nachfolgender Lyse durch  $150 \mu\text{l}$  RIPA-Puffer. Je  $50 \mu\text{g}$  Gesamtprotein des Zelllysats (**A**) beziehungsweise  $30 \mu\text{l}$  des Überstands (**B**) wurden pro Spur auf ein 7,5%iges SDS-Acrylamidgel aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde das Mausserum nach Immunisierung von *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* verwendet (siehe Abbildung C.16). Die nachfolgende Western Blot Analyse wurde mit den einzelnen Kaninchenseren durchgeführt. Die Entnahme der Seren erfolgte fünf Wochen nach der letzten DNA-Immunisierung. Nach Inkubation der Seren mit den auf der Membran immobilisierten hC3d<sub>3</sub>-Proteinen wurde mit einem  $\alpha$ -Kaninchen AP-Antikörper gefärbt.

### C.6.1.3 Kein Nachweis gp120-spezifischer B-Gedächtniszellen möglich

Mit der Bestimmung der Anzahl gp120-spezifischer B-Gedächtniszellen sollte überprüft werden, ob die hC3d3-Fusion an gp120 einen Einfluss auf die Bildung spezifischer B-Gedächtniszellen hat. Für den Test wurde Kaninchenblut nach der ersten und nach der letzten Proteinimmunisierung entnommen und periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) präpariert. Diese PBMC wurden ausgesät und mit IL-2 (10 ng) und SAC (1:5.000) für fünf Tage stimuliert. Anschließend wurde ein B-Zell-ELISPOT durchgeführt. Zur Bestimmung der Gesamtzahl an IgG-sezernierenden Zellen nach *in vitro*-Restimulation der PBMC mit IL-2 und SAC wurde eine ELISPOT-Platte mit dem Anti-rabbit IgG-*capture*-Antikörper R96 beschichtet. Zur Bestimmung der Anzahl an anti-gp120-sezernierenden Zellen wurde eine zweite Platte mit rekombinantem gp140<sub>CN54</sub> beschichtet. Nach Blockieren unspezifischer Bindungen wurden je 100 µl einer entsprechenden Verdünnung der stimulierten PBMC ( $0,5-5 \times 10^5$  Zellen pro well) zugegeben und 15 h bei 37°C kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Waschen entfernt und die gebundenen Antikörper mit dem sekundären, AP-gekoppelten anti-rabbit-*detection*-Antikörper RG16 (1:5.000) detektiert. Die entstandenen *Spots* wurden ausgezählt. Die Gesamtzahl der Ig-sezernierenden Zellen war mit 60 bis 300 bei  $5 \times 10^5$  PBMC zu niedrig, um gp120-spezifische B-Zellen detektieren zu können. Als Kontrolle wurden PBMC eines nicht immunisierten Kaninchens vermessen und so der Hintergrund des spezifischen ELISPOT festgestellt (fünf *Spots*). Bei den mit *HIVgp120* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisierten Hasen konnten keine gp120-spezifischen B-Gedächtniszellen nachgewiesen werden, da die Anzahl detektierter *Spots* nicht über den Hintergrund hinausging (Daten nicht gezeigt).

### C.6.2 Zusammenfassung

Die Kaninchenimmunisierungen zeigten, dass die Fusion von drei hC3d-Kassetten die gegen gp120 gerichtete humorale Immunantwort nicht signifikant steigern konnte. Im Gegenteil, es wurde das Ergebnis der Mausstudie bestätigt, dass die Fusion von hC3d<sub>3</sub> einen negativen Einfluss auf die Höhe der Antikörpertiter hat. Die Titer der Tiere, die mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten immunisiert wurden, waren erst nach dem ersten Protein-*Boost* detektierbar und nach 63 Wochen nicht mehr nachweisbar. Im Gegensatz dazu war in der Langzeitstudie bei einem mit *HIVgp120* vakzinierten Kaninchen der Antikörpertiter nach 63 Wochen noch relativ hoch.

Für die Impfstudien wurde humanes C3d gewählt, da die Konstrukte später in humanen Impfstudien verwendet werden sollen. Die DNA-Immunisierungen zeigten, dass Kaninchen, im Gegensatz zu Mäusen (C.5.1.4), keine Antikörper gegen hC3d bildeten. Es betätigte sich die Vermutung, dass die höhere Aminosäuresequenzhomologie des humanen und des Kaninchen C3d-Proteins die Bildung von α-hC3d Antikörpern in Kaninchen unterdrückt. Für zukünftige Immunisierungsstudien sollte daher das Kaninchenmodell gewählt werden, um unerwünschte Effekte der Immunabwehr bei *Boost*-Immunisierungen zu vermeiden.

## **C.7 Design und Aufbau Gag<sub>III B</sub>-basierter virusähnlicher Partikel**

Mit virusähnlichen Partikeln (VLP, *virus-like particles*), die auf HIV-1 Gag (Pr55<sub>Gag</sub>) basieren, konnten in verschiedenen Tiermodellen bereits vielversprechende humorale und zelluläre Immunantworten induziert werden (Buonaguro *et al.*, 2007; Deml *et al.*, 2005; Doan *et al.*, 2005; Notka *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1996b; Young *et al.*, 2006). Diese virusähnlichen Partikel enthalten alle immunologisch relevanten Strukturen, aber keine ungewollten regulatorischen Proteine und kein infektiöses Material. Die kapsidprotein-basierten VLP von HIV-1 besitzen die Fähigkeit, sich selbst zu hochorganisierten partikulären Strukturen zusammenzulagern und können in großen Mengen produziert und aufgereinigt werden. Neben einer effizienten humoralen Immunantwort induzieren diese VLP auch eine effiziente CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zell-vermittelte Immunantwort. So konnten starke humorale Immunantworten nach VLP-Immunisierung in Mäusen, Kaninchen und in Rhesusaffen ausgelöst werden (Buonaguro *et al.*, 2007; Deml *et al.*, 1997b; Deml *et al.*, 2005; Kuate *et al.*, 2006; Montefiori *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 1996a). Zudem sind Pr55<sup>Gag</sup>-Partikel auch fähig, CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen in Rhesusmakaken zu stimulieren (Paliard *et al.*, 2000). *In vitro*-Versuche zeigten, dass HIV-basierte VLP auch humane CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stimulieren können (Tsunetsugu-Yokota *et al.*, 2003).

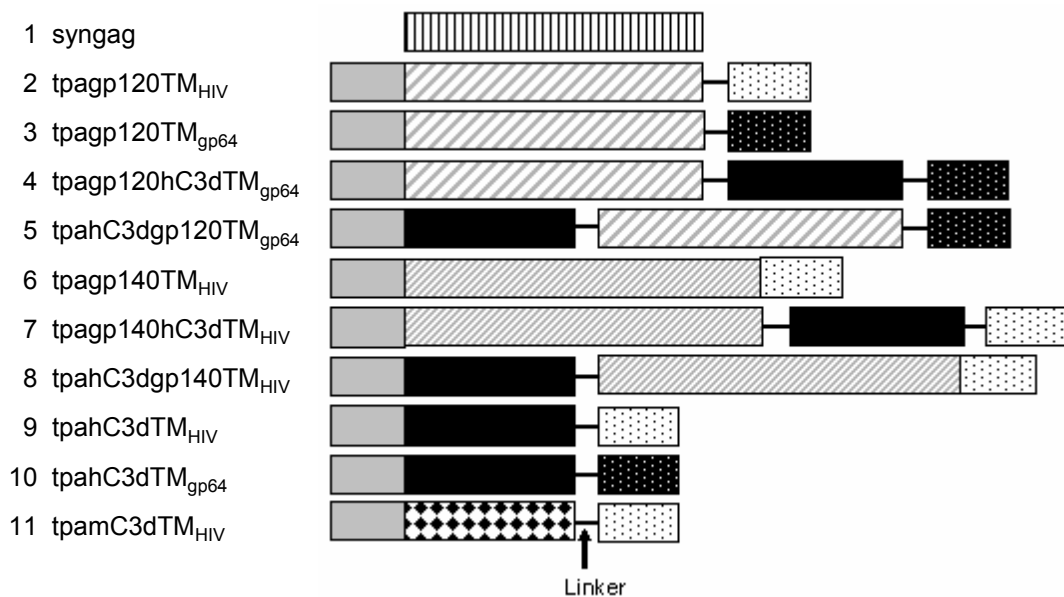
### **C.7.1 Herstellung verschiedener VLP-Varianten**

HIV-1 VLP werden durch Assemblierung der Pr55<sub>Gag</sub>-Proteine gebildet (siehe A.3.4.2). Um eine starke konstitutive Expression von Gag-Proteinen für die VLP sicher zu stellen, wurde ein synthetisch generiertes kodonoptimiertes syngag-Konstrukt verwendet (Bojak *et al.*, 2002). Dieses wurde in den multiplen Klonierungsbereich (*MCS*) des eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1 unter die Kontrolle des CMV-Promotors gesetzt (pcDNA3.1\_*syngag*<sub>III B</sub>, Abbildung C.21,1). Für die VLP wurde die kodonoptimierte Sequenz von syngag<sub>III B</sub> benutzt, da diese bereits in mehreren Studien eine gute Expression und Partikelbildung zeigte (Bojak *et al.*, 2002; Deml *et al.*, 2001; Deml *et al.*, 2005; Graf *et al.*, 2000; Graf *et al.*, 2004; Kofman *et al.*, 2003).

#### C.7.1.1 Herstellung verschiedener gp120- und gp140-VLP-Varianten

Die gp120- und gp140-Konstrukte wurden entweder unter der Kontrolle des SV40-Promotor auf dem pcDNA3.1\_*syngag*<sub>III B</sub>-Plasmid (gekennzeichnet mit S<sub>1</sub>) exprimiert, oder sie wurden unabhängig von syngag<sub>III B</sub> einzeln in den *MCS* von pcDNA3.1 unter die Kontrolle des CMV-Promotors gesetzt. Konstrukte 7 und 8 in Abbildung C.21 wurden nur als Einzelplasmide ohne syngag<sub>III B</sub> hergestellt. Für die Herstellung der unterschiedlichen gp120- und gp140-VLP-Konstrukte wurde eine auf Säugetierkodons optimierte Nukleinsäuresequenz von gp140 des *C-clade* Isolats CN54 (*acc no.*: AX149771) (Su *et al.*, 2000) und *tpa1gp120* (siehe C.2.1) verwendet. Durch PCR wurden die Sequenzen mit den

passenden Schnittstellen versehen und am 3'-OH-Ende mit den auf Säugetierkodons optimierten Transmembrandomänen von HIV-1 Env ( $TM_{HIV}$ ) oder vom baculoviralen Oberflächenprotein gp64 ( $TM_{gp64}$ ) versehen (Abbildung C.21, 2-3, 6). Die Sekretion der Konstrukte wurde durch die Signalsequenz *tpa1* sichergestellt, die vor gp120 beziehungsweise gp140 gesetzt wurde. In den Expressionsversuchen konnte kein Unterschied zwischen der *HIV*- und der *tpa1*-Signalsequenz hinsichtlich der Sekretionseffizienz festgestellt werden (siehe Abbildung C.5). Daher wurde aus klonierungstechnischen Gründen die Signalsequenz *tpa1* gewählt. Um zu überprüfen, ob die Fusion von C3d mit gp120 oder gp140 Auswirkung auf Expression, VLP-Bildung oder Immunantwort hat, wurde entweder am 5'- oder am 3'-Ende von gp120 beziehungsweise gp140 eine synthetisch hergestellte kodonoptimierte humane C3d Kasette kloniert (Abbildung C.21, 4-5, 7-8). Als Kontrollen wurde entweder eine humane (*hC3d*) oder eine murine C3d-Kasette (*mC3d*) mit der Signalsequenz *tpa1* und der Transmembrandomänen  $TM_{HIV}$  beziehungsweise  $TM_{gp64}$  verwendet (Abbildung C.21, 9-11). Eine Übersicht über die hergestellten Konstrukte gibt Abbildung C.21.



**Abbildung C.21: Schema der RNA- und kodonoptimierten VLP-Konstrukte.** Detaillierte Beschreibung der Konstrukte im Text. Die kodonoptimierte *syngag<sub>III</sub>*-Sequenz ist durch ein quergestreiftes Feld dargestellt. Die Sequenzen von gp120 und gp140 sind als breit bzw. eng diagonal gestreifte Felder abgebildet. Die verwendete Signalsequenz von *tpa1* ist grau unterlegt. Die humane C3d Kasette wird durch ein schwarzes Feld repräsentiert, murines C3d durch ein kariertes. Der Sequenz der ( $G_4S$ )<sub>2</sub>-Linker entspricht eine schwarze Linie. Die Transmembrandomänensequenz von HIV-1 Env ist durch schwarze Punkte auf weißem Grund, die von gp64 durch weiße Punkte auf schwarzem Grund gekennzeichnet.

### C.7.1.2 Herstellung von oberflächenexponiertem humanem und murinem C3d

In C.5.1.4 wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung von humanem C3d in Mausimmunisierungsstudien zur Bildung von  $\alpha$ -hC3d Antikörpern führt. Um den Einfluss von autologem C3d oder spezieisfremdem C3d zu untersuchen, wurde neben dem bereits in der DNA-Immunisierungsstudie (siehe C.5.1) eingesetzten hC3d-Konstrukt zusätzlich ein murines C3d-Konstrukt generiert. Für die Expression auf der Oberfläche der VLP fand nur die erste Kasette des humanen C3ds Verwendung, da zu erwarten war, dass die Oberflächendichte der C3d-Proteine für eine verstärkte Aktivierung des Immunsystems ausreicht. Ein großer Vorteil der Expression einer einzigen Kasette liegt in der schnelleren und somit stärkeren Transkription und Translation. Die mit einer Transmembrandomäne (entweder  $TM_{HIV}$  oder  $TM_{gp64}$ ) versehenen C3d-Konstrukte wurden unter der Kontrolle des CMV- oder des SV40-Promoters exprimiert. Die Ausschleusung der C3d-Proteine für die Präsentation an der Oberfläche wurde durch die Verwendung der *tpa1*-Signalsequenz garantiert.

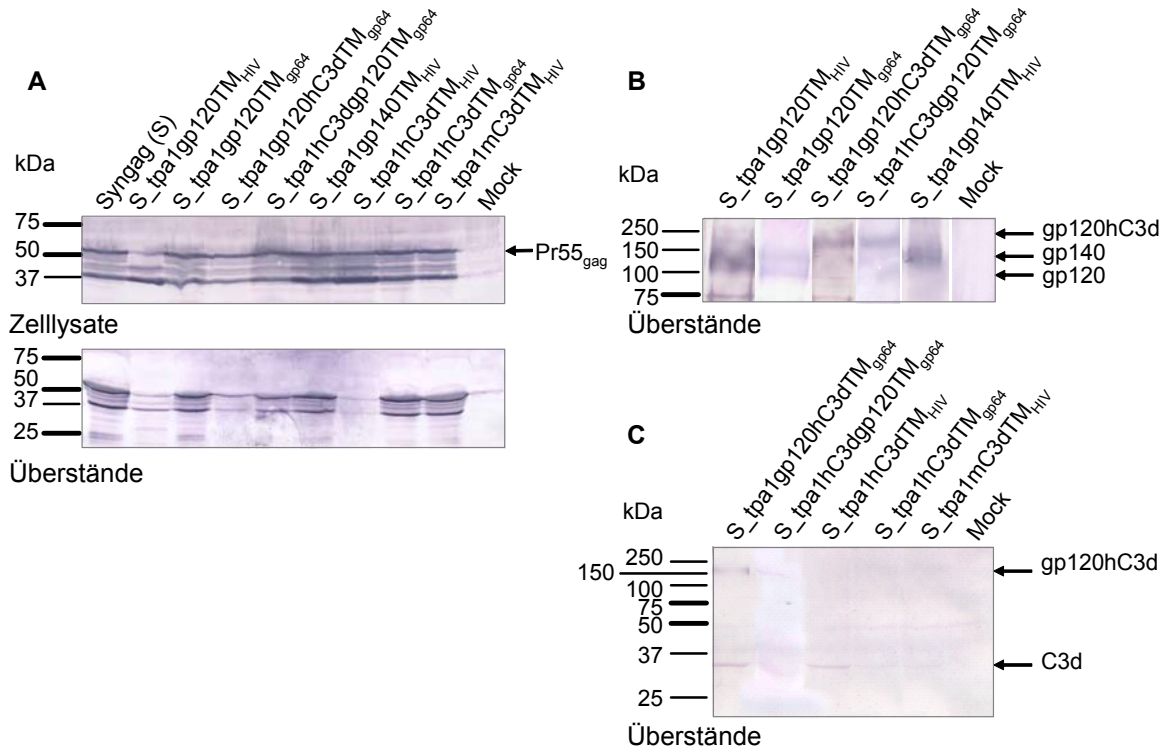
### C.7.1.3 Vergleich zweier verschiedener Transmembrandomänen

Virusähnliche Partikel sind von einer Lipiddoppelmembran umgeben, in der die Env- und C3d-Domänen fixiert sind. Die Verankerungen dieser Oberflächenproteine sollten einerseits relativ kurz sein, um eine große Oberflächendichte der exprimierten Domänen zu erreichen und andererseits eine stabile Befestigung zu bieten, damit die spezifischen Immunogene dauerhaft präsentiert werden. In diesem Versuchsansatz wurden zwei verschiedene Transmembrandomänen hinsichtlich ihrer Eignung für die VLP-Produktion überprüft. Die kodonoptimierte verkürzte Transmembrandomäne von HIV-1 Env ( $TM_{HIV}$ ) wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden  $TM_{HIV}fwd$  sowie  $TM_{HIV}back$  und der Matrize gp140TM amplifiziert. Die Transmembrandomäne des baculoviralen Oberflächenproteins gp64 ( $TM_{gp64}$ ) wurde durch PCR mit den Oligonukleotiden  $TM_{gp64}fwd$  und  $TM_{gp64}back$  und der kodonoptimierten Sequenz von gp64 amplifiziert. Mit Hilfe der angefügten Schnittstellen *Apal* und *PmeI* wurden die Transmembrandomänen an das 3'OH-Ende von C3d, gp120 und gp140 kloniert.

## C.7.2 Erfolgreiche Expression und VLP-Formation nach transienter Transfektion der VLP-DNA-Konstrukte

Für die Bildung immunogener VLP ist es notwendig, dass die verschiedenen Oberflächenproteine in ausreichender Zahl und stabil in der Membran verankert werden. Sowohl die Assemblierung als auch die Knospung der Partikel finden nach der Expression von Gag selbstständig statt. Um die Expression und die Partikelbildung der in C.7.1 beschriebenen VLP nachzuweisen, wurde die humane Zelllinie 293T mit den DNA-Plasmiden transient transfiziert. Die gp120-/gp140-Konstrukte, die auf dem gleichen Plasmid syngag<sub>IIIb</sub> enthalten, wurden mit „S\_“ gekennzeichnet. Achtundvierzig Stunden nach Transfektion wurden die Zelllysate und die Kulturüberstände präpariert und gp120,

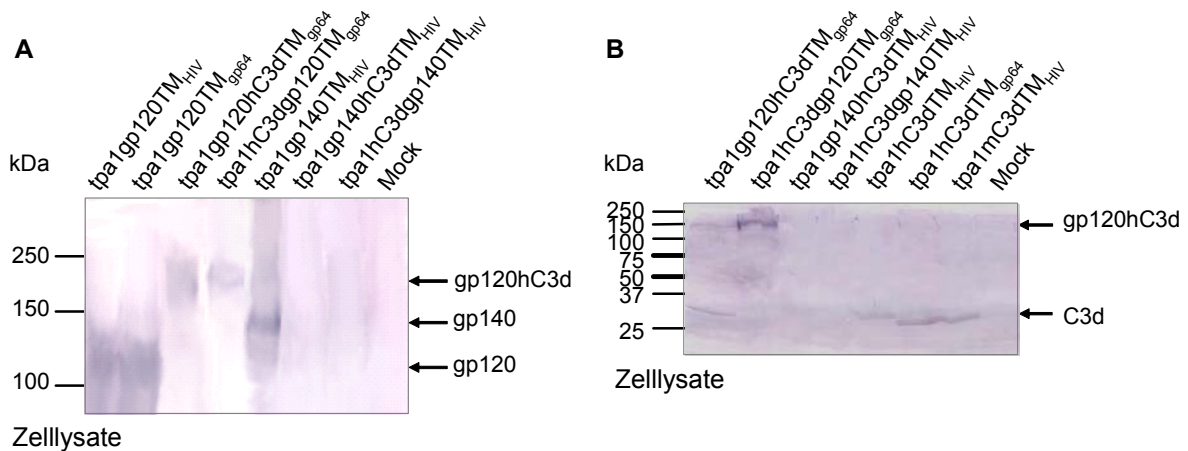
gp140, hC3d, mC3d und Gag mittels Immunoblot-Analysen unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen (siehe Abbildung C.22).



**Abbildung C.22: Expression und Partikelformation der VLP nach transienter Transfektion in 293T-Zellen.** 293T-Zellen wurden mit 3 µg der angegebenen Plasmid-DNA mittels Fugene transient transfiziert und Zellen und Kulturüberstände nach 48 h abgenommen. Als Negativkontrolle diente der Vektor pcDNA3.1 (mock). Fünzig Mikrogramm Gesamtprotein der Zelllysate und 30 µl der zellfreien Überstände wurden auf ein 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. **(A)** Die Expression und Sekretion von syngag<sub>III</sub>B (S) wurde durch eine Western Blot Analyse mittels eines Gag<sub>p24</sub>-spezifischen monoklonalen Antikörpers (13/5) verifiziert (siehe Tabelle B.4). **(B)** Detektion der gp120, gp140 und gp120hC3d Proteine auf den sezernierten VLP wurde mit einem gp120-spezifischen polyklonalen Antikörper (ARP422) durchgeführt. **(C)** Detektion der hC3d, mC3d und gp120hC3d Proteine auf den sezernierten VLP mit einem hC3d-spezifischen monoklonalen Antikörper (ab17453). Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben. Pro Konstrukt wurde jeweils eine repräsentative Transfektion aufgetragen.

Die Expression und Sekretion von Pr55<sub>Gag</sub> konnte in Zelllysaten und Zellkulturüberständen aller syngag<sub>III</sub>B-transfizierten Zellen in der erwarteten Proteingröße von 55 kDa nachgewiesen werden (Abbildung C.22A). Lediglich das Konstrukt S\_tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub> wies nur eine sehr schwache Sekretion von syngag auf. Die Überprüfung der Sequenz zeigte keinerlei Abweichungen, daher muß davon ausgegangen werden, dass unter Umständen eine Punktmutation im Vektorrückgrat verantwortlich war. Die Sekretion von gp120, gp140 und gp120hC3d-Varianten war trotz der gleichzeitig synthetisierten syngag-Proteine gut und konnten in der erwarteten Höhe von 120 kDa, 140 kDa und 150 kDa detektiert werden (Abbildung C.22B). Ferner konnte die Sekretion von hC3d, mC3d und gp120hC3d in der erwarteten Proteingröße von ca. 30 kDa nachgewiesen werden (Abbildung C.22C). Allerdings war die Einlagerung der C3d-Konstrukte in die VLP eher gering. Bei den

gp120hC3d-Konstrukten konnte neben der erwarteten Bande von ca. 150 kDa eine zusätzliche Bande bei ca. 30 kDa detektiert werden, die vermutlich von Abspaltungsereignissen des hC3d-Proteins herrührt. Die Detektion der Proteine erfolgte im Zellkulturüberstand, daher kann angenommen werden, dass sie auf den durch Pr55<sub>Gag</sub> gebildeten VLP fest verankert sind. In verschiedenen Western Blot-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass die Proteine, die durch Scherung von der Zelloberfläche in den Überstand gelangen vernachlässigbar sind (Daten nicht gezeigt). Die Western Blot-Analyse des Zellkulturüberstands beweist, dass VLP gebildet werden und gp120, gp140, hC3d, mC3d oder Varianten davon ungeachtet der verschiedenen Transmembrandomänen auf der VLP-Oberfläche eingebaut werden.



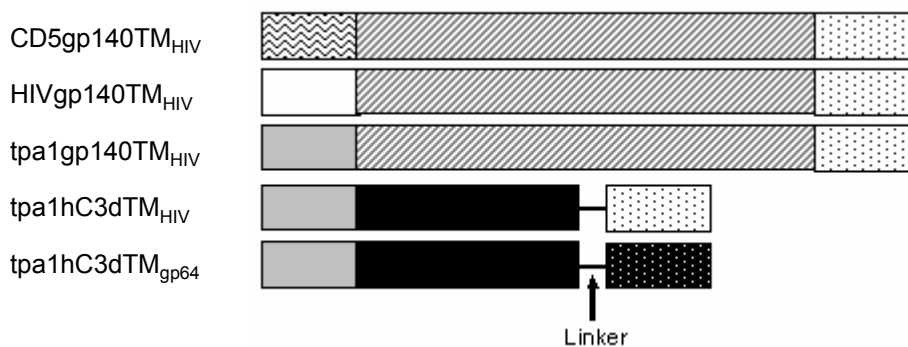
**Abbildung C.23: Expression der gp120-/gp140-Varianten auf der Zelloberfläche von 293T-Zellen.** 293T-Zellen wurden mit 3 µg der angegebenen Plasmid-DNA mittels Fugene-Technologie transient transfiziert und Zellen und Kulturüberstände nach 48 h abgenommen. Als Negativkontrolle diente der Vektor pcDNA3.1 (mock). Fünzig Mikrogramm Gesamtprotein der Zellysate und 30 µl der zellfreien Überstände wurden auf ein 7,5%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. **(A)** Der Expressionnachweis der gp120-, gp140- und gp120-/gp140hC3d-Proteine erfolgte mit einem gp120-spezifischen polyklonalen Antikörper (ARP422). **(B)** Detektion der hC3d-, mC3d- und gp120-/gp140hC3d-Proteine wurde mit einem hC3d-spezifischen monoklonalen Antikörper (ab17453) durchgeführt. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben. Pro Konstrukt wurde jeweils eine repräsentative Transfektion aufgetragen.

Neben den syngag-kodierenden gp120-/gp140-Varianten wurden zusätzlich DNA-Konstrukte kloniert, die gp120, gp140, hC3d, mC3d und Varianten davon unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren sollten. In Abbildung C.23 ist eine Western Blot-Analyse der transfizierten DNA-Konstrukte dargestellt. Die Expression von gp120, gp140, hC3d, mC3d, gp120hC3d und hC3dgp120 konnte gezeigt werden, nur bei den Konstrukten *tpa1gp140hC3dTM<sub>gp64</sub>* und *tpa1hC3dgp140TM<sub>gp64</sub>* war keine Expression nachweisbar. Im Konstrukt gp140hC3d konnte ein Frameshift für die fehlende Proteinbildung verantwortlich gemacht werden, aber bei dem Konstrukt hC3dgp140 konnte die Ursache der fehlenden Proteinsynthese nicht gefunden werden. Bis auf *tpa1gp140hC3dTM<sub>gp64</sub>* und *tpa1hC3dgp140TM<sub>gp64</sub>* können somit alle Konstrukte für die effektive VLP-Produktion in stabilen Zelllinien verwendet werden.

### C.7.3 Effiziente Expression von gp140TM und hC3dTM in stabilen Zelllinien

#### C.7.3.1 Herstellung der stabilen Zelllinien

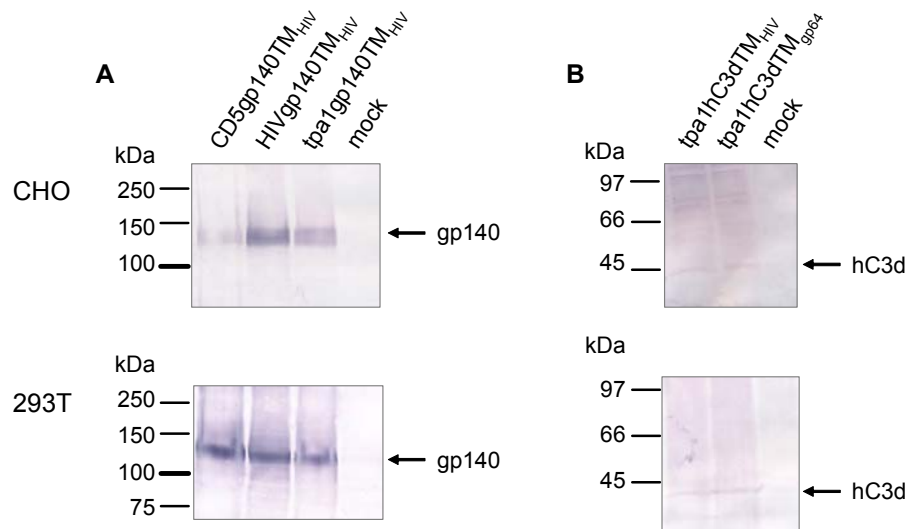
Um zu gewährleisten, dass eine mit syngag transfizierte Zelle auch die entsprechenden Env- und C3d-Konstrukte exprimiert, wurden folgende stabile Zelllinien generiert: *CD5gp140TM<sub>HIV</sub>*, *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>* und *tpa1gp140TM<sub>HIV</sub>*, sowie *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* und *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* wurden über die Schnittstellen *NheI* und *PmeI* in den Vektor pcDNA5/FRT kloniert und durch Selektion stabile Zelllinien generiert (siehe Abbildung C.24). Die Herstellung von *tpa1gp140TM<sub>HIV</sub>*, *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* und *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* ist in Abschnitt C.7.1 beschrieben. Für die Konstruktion von *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>* wurde die aus der Arbeitsgruppe erhaltene kodonoptimierte gp140TM-Sequenz durch PCR mit den Oligonukleotiden *cenvF1\_A* und *TM<sub>HIV</sub>back* vervielfältigt. Mit den Schnittstellen *BsmBI* und *PmeI* erfolgte die Klonierung des PCR-Fragments an das 3'OH-Ende der HIV-Signalsequenz, die über *NheI* und *HindIII* in den Vektor pcDNA5/FRT gesetzt wurde. Das synthetische Signalpeptid *CD5* wurde bereits in der ursprünglich erzeugten gp140TM<sub>HIV</sub>-Sequenz verwendet. Für die Herstellung von *CD5gp140TM<sub>HIV</sub>* konnte daher das gesamte Konstrukt über PCR mit den Oligonukleotiden *CD5fwd* und *TM<sub>HIV</sub>back* amplifiziert und über *NheI* und *PmeI* in den Vektor pcDNA5/FRT transferiert werden. Der Vektor ermöglicht unter Verwendung des Flp-In™ Systems die gezielte Integration einer Kopie des Transgens in einen definierten Locus der Zielzelle. Als weitere Komponente enthält der Vektor pcDNA5/FRT einen eukaryontischen Selektionsmarker (Hygromycin), der die Generierung stabiler Zelllinien gewährleistet.



**Abbildung C.24: Schema der RNA- und kodonoptimierten Konstrukte zur Herstellung stabiler Zelllinien.** Detaillierte Beschreibung der Konstrukte im Text. Die Sequenz von gp140 ist als eng diagonal gestreiftes Feld abgebildet. Die synthetische Signalsequenz CD5 ist mit einem Wellenmuster, die Signalsequenz HIV ist weiß und die tpa1 grau dargestellt. Die humane C3d-Kassette wird durch ein schwarzes Feld repräsentiert, die Sequenz der (G<sub>4</sub>S)<sub>2</sub>-Linker durch eine schwarze Linie und die Transmembrandomänensequenz von HIV-1 Env durch schwarze Punkte auf weißem Grund, die von gp64 durch weiße Punkte auf schwarzem Grund.

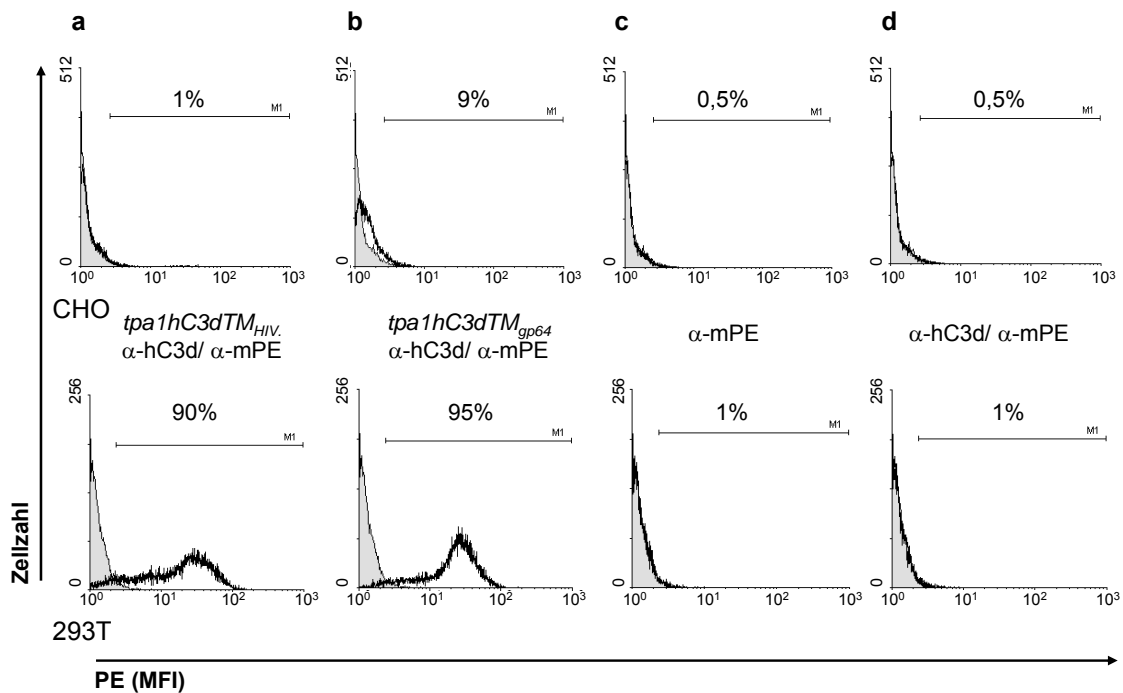
Es wurden zwei unterschiedliche Säugetierzelllinien verwendet, um auszutesten, ob sich die Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression oder in ihrem Transfektionsverhalten unterscheiden. Beide Zelllinien ließen sich auf 99% positive, Transgen-exprimierende

Zellen selektionieren. In diesen Zellen befand sich je eine Kopie des Transgens unter der Kontrolle des eukaryontischen CMV-Promotors. Die Proteinexpression der Klone wurde in Western Blot-Analysen überprüft. Zellysate der stabilen Zellen wurden für den Proteinnachweis verwendet und die Expression mit  $\alpha$ -gp120 beziehungsweise  $\alpha$ -hC3d detektiert. Für alle Genvarianten konnte in den jeweiligen stabilen CHO- sowie 293T-Zellen gp140 (140 kDa) und hC3d (44 kDa) nachgewiesen werden (siehe Abbildung C.25).



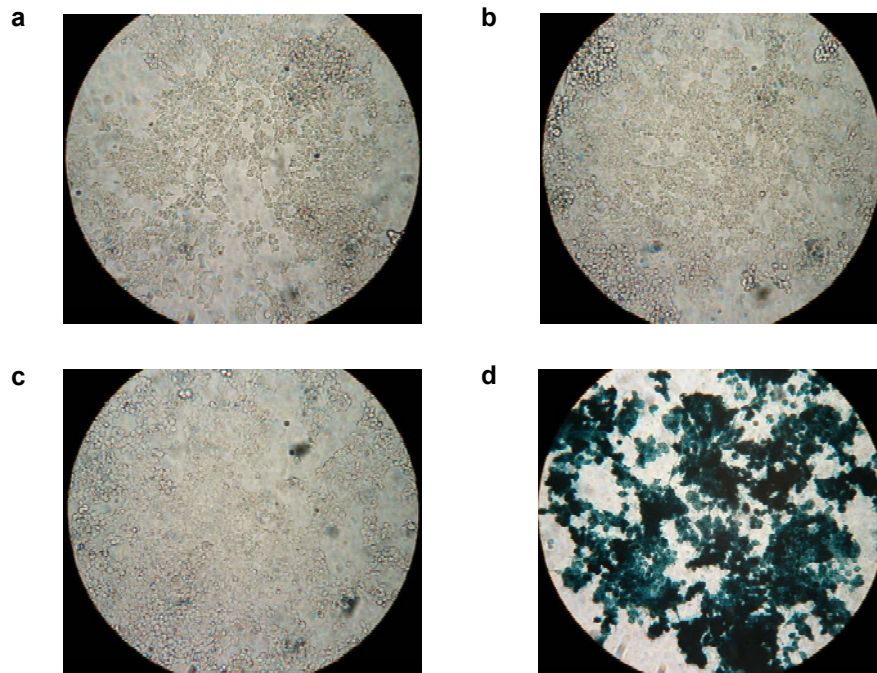
**Abbildung C.25: Western Blot-Analyse der stabil exprimierenden CHO- bzw. 293T-Zelllinien.** Wie unter B.2.4 beschrieben wurden stabil gp140TM bzw. hC3dTM exprimierende CHO- sowie 293T-Zellen etabliert. Nach Selektion wiesen beide Zellpopulationen mehr als 99% positive, Transgen-exprimierende Zellen auf. **(A)** Jeweils 50  $\mu$ g Gesamtprotein gp140TM<sub>HIV</sub>-produzierender Zellen (Spur 1,2,3) sowie mock-transfizierter Zellen (Spur 4) wurde aufgetragen. In der Western Blot-Analyse wurde gp140 mit dem polyklonalen  $\alpha$ -gp120 aus Kaninchenserum gefärbt und über einen AP-gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen Antikörper detektiert. In **(B)** wurde 50  $\mu$ g Gesamtprotein hC3dTM<sub>HIV</sub>- (Spur 5) oder hC3dTM<sub>gp64</sub>-exprimierender Zellen (Spur 6) sowie mock-transfizierter Zellen (Spur 7) aufgetragen. Exprimiertes hC3d wurde mit monoklonalem  $\alpha$ -hC3d aus Maushybridomen durch einen AP-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper nachgewiesen.

Die Expression von hC3d durch die stabilen Zellen konnte durch die Western Blot-Analyse nicht eindeutig nachgewiesen werden, da die Banden im Vergleich zum Hintergrund relativ schwach waren. Daher folgte der Versuch, die Expression von hC3d auf der Zelloberfläche durch eine FACS-Analyse der stabilen Zellen zu zeigen. Mittels eines  $\alpha$ -hC3d spezifischen Antikörpers, der durch einen PE-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper detektiert wurde, konnte das exprimierte humane C3d gefärbt werden. In Abbildung C.26 zeigte sich, dass die stabilen 293T-Zellen eine starke hC3d-Expression aufwiesen, während hingegen die stabilen CHO-Zellen hC3d nur gering oder gar nicht exprimierten. CHO-Zellen, die stabil mit *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* transfiziert waren, zeigten keinerlei hC3d Expression, diejenigen, die mit *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* transfiziert waren, wiesen nur eine geringe Expression auf.



**Abbildung C.26: Nachweis von hC3d-Expression auf stabilen CHO- und 293T-Zelllinien.** Die stabilen Zellen wurden mittels eines spezifischen  $\alpha$ -hC3d Antikörper gefärbt, der durch einen PE-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper ( $\alpha$ -mPE) detektiert wurde. Gefärbt wurden stabile CHO-Zellen und stabile 293T-Zellen, die entweder mit *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* (a) oder *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* (b) transfiziert waren. Als Negativkontrollen wurden nicht transfizierte 293T-Flp-In-Zellen mit  $\alpha$ -mPE allein (c) oder mit  $\alpha$ -hC3d und  $\alpha$ -mPE gefärbt (d). Nicht gefärbte Zellen sind als graue Fläche dargestellt. Für die FACS-Analyse wurden jeweils 20.000 Zellen aufgenommen. Auf der Y-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgetragen. Auf der X-Achse ist die *Mean fluorescence intensity* (MFI) dargestellt.

Die stabilen CHO-Zellen zeigten eine schwächere Expression von hC3d (siehe Abbildung C.26) und teilweise auch von gp140 (siehe Abbildung C.25) und wurden daher für weitergehende Experimente nicht mehr verwendet. Der Nachweis der gp140-Expression konnte nicht im FACS erfolgen, da die Env-spezifischen Antikörper ungeeignet für den Expressionsnachweis waren. Daher wurde eine LacZ-Analyse durchgeführt, um zusätzlich zu überprüfen, ob die generierten 293T-Zelllinien positiv für die Expression des Transgens waren. Ein funktionsfähiges *lacZ*-Gen liegt nur in Flp-In-Zellen vor, in die das Transgen nicht einrekombiniert wurde. Das Genprodukt des *lacZ*-Gens, die  $\beta$ -Galaktosidase, kann das farblose Substrat X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktosid) spalten und in das tiefblaue 5-Brom-4-Chlor-Indigo umsetzen. Mit dieser Färbung kann die Zerstörung des *lacZ*-Gens und die erfolgreiche Rekombination nachgewiesen werden. Die mit *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>* (a) und *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* (b) stabil transfizierte 293T-Zellen, 293T-Flp-In Zellen und normale 293T Zellen wurden durch Färbung mit X-Gal analysiert. In Abbildung C.27 ist deutlich zu sehen, dass keine Blaufärbung der stabil transfizierten Zellen stattfand (a, b). Die stabilen Zellen wurden folglich zu fast 100% auf das Transgen hin selektioniert. Als Negativkontrolle wurden normale 293T-Zellen verwendet, die kein *lacZ*-Gen enthalten (c) und als Positivkontrolle 293T Flp-In Zellen, die ein intaktes *lacZ* besitzen (d).

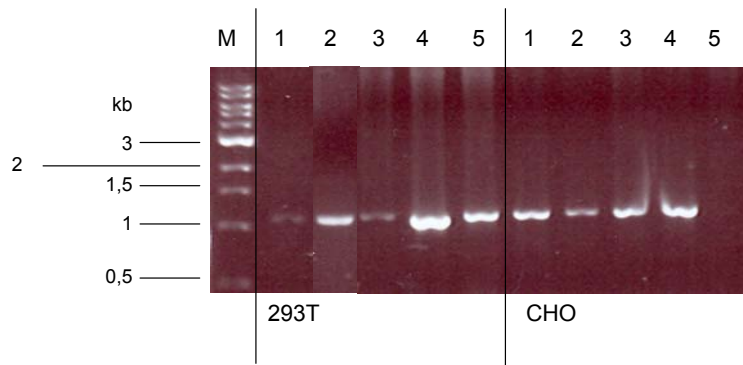


**Abbildung C.27: LacZ-Analyse der stabil gp140- bzw hC3d-exprimierenden 293T-Zelllinien.** Wie unter B.2.4 beschrieben, wurden stabil gp140- (a) beziehungsweise hC3d- (b) exprimierende 293T-Zellen etabliert. Nach der Hygromycinselektion wiesen alle Zellpopulationen mehr als 99% positive, gp140 bzw. C3d exprimierende Zellen auf. Als Negativkontrolle wurden 293T Zellen (c) und als Positivkontrolle 293TFlp-In-Zellen (d) verwendet.

Um zu überprüfen, ob die gewünschten Transgene korrekt rekombiniert waren, wurde die genomische DNA der stabilen Zellen isoliert und eine spezifische PCR durchgeführt, gefolgt von einer Sequenzierung. In diesem Versuch wurden die stabilen CHO-Zellen auch getestet, um zu ergründen, ob eine fehlerhafte Gensequenz des Transgens für die fehlende beziehungsweise geringe Expression verantwortlich war. Die genomische DNA wurde aus den stabilen Zellen isoliert und als Matrize für spezifische Gradienten-PCR-Experimente mit den Oligonukleotiden hC3d1fwd/TM<sub>HIV</sub>back (5) beziehungsweise TM<sub>gp64</sub>back (4) und cenv981f/TM<sub>HIV</sub>back (1, 2, 3) analysiert (siehe Abbildung C.28). Als Kontrollen wurden die isolierten DNAs mit den jeweils unpassenden Oligonukleotiden eingesetzt, um zu sehen, ob spezifische Banden erkennbar sind. Es waren keine falsch positiven Banden erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Die Durchführung der spezifischen PCR ergab, dass außer dem Transgen *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* in stabilen CHO-Zellen alle Transgene korrekt amplifiziert wurde. Die Fragmente der spezifischen PCR wurden mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* aufgereinigt und anschließend sequenziert. Durch den Vergleich mit den Ursprungssequenzen konnte festgestellt werden, dass *tpa1gp140TM<sub>HIV</sub>* eine Deletion von drei Basen in der Transmembrandomäne in beiden stabilen Zelllinien aufwies. In den stabilen CHO-Zelllinien zeigte *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* eine Insertion von 30bp in hC3d und *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* konnte gar nicht nachgewiesen werden. Diese Zelllinie entstand vermutlich durch eine Spontanmutation, die zu einer hohen Hygromycinresistenz führte. Die Sequenzierung bestätigte zudem die Daten der Western Blot Analyse (Abbildung

C.25), der FACS-Analyse (Abbildung C.26) und der Mikroskopieaufnahmen (Abbildung C.27), wonach fast alle 293T-Zelllinien das richtige Transgen stabil exprimierten und die beiden hC3d-stabilen CHO-Zelllinien keine oder nur eine geringe Expression zeigten.

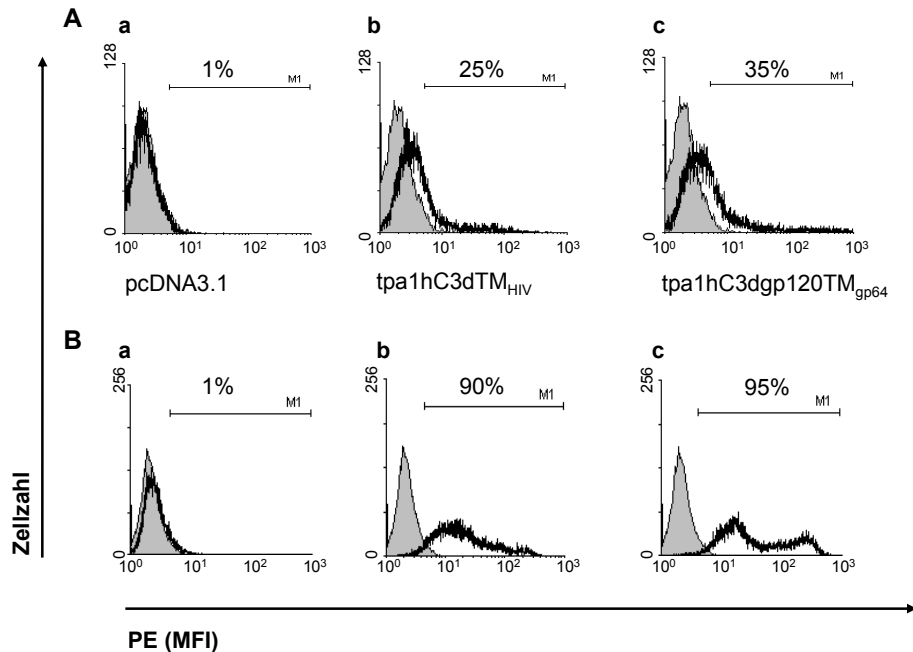


**Abbildung C.28: PCR über isolierte genomische DNA der stabilen CHO- und 293T-Zelllinien.** Nach Aufreinigung der genomischen DNA aus den stabil transfizierten 293T- und CHO-Zellen wurde mit einer spezifischen PCR mit den Oligonukleotiden *cenv981f/TM<sub>HIV</sub>back* und *TM<sub>gp64</sub>back* sowie *hC3d1fwd/TM<sub>HIV</sub>back* und *TM<sub>gp64</sub>back* überprüft, ob die Transgene enthalten waren. Aufgetragen sind die PCRs der mit *CD5gp140TM<sub>HIV</sub>* (1), *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>* (2), *tpa1gp140TM<sub>HIV</sub>* (3), *tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>* (4) und *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* (5) stabil transfizierten Zellen. Der DNA-Längenstandard ist mit M gekennzeichnet.

#### C.7.3.2 Transiente Transfektion der stabilen Zelllinien führt zu einer Verringerung der Transgenexpression

Zur Klärung der Frage, ob die stabilen Zelllinien auch nach transienter Transfektion verschiedener VLP-Konstrukte eine gute Expression aufweisen, wurden die stabil *gp140TM<sub>HIV</sub>*-produzierende Zelllinie transient mit *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* oder *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* transfiziert und durch FACS-Analysen überprüft (siehe Abbildung C.29A). Interessanterweise war die hC3d-Expression der transient transfizierten *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>*-Konstrukte nur bei 25% der Zellen nachweisbar, die der *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>*-Konstrukte bei 35% der Zellen. Die geringere Anzahl an positiven Zellen nach transienter Transfektion mit *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* ist eventuell durch die Verwendung unterschiedlicher Transmembrandomänen erklärbar. Es wurde nicht erwartet, dass die Verwendung des CMV-Promoters für das stabil integrierte Transgen und für das transient transfizierte Konstrukt die Expression so stark verringern würde. Möglicherweise war auch die Transfektionseffizienz nicht optimal. Die Expression *gp140TM* konnte zwar im FACS nicht vermessen werden, da der  $\alpha$ -*gp120<sub>CN54</sub>* Antikörper im FACS zu unspezifisch reagierte, aber die Western Blot-Analyse belegte bereits eine sehr gute Expression des stabil integrierten Transgens (siehe Abbildung C.25). Somit konnte von einem ähnlichen Wert für die stabile *gp140TM*-Zelllinie ausgegangen werden. Die transiente Transfektion von nicht stabilen 293T-Zellen mit *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* ergab bis zu 90% hC3d-positive Zellen, mit *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* sogar bis zu 95% hC3d-positive Zellen (Abbildung C.29B). Die Konstrukte an sich zeigten eine sehr gute Expression, folglich musste die verringerte Expression mit der Konkurrenz der CMV-Promotoren um

Transkriptionsfaktoren, oder mit der Konkurrenz der Transkripte um Translationsfaktoren zusammenhängen.



**Abbildung C.29: FACS-Analyse der transient transfizierten stabilen Zellen.** Es wurden **(A)** stabil gp140TM-exprimierende Zellen transient mit pcDNA3.1 (a), pcDNA3.1\_tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub> (b), oder pcDNA3.1\_tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub> (c) transfiziert. **(B)** Die Expression wurde zusätzlich in nicht stabilen 293T-Zellen mittels transients Transfektion von pcDNA3.1 (a), *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* (b) und *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* (c) überprüft. Der Expressionsnachweis erfolgte durch  $\alpha$ -hC3d und einem PE-gekoppelten  $\alpha$ -Maus Antikörper. Für die FACS-Analyse erfolgte die Vermessung von insgesamt 20.000 Zellen pro Färbung. Nicht gefärbte Zellen sind als graue Fläche dargestellt. Auf der Y-Achse ist die gemessene Zellzahl aufgetragen. Auf der X-Achse ist die *Mean fluorescence intensity* (MFI) dargestellt.

#### C.7.4 Zusammenfassung

Es wurden VLP kloniert, die pcDNA3.1 als Grundvektor benutzten und unter der Kontrolle des CMV-Promoters entweder syngag<sub>IIIb</sub>, C3dTM, gp120TM oder gp140TM exprimierten. Die damit produzierten VLP sollten durch die Kombination von HIV-1 Gag, Env und C3d die Immunantwort optimal stimulieren. Die transiente Transfektion der VLP-DNA-Konstrukte war vielversprechend und sowohl die Expression, als auch die Partikelbildung der VLP konnte gezeigt werden. Versuche von transienten Transfektionen stabiler Zelllinien offenbarten eine ausreichende Expression von Env und C3d auf der Zelloberfläche. Diese können daher für die Herstellung Env- oder C3d-tragender Gag-VLP verwendet werden. Immunologische Studien der hier klonierten VLP sollen in zukünftigen Arbeiten genauer untersucht werden.

## D Diskussion

---

### **D.1 Anforderungen an eine erfolgversprechende HIV-1-Vakzine**

Bisher konnte keine Vakzine ausreichenden Schutz vor der HIV-Infektion bieten (Burton *et al.*, 2004; Day, 2007; McMichael, 2006), denn eine effektive HIV-1-Vakzine muss sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten induzieren (Hinkula, 2007; Johnston & Fauci, 2007; Lehner & Anton, 2002). Dabei erwiesen sich Lebendimpfstoffe, rekombinante virale Vektoren, sowie DNA-Expressionsplasmide als am besten geeignet (Bergmeier & Lehner, 2006; Buonaguro *et al.*, 2007; Girard *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006; Rollman *et al.*, 2007; Tonks, 2007). DNA-Plasmide haben dabei den entscheidenden Vorteil, dass nach der Immunisierung durch den Körper wandern und verschiedenste Zellen transfizieren können (Boyle & Robinson, 2000; Sheets *et al.*, 2006; Tuomela *et al.*, 2005). Mit Hilfe verschiedener Modifikationen von DNA-Impfstoffen, wie Kodonoptimierung (Graf *et al.*, 2004), auf der DNA kodierte Zytokine (Barouch, 2006; Jiang *et al.*, 2007; Lori *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006a), CpG-Maximierung (Klinman *et al.*, 2004; Krieg, 2002) und Fusion molekularer Adjuvantien (Applequist *et al.*, 2005; Dempsey *et al.*, 1996; Nayak *et al.*, 2006; Scheerlinck, 2001) kann die Stimulation des Immunsystems intensiviert werden. Um eine effektive humorale als auch zelluläre Immunantwort gegen HIV-1 Env mit einer DNA-Vakzine zu induzieren, wurde daher in der vorliegenden Arbeit eine Kombination aus zwei verschiedenen Strategien angewendet: Erhöhung der Proteinexpressionsrate mittels RNA- und kodonoptimierter Gensequenzen und Fusion des molekularen Adjuvans C3d<sub>3</sub>.

### **D.2 Kodonoptimierte gp120-Konstrukte weisen eine gute Expression und Sekretion im Zellkultursystem auf**

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Höhe der Proteinexpression in Säugerzellen von HIV-1 Env Wildtypsequenzen 10-100 mal geringer ist, als die von Sequenzen, die auf den Gebrauch von Säugetierkodons optimiert wurden (Andre *et al.*, 1998; Haas *et al.*, 1996; Vinner *et al.*, 1999). Säugerzellen, die mit gp120- und gp120mC3d<sub>3</sub>-kodierenden Plasmiden transient transfiziert wurden, sezernierten sieben- bis zehnfach höhere Mengen an Protein als entsprechende Wildtypsequenzen (Bower *et al.*, 2005). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass die autologe Signalsequenz von Env (*HIV*) zu einer verringerten Sekretion von Env führt (Li *et al.*, 2000) und die Verwendung der Signalsequenz des *tissue plasminogen activators (tpa)* die Sekretion erhöht (Wang *et al.*, 2006b). Um zu überprüfen, ob diese Studien auf die neu generierten und kodonoptimierten DNA-Konstrukte übertragbar sind, wurden Expression und Sekretion von gp120 in Säugerzellen bestimmt.

### **D.2.1 Verwendung unterschiedlicher Signalpeptidvarianten führt zu einer gleichmäßig hohen gp120-Sekretion**

Für die Stimulation des Immunsystems können die exprimierten Proteine einer DNA-Vakzine entweder durch Fusion einer Transmembrandomäne auf der produzierenden Zelle präsentiert, oder von der Zelle in hohem Maß sezerniert werden. Der Vorteil bei der Sekretion der Proteine liegt darin, dass diese mit der Abgabe in den Extrazellularraum und in das Blut in andere Immunkompartimente gelangen und somit zu einer breiteren Immunantwort beitragen können. Für die Ausschleusung der Proteine an die Oberfläche der Zelle wird in jedem Fall ein Signalpeptid vor der Antigensequenz benötigt. Übersicht in (von Heijne, 1983; von Heijne, 1985; Walter & Lingappa, 1986). Alle bisher untersuchten eukaryontischen Signalpeptide setzen sich aus drei Regionen zusammen: eine positiv geladene N-terminale Region, einen zentralen hydrophoben Kernbereich (7-15 Aminosäuren) und eine polare C-terminale Region, die die Spaltstelle der Signalpeptidase beinhaltet (siehe Abbildung D.1) (von Heijne, 1985). Signalpeptide haben einen starken Einfluss auf die Prozessierung und die Sekretion nachfolgender Proteine. Von HIV-1 Env Signalpeptiden ist bekannt, dass sie eine unterschiedlich starke Prozessierung vermitteln und die Sekretion sogar verlangsamen können (LAND *et al.*, 2003; Land & Braakman, 2001; Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Martoglio *et al.*, 1997). Um eine maximale Sekretion der Env-Proteine zu erreichen, testete diese Studie verschiedene Signalpeptidvarianten für die Sekretion der gp120-Proteine.

Das Signalpeptid des *tissue plasminogen activators (tpa)* bewirkt eine sehr gute Sekretionseffizienz verschiedener Proteine und wurde daher für die vorliegende Arbeit ausgewählt (Brighty *et al.*, 1991; Golden *et al.*, 1998; Suradhat *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2001). In der Studie von Berg und Grinnell wurde bereits untersucht, inwiefern sich zusätzliche Aminosäuren vor der *tpa*-Signalpeptidspaltstelle auf die Spaltung und damit auf die Sekretion der Proteine auswirken (Berg & Grinnell, 1991). Die Geschwindigkeit und Effizienz der Prozessierung und Spaltung von Signalpeptiden kann durch bestimmte Aminosäuren nach der Spaltstelle beeinträchtigt werden (Andrews *et al.*, 1988; Folz & Gordon, 1986; Rehm *et al.*, 2001), allerdings wurde bisher noch nicht erforscht, ob Aminosäuren direkt nach der Spaltstelle von *tpa* einen Einfluss auf die Sekretion haben. In dieser Studie wurden daher nach der Spaltstelle keine (*tpa1*), eine (*tpa2*) oder fünf (*tpa3*) Aminosäuren zwischen der Spaltstelle und der Antigensequenz eingeführt. Damit sollte überprüft werden, ob die direkt nachfolgenden Aminosäuren des *tissue plasminogen activators* für die Spaltung des Signalpeptids eine Rolle spielen.

Der Einfluss von den sich nach der Spaltstelle befindlichen Aminosäuren auf die Prozessierung und Spaltung von Signalpeptiden konnte mit dem Signalpeptid von *tpa* nicht bestätigt werden. Aminosäuren an den Positionen +1 und +5 nach dem Signalpeptid scheinen nicht wichtig für die Spaltungs- beziehungsweise Expressionseffizienz zu sein, da weder bei der *tpa1*-, der *tpa2*- noch bei der *tpa3*-Signalsequenzvariante Unterschiede in der Sekretion feststellbar waren (Abbildung C.4). Die Sequenzen der eingefügten Aminosäuren lauteten S (*tpa2*) beziehungsweise SYQVI (*tpa3*). Gemäß von Heijne *et al.*

sind aber nur eingeführte Proline direkt nach der Spaltstelle für die Prozessierung von Bedeutung (von Heijne, 1992). In der Literatur gibt es zudem Hinweise darauf, dass sich die Spaltstelle des *tpa*-Signalpeptids vor der Sequenz GAR befindet und erst nach einem proteolytischen Abbau Serin als erste Aminosäure gilt (Berg & Grinnell, 1991; Li *et al.*, 1996)

Für das Signalpeptid von HIV-1 Env ist die Spaltstelle bekannt (Ellerbrok *et al.*, 1992; Martoglio *et al.*, 1997) und es gibt bisher auch keine Hinweise darauf, dass nachfolgende Aminosäuren die Sekretion des Proteins beeinflussen würden. Allerdings ist in der Literatur beschrieben, dass das autologe Signalpeptid von HIV-1 Env die Prozessierungsgeschwindigkeit der nachfolgenden Proteine verlangsamt (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000). Die mittlere Faltungsdauer des Influenza HA- oder des VSV-G-Proteins beträgt circa sechs Minuten, die von gp120 bei Verwendung des autologen Signalpeptids von HIV-1 Env 40-60 min (Li *et al.*, 2000). Um herauszufinden, ob das autologe Env-Signalpeptid des Virusisolats CN54 (*C-clade*) die Sekretion ebenfalls verlangsamt, wurde eine kodonoptimierte Signalpeptidvariante kloniert (*HIV*) und für die vorliegende Studie eingesetzt. Li *et al.* verwendete in seinen Studien den Klon BH8 (*B-clade*). Dieser weist im N-terminalen Bereich deutliche Unterschiede zu dem in dieser Arbeit verwendeten Isolat auf, im C-terminalen Bereich hingegen wurde lediglich ein Aminosäureaustausch festgestellt (Li *et al.*, 2000). Weitere Studien mit dem Isolat JRFL (*B-clade*) von Wang *et al.* erhärten die Befunde von Li *et al.*, da das autologe Signalpeptid von HIV-1 Env zu einer schwächeren gp120-Expression führte, als bei Verwendung des heterologen Signalpeptids *tpa* (Wang *et al.*, 2006b). Eine Verlangsamung der Sekretion konnte bei der für diese Arbeit eingesetzten kodonoptimierten Signalsequenz HIV-1 Env der CN54 Variante (*HIV*) nicht bestätigt werden. Im Gegenteil: die Expression und die Sekretion von kodonoptimiertem gp120 waren ebenso hoch wie die der Konstrukte mit den heterologen Signalpeptiden *tpa1*, *tpa2* und *tpa3* (Abbildung C.4).

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Deletionen und Mutationen im N-terminalen Bereich des HIV-1 Env Signalpeptids keinen oder nur wenig Einfluss auf die Prozessierung und Sekretion haben (Ellerbrok *et al.*, 1992). Ebenso bleibt die Funktionalität der hydrophoben Kernregion auch bei erheblichen Substitutionen bestehen, lediglich umfangreichere Deletionen werden nicht toleriert (Ellerbrok *et al.*, 1992). Der C-terminale Bereich, besonders die Aminosäuren -3 und -1 vor der Spaltstelle (gezählt ausgehend von der Spaltstelle) sind laut Literatur ausschlaggebend für die Spaltgeschwindigkeit und somit auch für die Expressionsmenge des nachfolgenden Proteins (Nothwehr & Gordon, 1990; von Heijne, 1983). Die C-terminale Region vor der Spaltstelle einer Signalsequenz besteht zum größten Teil aus kleinen unpolaren Aminosäuren, wie Prolin, Glycin und Isoleucin, aber auch aus ungeladenen polaren Aminosäuren wie Serin oder Cystein (Nothwehr & Gordon, 1989; von Heijne, 1983; von Heijne, 1990). Interessanterweise hat nur das in dieser Studie verwendete HIV-1 Env-Signalpeptid des Isolats CN54 (*HIV*) an der -3 Position vor der Spaltstelle das in allen überprüften Isolaten festgestellte Cystein durch ein Serin ersetzt (siehe Abbildung D.1). Dieser Aminosäureaustausch ist der einzige auffällige Unterschied zwischen der

Signalsequenz des Isolats CN54 und den bisher getesteten Sequenzen und könnte die verstärkte Sekretion bewirken (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006b).

Bei einem Sequenzvergleich des in dieser Arbeit verwendeten HIV-1 Env Signalpeptids, mit den in der Literatur verwendeten Signalpeptiden (Li *et al.*, 2000; Pfeiffer *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2007) und weiteren *B*- und *C-clade* Varianten des HIV-1 Env-Signalpeptids zeigte sich eine große Variabilität (siehe Abbildung D.1).

	1	2	3
1 HIV_CN54	MRVTGIRKNYRHL	WRWGTMLLGML	MISSA
2 HIV_C_93IN101	---r-tlr---qqw.-i---vlgfw----	cng	
3 HIV_C_YNRL9840	---r-t-r-hqqw.-i---ilgfw----	cnv	
4 HIV_C_GXC14	---r-t-r---qqw.-i---vlgfw----	cnv	
5 HIV_JRFL	---k---s-ay-.kg-l---i---c--		
6 HIV_BH8	---kekyqhlwrwg-----c--		
7 HIV_IIIB	---kekyqhlwrwg-k-----i---c--		
8 HIV_89.6	---ke---wq---.g-il-----c--		
9 HIV_CON-S	---r---qr-cq---.---li-----c--		

**Abbildung D.1: Vergleich verschiedener Signalpeptide von HIV-1 Env.** Signalpeptide der *C-clade* Isolate CN54 ((Su *et al.*, 2000), *acc no*: AX149771), 93IN101 ((Mochizuki *et al.*, 1999), *acc no*: AB023804), YNRL9840 ((Qiu *et al.*, 2005), *acc no*: AY967806), GYC14 ((Dong *et al.*, 2003), *acc no*: AY217546) wurden mit denen der *B-clade* Isolate JRFL ((Koyanagi *et al.*, 1987), *acc no*: U63632), BH8 ((Ratner *et al.*, 1985), *acc no*: K02011), IIIB ((Popovic *et al.*, 1984), *acc no*: A04321), 89.6 ((Collman *et al.*, 1992), *acc no*: U39362) und der HIV-1 Konsensussequenz CON-S ((Liao *et al.*, 2006)) verglichen. Aufbau der Signalpeptide aus einer N-terminalen Region (1), einem hydrophoben Kernbereich (2) und einer C-terminalen Region (3), die die Spaltstelle der Signalpeptidase beinhaltet. Vom Isolat CN54 abweichende Aminosäuren sind in Kleinbuchstaben angegeben, Trennstriche (-) stehen für homologe Aminosäuren, Punkte (.) für fehlende Aminosäuren. Positiv geladene Aminosäuren sind rot markiert.

Li *et al.* postulierten, dass die Häufigkeit der positiv geladenen Aminosäuren im HIV-1 Env Signalpeptid eine wichtige Rolle bei der verlangsamten Abspaltung des Signalpeptids und somit bei der verlangsamten Sekretion spielen würde (Li *et al.*, 2000). In dem von Li *et al.* verwendeten Isolat BH8 und im Isolat CN54 befinden sich sechs positiv geladene Aminosäuren, im Isolat JRFL und der HIV-1 Consensussequenz CON-S nur fünf (Li *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006b; Wang *et al.*, 2007). Bei der Verwendung des autologen Signalpeptids von HIV-1 Env des Isolats CN54 (*HIV*) in der vorliegenden Studie, wurde *in vitro* weder die Expression, noch die Sekretion beeinträchtigt, obwohl das CN54-Signalpeptid dieselbe Anzahl an positiv geladenen Aminosäuren besitzt wie die der Isolate BH8 und IIIB (siehe Abbildung D.1) (Wang *et al.*, 2006b). Sowohl Li *et al.* als auch Wang *et al.* stellten eine starke Reduzierung der Sekretion bei Einsatz des autologen HIV-1 Env-Signalpeptids fest (Li *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2006b). In der Arbeit von Pfeiffer *et al.* wurde allerdings ermittelt, dass sowohl Prozessierung als auch Einbau von Env in die Hüllmembran bei anderen Signalpeptidvarianten (*tpa*, *epo*) langsamer und schlechter funktioniert, als bei Verwendung des autologen Signalpeptids von HIV-1 Env IIIB, obwohl dieses Isolat auch sechs positiv geladene Aminosäuren im Signalpeptid aufweist (siehe Abbildung D.1) (Pfeiffer *et al.*, 2006). Die Anzahl der positiv geladenen Aminosäuren scheint demnach nur eine untergeordnete Rolle bei der Sekretion der nachfolgenden Proteine zu spielen. Land *et al.* gehen davon aus, dass die

Faltungsgeschwindigkeit von gp120 einen Einfluss auf die verlangsamte Abspaltung des Signalpeptids hat (LAND *et al.*, 2003; Land & Braakman, 2001). Nach dieser Theorie hätte die Verwendung verschiedener Signalpeptide keinen Einfluss mehr auf die Sekretion von gp120. Dies würde die Ergebnisse vorliegender Studie bestätigen, da ein Einfluss der unterschiedlichen Signalpeptidvarianten nicht festgestellt werden konnte (C.3.1.2). Allerdings widerspricht diese Hypothese den Daten von Wang *et al.*, die zeigten, dass sich die gp120-Sekretion trotz Kodonoptimierung von gp120 beim Einsatz der autologen HIV-1 Env-Signalsequenz stark reduzierte (Wang *et al.*, 2006b).

In der vorliegenden Studie könnte auch die Kodonoptimierung der HIV-1 Env-Signalsequenz einen positiven Einfluss auf die Sekretion der nachfolgenden Proteine gezeigt haben. Bei Verwendung einer nicht kodonoptimierten HIV-1 Env-Signalsequenz mit einer kodonoptimierten Variante von Env müsste demnach mit einer hohen Expression und einer vergleichsweise niedrigeren Sekretion zu rechnen sein. In der Arbeit von Wang *et al.* wurde diese Hypothese bestätigt, da der direkte Vergleich der nicht kodonoptimierten Signalpeptide von *tpa* und HIV-1 Env deutlich zeigte, dass bei Einsatz des *tpa*-Signalpeptids Expression und Sekretion von gp120 fast gleich schnell ablaufen. Bei der autologen HIV-1 Env -Signalsequenz hingegen ist die Expression deutlich stärker als die Sekretion (Wang *et al.*, 2006b). Ohne Optimierung des Kodongebrauchs der Signalsequenz ist die Expression von Env mit dem autologen Signalpeptid je nach Isolat niedriger (Wang *et al.*, 2006b) oder höher (Pfeiffer *et al.*, 2006). Für einen direkten Vergleich mit den Daten, die in der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, müsste eine nicht optimierte Variante der HIV-1 Env-Signalsequenz des Isolats CN54 mit einer kodonoptimierten Variante auf die Proteinexpression und -sekretion hin untersucht werden. Die Ergebnisse waren in jedem Fall überraschend und sollten im Rahmen weiterführender Arbeiten untersucht werden.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Signalsequenzen (*tpa1*, *tpa2*, *tpa3* und *HIV*) wurden auf den Kodongebrauch von Säugetieren optimiert, um eine bestmögliche Expression zu garantieren. Die Expression war bei allen verwendeten Signalpeptidvarianten gleich hoch und es konnten weder in der Western Blot Analyse, noch im spezifischen Env-ELISA irgendwelche signifikanten Unterschiede bei der Expressions- oder Sekretionseffizienz festgestellt werden (Abbildung C.4). Es konnte somit in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die Verwendung der verschiedenen kodonoptimierten Signalpeptidvarianten *tpa* und *HIV* weder Einfluss auf die Expression noch auf die Sekretion der nachfolgenden gp120-Proteine hatte.

### **D.2.2 C3d<sub>3</sub>-Fusion führt zu einer geringeren Expression und Sekretion von gp120 in Säugerzellen**

Die Variation der Signalpeptide hatte keinerlei Einfluss auf die Expression und Sekretion von gp120, aber nach der Fusion der drei humanen C3d-Kassetten wurde eine deutliche Verringerung der Expression als auch der Sekretion festgestellt (C.3.1.3). Dieses Phänomen wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Green *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006d). Die Arbeit von Bower *et al.* bestätigte, dass die Verringerung der Proteinsekretion nach C3d<sub>3</sub>-Fusion trotz Kodonoptimierung der gp120-Sequenz eintritt (Bower *et al.*, 2004b). Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurden in der vorliegenden Studie zusätzlich zu gp120 auch die Signalpeptide und das humane C3d optimal an den Kodongebrauch von Säugern angepasst. Mit dieser „Komplettoptimierung“ sollten negative Einflüsse auf die Expression oder die Stabilität der mRNA weitgehend auszuschließen sein. Allerdings waren bei diesen Konstrukten die Expressions- und Sekretionsunterschiede zwischen den gp120hC3d<sub>3</sub>- und den gp120-Konstrukten ebenso hoch wie bei Bower *et al.* (Bower *et al.*, 2004b). Zellen, die mit gp120-Sequenzen transfiziert wurden, sezernierten eine fünf- bis zehnfach höhere gp120-Proteinmenge als Zellen, die mit den gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten transfiziert wurden (Abbildung C.5). In den Studien von Liu *et al.* und Bower *et al.* erreichten die C3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte mit 60% beziehungsweise 40% der Sekretion von kodonoptimiertem gp120 weitaus höhere Raten (Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Die zusätzliche Optimierung der C3d-Sequenzen und der Signalpeptide hatte folglich keine Auswirkung auf die Expression oder Sekretion der hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte.

Um zu bestimmen, ob der Entnahmezeitpunkt bei den Experimenten der maximalen Sekretion entsprach, wurde sowohl der Zeitpunkt der maximalen Expression als auch der der maximalen Sekretion in einem Zeitverlaufsexperiment bestimmt (Abbildung C.3). Die maximale Expression fand sowohl bei den gp120- als auch bei den hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten nach 36 h statt, die maximale Sekretion erreichte nach 48 h ihren Höhepunkt. Diese Verteilung entspricht der Expression und Sekretion, die auch andere Studien feststellten (Bower *et al.*, 2004b).

Der Vergleich der gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte zeigte, dass das Verhältnis von Expression zu Sekretion zu jedem Zeitpunkt bei den gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten höher war (Abbildung C.6). Die Sekretion der hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte ist demnach deutlich verlangsamt gegenüber den gp120-Konstrukten ohne hC3d<sub>3</sub>. Die geringere Sekretion der Fusionskonstrukte kann zum einen durch die Länge der mRNA-Transkripte bedingt sein und somit von der mRNA-Stabilität oder der Konkurrenz um Transkriptionsfaktoren abhängen oder zum anderen durch die Länge der translatierten Proteine beeinflusst sein, und demgemäß von den vorhandenen Translationsfaktoren und der Faltungsgeschwindigkeit der gp120hC3d<sub>3</sub>-Proteine abhängen. Eine andere Erklärung für die Unterschiede zwischen der Expression und Sekretion der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte und den gp120-Konstrukten wäre die verringerte Transfektionseffizienz nach der transienten Transfektion aufgrund der unterschiedlichen Plasmidgrößen (Tabelle C.1).

### **D.2.3 gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte verringern die Expression eines endogenen Luciferasereportergens**

Um nachzuprüfen, ob die gp120-Expression unabhängig von der Transfektionseffizienz war, wurden alle gp120-Konstrukte in Luciferasereporterplasmide (*luc*-) umkloniert. Die gp120-Konstrukte wurden dabei unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt. Das sich auf dem gleichen Vektor befindliche *firefly*-Luciferasegen stand unter Kontrolle eines SV40-Promotors. Als Positivkontrolle diente das Luciferaseplasmid ohne zusätzlich einkloniertem Gen. Das Luciferasegen, das sich auf dem Plasmid der gp120-Konstrukte befand, sollte dabei zur Normalisierung der Transfektionen dienen. Es lag die Annahme zu Grunde, dass die Höhe der Luciferaseexpression bei gleicher Transfektionseffizienz in jeder Zelle identisch ist. Die exprimierte Luciferase sammelt sich nach der Expression in den Peroxisomen der Säugetierzellen (Gould & Subramani, 1988), daher wurden die Zellen nach der Zellernte mit CCLR-Puffer behandelt, um mittels kompletter Lyse der Zellen die Luciferase freizusetzen. Die Menge des umgesetzten Luciferins ist dabei direkt proportional zur Menge an Luciferase in der Reaktion (Gould & Subramani, 1988).

Alle neu in den Luciferasevektor klonierten gp120-Konstrukte (Beschreibung C.3.2) zeigten eine gute Expression und Sekretion der gp120-Proteine (Abbildung C.8). Expression und Sekretion waren dabei mit den Plasmiden ohne Luciferase vergleichbar (Abbildung C.5). Sowohl die Expressionsrate der gp120-Konstrukte als auch die Luciferaseaktivität korrelierten mit der Sequenzlänge der Konstrukte (Abbildung C.8 und Abbildung C.9). Das führte zur Annahme, dass die Transfektionseffizienz von der Größe der gp120-Konstrukte abhängt und sich die Expression anhand der Luciferaseexpression normalisieren ließe. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde ein gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukt in den Luciferasevektor kloniert, dem zwei Stopkodons zwischen gp120 und hC3d<sub>3</sub> eingefügt wurden (*luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*). Dieses Konstrukt besitzt die gleiche Sequenzlänge wie das gp120hC3d<sub>3</sub>-Luciferasekonstrukt, aber durch die Einführung der beiden Stopkodons kann lediglich gp120 translatiert werden, nicht jedoch das Fusionsprotein.

Das Konstrukt mit den neu eingeführten Stopkodons (*luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*) exprimierte und sezernierte gp120 fast ebenso gut wie *luc-tpa1gp120* (Abbildung C.8). Die ELISA-Daten widersprachen dabei den Ergebnissen der Western Blot-Analyse, da sie zeigten, dass die gp120-Expression des Stopkonstrukts (*luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>*) niedriger war als die von *luc-tpa1gp120*. Die Ergebnisse des Western Blots sind allerdings semiquantitativ und liefern nur Hinweise zur Interpretation der ELISA-Resultate. Zudem wurden die beiden eingefügten Stopkodons bei der Translation teilweise überlesen, da auf dem Western Blot spezifische Banden auf der Höhe von gp120hC3d<sub>3</sub> detektiert wurden (Abbildung C.8A). Dies kann ebenfalls zur Verringerung der Sekretionseffizienz beitragen. In den Konstrukten ohne Luciferase wurde bereits nachgewiesen, dass die gebildeten Fusionskonstrukte die Ausschleusungsrate verlangsamen (Abbildung C.6). Interessanterweise war die Luciferaseaktivität des Stopkonstrukts nach der Transfektion so hoch wie die von *luc-tpa1gp120*. Aufgrund der Länge des Konstrukts müsste allerdings die Trans-

fektionseffizienz ebenso eingeschränkt sein, wie die der *luc-tpa1gp120hC3d<sub>3</sub>*-Konstrukte ohne Stopkodons (Abbildung C.9). Die Plasmidgröße scheint demnach keine Auswirkung auf die Expression zu haben. Nach den vorliegenden Versuchen zu urteilen ist die Länge des translatierten Bereichs entscheidend für die Sekretionsrate und die Luciferaseaktivität. Die Luciferaseexpression des Vektors ohne zusätzliche Gene, die unter der Kontrolle des CMV-Promotors standen, war zwei- bis neunfach höher als die Luciferaseaktivität der gp120-Konstrukte (Abbildung C.9).

Um zu bestimmen, ob der Entnahmezeitpunkt 48 h nach Transfektion der maximalen Expression und Sekretion entsprach, wurden die jeweiligen Zeitpunkte der maximalen Expression und der maximalen Sekretion in einem Zeitverlaufexperiment bestimmt (Abbildung C.7). Die maximale Expression fand sowohl bei der Luciferase wie auch bei den gp120-Konstrukten nach 36 h statt, die Sekretion erreichte nach 48 h ihren Höhepunkt. Diese Verteilung entspricht den Expressions- und Sekretionsdaten der gp120-Proteine mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1 (siehe D.2.2). Die Luciferaseaktivität war bei allen Konstrukten nach 48 h am höchsten, lediglich die Luciferaseexpression des *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* Konstrukts fiel bereits nach 42 h ab (Abbildung C.7B). Eine Ursache dafür könnte die Verlangsamung der Transkription aufgrund der Konkurrenz zwischen den Transkriptionsfaktoren des *luciferase*-Gens und deren der langen repetitiven hC3d-Sequenzen sein. Die eingefügten Stopkodons wurden zudem teilweise überlesen, wie bereits oben erwähnt.

Die Normalisierung der Luciferaseaktivität erfolgt normalerweise anhand der Proteinkonzentration des Zellysats (Jefferies & O'Neill, 2000; Mukhopadhyay *et al.*, 1997). Dies ist allerdings unter Umständen problematisch, wenn die Expression des internen Standards, in diesem Fall Luciferase, systematisch durch die gebildeten Proteine verändert wird. Die Verwendung des internen Standards kann dann zu einem systematischen Fehler in den Ergebnissen führen (Huszar *et al.*, 2001). Neben der Zugabe von Serum kann auch die Kotransfektion verschiedener Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Promotoren die Aktivität der Reporterkonstrukte verändern und zu einem systematischen Fehler führen (Bergeron *et al.*, 1995; Huszar *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden die Transfektionsexperimente sowohl mit als auch ohne Serum (10% FKS) durchgeführt. Es ergaben sich dabei keine Unterschiede in der Luciferaseaktivität (Daten nicht gezeigt). Um die Problematik der Kotransfektion des Reporterplasmids zu umgehen und um die Konkurrenz der Transkriptionsfaktoren bei gleichen Promotoren zu vermeiden, wurden die Konstrukte auf einem Plasmid mit unterschiedlichen Promotoren zusammengeführt. Folglich sollte sich die Aktivität des Reporterkonstrukts nicht ändern. Wie in der Abbildung C.9 aber klar ersichtlich ist, beeinflussen die exprimierten gp120-Gensequenzen die Luciferaseaktivität erheblich. Die Gene standen zwar unter der Kontrolle unterschiedlicher konstitutiver Promotoren – gp120-Konstrukte unter dem Einfluss des CMV-Promotors und Luciferase unter SV40-Einfluss – dies kann aber aufgrund der Verwendung der gleichen RNA-Polymerase II und überwiegend gleicher Transkriptionsfaktoren trotzdem zur gegenseitigen Beeinflussung der Expressionsrate führen (Schambach *et al.*, 2006). Diese Unterschiede in der Luciferaseexpression ließen sich weder auf den Einfluss kotransfizierter Plasmide, noch auf die unterschiedlichen

Transkriptlängen der Konstrukte zurückführen. Eine Erklärung für die Korrelation der Expression der Luciferase mit der der gp120-Konstrukte könnte die geringere Verfügbarkeit von Translationsfaktoren sein. Die gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukte binden die Translationsfaktoren für längere Zeit bis Faltung und Sekretion erfolgen, als die kürzeren gp120-Konstrukte. Diese gebundenen Translationsfaktoren stehen somit für die Produktion der Luciferase nicht mehr zur Verfügung und verlangsamen folglich die Translation des Reporterkonstrukts. Demgemäß korrelierte die Sekretion von gp120 und die Expressionsrate der Luciferase mit der translatierten Länge der gp120-Konstrukte (Abbildung C.9).

Der Luciferase-Reporter-Assay war somit nicht geeignet die Expression der gp120-Konstrukte zu normalisieren, da bei der Translation der gp120-Konstrukte die Expression des Reporters Luciferase beeinflusst wurde. Anhand des Konstrukts *luc-tpa1gp120ShC3d<sub>3</sub>* konnte allerdings nachgewiesen werden, dass die Plasmidgröße der Konstrukte keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz hat und die Fusion von hC3d<sub>3</sub> an gp120 nicht die Expression, sondern nur die Sekretion der Konstrukte beeinflusste. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Translation und/oder die Sekretion oberhalb eines bestimmten mRNA-Expressionsniveaus zum limitierenden Faktor bei der Proteinproduktion wird (Barnes *et al.*, 2004; Harter & Wieland, 1996).

Neben der erfolgreichen Expression und Sekretion der Konstrukte muss natürlich auch die Funktionalität der Bindung von C3d an den CD21 Rezeptor gewährleistet sein. Nur so kann sichergestellt werden, dass hC3d<sub>3</sub> der sezernierten gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine als Adjuvans wirken kann.

### **D.3 Effiziente Bindung der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte an CD21 auf humanen B-Zellen**

Die Bindung von C3d an den Rezeptor CD21 auf humanen B-Zellen führt zu einer Schwellenwertsenkung für eingehende Signale am B-Zell-Rezeptor (BCR) und somit zur Signalverstärkung (Barel *et al.*, 2003; Carroll, 2004; Carroll, 1998b; Cherukuri *et al.*, 2001a; Mongini *et al.*, 1997; Rickert, 2005). Die Bindung von C3d an CD21 kann ferner die Aufnahme des C3d-gekoppelten Antigens vermitteln und zu einer verstärkten Antigenprozessierung und -präsentation auf B-Zellen und FDC führen (Hess *et al.*, 2000; Perrin-Cocon *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 1998). Der Nachweis der Bindung der gekoppelten humanen C3d-Proteine an CD21 auf den B-Zellen ist somit wichtig für den Beweis der Funktionalität der gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukte. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde festgestellt, dass C3d sogar als Adjuvans wirken kann, wenn kein CD21 auf der Zelloberfläche vorhanden ist (Haas *et al.*, 2004). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass es ohne die Interaktion von C3d mit CD21 nicht zu einer verstärkten Induktion der Immunantwort kommt (Mitsuyoshi *et al.*, 2005).

Nachdem der humane CD21-Rezeptor dem murinen CD21-Rezeptor sehr ähnlich ist (Fingerroth, 1990) und die gleichen Bindungsstellen relevant sind, wurden für den

Bindungsnachweis humane Raji-B-Zellen verwendet, da diese eine gute CD21-Expression auf ihrer Oberfläche zeigen (Braun *et al.*, 1998; Carel *et al.*, 1989). Murines und humanes C3d haben an den CD21-Bindungsstellen eine identische Sequenz (Hannan *et al.*, 2002; Hannan *et al.*, 2005; Szakonyi *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2006), (siehe auch Seqvergleich F.2). Zudem wurde bereits in mehreren Arbeiten bestätigt, dass die Bindung von humanem C3d an den murinen CD21-Rezeptor funktionell ist (Henson *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Lyubchenko *et al.*, 2005). Um grundsätzlich zu zeigen, dass die in Säugerzellen exprimierte hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine an ihren Rezeptor (CD21) auf B-Zellen binden, wurden Überstände transient transfizierter 293T-Zellen mit humanen Raji-B-Zellen inkubiert und nach Antikörperfärbung im FACS überprüft (Abbildung C.12). Es stellte sich heraus, dass nur 16-40% der unstimulierten Raji-B-Zellen positiv für den CD21-Rezeptor waren. Folglich standen für die C3d-Bindung auch nicht mehr positive Zellen zur Verfügung. In Versuchen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, zeigte die Inkubation mit Überständen, die nur gp120-Protein enthielten, keine Bindung an CD21. Bei Überständen mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteinen waren hingegen annähernd 55% der CD21-tragenden Zellen an gp120hC3d<sub>3</sub> gebunden. Bei der Positivkontrolle mit sezerniertem hC3d<sub>3</sub>-Protein konnte sogar bei fast 70% der CD21-positiven Zellen eine C3d-Bindung nachgewiesen werden (Abbildung C.12). Dies bestätigte die Ergebnisse von Suradhat *et al.*, der zeigte, dass murines C3d<sub>2</sub> zu ca. 50% an den CD21-Rezeptor von B-Zellen aus Peyerschen Plaques von Schafen binden kann (Suradhat *et al.*, 2001) und die von Carel, der eine 60%ige Bindung von EBV an Raji-B-Zellen feststellte, das an der gleichen Stelle wie C3d bindet (Carel *et al.*, 1989).

Anderen Studien zufolge ist die Expression von CD21 auf der Oberfläche der Raji-B-Zellen mit ca. 80-90% der Zellen viel höher (Braun *et al.*, 1998; Carel *et al.*, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, durch Stimulation unterschiedlicher B-Zellen eine erhöhte Präsentation von CD21 auf der Oberfläche zu erreichen. Die Stimulierung verschiedener B-Zellen mit unterschiedlichen Kombinationen von IL-2, PHA und PMA führte allerdings nicht zu einer höheren Expression von CD21 (Abbildung C.11), obwohl frühere Studien eine höhere CD21-Präsentation nach Stimulation von B-Zellen beschreiben (Corcoran *et al.*, 2004; Hivroz *et al.*, 1991; Nanan *et al.*, 2002; Vereshchagina *et al.*, 2001). Es gibt aber in der Literatur auch Hinweise darauf, dass die Stimulation mit PMA zur Scherung von CD21 auf der Zelloberfläche führen kann (Masilamani *et al.*, 2003). Die Bindungsstudien wurden folglich mit unstimulierten Raji-B-Zellen durchgeführt, die durchwegs die beste CD21-Expressionsrate aufwiesen (Abbildung C.10). Der geringe Prozentsatz CD21-positiver Raji-B-Zellen reichte auch aus, um die Bindung der hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine an CD21 auf der Oberfläche nachzuweisen. Da die Bindungsstellen von humanem C3d an murines und humanes CD21 identisch sind (Braun *et al.*, 1998; Henson *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2005; Lyubchenko *et al.*, 2005; Tong *et al.*, 2006), kann davon ausgegangen werden, dass die exprimierte hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine in Mäusen funktionell sind und sich daher gut für Mausimmunisierungsstudien eignen.

#### **D.4 Verringerte Immunogenität der hC3d<sub>3</sub>-fusionierten gp120-DNA-Vakzinekonstrukte im Balb/C-Mausmodell**

Die Effizienz, die Dauer und die Polarisierung der mit den gp120-Konstrukten induzierten humoralen und zellulären Immunantwort wurde im Balb/C Mausmodell bestimmt (siehe C.5). In früheren Studien konnte nach Anpassung des Kodongebrauchs von HIV-DNA-Sequenzen an Säugerzellen festgestellt werden, dass die Expressionsrate der Konstrukte um ein Vielfaches gesteigert wurde (Bojak *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2004; zur Megede J. *et al.*, 2000). Die erhöhte Expression korrelierte dabei direkt mit höheren Antikörpertitern (Bower *et al.*, 2005; Casimiro *et al.*, 2002; Corbet *et al.*, 2000; Deml *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2007b; Kumar *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2006b; Yan *et al.*, 2007). Mit der Fusion von drei gleichen Komplementfaktoren, C3d<sub>3</sub>, wurde ebenfalls eine Verstärkung der humoralen und der zellulären Immunantwort erreicht (Bower *et al.*, 2004a; Dempsey *et al.*, 1996; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2006d). Diese Studie untersuchte, welchen Einfluss die Verwendung beider immunstimulatorischer Strategien in einem einzigen Versuchsansatz auf die Induktion der Immunantworten hatte.

##### **D.4.1 Effektivere humorale Immunantwort von nicht hC3d<sub>3</sub>-fusionierten gp120-DNA-Konstrukten**

Alle gp120-DNA-Konstrukte induzierten nach intramuskulärer Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort, allerdings war die Qualität und Quantität der Immunantworten sehr unterschiedlich.

Der Gesamtiter, der aus den Antikörpern resultierte, die von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten induziert wurden, war vier- bis siebenmal niedriger, als der gp120-immunisierter Tiere (Abbildung C.14). Die humorale Immunantwort nach der Immunisierung von gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten war folglich drastisch reduziert und korrelierte mit der geringeren Expression beziehungsweise Sekretion der Konstrukte nach transienter Transfektion in 293T-Zellen (siehe C.5). Die *in vivo* gewonnenen Daten passen somit sehr gut mit den schon *in vitro* ermittelten Expressionsdaten zusammen (siehe D.2.2). Andere Studien bestätigen diese Ergebnisse. Sie ergaben, dass die Höhe der Antikörpertiter direkt mit der Menge an Protein korreliert, das von der DNA-Vakzine gebildet wird (Bower *et al.*, 2004b; Bower *et al.*, 2005; Gor *et al.*, 2006). In der Literatur gibt es allerdings auch Hinweise darauf, dass die induzierten Immunantworten von der Expressionshöhe des Antigens unabhängig sind (Guan *et al.*, 2007). Aus früheren Studien ist bekannt, dass es bei Verwendung von mC3d<sub>3</sub>-gekoppelten gp120 zu einer Vervielfachung der Antikörpertiter und einer verbesserten Reifung der Antikörper kommt (Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004c; Wang *et al.*, 2006d). In den Studien von Bower *et al.* und Liu *et al.* zeigte sich jedoch, dass die humorale Immunantwort bei gleichzeitiger Kodonoptimierung und C3d-Fusion der DNA-Konstrukte im Vergleich zu nicht fusionierten Konstrukten nicht höher ausfällt (Bower *et al.*, 2004b;

Bower *et al.*, 2005; Bower & Ross, 2006; Liu *et al.*, 2004). Die Kodonoptimierung der Konstrukte allein reichte folglich für eine verbesserte Antikörperantwort völlig aus. Die zusätzliche Fusion von C3d brachte demnach keine Synergieeffekte im Hinblick auf die Induktion der humoralen Immunantwort. Interessanterweise konnte in einigen Arbeiten eine inhibitorische Wirkung nach C3d-Fusion festgestellt werden, die aber anscheinend von der Natur des Antigens abhing (Gor *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Suradhat *et al.*, 2001; Terrazzini *et al.*, 2004).

In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass nach C3d-Fusion nicht nur die humorale Immunantwort verstärkt wird, sondern auch die Polarisierung der Antikörperisotypen beeinflusst wird (Wang *et al.*, 2004c; Wang *et al.*, 2006d). Der freigesetzte IgG-Isotyp ist ein Indikator für die ausgelöste T-Helferzellantwort, die vom Antigen, der Immunisierungsrouten und weiteren Faktoren abhängt (Oran & Robinson, 2003; Sin & Weiner, 2000; Spellberg & Edwards, Jr., 2001). Generell zeigen DNA-Immunistrungen von Konstrukten ohne C3d meist eine T<sub>H</sub>1-basierte Immunantwort (Deml *et al.*, 2001; Ulmer *et al.*, 1995) während Proteinimpfstoffe eher eine T<sub>H</sub>2-Ausrichtung induzieren (Raz *et al.*, 1996). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da die IgG2a-Titer in Tieren, die mit *tpa3gp120* vakziniert wurden, deutlich höher waren als die IgG1-Titer (Abbildung C.15). Übereinstimmend zur Studie von Oran *et al.* konnte in der vorliegenden Arbeit nach intramuskulärer DNA-Immunistrung von *tpa3gp120* ein hoher IgG2a-Titer nachgewiesen werden (Oran & Robinson, 2003). Im Gegensatz zu den neu generierten Daten, in denen zusätzlich hohe IgG1-Titer gemessen wurden, konnten in der Studie von Oran *et al.* keine IgG1-Antikörper festgestellt werden (Oran & Robinson, 2003). Die höhere IgG1-Ausschüttung könnte durch die Sekretion von gp120 bedingt sein, da lösliche Antigene eher T<sub>H</sub>2-Antworten verstärken (Oran & Robinson, 2003; Robinson & Pertmer, 2000). Laut der aktuellen Literatur verstärkt die Verwendung des molekularen Adjuvans C3d sowohl T<sub>H</sub>1- als auch T<sub>H</sub>2-Antworten (Bergmann-Leitner *et al.*, 2005; Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2004c; Wang *et al.*, 2006d), scheint aber besonders effektiv bei der Freisetzung von IgG1 zu sein (Bower & Ross, 2006). Bei Bower *et al.* wurde jedoch die DNA mit GeneGun appliziert, eine Methode, die laut Oran *et al.* automatisch zu einer T<sub>H</sub>2-basierten Immunantwort führt (Bower & Ross, 2006; Oran & Robinson, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte die Ausrichtung der Immunantwort nicht bei allen Konstrukten festgestellt werden, da in den Mäusen der mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten immunisierten Tiere weder IgG1- noch IgG2a-Antikörper bestimmt werden konnten, weil die Titer zu gering waren (Abbildung C.15).

Humanes IgG1 und IgG3, das den murinen Isotypen IgG4 und IgG2a entspricht, sind die vorherrschenden Isotypen im Serum von Patienten in einem natürlichen Infektionsverlauf von HIV-1 (Cavacini *et al.*, 2003; Raux *et al.*, 2000). IgG3 ist zudem bei der *in vitro*-Neutralisierung von HIV-1 wirksamer als die anderen Isotypen (Scharf *et al.*, 2001). In der vorliegenden Impfstudie mit kodonoptimiertem gp120 wurde hauptsächlich IgG2a gebildet und ist daher eine gute Voraussetzung für die Entwicklung einer starken und effektiven neutralisierenden Immunantwort. In weiteren Impfstudien sollten zusätzliche Boost-Immunistrungen mit Protein erfolgen, da sie das Repertoire der

IgG-Isotypen erweitern und die Sekretion von Zytokinen verstärken (Bower *et al.*, 2005; Bower *et al.*, 2006; Cristillo *et al.*, 2006; Rollman *et al.*, 2007).

Die Antikörpertiter von Mäusen, die mit Konstrukten immunisiert wurden, die das autologe Signalpeptid *HIV* enthielten, waren höher als die von Mäusen, die mit *tpa*-Konstrukten vakziniert wurden. Der Effekt kann bei den Mäusen, die mit *HIVgp120* immunisiert wurden, durch die hohen Env-Antikörpertiter einer einzigen Maus erklärt werden. Die Vermessung der Einzeleren ergab, dass eine der sechs Mäuse nach drei DNA-Immunisierungen extrem hohe Antikörpertiter aufwies (Abbildung C.13). Die Werte dieser Maus dürften bereits für den erhöhten Antikörpertiter der Präimmunseren verantwortlich sein, die jedoch nicht einzeln vermessen wurden. Mäuse, denen *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* injiziert wurde, hatten höhere Antikörpertiter, als nach Vakzinierung von *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* (Abbildung C.14). Die Ursache dafür konnte nicht geklärt werden. Möglicherweise vermittelt das kodonoptimierte autologe Signalpeptid *HIV in vivo* eine bessere Sekretion als *in vitro* (siehe D.2.1). In der Literatur gibt es zudem Hinweise darauf, dass die Verwendung des *tpa*-Signalpeptids zu einer Verringerung der Faltung von Env und damit zur Erniedrigung der Sekretionseffizienz kommt (Pfeiffer *et al.*, 2006).

Der Vergleich der Aminosäuresequenzen von humanem und murinem C3d zeigte, dass ca. 74% der Aminosäuren homolog (siehe Anhang F.2 und (Green *et al.*, 2003)) und die Bindungsstellen an CD21 völlig identisch sind (Hannan *et al.*, 2005; Szakonyi *et al.*, 2001). Aufgrund dieser Sequenzhomologie sollte es nicht zur Bildung von anti-hC3d gerichteten Antikörpern in Mäusen kommen. In der vorliegenden Studie reichten die geringen Unterschiede jedoch, um nach dreimaliger DNA-Immunisierung der Mäuse hC3d-spezifische Antikörper im Western Blot nachzuweisen (Abbildung C.16). Die Bildung hC3d<sub>3</sub>-spezifischer Antikörper minimiert die Wirkung der Vakzine, da die von der DNA-Vakzine produzierten Proteine sofort von den Antikörpern komplexiert werden und so für die Aktivierung des Immunsystems nicht mehr zur Verfügung stehen. Eine zusätzliche Problematik ergibt sich bei Erkennung von körpereigenem C3d, da dies zu Autoimmunerkrankungen führen kann (Del Nagro *et al.*, 2005). Für die Testung der Adjuvanswirkung von C3d in Mäusen ist demnach die Verwendung von murinem C3d vorteilhafter. Laut Green *et al.* ist die Aminosäuresequenz von C3d aus Kaninchen mit dem humanen C3d zu mehr als 80% identisch und daher die Bildung von hC3d-spezifischen Antikörpern unwahrscheinlich (Green *et al.*, 2003). Für eine weitere Immunisierungsstudie mit den hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten wurden folglich Kaninchen verwendet.

#### **D.4.2 Zelluläre Immunantworten von C3d-fusionierten und nicht fusionierten gp120-DNA-Konstrukten sind vergleichbar**

Die Expression viraler Antigene von immunisierter DNA löst nicht nur humorale, sondern auch starke zellvermittelte Immunantworten aus (Estcourt *et al.*, 2004; Gurunathan *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006). In der vorliegenden Studie wurden die zellulären Immunantworten durch die intra- und extrazelluläre Vermessung der Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ )-Produktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Stimulation eines MHC-I spezifischen Peptids bestimmt. Die Auswertung beider Testsysteme, ELISPOT und FACS, offenbarte konsistente Daten (siehe C.5.2).

Die IFN $\gamma$ -Ausschüttung bei Splenozyten war von den Tieren, die mit Konstrukten immunisiert wurden, welche das autologe HIV-1 Env Signalpeptid (*HIV*) enthielten, höher als bei Splenozyten von Mäusen, die mit *tpa*-Konstrukten vakziniert wurden. Die hohen Werte der mit *HIVgp120*-immunisierten Mäuse, im Vergleich zu Tieren, denen *tpa3gp120* verabreicht wurde, können unter Umständen auf eine einzige Maus zurückgeführt werden, die bei der Vermessung der Antikörpertiter der Einzeleren auffiel (Abbildung C.13). Der Vergleich der beiden Gruppen, die mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* beziehungsweise *tpa3gp120hC3d<sub>3</sub>* immunisiert wurden, offenbarte ähnliche Unterschiede, allerdings konnten diese nicht durch eine Maus begründet werden. In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass das *tpa*-Signalpeptid *in vivo* eine niedrigere Sekretion vermittelt als die *HIV*-Signalsequenz und demzufolge die Erniedrigung humoraler und zellulärer Immunantworten der *tpa*-Konstrukte erklären würde (Pfeiffer *et al.*, 2006). Die relativ hohen Standardabweichungen der beiden Gruppen, die mit *HIVgp120* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisiert wurden, weisen allerdings darauf hin, dass der Einfluss des Signalpeptids nicht sehr stark war. Bei einem größeren Einfluss würden die Werte eindeutiger ausfallen. Die IFN $\gamma$ -Ausschüttung der Konstrukte, die das autologe Signalpeptid *HIV* enthielten, war allerdings trotz einberechneter Standardabweichungen etwas höher und wurden deshalb für die nachfolgenden Immunisierungen in Kaninchen verwendet.

Die mit gp120hC3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten immunisierten Mäuse hatten in etwa gleich viele IFN $\gamma$ -produzierende Splenozyten wie Mäuse, denen *HIVgp120* beziehungsweise *tpa3gp120* injiziert wurde (Abbildung C.17 und Abbildung C.18). Dieses Ergebnis war insofern überraschend, da sowohl Expression und Sekretion (Abbildung C.5) als auch die humorale Immunantwort (Abbildung C.14) nach Kopplung von hC3d<sub>3</sub> an kodonoptimiertes gp120 stark reduziert war. Die Resultate bestätigten Versuche von Bower *et al.* mit kodonoptimiertem Env, der ebenfalls keine Erhöhung der IFN $\gamma$ -Produktion nach C3d-Fusion feststellte (Bower *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu anderen Studien (Bower *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004c), die nachweisen konnten, dass es nach Immunisierung eines C3d-gekoppelten Antigens zu einer verstärkten IFN $\gamma$ -Antwort kommt. Die erhöhte IFN $\gamma$ -Produktion nach der Immunisierung mit C3d<sub>3</sub>-Fusionskonstrukten bei Mäusen wurde sowohl bei der Verwendung von gp120-Wildtypsequenzen als auch bei kodonoptimierten Sequenzen festgestellt (Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Laut Literatur hat die Kodonoptimierung von gp120 keinen oder

nur sehr wenig Einfluss auf die zelluläre Immunantwort (Bower *et al.*, 2005). In Übereinstimmung mit anderen Arbeiten wurde somit festgestellt, dass weder die exprimierte noch die sezernierte Antigenmenge einen Einfluss auf die Zahl der IFN $\gamma$ -produzierender Zellen hat (Bower & Ross, 2006; Liu *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2003). Die Fusion von hC3d<sub>3</sub> scheint jedoch einen adjuvierenden Effekt auf die Induktion der zellvermittelten Immunantwort zu haben. Ohne diese Adjuvanswirkung wäre anzunehmen, dass die verringerte Sekretion der Antigene zugleich zu einer Verminderung der IFN $\gamma$ -Produktion führt. Laut Literatur ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung von B-Zellen durch Antigen-C3d Komplexe mittels der Quervernetzung von C3d-Rezeptor CD21 und BCR erfolgt, die in einer signifikanten Reduktion des Signalschwellenwerts resultiert (Fearon & Carter, 1995; Kozono *et al.*, 1998; Mongini *et al.*, 1997). C3d-gekoppelte Antigene können die Immunantwort beeinflussen durch (i) gezielte Bindung an CD21, die zu einer erhöhten Antigenprozessierung und Präsentation in allen B-Zellen und FDC führt (Boackle *et al.*, 1997; Cherukuri *et al.*, 2001a; Hess *et al.*, 2000; Prechl *et al.*, 2002), (ii) längerfristige Bindung an FDC in der Milz mit Aktivierung vorbeiwandernder T-Helferzellen (Fearon & Carroll, 2000; Qin *et al.*, 1998) und (iii) Regulation der zellulären Immunantwort mit Hilfe der Bindung an CD21 auf T-Zellen (Bergmann-Leitner *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2005). In Bezug auf die Ergebnisse vorliegender Arbeit ist es wahrscheinlich, dass der adjuvierende Effekt von C3d auf die zelluläre Immunantwort auf dem „*cross-priming*“ der FDC beruht, welches schließlich zur Stimulation der T-Zellen führt. Dieser auf C3d beruhende Effekt führte allerdings nicht zur Induktion einer stärkeren zellulären Immunantwort, als durch die Kodonoptimierung allein erreicht werden konnte. Weiterhin wäre es möglich, dass die Stärke der zellulären Immunantwort auf der Überschreitung eines Schwellenwerts beruht, und die Expression und Sekretion der hC3d<sub>3</sub>-fusionierten Proteine für die Überschreitung des Schwellenwerts ausreichte. Aktuelle Veröffentlichungen zeigen, dass C3d auch ein wirksamer Immunsuppressor sein kann (Gor *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007). Die Wirksamkeit der C3d-Fusion ist demnach abhängig von der Art des aktivierten Rezeptors (Bennett & Leanderson, 2003) und von der Stärke der Aktivierung (Chakravarty *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Mausstudie offenbarten sich große Unterschiede bei den ausgelösten Immunantworten nach Konjugation von C3d an gp120. Die niedrigere Expression und Sekretion der Fusionskonstrukte führte zu einer starken Verringerung der gp120-spezifischen humoralen Immunantwort, jedoch nicht zu einer verminderten zellulären Immunantwort. hC3d<sub>3</sub> scheint die niedrigere Expression durch zusätzliche Aktivierung des zellvermittelten Immunsystems zu kompensieren. Um die in der Maus gebildeten anti-hC3d Antikörper zu vermeiden (D.4.1), wurde eine weitere Immunisierungsstudie in Kaninchen durchgeführt, da C3d von Kaninchen eine größere Ähnlichkeit mit dem humanen C3d aufweist, als murines C3d ((Green *et al.*, 2003), siehe auch Anhang F.2).

## **D.5 Verlangsamte Bildung von Antikörpern nach Immunisierung C3d-gekoppelter gp120-DNA-Vakzinekonstrukte im New-Zealand-White-Rabbit-Modell**

Die zwei DNA-Konstrukte, *HIVgp120* und *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*, induzierten die stärksten humoralen und zellulären Immunantworten im Balb/C-Mausmodell (D.4) und wurden daher in einem weiteren Nagetiermodell, in *New-Zealand-White*-Kaninchen, überprüft.

Analog zur Mausstudie war die ausgelöste humorale Immunantwort der mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* immunisierten Kaninchen stark verringert im Vergleich zu Tieren, die mit *HIVgp120* vakziniert wurden (Abbildung C.19). Die Antikörpertiter korrelierten mit der geringen Sekretion der Antigene nach transienter Transfektion von 293T-Zellen (siehe C.3.1.3). Für die Immunisierung von Kaninchen waren zur Induktion messbarer Antikörpertiter insgesamt mehr Impfgaben nötig als bei der zuvor durchgeführten Mausstudie. Der durch *gp120hC3d<sub>3</sub>* induzierte Gesamtiter in Kaninchen war zehn- bis sechzigmal niedriger, als der *gp120*-immunisierter Tiere (Abbildung C.19). Env-spezifische Antikörper erreichten nach Immunisierung von *HIVgp120* bereits nach vier DNA-Gaben einen Titer von ca. 2.000, der nach den *Boost*-Immunisierungen mit Protein auf bis zu 100.000 beziehungsweise 8.000 anstieg. In der Literatur ist beschrieben, dass bei Kaninchen sogar schon nach zweimaliger Immunisierung von *gp120*-DNA hohe Antikörpertiter nachweisbar sind (Beddows *et al.*, 2007). Bei den Kaninchen, die mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* vakziniert wurden, konnten erst nach dem ersten beziehungsweise dritten Protein-*Boost* Antikörper nachgewiesen werden, die höchstens Titer von 1.600 beziehungsweise 800 erreichten (Abbildung C.19). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu einer Studie von Green *et al.*, in der ebenfalls Kaninchen mit *gp120hC3d<sub>3</sub>*-Fusionskonstrukten intramuskulär immunisiert wurden (Green *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden maximale Env-spezifische Antikörpertiter von 10.000 erreicht. C3d-fusionierte Konstrukte wiesen dabei insgesamt eine zehnfach bessere humorale Immunantwort auf, als nicht fusioniertes *gp120*. Allerdings war die verwendete *gp120*-Sequenz nicht auf den Kodongebrauch von Säugetierzellen modifiziert. Damit sind die Daten nur schlecht vergleichbar, da auch in früheren Mausstudien nach Kopplung von C3d an *gp120*-Wildtypsequenzen eine bessere Immunantwort induziert wurde, jedoch nicht mehr nach Kodonoptimierung (Bower *et al.*, 2004b; Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2001). Allerdings war erstaunlich, dass in der Studie von Green *et al.* die Induktion der Antikörper nach DNA-Immunisierung mit *gp120hC3d<sub>3</sub>*-Konstrukten relativ schnell erfolgte. Bereits drei Wochen nach der ersten Applikation konnten Env-spezifische Antikörpertiter in Höhe von 200-700 festgestellt werden (Green *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse sind abweichend von der hier beschriebenen Kaninchenstudie, in der in den mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>* vakzinierten Tieren erst nach ein beziehungsweise drei *Proteinboost*-Immunisierungen Antikörper detektierbar waren (siehe C.6). Die Widersprüchlichkeit der Daten ist erstaunlich, da für die vorliegende Studie die gleiche intramuskuläre Applikationsroute und die gleiche Kaninchenrasse gewählt wurde wie in der Arbeit von Green *et al.*. Diese Unterschiede können auf verschiedenartige DNA-

Präparationsmethoden oder auf den unterschiedlichen Immunisierungsschemata beruhen. Beide Erklärungen sind nicht zufriedenstellend, daher sollten die Immunisierungen in zukünftigen Studien nochmals überprüft werden.

Der Verlauf der humoralen Immunantwort wurde über 63 Wochen hinweg beobachtet. Es zeigte sich, dass langanhaltende Antikörpertiter nur bei einem mit *HIVgp120* immunisierten Tier induziert wurden. Bei den drei anderen Tieren konnten nach dieser Zeit keine Antikörper mehr nachgewiesen werden (Abbildung C.19). Die Immunisierung mit kodonoptimiertem gp120 führte somit zu einer hochtitrigen und langanhaltenden humoralen Immunantwort, während die zusätzliche Fusion mit C3d bewirkte, dass insgesamt weniger Antikörper gebildet wurden, die erst nach weiteren Proteinimmunisierungen detektierbar waren. Die Induktion langlebiger Antikörperantworten durch DNA-Immunisierung von Kaninchen ist in der Literatur wiederholt beschrieben (Bates *et al.*, 2006; Gardsvoll *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2002; Isagulians *et al.*, 2000; Law *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2002) und entscheidend für die Effizienz von DNA-Vakzinen (Davis *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 2004). Die Verwendung eines Immunisierungsschemas mit DNA-*Prime* und Protein-*Boost* führt ebenfalls zu langanhaltenden Immunantworten (Beddows *et al.*, 2007) und stimuliert in verschiedenen Tiermodellen die Bildung von B-Gedächtniszellen, die hochtitrige neutralisierende Antikörper mit einer hohen Avidität sezernieren (Bower *et al.*, 2004b; Davis *et al.*, 1996; Devito *et al.*, 2004; Radaelli *et al.*, 2003; Richmond *et al.*, 1997). Die Verwendung von „*Prime-Boost*“-Strategien bei Env-basierten Vakzinen scheint optimal für die Induktion hochtitriger Immunantworten gegen HIV-1 Antigene zu sein (Amara *et al.*, 2002; Buonaguro *et al.*, 2007; Dale *et al.*, 2006; Hanke *et al.*, 2007; Hinkula, 2007; Richmond *et al.*, 1998; Seaman *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie konnte der Nachweis langlebiger B-Gedächtniszellen nach DNA-*Prime* und Protein-*Boost* der immunisierten Kaninchen nicht erbracht werden. Die bei diesem Versuch gewonnene, geringe Anzahl an B-Gedächtniszellen in den PBMC konnte trotz fünftägiger Stimulation nicht erhöht werden (siehe C.6.1.3). Lediglich die Gesamtmenge an IgG konnte bestimmt werden, aber gp120-spezifisches IgG war weder bei *HIVgp120*-, noch bei *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*-immunisierten Tieren nachweisbar. Die Versuche konnten nicht wiederholt werden, da die Kaninchen erkrankten und daher vorzeitig getötet werden mussten.

Für diese zweite Immunisierungsstudie mit den gp120- und gp120hC3d<sub>3</sub>-Konstrukten wurden Kaninchen als Tiermodell gewählt, da C3d von Kaninchen mit dem von Menschen zu ca. 80% identisch ist (siehe Anhang F.2 und (Green *et al.*, 2003)). Aufgrund der höheren Ähnlichkeit der C3d-Proteine war zu erwarten, dass es nach den DNA-Immunisierungen nicht zur Bildung von hC3d-spezifischen Antikörpern kommt. Somit ließe sich die Adjuvanswirkung von C3d besser überprüfen, da die gebildeten Proteine nicht komplexiert würden und die Gefahr einer Autoimmunerkrankung verringert wäre. Die durchgeführte Studie zeigte, dass sich auch nach viermaliger DNA-Immunisierung keine Antikörper gegen humanes C3d in den Kaninchen bildeten (Abbildung C.20). Green *et al.* beschreiben, dass bereits nach drei DNA-Immunisierungen mit gp120hC3d<sub>3</sub> spezifische Antikörper gegen humanes C3d in Kaninchen nachweisbar waren (Green *et al.*, 2003). In jenem Versuch wurden bereits nach der ersten DNA-

Immunisierung mit *tpagp120hC3d<sub>3</sub>* Antikörper gegen gp120 mit Titern von bis zu 7.000 nachgewiesen. Die Antikörperantwort war allerdings insgesamt stärker. In der vorliegenden Studie wurden die Antikörpertiter erst nach der vierten DNA-Injektion vermessen, wobei in den mit *HIVgp120hC3d<sub>3</sub>*-immunisierten Tieren keine humorale Immunantwort gegen hC3d nachgewiesen werden konnte. In zukünftigen Immunisierungsversuchen mit spezie fremden C3d-Proteinen sollte die Induktion von Antikörpern, die sich gegen körpereigenes C3d richten, besondere Beachtung verdienen, denn bei Bildung derartiger Antikörper wäre die Verwendung als Vakzine unzweckmäßig.

Das molekulare Adjuvans C3d wurde bereits in mehreren Studien für die Verstärkung der Immunantwort gegen bakterielle, virale und andere Antigene verwendet (Bower *et al.*, 2004a; Dempsey *et al.*, 1996; Green *et al.*, 2001; Haas *et al.*, 2004; Mitchell *et al.*, 2003; Test *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004a; Wang *et al.*, 2006d). Bei einigen Antigenen verbesserte sich die Immunantwort jedoch nicht, sondern verschlechterte sich teilweise sogar nach Fusion von C3d<sub>3</sub> (Gor *et al.*, 2006; Guan *et al.*, 2007; Hu & Test, 2004; Koch *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2005; Suradhat *et al.*, 2001; Terrazzini *et al.*, 2004). In der Literatur ist beschrieben, dass die Wildtypsequenz des HIV-1 Hüllproteins stets höhere Antikörpertiter nach Fusion von drei murinen C3d-Kassetten induziert (Bower *et al.*, 2004b; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2001). Inzwischen zeigen jedoch mehrere Arbeiten, dass sich die Immunogenität von kodonoptimierten gp120-DNA-Vakzinen nach mC3d<sub>3</sub>-Fusion eher verschlechtert (Bower *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2004). Die vorliegende Studie bestätigte diese Arbeiten, die bei gleichzeitigem Einsatz von Kodonoptimierung und C3d-Kopplung keine Synergieeffekte bemerkten. Die Fusion von hC3d<sub>3</sub> zeigte trotz Kodonoptimierung aller beteiligten Sequenzen (Signalpeptide, gp120 und C3d) keinen zusätzlichen Adjuvanseffekt auf die humorale Immunantwort von Mäusen oder Kaninchen. In Mäusen scheint hC3d<sub>3</sub> allerdings einen positiven Einfluss auf die zelluläre Immunantwort zu haben, da diese trotz der geringeren Expressions- und Sekretionsraten der hC3d<sub>3</sub>-Fusionsproteine eine ähnliche Höhe erreichte, wie die nicht fusionierter gp120-Konstrukte. Eine kürzlich durchgeführte Immunisierungsstudie mit aufgereinigten gp120mC3d<sub>3</sub>-Proteinen weist darauf hin, dass die C3d<sub>3</sub>-Kopplung an Protein-Vakzinen zu erhöhten humoralen Immunantworten führt (Koch *et al.*, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die Kopplung von C3d durchaus immunstimulatorische Kapazität besitzt, allerdings nur, wenn sich weder Expression noch Sekretion limitierend auswirkt, wie es nach Fusion dreier C3d-Kassetten der Fall war (siehe D.2.2). Um die immunstimulatorische Funktion von C3d zu nutzen, wäre daher die Kopplung von C3d an gp120 im Rahmen einer Proteinvakzine oder in Form von VLP sinnvoller.

Generell waren bisherige Immunantworten, die durch den Einsatz von DNA-Vakzinen induziert wurden, zwar in Nagetieren vielversprechend, aber in Primaten und im Menschen eher enttäuschend (Bower *et al.*, 2004a; Cebere *et al.*, 2006; MacGregor *et al.*, 2002; Ross *et al.*, 2001; Tavel *et al.*, 2007; Ulmer *et al.*, 2006). Antikörpervermittelter Schutz vor HIV-1 wird nur durch Neutralisation von HIV-1-Virionen erreicht und benötigt dementsprechend hohe Antikörpertiter (McMichael, 2006; Pantophlet & Burton, 2006; Phogat *et al.*, 2007; Srivastava *et al.*, 2005). Bessere humorale Immunantworten und höhere Titer neutralisierender Antikörper können mit Hilfe verschiedener

*Prime-Boost*-Strategien induziert werden (Beddows *et al.*, 2007; Dale *et al.*, 2006; Kent *et al.*, 2007; Lu, 2006; Puaux & Michel, 2003). Dabei wird meist eine DNA-Vakzine als *Prime* und ein proteinbasierter Impfstoff als *Boost* eingesetzt (Buonaguro *et al.*, 2007; Law *et al.*, 2007; Rasmussen *et al.*, 2006; Rollman *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2005b). Dabei zeigte sich, dass die Neutralisation von HIV-1 am effektivsten ist, wenn gleichzeitig gegen verschiedene HIV-1 Proteine Antikörper gebildet werden (Pal *et al.*, 2006; Rollman *et al.*, 2004; Rollman *et al.*, 2005; Seaman *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006c; Zhan *et al.*, 2003). Virusähnliche Partikel (*virus-like particles*; VLP) enthalten meist sowohl Gag- als auch Env-Antigene und sind daher in der Lage sehr effiziente humorale und zellvermittelte Immunantworten zu induzieren (Deml *et al.*, 2005; McBurney *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2006).

## **D.6 Entwicklung eines VLP-basierten Impfstoffs unter Einbeziehung des Adjuvans C3d**

Sehr erfolgreiche antivirale Impfstoffe beruhen auf dem Einsatz von attenuierten Viren. Attenuierte HI-Viren sind aber als Vakzine nicht geeignet, da sie ein großes Risiko für Reversionen, Rekombinationen und Mutationen bergen (Doan *et al.*, 2005). Bisherige HIV-1-Impfstoffe induzieren weder hinreichende breit-neutralisierende Antikörpertiter, noch ausreichende zytotoxische T-Zell-Antworten gegen Primärisolate und sind daher als Vakzine unbrauchbar (Duerr *et al.*, 2006). VLP hingegen sind sicher beim Einsatz in Tieren und Menschen und können effizient sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten gegen mehrere HIV-1-Antigene stimulieren (Buonaguro *et al.*, 2005; Hammonds *et al.*, 2005). Weitere Verbesserungen des VLP-Designs durch effektivere Proteinproduktion mittels kodonoptimierter Sequenzen oder durch Hinzufügen zusätzlicher Immunstimulantien wie z.B. C3d können den Einsatz als HIV-1 Impfstoff reformieren.

### **D.6.1 Gute Expressionsraten nach transienter Transfektion einzelner VLP-Vakzine-konstrukte**

Für die vorliegende Studie wurden DNA-basierte VLP generiert, die entweder auf einem Plasmid sowohl die Sequenz von syngag<sub>III<sub>B</sub></sub> als auch die von gp120, gp140, C3d oder Env-C3d-Fusionskonstrukten enthielten, oder pro Plasmid nur für eine der genannten Sequenzen kodierten (Übersicht siehe Abbildung C.21). Außer syngag<sub>III<sub>B</sub></sub> wurden alle Sequenzen über einen *linker* mit einer Transmembrandomäne verknüpft, um die Proteine auf der Membran der VLP zu präsentieren. Zwei verschiedene Transmembrandomänen dienten als Verankerungsmöglichkeit: die autologe Transmembrandomäne von HIV-1 Env (TM<sub>HIV</sub>) oder die heterologe des baculoviralen Oberflächenproteins gp64 (TM<sub>gp64</sub>). Die autologe TM<sub>HIV</sub> wurde mit einem verkürzten zytoplasmatischen Teil verwendet, da dieser sonst zu einem verminderten Einbau von Env in die VLP führt (Deml *et al.*, 1997a). Alle verwendeten Sequenzen wurden auf den Kodongebrauch von Säugetieren optimiert, um eine möglichst starke Proteinexpression zu erhalten. Aus der Literatur ist bekannt, dass

die Kodonoptimierung von syngag<sub>III<sub>B</sub></sub> (Pr55<sup>Gag</sup>) zu einer höheren Expression führt und zu einer erhöhten Immunantwort (Deml *et al.*, 2001; Kofman *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2000; zur Megede J. *et al.*, 2000).

Die in der vorliegenden Studie klonierten DNA-basierten VLP kodierten für zwei verschiedene virale Genprodukte (Gag und Env), die sich nach gleichzeitiger Expression zu VLP formieren können. Die Konstrukte, die Gag und Env unter der Kontrolle verschiedener Promotoren enthielten, führten zu einer effizienten Expression und Sekretion virusähnlicher Partikel, und sowohl Gag als auch Env und C3d konnten in fast allen Zellsynten und Überständen nachgewiesen werden (Abbildung C.22).

Bereits in früheren Studien wurden HIV-VLP ausschließlich mit Pr55<sup>Gag</sup> hergestellt (Deml *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 1994a; Wagner *et al.*, 1996b). Die geringe Expression wurde durch Kodonoptimierung von Gag bedeutend erhöht und führte zu stärkeren Immunantworten (Bojak *et al.*, 2002; Deml *et al.*, 2001). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Env eine entscheidende Rolle bei der Induktion von schützenden Immunantworten spielt (Amara & Robinson, 2002; Letvin *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2005; Zolla-Pazner, 2004). Für eine erfolgreiche Induktion von humoraler und zellulärer Immunantwort scheint allerdings sowohl Gag als auch Env wichtig zu sein (McBurney *et al.*, 2007). In Affenstudien zeigte sich, dass durch eine Immunisierung mit Gag allein die virale Infektion schlechter kontrolliert wurde als bei Impfstoffen, die auch Env enthielten (Amara *et al.*, 2002). Die genauen Mechanismen sind noch ungeklärt, aber es wird davon ausgegangen, dass die bessere Viruskontrolle auf Anti-Env basierten humoralen und zellulären Immunantworten beruht (McBurney *et al.*, 2007).

Bei HIV-1-Infektion kommt es erst nach und nach zu einer verstärkten Ausschüttung von Env-spezifischen Antikörpern, die konformationsspezifische Epitope erkennen und eine höhere Avidität aufweisen. Diese höhere Avidität hat meist eine bessere Neutralisation zur Folge, aber die genauen Zusammenhänge sind noch unklar (Bower *et al.*, 2005). Env wurde bereits in vielen verschiedenen Impfstudien entweder als Monomer oder in der natürlich vorliegenden Form als Trimer eingesetzt (Beddows *et al.*, 2005; Beddows *et al.*, 2007; Binley *et al.*, 2000; Bower *et al.*, 2004b; Bower *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 1995). Neuere Studien weisen daraufhin, dass die Art der Präsentation von Env für eine effektive Induktion von Antikörpern und CTL-Antworten wichtig sein kann. Grundsätzlich induzierten lösliche Env-Antigene, die intramuskulär immunisiert wurden, meist niedrigere Titer an neutralisierenden Antikörpern als Env-Antigene, die auf der Oberfläche von Partikeln exprimiert wurden (Hammonds *et al.*, 2005; McBurney *et al.*, 2007; Stamatou *et al.*, 1998). Dabei zeigen gp140-Trimere, die an Proteoliposome oder an VLP-Lipidmembranen gekoppelt sind, eine bessere Immunogenität und können höhere neutralisierende Antikörpertiter auslösen (Grundner *et al.*, 2005; McBurney *et al.*, 2007). In der vorliegenden Studie wurde für die Konstruktion der VLP das kodonoptimierte Konstrukt gp140TM verwendet, da vermutet wird, dass trimerisierte Formen von Env das native Env-Trimer besser imitieren und deshalb eine stärkere Immunantwort induzieren können als monomeres Env (Barnett *et al.*, 2001; Bower *et al.*, 2004b; Crooks *et al.*, 2007; Grundner *et al.*, 2005; Klasse, 2007; Pancera *et al.*, 2005; VanCott *et al.*, 1997; Yang *et*

*al.*, 2000). Für die VLP wurde nicht das Volllängekonstrukt gp160 verwendet, sondern gp140TM, da verschiedene Studien belegten, dass eine Verkürzung der zytoplasmatischen Domäne von Env in einem höheren Einbau von Env auf der Oberfläche der VLP resultiert (Deml *et al.*, 1997a; Devitt *et al.*, 2007; Holtkotte *et al.*, 2006; Johnston *et al.*, 1993; Yamshchikov *et al.*, 1995; Yao *et al.*, 2000). Die Induktion konformationsspezifischer Antikörper durch Env-Trimere korreliert allerdings nicht direkt mit der Fähigkeit HI-Viren zu neutralisieren (Bower *et al.*, 2006). Die Bildung hochaffiner Antikörper, die durch Fusion mit C3d intensiviert wird, scheint jedoch durchaus Einfluss auf die Neutralisierung zu haben. Die höhere Affinität gewährleistet eine bessere Absättigung der wichtigen Bindungsstellen des Virus und führt so aufgrund sterischer Hinderung zu einer verstärkten Neutralisationsfähigkeit (Bower *et al.*, 2006; Parren *et al.*, 1998).

VLP, die sowohl Gag als auch Env beinhalten, wurden bereits in mehreren Studien auf ihre Immunogenität untersucht (Buonaguro *et al.*, 2007; Crooks *et al.*, 2007; Deml *et al.*, 1997b; Deml *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 1996a; Young *et al.*, 2004). Dabei zeigte sich, dass VLP auch ohne zusätzliche Immunstimulantien sehr immunogen waren (Deml *et al.*, 2005; Doan *et al.*, 2005; Sailaja *et al.*, 2007). Teilweise konnte dies auf die Herstellungsweise der VLP zurückgeführt werden. Bei der Produktion von VLP durch Baculoviren beispielsweise verbleibt eine gewisse Anzahl an Baculoviren in der aufgereinigten VLP-Fraktion. Diese entfalten eine starke Adjuvanswirkung unabhängig von den VLP. Um unerwünschte Adjuvanseffekte auszuschließen, erfolgte die Produktion der VLP in der vorliegenden Studie mittels DNA-Transfektion humaner Zellen. Zusätzliche Immunogenität soll den Gag-Env-VLP dabei die immunstimulatorische Komponente C3d vermitteln.

DNA-basierte gp120-Impfstoffe beruhen auf der effektiven Expression und Sekretion des Immunogens, das nach zusätzlicher Fusion von C3d zu einer verstärkten Stimulation des Immunsystems führen soll. Dabei gilt die Regel, dass die Bindung an CD21 desto besser ist, je mehr C3d-Proteine an das Antigen gekoppelt werden (Dempsey *et al.*, 1996). Die Expressionsrate der DNA-Impfstoffe ist allerdings abhängig von der Länge der Konstrukte. Denn je mehr C3d-Kassetten an das Antigen gekoppelt werden, desto länger wird die zu transkribierende DNA-Sequenz und desto schlechter wird die Expression (Bower *et al.*, 2004b). Die verringerte Expression wirkt sich direkt auf die Immunogenität aus, da die Immunantwort unmittelbar von der Antigenmenge abhängt (Bower *et al.*, 2005). Der Effekt der verminderten Expression kann durch die zusätzliche Immunstimulation mit fusioniertem C3d ausgeglichen werden, allerdings wirken sich mehr als drei gekoppelte C3d-Proteine kontraproduktiv auf die Immunogenität des Antigens aus (Bower *et al.*, 2004b). Die Fusion der C3d-Proteine über *Linker*-Sequenzen ist nicht optimal, da eine völlig freie Beweglichkeit der C3d-Proteine nicht gegeben ist. Im Gegensatz zu den DNA-Konstrukten werden bei VLP nur einzelne C3d-Proteine mit einer Transmembrandomäne auf der VLP-Membran präsentiert. Die einzelnen C3d-Proteine sind dort in direkter Nachbarschaft zu Env und imitieren die natürliche Situation des alternativen Komplementwegs (siehe A.2.1). Zudem ist durch die Einzelsequenzen die Anzahl der C3d-Proteine nicht mehr limitiert und es ist anzunehmen, dass dies einen

positiven Einfluss auf die Immunogenität hat. Um zu überprüfen, ob körpereigenes C3d eine bessere Adjuvanswirkung als humanes C3d bei Mäusen hat, wurden VLP mit murinem C3d (mC3d) kloniert. Zukünftige Immunisierungsversuche in Mäusen sollen Aufschluss darüber geben, ob es beim Einsatz von mC3d zur Bildung C3d-spezifischer Antikörper kommt.

Je größer die Anzahl und die Vielfalt der verwendeten HIV-1 Antigene ist, desto umfangreicher und ausführlicher kann die Immunantwort durch die Vakzine induziert werden. Die räumliche Trennung der verschiedenen Subtypen (*clades*) von HIV-1 beginnt sich aufgrund intensiverer Reisetätigkeit in allen Gebieten der Erde zu vermischen. Es ist daher von Vorteil, wenn Vakzinen Antigene von mehreren Subtypen beinhalten (Cristillo *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006c). Das in dieser Studie verwendete Isolat CN54 aus China ist eine Chimäre aus *B*- und *C-clade* Anteilen, wobei Env dem *C-clade* Teil zugerechnet werden kann (Su *et al.*, 2000). Um zusätzlich eine *B-clade*-spezifische Immunantwort zu induzieren, wurde für die VLP-Konstrukte ein kodonoptimiertes Gag des Isolats IIIB verwendet (Popovic *et al.*, 1984). In früheren Studien wurden bereits Multigen-basierte VLP mit unterschiedlichem Erfolg getestet. Die Expression dieser VLP erfolgte dabei von einzelnen DNA-Plasmiden. Während in einigen Studien nach VLP-Immunisierung hauptsächlich zelluläre Immunantworten nachgewiesen wurden (Amara *et al.*, 2002; Ellenberger *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 1994b; Wyatt *et al.*, 2004), konnten im Rahmen anderer Arbeiten sowohl humorale als auch zellvermittelte Immunantworten generiert werden (Deml *et al.*, 2005; McBurney *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 1998; Yao *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2006). Aus der Literatur ist bekannt, dass es durch die intensive Aufnahme von VLP in dendritische Zellen und die vornehmliche Präsentation über den MHC I Weg zu einer vermehrten Induktion einer zellvermittelten Immunantwort kommt (Doan *et al.*, 2005). Das auf der Oberfläche verankerte Env-Protein kann zudem die Bindung an den CD4-Rezeptor und an Chemokinrezeptoren auf Makrophagen und dendritischen Zellen vermitteln und die Aufnahme der VLP fördern (Young *et al.*, 2006). Dies führt wiederum zu einer verstärkten MHC I-Präsentation der Antigene und zu einer intensiveren Stimulation der Immunantwort. Nach Bindung Env-spezifischer Antikörper kann die Aufnahme der VLP auch durch Fc-Rezeptoren auf phagozytischen Zellen erfolgen, die die Präsentation auf MHC-II erhöht (Young *et al.*, 2006). Ferner besteht durch die Verankerung von C3d auf den VLP die Möglichkeit der Bindung an B-Zellen und FDC. FDC können, wie in D.4.2 beschrieben, sowohl die Bildung von Antikörpern als auch CTL-Antworten induzieren.

Um eine größere Variation der Konstrukte zu ermöglichen, wurden nicht nur Plasmide kloniert, die sowohl Pr55<sup>Gag</sup> (syngag<sub>IIIB</sub>) als auch gp120TM, gp140TM, hC3dTM, mC3dTM oder gp120/gp140hC3dTM-Fusionskonstrukte enthielten, sondern auch Plasmide, die diese Sequenzen einzeln kodierten (Abbildung C.21). Die erfolgreiche Expression dieser Einzelgene wurde im Western Blot nachgewiesen (Abbildung C.23). Diese Konstrukte können nach Transfektion von stabilen gp140TM- oder hC3dTM-exprimierenden Zellen mit Gag-kodierenden Plasmide eine effektive Sekretion von VLP vermitteln, die eine große Anzahl von gp140 bzw. hC3d auf ihrer Oberfläche tragen.

### D.6.2 Niedrigere hC3d-Expression nach Kotransfektion stabiler gp140-Zellen

Die Präsentation von gp120, gp140 und hC3d nach transienter Transfektion auf der Oberfläche der Zellen war relativ gering (Abbildung C.22 und Abbildung C.23). Die Verkürzung des zytoplasmatischen Anteils der Transmembrandomäne von HIV-1 Env, die zu einer höheren Dichte auf der Lipiddoppelmembran führen sollte (Devitt *et al.*, 2007; Holtkotte *et al.*, 2006), verbesserte die Präsentationsrate nicht wesentlich. Um eine größere Anzahl von Env und C3d auf der Oberfläche der VLP zu gewährleisten, wurden stabile Zellen generiert. Sie sollten nach stabiler Integration der gp140- oder hC3d-Konstrukte eine gute Expression von gp140- beziehungsweise hC3d-Proteinen auf ihrer Zelloberfläche zeigen (Übersicht der Konstrukte siehe Abbildung C.24). Es wurden sowohl CHO- als auch 293T-Zellen stabil transfiziert. Nach mehrwöchiger Selektion mit Hygromycin war bei allen Zellen eine gute und stabile gp140-Expression auf der Zelloberfläche nachzuweisen (Abbildung C.25 und Abbildung C.27). Lediglich hC3d wurde nur auf der Oberfläche von 293T-Zellen exprimiert (Abbildung C.25 und Abbildung C.26). Die Isolierung der genomischen DNA aller stabil transfizierter Zellen mit nachfolgender PCR und Sequenzierung dieser PCR-Produkte offenbarte, dass die mit den C3d-Konstrukten transfizierten CHO-Zellen die C3d-Sequenz nicht (*tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>*) oder mit Deletionen (*tpa1hC3dTM<sub>gp64</sub>*) enthielten (Abbildung C.28). Die stabilen CHO-Zellen wurden daher nicht weiter verwendet. Die hergestellten stabilen 293T-Zellen zeigten eine gute Expression der stabil integrierten Transgene gp140TM und hC3dTM (Abbildung C.25B und Abbildung C.26) und wiesen keine relevanten Sequenzveränderungen auf. Die Expression der stabil integrierten Transgene wurde drei Monate lang untersucht und war bis auf die abnehmende Expression der *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>*-Variante in allen 293T-Zelllinien unverändert (Daten nicht gezeigt). Aus der Literatur ist bekannt, dass 293T-Zellen leicht transfizierbar sind (Zhao *et al.*, 2006). Sie eignen sich daher nach transienter Transfektion von *syngag<sub>III B</sub>* bestens zur Produktion von VLP, die eine hohe Zahl von Env beziehungsweise C3d auf ihrer Oberfläche tragen.

Die Transfektion der stabilen *HIVgp140TM<sub>HIV</sub>*-293T-Zelllinie ergab, dass die Expression der transient transfizierten hC3d-Konstrukte zwischen 25% hC3d-positiven Zellen bei *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* und 35% hC3d-positiven Zellen bei *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* lag (Abbildung C.29A). Die vergleichsweise geringe Expression nach transienter Transfektion war unerwartet, da diese in nicht stabilen 293T-Zellen Werte von bis zu 90% C3d-positive Zellen bei *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>* und bis zu 95% C3d-positive Zellen bei *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* erreichte (Abbildung C.29B). Eine mögliche Erklärung wäre, dass bei beiden Konstrukten, sowohl das stabile, wie auch das transient transfizierte, die gewünschten Gene unter Kontrolle eines CMV-Promotors standen. Dies kann aufgrund der Verwendung der gleichen RNA-Polymerase II und gleicher Transkriptionsfaktoren zur gegenseitigen Beeinflussung der Expressionsrate führen (Schambach *et al.*, 2006). Das Konstrukte *tpa1hC3dgp120TM<sub>gp64</sub>* zeigte grundsätzlich eine höhere Expression auf der Zelloberfläche als das Konstrukt *tpa1hC3dTM<sub>HIV</sub>*. Dies könnte entweder an der stabileren mRNA des Fusionskonstrukts liegen, oder an der Verwendung der unterschiedlichen Transmembrandomänen. Die Transmembrandomäne von HIV-1 Env ist unter Umständen nicht so stabil

in der Membran verankert als  $TM_{gp64}$ . Die durchschnittliche Transfektionseffizienz transient transfizierter Zellen lag bei ca. 40-50% (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz zeigte der Versuch, dass es möglich ist VLP herzustellen, die sowohl Env als auch C3d in ausreichender Anzahl auf der Oberfläche tragen.

Mit Hilfe der stabilen Zelllinien lassen sich so unterschiedliche VLP in beliebiger Kombination mit einer großen Anzahl Env und C3d auf der Oberfläche generieren. Diese VLP können nach ultrazentrifugaler Aufreinigung über ein 20%iges Saccharosekissen ohne weitere Adjuvantien immunologisch in Mäusen getestet werden. Weiterführende Experimente sollen in jedem Fall erfolgen, um die immunstimulatorische Wirkung von C3d in VLP intensiv zu erforschen.

## D.7 Ausblick

Die in dieser Studie hergestellten kodonoptimierten DNA-Konstrukte wurden intensiv auf ihre Expression, Sekretion und Immunogenität getestet. In ähnlichen Studien wurde beobachtet, dass die Fusion von hC3d<sub>3</sub> Einfluss auf die Reifung der Antikörper hat (Bower *et al.*, 2004b; Green *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2000). Um diese Theorie zu bestätigen, sollen die gebildeten Antikörper auf ihre Neutralisationseffizienz überprüft werden.

Zudem konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des kodonoptimierten HIV-Signalpeptids im Vergleich zum *tpa*-Signalpeptid zu einer verbesserten humoralen und zellulären Immunantwort führte (D.4). Um zu überprüfen, ob die Kodonoptimierung oder die Sequenz selbst einen Einfluss auf die Proteinsynthese oder die Sekretion hat, soll die kodonoptimierte Variante mit einer nicht optimierten HIV-1 Env Signalsequenz des Isolats CN54 hinsichtlich ihres *in vitro*- und *in vivo*-Verhaltens verglichen werden.

Nach den DNA-Immunisierungen wiesen die gp120-immunisierten Mäuse eine T<sub>H</sub>1-Polarisierung auf (C.5.1.3). Um zu untersuchen, ob sich das Repertoire der IgG-Isotypen nach einer Proteingabe ändert, sollen weitere *Prime-Boost*-Immunisierungen und IgG-Isotypuntersuchungen durchgeführt werden.

Nach DNA-Immunisierung von Mäusen wurde die Bildung von Antikörpern gegen das verwendete humane C3d beobachtet (siehe C.5.1.4). Diese können zur Bildung autoreaktiver Antikörper gegen C3d führen und Autoimmunerkrankungen bedingen (Del Nagro *et al.*, 2005). Um dieses Problem zu lösen, wurde bereits eine kodonoptimierte murine C3d-Variante (mC3d) kloniert, die mittels Kotransfektion zur Herstellung verschiedener VLP benutzt werden kann. Es soll überprüft werden, ob dies auch bei Verwendung des autologen mC3ds auf den VLP der Fall ist, auch wenn bisher in anderen Studien nach Verwendung von homologem C3d keine autoreaktiven Antikörper festgestellt wurden (Green *et al.*, 2003).

Eine in der Arbeitsgruppe durchgeführte Mausimmunisierungsstudie mit aufgereinigten VLP aus 293T-Zellen konnte immunogene Wirkungen der VLP unabhängig von Baculoviren nachweisen. Die in dieser Arbeit klonierten VLP-Plasmide sollen daher in

verschiedenen Varianten hergestellt und in Mausstudien auf ihre Immunogenität überprüft werden. Für die effiziente Produktion der von VLP, die C3d- und gp140-Proteine in großer Anzahl auf ihrer Oberfläche präsentieren, eignen sich die in D.6.2 beschriebenen stabilen Zelllinien. In den Immunisierungsstudien kann außerdem die unterschiedliche Induktion der Immunantworten bei Verwendung der monomeren gp120- und der trimeren gp140-Variante untersucht werden. Ferner soll die Bindung der auf den VLP präsentierten C3d-Proteine, wie in C.4 beschrieben, verifiziert werden. Darüber hinaus kann mit aufgereinigtem Protein die nachfolgend ausgelöste Stimulation der B-Zell-Signalkaskade gezeigt werden.

Wenn sich die Immunisierung mit den in dieser Arbeit generierten VLP-Varianten als erfolgreich erweist, können im Weiteren Modifikationen des HIV-1 Hüllproteins Env vorgenommen werden. In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Veränderungen von Env die Immunantworten erfolgreich verstärken und effektive neutralisierende Antikörper auslösen (Barnett *et al.*, 2001; Jeffs *et al.*, 1996; Jeffs *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2003; Phogat & Wyatt, 2007; Srivastava *et al.*, 2003). So könnten Deletionen in Env eingeführt oder durch Mischung verschiedener *Clade*-Sequenzen Env-Varianten generiert werden, die in der Lage sind, Antikörper zu induzieren, die mehrere HIV-Varianten binden.

Die kodonoptimierten gp120-DNA-Konstrukte waren erfolgreich bei der Induktion starker humoraler und zellvermittelter Immunantworten (D.4). Fusion von C3d führte zu einer verminderten Proteinexpression, die mit niedrigeren Antikörpertitern einherging. Diese verminderte Expression kann durch die Herstellung von VLP überwunden werden, da der Einsatz einzelner C3d-Kassetten die Expression nicht beeinträchtigt und die Menge an produziertem Antigen erhöht wird. C3d sollte daher bei der Konzeption DNA-basierter Therapeutika eine geringere Rolle spielen, aber dafür bei der Konstruktion von VLP-Vakzinen zukünftig eine wichtige Rolle übernehmen. Mittels Kombination unterschiedlicher Env-Antigene mit C3d auf der Oberfläche von VLP können so effektive Immunantworten gegen Env-Varianten generiert werden.

## E Literaturverzeichnis

---

- Aasa-Chapman, M. M. I., Holuigue, S., Aubin, K., Wong, M., Jones, N. A., Cornforth, D., Pellegrino, P., Newton, P., Williams, I., Borrow, P. & McKnight, A. (2005). Detection of Antibody-Dependent Complement-Mediated Inactivation of both Autologous and Heterologous Virus in Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* **79**, 2823-2830.
- Abaitua, F., Rodriguez, J. R., Garzon, A., Rodriguez, D. & Esteban, M. (2006). Improving recombinant MVA immune responses: Potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Research* **116**, 11-20.
- Abrahamyan, L. G., Mkrtychyan, S. R., Binley, J., Lu, M., Melikyan, G. B. & Cohen, F. S. (2005). The Cytoplasmic Tail Slows the Folding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Env from a Late Prebundle Configuration into the Six-Helix Bundle. *J Virol* **79**, 106-115.
- Agadjanyan, M. G., Chattergoon, M. A., Holterman, M. J., Monzavi-Karbassi, B., Kim, J. J., Dentchev, T., Wilson, D., Ayyavoo, V., Montaner, L. J., Kieber-Emmons, T., Sekaly, R. P. & Weiner, D. B. (2003). Costimulatory Molecule Immune Enhancement in a Plasmid Vaccine Model Is Regulated in Part Through the Ig Constant-Like Domain of CD80/86. *J Immunol* **171**, 4311-4319.
- Ahearn, J. M., Fischer, M. B., Croix, D., Goerg, S., Ma, M., Xia, J., Zhou, X., Howard, R. G., Rothstein, T. L. & Carroll, M. C. (1996). Disruption of the Cr2 locus results in a reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity* **4**, 251-262.
- Ahlers, J. D., Belyakov, I. M. & Berzofsky, J. A. (2003). Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines. *Curr Mol Med* **3**, 285-301.
- Akahata, W., Yang, Z. y. & Nabel, G. J. (2005). Comparative Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Particles and Corresponding Polypeptides in a DNA Vaccine. *J Virol* **79**, 626-631.
- Aluvihare, V. R., Khamlichi, A. A., Williams, G. T., Adorini, L. & Neuberger, M. S. (1997). Acceleration of intracellular targeting of antigen by the B-cell antigen receptor: importance depends on the nature of the antigen-antibody interaction. *EMBO J* **16**, 3553-3562.
- Amara, R. R. & Robinson, H. L. (2002). A new generation of HIV vaccines. *Trends Mol Med* **8**, 489-495.
- 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., Hulse, M. L., McClure, H. M., McNicholl, J. M., Moss, B. & Robinson, H. L. (2002). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* **20**, 1949-1955.
- Andre, S., Seed, B., Eberle, J., Schraut, W., Bultmann, A. & Haas, J. (1998). Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virol* **72**, 1497-1503.
- Andrews, D. W., Perara, E., Lesser, C. & Lingappa, V. R. (1988). Sequences beyond the cleavage site influence signal peptide function. *J Biol Chem* **263**, 15791-15798.
- Applequist, S. E., Rollman, E., Wareing, M. D., Liden, M., Rozell, B., Hinkula, J. & Ljunggren, H. G. (2005). Activation of Innate Immunity, Inflammation, and Potentiation of DNA Vaccination through Mammalian Expression of the TLR5 Agonist Flagellin. *J Immunol* **175**, 3882-3891.
- Armbruster, C., Stiegler, G., Vcelar, B., Jager, W., Vetter, N. & Katinger, H. (2002). A phase I trial with two human monoclonal antibodies (hMAb 2F5, 2G12) against HIV-1. *AIDS* **16**, 227-233.
- Ashish, Garg, R., Anguita, J. & Krueger, J. K. (2006). Binding of Full-Length HIV-1 gp120 to CD4 Induces Structural Reorientation around the gp120 Core. *Biophys J* **91**, L69-L71.
- Asokan, R., Hua, J., Young, K. A., Gould, H. J., Hannan, J. P., Kraus, D. M., Szakonyi, G., Grundy, G. J., Chen, X. S., Crow, M. K. & Holers, V. M. (2006). Characterization of Human Complement Receptor Type 2 (CR2/CD21) as a Receptor for IFN- $\alpha$ : A Potential Role in Systemic Lupus Erythematosus. *J Immunol* **177**, 383-394.
- Aubry, J. P., Pochon, S., Graber, P., Jansen, K. U. & Bonnefoy, J. Y. (1992). CD21 is a ligand for CD23 and regulates IgE production. *Nature* **358**, 505-507.
- Ausubel, F. (1987). *Current protocols in molecular biology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.

- Aydar, Y., Sukumar, S., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (2005).** The Influence of Immune Complex-Bearing Follicular Dendritic Cells on the IgM Response, Ig Class Switching, and Production of High Affinity IgG. *J Immunol* **174**, 5358-5366.
- Baba, T. W., Jeong, Y. S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M. F. & 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. & Ruprecht, R. M. (1999).** Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med* **5**, 194-203.
- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Lu, Y., Wright, J. E., Chou, T. C. & Ruprecht, R. M. (2000).** Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat Med* **6**, 200-206.
- Barel, M., Balbo, M., Le Romancer, M. & Frade, R. (2003).** Activation of Epstein-Barr virus/C3d receptor (gp140, CR2, CD21) on human cell surface triggers pp60src and Akt-GSK3 activities upstream and downstream to PI 3-kinase, respectively. *Eur J Immunol* **33**, 2557-2566.
- Barnes, L. M., Bentley, C. M. & Dickson, A. J. (2004).** Molecular definition of predictive indicators of stable protein expression in recombinant NS0 myeloma cells. *Biotechnol Bioeng* **85**, 115-121.
- Barnett, S. W., Lu, S., Srivastava, I., Cherpelis, S., Gettie, A., Blanchard, J., Wang, S., Mboudjeka, I., Leung, L., Lian, Y., Fong, A., Buckner, C., Ly, A., Hilt, S., Ulmer, J., Wild, C. T., Mascola, J. R. & Stamatatos, L. (2001).** The Ability of an Oligomeric Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Envelope Antigen To Elicit Neutralizing Antibodies against Primary HIV-1 Isolates Is Improved following Partial Deletion of the Second Hypervariable Region. *J Virol* **75**, 5526-5540.
- Barouch, D. H., Craiu, A., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Zheng, X. X., Santra, S., Frost, J. D., Krivulka, G. R., Lifton, M. A., Crabbs, C. L., Heidecker, G., Perry, H. C., Davies, M. E., Xie, H., Montefiori, D. C., Strom, T. B., Shiver, J. W., Lewis, M. G. & Letvin, N. L. (2000a).** Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 4192-4197.
- Barouch, D. H., Santra, S., Schmitz, J. E., Kuroda, M. J., Fu, T. M., Wagner, W., Biliska, M., Craiu, A., Zheng, X. X., Krivulka, G. R., Beaudry, K., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Trigona, W. L. & Letvin, N. L. (2000b).** Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science* **290**, 486-492.
- Barouch, D. H. & Letvin, N. L. (2000).** DNA vaccination for HIV-1 and SIV. *Intervirology* **43**, 282-287.
- Barouch, D. H., Santra, S., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Plishka, R., Buckler-White, A., Gaitan, A. E., Zin, R., Nam, J. H., Wyatt, L. S., Lifton, M. A., Nickerson, C. E., Moss, B., Montefiori, D. C., Hirsch, V. M. & Letvin, N. L. (2001).** Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol* **75**, 5151-5158.
- Barouch, D. H. & Nabel, G. J. (2005).** Adenovirus Vector-Based Vaccines for Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Human Gene Therapy* **16**, 149-156.
- Barouch, D. H. (2006).** Rational design of gene-based vaccines. *J Pathol* **208**, 283-289.
- Barrault, D. V. & Knight, A. M. (2004).** Distinct sequences in the cytoplasmic domain of complement receptor 2 are involved in antigen internalization and presentation. *J Immunol* **172**, 3509-3517.
- Barre-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W. & Montagnier, L. (1983).** Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- Barrington, R. A., Zhang, M., Zhong, X., Jonsson, H., Holodick, N., Cherukuri, A., Pierce, S. K., Rothstein, T. L. & Carroll, M. C. (2005).** CD21/CD19 coreceptor signaling promotes B cell survival during primary immune responses. *J Immunol* **175**, 2859-2867.
- Bates, M. K., Zhang, G., Sebestyen, M. G., Neal, Z. C., Wolff, J. A. & Herweijer, H. (2006).** Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *Biotechniques* **40**, 199-208.

- Batista, F. D. & Neuberger, M. S. (1998).** Affinity Dependence of the B Cell Response to Antigen: A Threshold, a Ceiling, and the Importance of Off-Rate. *Immunity* **8**, 751-759.
- Batista, F. D. & Neuberger, M. S. (2000).** B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination. *EMBO J* **19**, 513-520.
- Batista, F. D., Iber, D. & Neuberger, M. S. (2001).** B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* **411**, 489-494.
- Battiste, J. L., Mao, H., Rao, N. S., Tan, R., Muhandiram, D. R., Kay, L. E., Frankel, A. D. & Williamson, J. R. (1996).** Alpha helix-RNA major groove recognition in an HIV-1 rev peptide-RRE RNA complex. *Science* **273**, 1547-1551.
- Bauer, T., Weinberger, K. & Jilg, W. (2002).** Variants of two major T cell epitopes within the hepatitis B surface antigen are not recognized by specific T helper cells of vaccinated individuals. *Hepatology* **35**, 455-465.
- Beddows, S., Schulke, N., Kirschner, M., Barnes, K., Franti, M., Michael, E., Ketas, T., Sanders, R. W., Maddon, P. J., Olson, W. C. & Moore, J. P. (2005).** Evaluating the Immunogenicity of a Disulfide-Stabilized, Cleaved, Trimeric Form of the Envelope Glycoprotein Complex of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **79**, 8812-8827.
- Beddows, S., Franti, M., Dey, A. K., Kirschner, M., Iyer, S. P., Fisch, D. C., Ketas, T., Yuste, E., Desrosiers, R. C., Klasse, P. J., Maddon, P. J., Olson, W. C. & Moore, J. P. (2007).** A comparative immunogenicity study in rabbits of disulfide-stabilized, proteolytically cleaved, soluble trimeric human immunodeficiency virus type 1 gp140, trimeric cleavage-defective gp140 and monomeric gp120. *Virology* **360**, 329-340.
- Bellier, B., Dalba, C., Clerc, B., Desjardins, D., Drury, R., Cosset, F. L., Collins, M. & Klatzmann, D. (2006).** DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. *Vaccine* **24**, 2643-2655.
- Bennett, M. & Leanderson, T. (2003).** Was it there all the time? *Scand J Immunol* **57**, 499-505.
- Berg, D. T. & Grinnell, B. W. (1991).** Signal and propeptide processing of human tissue plasminogen activator: activity of a pro-tPA derivative. *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 1289-1296.
- Bergeron, D., Barbeau, B., Leger, C. & Rassart, E. (1995).** Experimental bias in the evaluation of the cellular transient expression in DNA co-transfection experiments. *Cell Mol Biol Res* **41**, 155-159.
- Bergmann, C., Stohmann, S. A. & McMillan, M. (1993).** An endogenously synthesized decamer peptide efficiently primes cytotoxic T cells specific for the HIV-1 envelope glycoprotein. *Eur J Immunol* **23**, 2777-2781.
- Bergmann-Leitner, E. S., Scheiblhofer, S., Weiss, R., Duncan, E. H., Leitner, W. W., Chen, D., Angov, E., Khan, F., Williams, J. L., Winter, D. B., Thalhamer, J., Lyon, J. A. & Tsokos, G. C. (2005).** C3d binding to the circumsporozoite protein carboxy-terminus deviates immunity against malaria. *Int Immunol* **17**, 245-255.
- Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W. & Tsokos, G. C. (2006).** Complement 3d: from molecular adjuvant to target of immune escape mechanisms. *Clin Immunol* **121**, 177-185.
- Bergmeier, L. A. & Lehner, T. (2006).** Innate and Adaptive Mucosal Immunity in Protection against HIV Infection. *Adv Dent Res* **19**, 21-28.
- Berlioz-Torrent, C., Shacklett, B. L., Erdtmann, L., Delamarre, L., Bouchaert, I., Sonigo, P., Dokhelar, M. C. & Benarous, R. (1999).** Interactions of the Cytoplasmic Domains of Human and Simian Retroviral Transmembrane Proteins with Components of the Clathrin Adaptor Complexes Modulate Intracellular and Cell Surface Expression of Envelope Glycoproteins. *J Virol* **73**, 1350-1361.
- Berman, P. W., Gregory, T. J., Riddle, L., Nakamura, G. R., Champe, M. A., Porter, J. P., Wurm, F. M., Hershberg, R. D., Cobb, E. K. & Eichberg, J. W. (1990).** Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* **345**, 622-625.
- Bernstein, H. B. & Compans, R. W. (1992).** Sulfation of the human immunodeficiency virus envelope glycoprotein. *J Virol* **66**, 6953-6959.

- Binley, J. M., Sanders, R. W., Clas, B., Schuelke, N., Master, A., Guo, Y., Kajumo, F., Anselma, D. J., Maddon, P. J., Olson, W. C. & Moore, J. P. (2000).** A Recombinant Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein Complex Stabilized by an Intermolecular Disulfide Bond between the gp120 and gp41 Subunits Is an Antigenic Mimic of the Trimeric Virion-Associated Structure. *J Virol* **74**, 627-643.
- Binley, J., Ngo-Abdalla, S., Moore, P., Bobardt, M., Chatterji, U., Gallay, P., Burton, D., Wilson, I., Elder, J. & de Parseval, A. (2006).** Inhibition of HIV Env binding to cellular receptors by monoclonal antibody 2G12 as probed by Fc-tagged gp120. *Retrovirology* **3**, 39.
- Boackle, S. A., Holers, V. M. & Karp, D. R. (1997).** CD21 augments antigen presentation in immune individuals. *Eur J Immunol* **27**, 122-129.
- Boackle, S. A., Morris, M. A., Holers, V. M. & Karp, D. R. (1998).** Complement Opsonization Is Required for Presentation of Immune Complexes by Resting Peripheral Blood B Cells. *J Immunol* **161**, 6537-6543.
- Bojak, A., Wild, J., Deml, L. & Wagner, R. (2002).** Impact of codon usage modification on T cell immunogenicity and longevity of HIV-1 gag-specific DNA vaccines. *Intervirology* **45**, 275-286.
- Bolesta, E., Kowalczyk, A., Wierzbicki, A., Eppolito, C., Kaneko, Y., Takiguchi, M., Stamatatos, L., Shrikant, P. A. & Kozbor, D. (2006).** Increased Level and Longevity of Protective Immune Responses Induced by DNA Vaccine Expressing the HIV-1 Env Glycoprotein when Combined with IL-21 and IL-15 Gene Delivery. *J Immunol* **177**, 177-191.
- Bower, J. F., Green, T. D. & Ross, T. M. (2004a).** DNA vaccines expressing soluble CD4-envelope proteins fused to C3d elicit cross-reactive neutralizing antibodies to HIV-1. *Virology* **328**, 292-300.
- Bower, J. F., Yang, X., Sodroski, J. & Ross, T. M. (2004b).** Elicitation of neutralizing antibodies with DNA vaccines expressing soluble stabilized human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers conjugated to C3d. *J Virol* **78**, 4710-4719.
- Bower, J. F., Sanders, K. L. & Ross, T. M. (2005).** C3d enhances immune responses using low doses of DNA expressing the HIV-1 envelope from codon-optimized gene sequences. *Curr HIV Res* **3**, 191-198.
- Bower, J. F., Li, Y., Wyatt, R. & Ross, T. M. (2006).** HIV-1 Envgp140 trimers elicit neutralizing antibodies without efficient induction of conformational antibodies. *Vaccine* **24**, 5442-5451.
- Bower, J. F. & Ross, T. M. (2006).** A minimum CR2 binding domain of C3d enhances immunity following vaccination. *Adv Exp Med Biol* **586**, 249-264.
- Boyer, J. D., Wang, B., Ugen, K. E., Agadjanyan, M., Javadian, A., Frost, P., Dang, K., Carrano, R. A., Ciccarelli, R., Coney, L., Williams, W. V. & Weiner, D. B. (1996).** In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J Med Primatol* **25**, 242-250.
- 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. & Weiner, D. B. (1997).** Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination [see comments]. *Nat Med* **3**, 526-532.
- Boyle, C. M. & Robinson, H. L. (2000).** Basic Mechanisms of DNA-Raised Antibody Responses to Intramuscular and Gene Gun Immunizations. *DNA and Cell Biology* **19**, 157-165.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Braun, M., Melchers, I., Peter, H. H. & Illges, H. (1998).** Human B and T lymphocytes have similar amounts of CD21 mRNA, but differ in surface expression of the CD21 glycoprotein. *Int Immunol* **10**, 1197-1202.
- Briggs, J. A., Wilk, T., Welker, R., Krausslich, H. G. & Fuller, S. D. (2003).** Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO J* **22**, 1707-1715.
- Brighty, D. W., Rosenberg, M., Chen, I. S. & Ivey Hoyle, M. (1991).** Envelope proteins from clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1 that are refractory to neutralization by soluble CD4 possess high affinity for the CD4 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7802-7805.
- Bruck, C., Thiriart, C., Fabry, L., Francotte, M., Pala, P., Van Opstal, O., Culp, J., Rosenberg, M., De Wilde, M., Heidt, P. & et al (1994).** HIV-1 envelope-elicited neutralizing antibody titres correlate with protection and virus load in chimpanzees. *Vaccine* **12**, 1141-1148.

- Bultmann, A., Muranyi, W., Seed, B. & Haas, J. (2001). Identification of Two Sequences in the Cytoplasmic Tail of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein That Inhibit Cell Surface Expression. *J Virol* **75**, 5263-5276.
- Buonaguro, L., Buonaguro, F. M., Tornesello, M. L., Mantas, D., Beth-Giraldo, E., Wagner, R., Michelson, S., Prevost, M. C., Wolf, H. & Giraldo, G. (2001). High efficient production of Pr55(gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res* **49**, 35-47.
- Buonaguro, L., Racioppi, L., Tornesello, M. L., Arra, C., Visciano, M. L., Biryahwaho, B., Sempala, S. D., Giraldo, G. & Buonaguro, F. M. (2002). Induction of neutralizing antibodies and cytotoxic T lymphocytes in Balb/c mice immunized with virus-like particles presenting a gp120 molecule from a HIV-1 isolate of clade A. *Antiviral Res* **54**, 189-201.
- Buonaguro, L., Visciano, M. L., Tornesello, M. L., Tagliamonte, M., Biryahwaho, B. & Buonaguro, F. M. (2005). Induction of Systemic and Mucosal Cross-Clade Neutralizing Antibodies in BALB/c Mice Immunized with Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade A Virus-Like Particles Administered by Different Routes of Inoculation. *J Virol* **79**, 7059-7067.
- Buonaguro, L., Devito, C., Tornesello, M. L., Schroder, U., Wahren, B., Hinkula, J. & Buonaguro, F. M. (2007). DNA-VLP prime-boost intra-nasal immunization induces cellular and humoral anti-HIV-1 systemic and mucosal immunity with cross-clade neutralizing activity. *Vaccine* **25**, 5968-5977.
- Burgers, W. A., van Harmelen, J. H., Shephard, E., Adams, C., Mgwebi, T., Bourn, W., Hanke, T., Williamson, A. L. & Williamson, C. (2006). Design and preclinical evaluation of a multigene human immunodeficiency virus type 1 subtype C DNA vaccine for clinical trial. *J Gen Virol* **87**, 399-410.
- Burnett, M. S., Wang, N., Hofmann, M. & Barrie, K. G. (2000). Potential live vaccines for HIV. *Vaccine* **19**, 735-742.
- Burton, D. R. (2002). Antibodies, viruses and vaccines. *Nat Rev Immunol* **2**, 706-713.
- 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. & Wyatt, R. T. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol* **5**, 233-236.
- Burton, D. R. (2006). Structural biology: Images from the surface of HIV. *Nature* **441**, 817-818.
- Calarese, D. A., Scanlan, C. N., Zwick, M. B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., Zhu, P., Wormald, M. R., Stanfield, R. L., Roux, K. H., Kelly, J. W., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Katinger, H., Burton, D. R. & Wilson, I. A. (2003). Antibody Domain Exchange Is an Immunological Solution to Carbohydrate Cluster Recognition. *Science* **300**, 2065-2071.
- Campbell, S. & Vogt, V. M. (1995). Self-assembly in vitro of purified CA-NC proteins from Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **69**, 6487-6497.
- Campbell, S. & Rein, A. (1999). In Vitro Assembly Properties of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Lacking the p6 Domain. *J Virol* **73**, 2270-2279.
- Campbell, S., Fisher, R. J., Towler, E. M., Fox, S., Issaq, H. J., Wolfe, T., Phillips, L. R. & Rein, A. (2001). Modulation of HIV-like particle assembly in vitro by inositol phosphates. *PNAS* **98**, 10875-10879.
- Carel, J. C., Frazier, B., Ley, T. J. & Holers, V. M. (1989). Analysis of epitope expression and the functional repertoire of recombinant complement receptor 2 (CR2/CD21) in mouse and human cells. *J Immunol* **143**, 923-930.
- Carel, J. C., Myones, B. L., Frazier, B. & Holers, V. M. (1990). Structural requirements for C3d,g/Epstein-Barr virus receptor (CR2/CD21) ligand binding, internalization, and viral infection. *J Biol Chem* **265**, 12293-12299.
- Carroll, M. C. (1998a). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 545-568.
- Carroll, M. C. (1998b). CD21/CD35 in B cell activation. *Seminars in Immunology* **10**, 279-286.
- Carroll, M. C. (2004). The complement system in B cell regulation. *Mol Immunol* **41**, 141-146.
- Carter, R. H., Spycher, M. O., Ng, Y. C., Hoffman, R. & Fearon, D. T. (1988). Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J Immunol* **141**, 457-463.

- Casimiro, D. R., Tang, A., Perry, H. C., Long, R. S., Chen, M., Heidecker, G. J., Davies, M. E., Freed, D. C., Persaud, N. V., Dubey, S., Smith, J. G., Havlir, D., Richman, D., Chastain, M. A., Simon, A. J., Fu, T. M., Emini, E. A. & Shiver, J. W. (2002). Vaccine-Induced Immune Responses in Rodents and Nonhuman Primates by Use of a Humanized Human Immunodeficiency Virus Type 1 pol Gene. *J Virol* **76**, 185-194.
- 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., & 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.
- Catanzaro, A. T., Roederer, M., Koup, R. A., Bailer, R. T., Enama, M. E., Nason, M. C., Martin, J. E., Rucker, S., Andrews, C. A., Gomez, P. L., Mascola, J. R., Nabel, G. J. & Graham, B. S. (2007). Phase I clinical evaluation of a six-plasmid multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *Vaccine* **25**, 4085-4092.
- Cavacini, L. A., Kuhrt, D., Duval, M., Mayer, K. & Posner, M. R. (2003). Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 785-792.
- Cebere, I., Dorrell, L., McShane, H., Simmons, A., McCormack, S., Schmidt, C., Smith, C., Brooks, M., Roberts, J. E., Darwin, S. C., Fast, P. E., Conlon, C., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J. & Hanke, T. (2006). Phase I clinical trial safety of DNA- and modified virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccines administered alone and in a prime-boost regime to healthy HIV-1-uninfected volunteers. *Vaccine* **24**, 417-425.
- Chakrabarti, B. K., Kong, W. P., Wu, B. y., Yang, Z. y., Friborg, J., Ling, X., King, S. R., Montefiori, D. C. & Nabel, G. J. (2002). Modifications of the Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein Enhance Immunogenicity for Genetic Immunization. *J Virol* **76**, 5357-5368.
- Chakrabarti, B. K., Ling, X., Yang, Z. y., Montefiori, D. C., Panet, A., Kong, W. P., Welcher, B., Louder, M. K., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2005). Expanded breadth of virus neutralization after immunization with a multiclade envelope HIV vaccine candidate. *Vaccine* **23**, 3434-3445.
- Chakravarty, L., Zabel, M. D., Weis, J. J. & Weis, J. H. (2002). Depletion of Lyn kinase from the BCR complex and inhibition of B cell activation by excess CD21 ligation. *Int Immunol* **14**, 139-146.
- Cham, F., Zhang, P. F., Heyndrickx, L., Bouma, P., Zhong, P., Katinger, H., Robinson, J., van der Groen, G. & Quinnan, J. (2006). Neutralization and infectivity characteristics of envelope glycoproteins from human immunodeficiency virus type 1 infected donors whose sera exhibit broadly cross-reactive neutralizing activity. *Virology* **347**, 36-51.
- Chan, D. C. & Kim, P. S. (1998). HIV Entry and Its Inhibition. *Cell* **93**, 681-684.
- Chattergoon, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (1998). Specific Immune Induction Following DNA-Based Immunization Through In Vivo Transfection and Activation of Macrophages/Antigen-Presenting Cells. *J Immunol* **160**, 5707-5718.
- Check, E. (2003). AIDS Vaccines: Back to 'plan A'. *Nature* **423**, 912-914.
- Chen, H., Xu, X. & Jones, I. (2007). Immunogenicity of the outer domain of a HIV-1 clade C gp120. *Retrovirology* **4**, 33.
- Chen, Z., Koralov, S. B., Gendelman, M., Carroll, M. C. & Kelsoe, G. (2000). Humoral Immune Responses in Cr2<sup>-/-</sup> Mice: Enhanced Affinity Maturation but Impaired Antibody Persistence. *J Immunol* **164**, 4522-4532.
- Cheng, P. C., Cherukuri, A., Dykstra, M., Malapati, S., Sproul, T., Chen, M. R. & Pierce, S. K. (2001). Floating the raft hypothesis: the roles of lipid rafts in B cell antigen receptor function. *Semin Immunol* **13**, 107-114.
- Cherukuri, A., Cheng, P. C. & Pierce, S. K. (2001a). The role of the CD19/CD21 complex in B cell processing and presentation of complement-tagged antigens. *J Immunol* **167**, 163-172.
- Cherukuri, A., Cheng, P. C., Sohn, H. W. & Pierce, S. K. (2001b). The CD19/CD21 complex functions to prolong B cell antigen receptor signaling from lipid rafts. *Immunity* **14**, 169-179.
- Cherukuri, A., Shoham, T., Sohn, H. W., Levy, S., Brooks, S., Carter, R. & Pierce, S. K. (2004). The Tetraspanin CD81 Is Necessary for Partitioning of Coligated CD19/CD21-B Cell Antigen Receptor Complexes into Signaling-Active Lipid Rafts. *J Immunol* **172**, 370-380.

- Chong, S. Y., Egan, M. A., Kutzler, M. A., Megati, S., Masood, A., Roopchard, V., Garcia-Hand, D., Montefiori, D. C., Quiroz, J., Rosati, M., Schadeck, E. B., Boyer, J. D., Pavlakis, G. N., Weiner, D. B., Sidhu, M., Eldridge, J. H. & Israel, Z. R. (2007). Comparative ability of plasmid IL-12 and IL-15 to enhance cellular and humoral immune responses elicited by a SIVgag plasmid DNA vaccine and alter disease progression following SHIV89.6P challenge in rhesus macaques. *Vaccine* **25**, 4967-4982.
- Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M. A., Santos-Ferreira, M. O., Laurent, A. G., Dauguet, C., Katlama, C., Rouzioux, C. & al., e. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346.
- Clemenza, L. & Isenman, D. E. (2000). Structure-Guided Identification of C3d Residues Essential for Its Binding to Complement Receptor 2 (CD21). *J Immunol* **165**, 3839-3848.
- Coffin, J. & V. (1997). *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Cole, K. S., Murphey-Corb, M., Narayan, O., Joag, S. V., Shaw, G. M. & Montelaro, R. C. (1998). Common Themes of Antibody Maturation to Simian Immunodeficiency Virus, Simian-Human Immunodeficiency Virus, and Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infections. *J Virol* **72**, 7852-7859.
- Collman, R., Balliet, J. W., Gregory, S. A., Friedman, H., Kolson, D. L., Nathanson, N. & Srinivasan, A. (1992). An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **66**, 7517-7521.
- Corbet, S., Vinner, L., Hougaard, D. M., Bryder, K., Nielsen, H. V., Nielsen, C. & Fomsgaard, A. (2000). Construction, biological activity, and immunogenicity of synthetic envelope DNA vaccines based on a primary, CCR5-tropic, early HIV type 1 isolate (BX08) with human codons. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1997-2008.
- Corcoran, A., Mahon, B. P. & Doyle, S. (2004). B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1. *J Infect Dis* **189**, 1873-1880.
- Cristillo, A. D., Wang, S., Caskey, M. S., Unangst, T., Hocker, L., He, L., Hudacik, L., Whitney, S., Keen, T., Chou, T. H., Shen, S., Joshi, S., Kalyanaraman, V. S., Nair, B., Markham, P., Lu, S. & Pal, R. (2006). Preclinical evaluation of cellular immune responses elicited by a polyvalent DNA prime/protein boost HIV-1 vaccine. *Virology* **346**, 151-168.
- Croix, D. A., Ahearn, J. M., Rosengard, A. M., Han, S., Kelsoe, G., Ma, M. & Carroll, M. C. (1996). Antibody response to a T-dependent antigen requires B cell expression of complement receptors. *J Exp Med* **183**, 1857-1864.
- Crooks, E. T., Moore, P. L., Richman, D., Robinson, J., Crooks, J. A., Franti, M., Schulke, N. & Binley, J. M. (2005). Characterizing anti-HIV monoclonal antibodies and immune sera by defining the mechanism of neutralization. *Hum Antibodies* **14**, 101-113.
- Crooks, E. T., Moore, P. L., Franti, M., Cayanan, C. S., Zhu, P., Jiang, P., de Vries, R. P., Wiley, C., Zharkikh, I., Schulke, N., Roux, K. H., Montefiori, D. C., Burton, D. R. & Binley, J. M. (2007). A comparative immunogenicity study of HIV-1 virus-like particles bearing various forms of envelope proteins, particles bearing no envelope and soluble monomeric gp120. *Virology* **366**, 245-262.
- Crotty, S., Aubert, R., Glidewell, J. & Ahmed, R. (2004). Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system. *Journal of Immunological Methods* **286**, 111-122.
- Cullen, B. R. & Garrett, E. D. (1992). A comparison of regulatory features in primate lentiviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 387-393.
- Cutler, A. J., Botto, M., van Essen, D., Rivi, R., Davies, K. A., Gray, D. & Walport, M. J. (1998). T Cell-dependent Immune Response in C1q-deficient Mice: Defective Interferon gamma Production by Antigen-specific T Cells. *J Exp Med* **187**, 1789-1797.
- D'Addario, M., Ahmad, A., Morgan, A. & Menezes, J. (2000). Binding of the epstein-barr virus major envelope glycoprotein gp350 results in the upregulation of the TNF-[alpha] gene expression in monocytic cells via NF-[kappa]b involving PKC, PI3-K and tyrosine kinases. *Journal of Molecular Biology* **298**, 765-778.
- Dacheux, L., Moreau, A., Ataman-Onal, Y., Biron, F., Verrier, B. & Barin, F. (2004). Evolutionary Dynamics of the Glycan Shield of the Human Immunodeficiency Virus Envelope during Natural Infection and Implications for Exposure of the 2G12 Epitope. *J Virol* **78**, 12625-12637.

- Dal Maso, L., Serraino, D. & Franceschi, S. (2001). Epidemiology of AIDS-related tumours in developed and developing countries. *European Journal of Cancer* **37**, 1188-1201.
- Dale, C. J., Liu, X. S., De Rose, R., Purcell, D. F. J., Anderson, J., Xu, Y., Leggatt, G. R., Frazer, I. H. & Kent, S. J. (2002). Chimeric Human Papilloma Virus-Simian/Human Immunodeficiency Virus Virus-like-Particle Vaccines: Immunogenicity and Protective Efficacy in Macaques. *Virology* **301**, 176-187.
- Dale, C. J., De Rose, R., Stratov, I., Chea, S., Montefiori, D. C., Thomson, S., Ramshaw, I. A., Coupar, B. E. H., Boyle, D. B., Law, M. & Kent, S. J. (2004). Efficacy of DNA and Fowlpox Virus Priming/Boosting Vaccines for Simian/Human Immunodeficiency Virus. *J Virol* **78**, 13819-13828.
- Dale, C. J., Thomson, S., De Rose, R., Ranasinghe, C., Medveczky, C. J., Pamungkas, J., Boyle, D. B., Ramshaw, I. A. & Kent, S. J. (2006). Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med* **127**, 171-197.
- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K. & Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**, 1938-1941.
- Davis, H. L., Mancini, M., Michel, M. L. & Whalen, R. G. (1996). DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14**, 910-915.
- Day, M. (2007). AIDS expert doubts vaccine will be found in near future. *BMJ* **334**, 1133.
- Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C. & . (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-991.
- Decroly, E., Vandenbranden, M., Ruyschaert, J. M., Cogniaux, J., Jacob, G. S., Howard, S. C., Marshall, G., Kompelli, A., Basak, A. & Jean, F. (1994). The convertases furin and PC1 can both cleave the human immunodeficiency virus (HIV)-1 envelope glycoprotein gp160 into gp120 (HIV-1 SU) and gp41 (HIV-1 TM). *J Biol Chem* **269**, 12240-12247.
- Deeks, S. G., Schweighardt, B., Wrin, T., Galovich, J., Hoh, R., Sinclair, E., Hunt, P., McCune, J. M., Martin, J. N., Petropoulos, C. J. & Hecht, F. M. (2006). Neutralizing Antibody Responses against Autologous and Heterologous Viruses in Acute versus Chronic Human Immunodeficiency Virus (HIV) Infection: Evidence for a Constraint on the Ability of HIV To Completely Evade Neutralizing Antibody Responses. *J Virol* **80**, 6155-6164.
- Del Nagro, C. J., Kolla, R. V. & Rickert, R. C. (2005). A critical role for complement C3d and the B cell coreceptor (CD19/CD21) complex in the initiation of inflammatory arthritis. *J Immunol* **175**, 5379-5389.
- Delcayre, A. X., Salas, F., Mathur, S., Kovats, K., Lotz, M. & Lernhardt, W. (1991). Epstein Barr virus/complement C3d receptor is an interferon alpha receptor. *EMBO J* **10**, 919-926.
- Deml, L., Kratochwil, G., Osterrieder, N., Knuchel, R., Wolf, H. & Wagner, R. (1997a). Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain. *Virology* **235**, 10-25.
- Deml, L., Schirmbeck, R., Reimann, J., Wolf, H. & Wagner, R. (1997b). Recombinant human immunodeficiency Pr55gag virus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic T-cells and neutralizing antibodies. *Virology* **235**, 26-39.
- Deml, L., Wolf, H. & Wagner, R. (1999). High level expression of hepatitis B virus surface antigen in stably transfected Drosophila Schneider-2 cells. *J Virol Methods* **79**, 191-203.
- Deml, L., Bojak, A., Steck, S., Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H. & 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., Wild, J. & Wagner, R. (2004). Virus-like particles. In *Methods in Molecular Medicine*, pp. 133-157. Edited by J. a. R. U. Decker. Totowa, New Jersey, USA: Humana Press Inc.
- Deml, L., Speth, C., Dierich, M. P., Wolf, H. & Wagner, R. (2005). Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Molecular Immunology* **42**, 259-277.
- Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C. & Fearon, D. T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* **271**, 348-350.

- Derby, N. R., Kraft, Z., Kan, E., Crooks, E. T., Barnett, S. W., Srivastava, I. K., Binley, J. M. & Stamatatos, L. (2006). Antibody Responses Elicited in Macaques Immunized with Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) SF162-Derived gp140 Envelope Immunogens: Comparison with Those Elicited during Homologous Simian/Human Immunodeficiency Virus SHIVSF162P4 and Heterologous HIV-1 Infection. *J Virol* **80**, 8745-8762.
- Derdowski, A., Ding, L. & Spearman, P. (2004). A Novel Fluorescence Resonance Energy Transfer Assay Demonstrates that the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Pr55Gag I Domain Mediates Gag-Gag Interactions. *J Virol* **78**, 1230-1242.
- Devaux, P., Christiansen, D., Plumet, S. & Gerlier, D. (2004). Cell surface activation of the alternative complement pathway by the fusion protein of measles virus. *J Gen Virol* **85**, 1665-1673.
- Devito, C., Zuber, B., Schroder, U., Benthin, R., Okuda, K., Broliden, K., Wahren, B. & Hinkula, J. (2004). Intranasal HIV-1-gp160-DNA/gp41 Peptide Prime-Boost Immunization Regimen in Mice Results in Long-Term HIV-1 Neutralizing Humoral Mucosal and Systemic Immunity. *J Immunol* **173**, 7078-7089.
- Devitt, G., Emerson, V., Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Pisch, T. & Bosch, V. (2007). Incorporation of chimeric HIV-SIV-Env and modified HIV-Env proteins into HIV pseudovirions. *Virology* **361**, 465-471.
- Didierlaurent, A., Ramirez, J. C., Gherardi, M., Zimmerli, S. C., Graf, M., Orbea, H. A., Pantaleo, G., Wagner, R., Esteban, M., Kraehenbuhl, J. P. & Sirard, J. C. (2004). Attenuated poxviruses expressing a synthetic HIV protein stimulate HLA-A2-restricted cytotoxic T-cell responses. *Vaccine* **22**, 3395-3403.
- Diefenbach, R. J. & Isenman, D. E. (1995). Mutation of residues in the C3dg region of human complement component C3 corresponding to a proposed binding site for complement receptor type 2 (CR2, CD21) does not abolish binding of iC3b or C3dg to CR2. *J Immunol* **154**, 2303-2320.
- Dishaw, L., Smith, S. & Bigger, C. (2005). Characterization of a C3-like cDNA in a coral: phylogenetic implications. *Immunogenetics* **57**, 535-548.
- Doan, L. X., Li, M., Chen, C. & Yao, Q. (2005). Virus-like particles as HIV-1 vaccines. *Rev Med Virol* **15**, 75-88.
- Dong, M., Zhang, P. F., Grieder, F., Lee, J., Krishnamurthy, G., VanCott, T., Broder, C., Polonis, V. R., Yu, X. F., Shao, Y., Faix, D., Valente, P. & Quinnan, G. V., Jr. (2003). Induction of Primary Virus-Cross-Reactive Human Immunodeficiency Virus Type 1-Neutralizing Antibodies in Small Animals by Using an Alphavirus-Derived In Vivo Expression System. *J Virol* **77**, 3119-3130.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. & Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, 617-648.
- Duerr, A., Wasserheit, J. N. & Corey, L. (2006). HIV Vaccines: New Frontiers in Vaccine Development. *Clin Infect Dis* **43**, 500-511.
- 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. & McDonald, D. M. (2000). Distribution of DNA Vaccines Determines Their Immunogenicity After Intramuscular Injection in Mice. *J Immunol* **165**, 2850-2858.
- Earl, P. L., Moss, B. & Doms, R. W. (1991). Folding, interaction with GRP78-BiP, assembly, and transport of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol* **65**, 2047-2055.
- Earl, P. L., Sugiura, W., Montefiori, D. C., Broder, C. C., Lee, S. A., Wild, C., Lifson, J. & Moss, B. (2001). Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140. *J Virol* **75**, 645-653.
- Eckert, D. M. & Kim, P. S. (2001). MECHANISMS OF VIRAL MEMBRANE FUSION AND ITS INHIBITION. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 777-810.
- Eda, Y., Murakami, T., Ami, Y., Nakasone, T., Takizawa, M., Someya, K., Kaizu, M., Izumi, Y., Yoshino, N., Matsushita, S., Higuchi, H., Matsui, H., Shinohara, K., Takeuchi, H., Koyanagi, Y., Yamamoto, N. & Honda, M. (2006). Anti-V3 Humanized Antibody KD-247 Effectively Suppresses Ex Vivo Generation of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Affords Sterile Protection of Monkeys against a Heterologous Simian/Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* **80**, 5563-5570.
- Egan, M. A., Megati, S., Roopchand, V., Garcia-Hand, D., Luckay, A., Chong, S. Y., Rosati, M., Sackitey, S., Weiner, D. B., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., Israel, Z. R., Eldridge, J. H. & Sidhu, M. K. (2006). Rational design of a plasmid DNA vaccine capable of eliciting cell-mediated immune responses to multiple HIV antigens in mice. *Vaccine* **24**, 4510-4523.

- El Barrawy, M., Lichtiger, B., Fisher, H. & Daryl, O. (1991). In vitro response of peripheral blood mononuclear cells to phytohemagglutinin and interleukin-2. *Human Immunology* **30**, 222-225.
- Ellenberger, D., Wyatt, L., Li, B., Buge, S., Lanier, N., Rodriguez, I. V., Sariol, C. A., Martinez, M., Monsour, M., Vogt, J., Smith, J., Otten, R., Montefiori, D., Kraiselburd, E., Moss, B., Robinson, H., McNicholl, J. & Butera, S. (2005). Comparative immunogenicity in rhesus monkeys of multi-protein HIV-1 DNA/MVA vaccines expressing mature and immature VLPs. *Virology* **340**, 21-32.
- Ellenberger, D., Otten, R. A., Li, B., Aidoo, M., Rodriguez, I. V., Sariol, C. A., Martinez, M., Monsour, M., Wyatt, L., Hudgens, M. G., Kraiselburd, E., Moss, B., Robinson, H., Folks, T. & Butera, S. (2006). HIV-1 DNA/MVA vaccination reduces the per exposure probability of infection during repeated mucosal SHIV challenges. *Virology* **352**, 216-225.
- Eller, N., Golding, H., Inoue, S., Beining, P., Inman, J., Matthews, N., Scott, D. E. & Golding, B. (2004). Systemic and mucosal immunity in rhesus macaques immunized with HIV-1 peptide and gp120 conjugated to *Brucella abortus*. *Journal of Medical Primatology* **33**, 167-174.
- Ellerbrok, H., D'Auriol, L., Vaquero, C. & Sitbon, M. (1992). Functional tolerance of the human immunodeficiency virus type 1 envelope signal peptide to mutations in the amino-terminal and hydrophobic regions. *J Virol* **66**, 5114-5118.
- Elmowalid, G. A., Qiao, M., Jeong, S. H., Borg, B. B., Baumert, T. F., Sapp, R. K., Hu, Z., Murthy, K. & Liang, T. J. (2007). Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *PNAS* **104**, 8427-8432.
- Eriksson, K. K., Makia, D., Maier, R., Ludewig, B. & Thiel, V. (2006). Towards a coronavirus-based HIV multigene vaccine. *Clin Dev Immunol* **13**, 353-360.
- Esparza, I., Becherer, J. D., Alsenz, J., De la, H. A., Lao, Z., Tsoukas, C. D. & Lambris, J. D. (1991). Evidence for multiple sites of interaction in C3 for complement receptor type 2 (C3d/EBV receptor, CD21). *Eur J Immunol* **21**, 2829-2838.
- Estcourt, M. J., McMichael, A. J. & Hanke, T. (2004). DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1. *Immunol Rev* **199**, 144-155.
- Evans, T. G., Frey, S., Israel, H., Chiu, J., El Habib, R., Gilbert, P., Gaitan, A. & Montefiori, D. C. (2004). Long-term memory B-cell responses in recipients of candidate human immunodeficiency virus type 1 vaccines. *Vaccine* **22**, 2626-2630.
- Fan, H., Tong, T., Chen, H. & Guo, A. (2007). Immunization of DNA vaccine encoding C3d-VP1 fusion enhanced protective immune response against foot-and-mouth disease virus. *Virus Genes* **35**, 347-357.
- Fang, Y., Xu, C., Fu, Y. X., Holers, V. M. & Molina, H. (1998). Expression of Complement Receptors 1 and 2 on Follicular Dendritic Cells Is Necessary for the Generation of a Strong Antigen-Specific IgG Response. *J Immunol* **160**, 5273-5279.
- Farzan, M., Choe, H., Desjardins, E., Sun, Y., Kuhn, J., Cao, J., Archambault, D., Kolchinsky, P., Koch, M., Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. *J Virol* **72**, 7620-7625.
- Fearon, D. T. & Carter, R. H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 127-149.
- Fearon, D. T. & Carroll, M. C. (2000). Regulation of B lymphocyte responses to foreign and self-antigens by the CD19/CD21 complex. *Annu Rev Immunol* **18**, 393-422.
- Fenouillet, E. & Jones, I. M. (1995). The glycosylation of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein (gp41) is important for the efficient intracellular transport of the envelope precursor gp160. *J Gen Virol* **76**, 1509-1514.
- Ferrantelli, F., Rasmussen, R. A., Buckley, K. A., Li, P. L., Wang, T., Montefiori, D. C., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D. C., McClure, H. M. & Ruprecht, R. M. (2004). Complete protection of neonatal rhesus macaques against oral exposure to pathogenic simian-human immunodeficiency virus by human anti-HIV monoclonal antibodies. *J Infect Dis* **189**, 2167-2173.

- Ferrantelli, F., Buckley, K. A., Rasmussen, R. A., Chalmers, A., Wang, T., Li, P. L., Williams, A. L., Hofmann-Lehmann, R., Montefiori, D. C., Cavacini, L. A., Katinger, H., Stiegler, G., Anderson, D. C., McClure, H. M. & Ruprecht, R. M. (2007). Time dependence of protective post-exposure prophylaxis with human monoclonal antibodies against pathogenic SHIV challenge in newborn macaques. *Virology* **358**, 69-78.
- Fingerroth, J. D., Clabby, M. L. & Strominger, J. D. (1988). Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J Virol* **62**, 1442-1447.
- Fingerroth, J. D. (1990). Comparative structure and evolution of murine CR2. The homolog of the human C3d/EBV receptor (CD21). *J Immunol* **144**, 3458-3467.
- Finzi, A., Orthwein, A., Mercier, J. & Cohen, E. A. (2007). Productive Human Immunodeficiency Virus Type 1 Assembly Takes Place at the Plasma Membrane. *J Virol* **81**, 7476-7490.
- Fischer, E., Delibrias, C. & Kazatchkine, M. D. (1991). Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* **146**, 865-869.
- Fischer, E. M., Mouhoub, A., Maillet, F., Fremeaux-Bacchi, V., Krief, C., Gould, H., Berrih-Aknin, S. & Kazatchkine, M. D. (1999). Expression of CD21 is developmentally regulated during thymic maturation of human T lymphocytes. *Int Immunol* **11**, 1841-1849.
- Fischer, M. B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A. P., Goodnow, C. C., Kelsoe, G. & Carroll, M. C. (1998). Dependence of Germinal Center B Cells on Expression of CD21/CD35 for Survival. *Science* **280**, 582-585.
- Fischer, W., Perkins, S., Theiler, J., Bhattacharya, T., Yusim, K., Funkhouser, R., Kuiken, C., Haynes, B., Letvin, N. L., Walker, B. D., Hahn, B. H. & Korber, B. T. (2007). Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med* **13**, 100-106.
- Flynn, N. M., Forthal, D. N., Harro, C. D., Judson, F. N., Mayer, K. H. & Para, M. F. (2005). Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis* **191**, 654-665.
- Folz, R. J. & Gordon, J. I. (1986). Deletion of the propeptide from human preproapolipoprotein A-II redirects cotranslational processing by signal peptidase. *J Biol Chem* **261**, 14752-14759.
- Frade, R., Myones, B. L., Barel, M., Krikorian, L., Charriaut, C. & Ross, G. D. (1985). gp140, a C3b-binding membrane component of lymphocytes, is the B cell C3dg/C3d receptor (CR2) and is distinct from the neutrophil C3dg receptor (CR4). *Eur J Immunol* **15**, 1192-1197.
- Frade, R., Hermann, J. & Barel, M. (1992). A 16 amino acid synthetic peptide derived from human C3d triggers proliferation and specific tyrosine phosphorylation of transformed CR2-positive human lymphocytes and of normal resting B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **188**, 833-842.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1995). The Role of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins in Virus Infection. *J Biol Chem* **270**, 23883-23886.
- Freed, E. O. & Martin, M. A. (1996). Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions. *J Virol* **70**, 341-351.
- Freed, E. O. (2002). Viral Late Domains. *J Virol* **76**, 4679-4687.
- Freed, E. & Mouland, A. (2006). The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* **3**, 77.
- Fujita, T., Endo, Y. & Nonaka, M. (2004). Primitive complement system--recognition and activation. *Molecular Immunology* **41**, 103-111.
- Gallo, R. C., Salahuddin, S. Z., Popovic, M., Shearer, G. M., Kaplan, M., Haynes, B. F., Palker, T. J., Redfield, R., Oleske, J., Safai, B. & et al (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-503.
- Gallo, S. A., Finnegan, C. M., Viard, M., Raviv, Y., Dimitrov, A., Rawat, S. S., Puri, A., Durell, S. & Blumenthal, R. (2003). The HIV Env-mediated fusion reaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1614**, 36-50.
- Gao, F., Li, Y., Decker, J. M., Peyerl, F. W., Bibollet-Ruche, F., Rodenburg, C. M., Chen, Y., Shaw, D. R., Allen, S., Musonda, R., Shaw, G. M., Zajac, A. J., Letvin, N. & Hahn, B. H. (2003). Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res Hum Retroviruses* **19**, 817-823.

- Gardsvoll, H., Solberg, H., Dano, K. & Hoyer-Hansen, G. (2000).** Generation of high-affinity rabbit polyclonal antibodies to the murine urokinase receptor using DNA immunization. *Journal of Immunological Methods* **234**, 107-116.
- Gelmann, E. P., Franchini, G., Manzari, V., Wong-Staal, F. & Gallo, R. C. (1984).** Molecular Cloning of a Unique Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV-II<sub>Mo</sub>). *PNAS* **81**, 993-997.
- Gilbert, H. E., Eaton, J. T., Hannan, J. P., Holers, V. M. & Perkins, S. J. (2005).** Solution structure of the complex between CR2 SCR 1-2 and C3d of human complement: an X-ray scattering and sedimentation modelling study. *J Mol Biol* **346**, 859-873.
- Gilbert, H. E., Asokan, R., Holers, V. M. & Perkins, S. J. (2006).** The 15 SCR Flexible Extracellular Domains of Human Complement Receptor Type 2 can Mediate Multiple Ligand and Antigen Interactions. *Journal of Molecular Biology* **362**, 1132-1147.
- Girard, M. P., Osmanov, S. K. & Kieny, M. P. (2006).** A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* **24**, 4062-4081.
- Glynn, R. (2000).** B-lymphocyte quiescence, tolerance and activation as viewed by global gene expression profiling on microarrays. *Immunological Reviews* **176**, 216-246.
- Gnanamony, M., Peedicayil, A. & Abraham, P. (2007).** An overview of human papillomaviruses and current vaccine strategies. *Indian J Med Microbiol* **25**, 10-17.
- Goepfert, P. A., Horton, H., McElrath, M. J., Gurunathan, S., Ferrari, G., Tomaras, G. D., Montefiori, D. C., Allen, M., Chiu, Y. L., Spearman, P., Fuchs, J. D., Koblin, B. A. & NIAID HIV Vaccine Trials Network (2005).** High-Dose Recombinant Canarypox Vaccine Expressing HIV-1 Protein, in Seronegative Human Subjects. *J Infect Dis* **192**, 1249-1259.
- Gold, M. R., Matsuuchi, L., Kelly, R. B. & DeFranco, A. L. (1991).** Tyrosine Phosphorylation of Components of the B-Cell Antigen Receptors Following Receptor Crosslinking. *PNAS* **88**, 3436-3440.
- Gold, M. R. (2002).** To make antibodies or not: signaling by the B-cell antigen receptor. *Trends Pharmacol Sci* **23**, 316-324.
- Golden, A., Austen, D. A., van Schravendijk, M. R., Sullivan, B. J., Kawasaki, E. S. & Osburne, M. S. (1998).** Effect of promoters and signal sequences on the production of secreted HIV-1 gp120 protein in the baculovirus system. *Protein Expr Purif* **14**, 8-12.
- Golding, H., Zaitseva, M., de Rosny, E., King, L. R., Manischewitz, J., Sidorov, I., Gorny, M. K., Zolla-Pazner, S., Dimitrov, D. S. & Weiss, C. D. (2002).** Dissection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry with Neutralizing Antibodies to gp41 Fusion Intermediates. *J Virol* **76**, 6780-6790.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Jimenez, E. P., Jimenez, V., Wagner, R., Graf, M., Frchette, M. J., Liljestrom, P., Pantaleo, G. & Esteban, M. (2007a).** Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1<sub>BX08</sub> gp120 and HIV-1<sub>(IIIB)</sub> Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* **25**, 2863-2885.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Jimenez, V., Bieler, K., Wild, J., Kostic, L., Heidari, S., Chen, M., Frchette, M. J., Pantaleo, G., Wolf, H., Liljestrom, P., Wagner, R. & Esteban, M. (2007b).** Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine* **25**, 1969-1992.
- Goonetilleke, N., Moore, S., Dally, L., Winstone, N., Cebere, I., Mahmoud, A., Pinheiro, S., Gillespie, G., Brown, D., Loach, V. & McMichael, A. J. (2006).** Induction of Multifunctional Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-Specific T Cells Capable of Proliferation in Healthy Subjects by Using a Prime-Boost Regimen of DNA- and Modified Vaccinia Virus Ankara-Vectored Vaccines Expressing HIV-1 Gag Coupled to CD8+ T-Cell Epitopes. *J Virol* **80**, 4717-4728.
- Gor, D. O., Ding, X., Li, Q. & Greenspan, N. S. (2006).** Genetic fusion of three tandem copies of murine C3d sequences to diphtheria toxin fragment B elicits a decreased fragment B-specific antibody response. *Immunology Letters* **102**, 38-49.
- Gorny, M. K. & Zolla-Pazner, S. (2000).** Recognition by Human Monoclonal Antibodies of Free and Complexed Peptides Representing the Prefusogenic and Fusogenic Forms of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41. *J Virol* **74**, 6186-6192.
- Gorse, G. J., Frey, S. E., Patel, G., Newman, F. K. & Belshe, R. B. (1994).** Vaccine-induced antibodies to native and recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *Vaccine* **12**, 912-918.

- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1989).** Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5781-5785.
- Gould, S. J. & Subramani, S. (1988).** Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry* **175**, 5-13.
- Gould, S. J., Booth, A. M. & Hildreth, J. E. K. (2003).** The Trojan exosome hypothesis. *PNAS* **100**, 10592-10597.
- Graf, M., Bojak, A., Dem, L., Bieler, K., Wolf, H. & Wagner, R. (2000).** Concerted Action of Multiple cis- Acting Sequences Is Required for Rev Dependence of Late Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Journal of Virology* **74**.
- Graf, M., Deml, L. & Wagner, R. (2004).** Codon-optimized genes that enable increased heterologous expression in mammalian cells and elicit efficient immune responses in mice after vaccination of naked DNA. *Methods Mol Med* **94:197-210.**, 197-210.
- Graham, B. S., Keefer, M. C., McElrath, M. J., Gorse, G. J., Schwartz, D. H., Weinhold, K., Matthews, T. J., Esterlitz, J. R., Sinangil, F., Fast, P. E. & and the NIAID AIDS Vaccine Group\* (1996).** Safety and Immunogenicity of a Candidate HIV-1 Vaccine in Healthy Adults: Recombinant Glycoprotein (rgp) 120: A Randomized, Double-Blind Trial. *Ann Intern Med* **125**, 270-279.
- Graham, B. S. & Mascola, J. R. (2005).** Lessons from failure--preparing for future HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis* **191**, 647-649.
- Graham, B. S., Koup, R. A., Roederer, M., Bailer, R. T., Enama, M. E., Moodie, Z., Martin, J. E., McCluskey, M. M., Chakrabarti, B. K., Lamoreaux, L., Andrews, C. A., Gomez, P. L., Mascola, J. R., Nabel, G. J. & Vaccine Research Center (2006).** Phase 1 Safety and Immunogenicity Evaluation of a Multiclade HIV-1 DNA Candidate Vaccine. *J Infect Dis* **194**, 1650-1660.
- Graham, F. L. & Eb, A. J. (1973).** A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Green, T. D., Newton, B. R., Rota, P. A., Xu, Y., Robinson, H. L. & Ross, T. M. (2001).** C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine* **20**, 242-248.
- Green, T. D., Montefiori, D. C. & Ross, T. M. (2003).** Enhancement of antibodies to the human immunodeficiency virus type 1 envelope by using the molecular adjuvant C3d. *J Virol* **77**, 2046-2055.
- Greene, W. C. & Peterlin, B. M. (2002).** Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat Med* **8**, 673-680.
- Grgacic, E. V. L. & Anderson, D. A. (2006).** Virus-like particles: Passport to immune recognition. *Methods* **40**, 60-65.
- Gros, L., Pelegrin, M., Plays, M. & Piechaczyk, M. (2006).** Efficient Mother-to-Child Transfer of Antiretroviral Immunity in the Context of Preclinical Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy. *J Virol* **80**, 10191-10200.
- Grundner, C., Li, Y., Louder, M., Mascola, J., Yang, X., Sodroski, J. & Wyatt, R. (2005).** Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* **331**, 33-46.
- Gu, M., Rappaport, J. & Leppla, S. H. (1995).** Furin is important but not essential for the proteolytic maturation of gp160 of HIV-1. *FEBS Letters* **365**, 95-97.
- Guan, Q. D., Wang, Y., Chu, Y. W., Wang, L. X., Ni, J., Guo, Q. & Xiong, S. D. (2007).** The distinct effects of three tandem repeats of C3d in the immune responses against tumor-associated antigen hCGbeta by DNA immunization. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 875-884.
- Guo, R. F. & Ward, P. A. (2005).** ROLE OF C5A IN INFLAMMATORY RESPONSES. *Annual Review of Immunology* **23**, 821-852.
- Gurunathan, S., Wu, C. Y., Freidag, B. L. & Seder, R. A. (2000).** DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* **12**, 442-447.
- Guthridge, J. M., Rakstang, J. K., Young, K. A., Hinshelwood, J., Aslam, M., Robertson, A., Gipson, M. G., Sarrias, M. R., Moore, W. T., Meagher, M., Karp, D., Lambris, J. D., Perkins, S. J. & Holers, V. M. (2001).** Structural Studies in Solution of the Recombinant N-Terminal Pair of Short Consensus/Complement Repeat Domains of Complement Receptor Type 2 (CR2/CD21) and Interactions with Its Ligand C3dg. *Biochemistry* **40**, 5931-5941.

- Gzyl, J., Bolesta, E., Wierzbicki, A., Kmiecik, D., Naito, T., Honda, M., Komuro, K., Kaneko, Y. & Kozbor, D. (2004). Effect of partial and complete variable loop deletions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein on the breadth of gp160-specific immune responses. *Virology* **318**, 493-506.
- Haas, J., Park, E. C. & Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr Biol* **6**, 315-324.
- Haas, K. M., Toapanta, F. R., Oliver, J. A., Poe, J. C., Weis, J. H., Karp, D. R., Bower, J. F., Ross, T. M. & Tedder, T. F. (2004). Cutting edge: C3d functions as a molecular adjuvant in the absence of CD21/35 expression. *J Immunol* **172**, 5833-5837.
- Haigwood, N. L., Nara, P. L., Brooks, E., Van Nest, G. A., Ott, G., Higgins, K. W., Dunlop, N., Scandella, C. J., Eichberg, J. W. & Steimer, K. S. (1992). Native but not denatured recombinant human immunodeficiency virus type 1 gp120 generates broad-spectrum neutralizing antibodies in baboons. *J Virol* **66**, 172-182.
- Hammonds, J., Chen, X., Fouts, T., DeVico, A., Montefiori, D. & Spearman, P. (2005). Induction of Neutralizing Antibodies against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolates by Gag-Env Pseudovirion Immunization. *J Virol* **79**, 14804-14814.
- Hanahan, D. & Meselson, M. (1983). Plasmid screening at high colony density Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Methods Enzymol* **166**, 557-580.
- Hanke, T., McMichael, A. J., Samuel, R. V., Powell, L. A. J., McLoughlin, L., Crome, S. J. & Edlin, A. (2002). Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA- and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccines for Kenya. *Vaccine* **21**, 108-114.
- Hanke, T., McMichael, A. J. & Dorrell, L. (2007). Clinical experience with plasmid DNA- and modified vaccinia virus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *J Gen Virol* **88**, 1-12.
- Hannan, J., Young, K., Szakonyi, G., Overduin, M. J., Perkins, S. J., Chen, X. & Holers, V. M. (2002). Structure of complement receptor (CR) 2 and CR2-C3d complexes. *Biochem Soc Trans* **30**, 983-989.
- Hannan, J. P., Young, K. A., Guthridge, J. M., Asokan, R., Szakonyi, G., Chen, X. S. & Holers, V. M. (2005). Mutational analysis of the complement receptor type 2 (CR2/CD21)-C3d interaction reveals a putative charged SCR1 binding site for C3d. *J Mol Biol* **346**, 845-858.
- Harro, C. D., Pang, Y. Y., Roden, R. B., Hildesheim, A., Wang, Z., Reynolds, M. J., Mast, T. C., Robinson, R., Murphy, B. R., Karron, R. A., Dillner, J., Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (2001). Safety and immunogenicity trial in adult volunteers of a human papillomavirus 16 L1 virus-like particle vaccine. *J Natl Cancer Inst* **93**, 284-292.
- Harter, C. & Wieland, F. (1996). The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **1286**, 75-93.
- Hawlich, H. & Kohl, J. (2006). Complement and Toll-like receptors: Key regulators of adaptive immune responses. *Molecular Immunology* **43**, 13-21.
- Healy, J. I., Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S. & Goodnow, C. C. (1998). Quantitative and qualitative control of antigen receptor signalling in tolerant B lymphocytes. *Novartis Found Symp* **215**, 137-144.
- Heap, C. J., Reading, S. A. & Dimmock, N. J. (2005). An antibody specific for the C-terminal tail of the gp41 transmembrane protein of human immunodeficiency virus type 1 mediates post-attachment neutralization, probably through inhibition of virus-cell fusion. *J Gen Virol* **86**, 1499-1507.
- Henson, S. E., Smith, D., Boackle, S. A., Holers, V. M. & Karp, D. R. (2001). Generation of recombinant human C3dg tetramers for the analysis of CD21 binding and function. *J Immunol Methods* **258**, 97-109.
- Herrera, C., Klasse, P. J., Michael, E., Kake, S., Barnes, K., Kibler, C. W., Campbell-Gardener, L., Si, Z., Sodroski, J., Moore, J. P. & Beddows, S. (2005). The impact of envelope glycoprotein cleavage on the antigenicity, infectivity, and neutralization sensitivity of Env-pseudotyped human immunodeficiency virus type 1 particles. *Virology* **338**, 154-172.
- Hess, M. W., Schwendinger, M. G., Eskelinen, E. L., Pfaller, K., Pavelka, M., Dierich, M. P. & Prodinger, W. M. (2000). Tracing uptake of C3dg-conjugated antigen into B cells via complement receptor type 2 (CR2, CD21). *Blood* **95**, 2617-2623.

- Hinkula, J. (2007).** Clarification of how HIV-1 DNA and protein immunizations may be better used to obtain HIV-1-specific mucosal and systemic immunity. *Expert Review of Vaccines* **6**, 203-212.
- Hirsch MS, C. J. (1990).** Human immunodeficiency viruses. In *Virology*, 4th ed. edn, pp. 1953-1975. Edited by Fields. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Hivroz, C., Fischer, E., Kazatchkine, M. D. & Grillot-Courvalin, C. (1991).** Differential effects of the stimulation of complement receptors CR1 (CD35) and CR2 (CD21) on cell proliferation and intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilization of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Immunol* **146**, 1766-1772.
- Hlavacek, W. S., Percus, J. K., Percus, O. E., Perelson, A. S. & Wofsy, C. (2002).** Retention of antigen on follicular dendritic cells and B lymphocytes through complement-mediated multivalent ligand-receptor interactions: theory and application to HIV treatment. *Mathematical Biosciences* **176**, 185-202.
- Hokey, D. & Weiner, D. (2006).** DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Seminars in Immunopathology* **28**, 267-279.
- Holers, V. M. (2005).** Complement receptors and the shaping of the natural antibody repertoire. *Springer Seminars in Immunopathology* **26**, 405-423.
- Holers, V. M. & Kulik, L. (2007).** Complement receptor 2, natural antibodies and innate immunity: Inter-relationships in B cell selection and activation. *Molecular Immunology* **44**, 64-72.
- Holl, V., Peressin, M., Decoville, T., Schmidt, S., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A. M. & Moog, C. (2006a).** Nonneutralizing Antibodies Are Able To Inhibit Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication in Macrophages and Immature Dendritic Cells. *J Virol* **80**, 6177-6181.
- Holl, V., Peressin, M., Schmidt, S., Decoville, T., Zolla-Pazner, S., Aubertin, A. M. & Moog, C. (2006b).** Efficient inhibition of HIV-1 replication in human immature monocyte-derived dendritic cells by purified anti-HIV-1 IgG without induction of maturation. *Blood* **107**, 4466-4474.
- Holtkotte, D., Pfeiffer, T., Pisch, T. & Bosch, V. (2006).** Selection and Characterization of a Replication-Competent Human Immunodeficiency Virus Type 1 Variant Encoding C-Terminally Truncated Env. *AIDS Research and Human Retroviruses* **22**, 57-65.
- Hong, W., Xiao, S., Zhou, R., Fang, L., He, Q., Wu, B., Zhou, F. & Chen, H. (2002).** Protection induced by intramuscular immunization with DNA vaccines of pseudorabies in mice, rabbits and piglets. *Vaccine* **20**, 1205-1214.
- Hu, S. L., Klaniecki, J., Dykers, T., Sridhar, P. & Travis, B. M. (1991).** Neutralizing antibodies against HIV-1 BRU and SF2 isolates generated in mice immunized with recombinant vaccinia virus expressing HIV-1 (BRU) envelope glycoproteins and boosted with homologous gp160. *AIDS Res Hum Retroviruses* **7**, 615-620.
- Hu, Y. & Test, S. T. (2004).** Functional differences in IgG anti-polysaccharide antibodies elicited by immunization of mice with C3d versus ovalbumin conjugates of pneumococcal serotype 14 capsular polysaccharide. *Vaccine* **23**, 21-28.
- Huber, M. & Trkola, A. (2007).** Humoral immunity to HIV-1: neutralization and beyond. *Journal of Internal Medicine* **262**, 5-25.
- Humbert, M. & Dietrich, U. (2006).** The role of neutralizing antibodies in HIV infection. *AIDS Rev* **8**, 51-59.
- Huszar, T., Mucsi, I., Terebessy, T., Masszi, A., Adamko, S., Jeney, C. & Rosivall, L. (2001).** The use of a second reporter plasmid as an internal standard to normalize luciferase activity in transient transfection experiments may lead to a systematic error. *Journal of Biotechnology* **88**, 251-258.
- Isaguliants, M. G., Gudima, S. O., Ivanova, O. V., Levi, M., Hinkula, J., Garaev, M. M., Kochetkov, S. N. & Wahren, B. (2000).** Immunogenic properties of reverse transcriptase of HIV type 1 assessed by DNA and protein immunization of rabbits. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 1269-1280.
- Janeway, C., Jr. (2002).** *Immunologie*. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jefferies, C. A. & O'Neill, L. A. J. (2000).** Rac1 Regulates Interleukin 1-induced Nuclear Factor kappa B Activation in an Inhibitory Protein kappa Balph -independent Manner by Enhancing the Ability of the p65 Subunit to Transactivate Gene Expression. *J Biol Chem* **275**, 3114-3120.
- Jeffs, S. A., McKeating, J., Lewis, S., Craft, H., Biram, D., Stephens, P. E. & Brady, R. L. (1996).** Antigenicity of truncated forms of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Gen Virol* **77**, 1403-1410.

- Jeffs, S. A., Shotton, C., Balfe, P. & McKeating, J. A. (2002).** Truncated gp120 envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus 1 elicits a broadly reactive neutralizing immune response. *J Gen Virol* **83**, 2723-2732.
- Jeffs, S. A., Goriup, S., Kebble, B., Crane, D., Bolgiano, B., Sattentau, Q., Jones, S. & Holmes, H. (2004).** Expression and characterisation of recombinant oligomeric envelope glycoproteins derived from primary isolates of HIV-1. *Vaccine* **22**, 1032-1046.
- Jeong, S. H., Qiao, M., Nascimbeni, M., Hu, Z., Rehermann, B., Murthy, K. & Liang, T. J. (2004).** Immunization with Hepatitis C Virus-Like Particles Induces Humoral and Cellular Immune Responses in Nonhuman Primates. *J Virol* **78**, 6995-7003.
- Jiang, W., Ren, L. & Jin, N. (2007).** HIV-1 DNA vaccine efficacy is enhanced by coadministration with plasmid encoding IFN-[alpha]. *Journal of Virological Methods In Press, Corrected Proof*.
- Johnson, R. P., Lifson, J. D., Czajak, S. C., Cole, K. S., Manson, K. H., Glickman, R., Yang, J., Montefiori, D. C., Montelaro, R., Wyand, M. S. & Desrosiers, R. C. (1999).** Highly Attenuated Vaccine Strains of Simian Immunodeficiency Virus Protect against Vaginal Challenge: Inverse Relationship of Degree of Protection with Level of Attenuation. *J Virol* **73**, 4952-4961.
- Johnston, M. I. & Fauci, A. S. (2007).** An HIV Vaccine -- Evolving Concepts. *N Engl J Med* **356**, 2073-2081.
- Johnston, P. B., Dubay, J. W. & Hunter, E. (1993).** Truncations of the simian immunodeficiency virus transmembrane protein confer expanded virus host range by removing a block to virus entry into cells. *J Virol* **67**, 3077-3086.
- Jones, C. D., Page, M., Bacon, A., Cahill, E., Bentley, M. & Chatfield, S. N. (1999).** T-cell and antibody response characterisation of a new recombinant pre-S1, pre-S2 and SHBs antigen-containing hepatitis B vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice. *Vaccine* **17**, 2528-2537.
- Joos, B., Trkola, A., Kuster, H., Aceto, L., Fischer, M., Stiegler, G., Armbruster, C., Vcelar, B., Katinger, H. & Gunthard, H. F. (2006).** Long-Term Multiple-Dose Pharmacokinetics of Human Monoclonal Antibodies (MAbs) against Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope gp120 (MAb 2G12) and gp41 (MAbs 4E10 and 2F5). *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1773-1779.
- Kalli, K. R., Ahearn, J. M. & Fearon, D. T. (1991).** Interaction of iC3b with recombinant isotypic and chimeric forms of CR2. *J Immunol* **147**, 590-594.
- Kang, S. M., Shi Quan, F., Huang, C., Guo, L., Ye, L., Yang, C. & Compans, R. W. (2005).** Modified HIV envelope proteins with enhanced binding to neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* **331**, 20-32.
- Karwowska, S., Gorny, M. K., Buchbinder, A., Gianakakos, V., Williams, C., Fuerst, T. & Zolla Pazner, S. (1992).** Production of human monoclonal antibodies specific for conformational and linear non-V3 epitopes of gp120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1099-1106.
- Kaya, Z., Afanasyeva, M., Wang, Y., Dohmen, K. M., Schlichting, J., Tretter, T., Fairweather, D., Holers, V. M. & Rose, N. R. (2001).** Contribution of the innate immune system to autoimmune myocarditis: a role for complement. *Nat Immunol* **2**, 739-745.
- Kent, S., De Rose, R. & Rollman, E. (2007).** Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine. *Curr Opin Investig Drugs* **8**, 159-167.
- Kim, M., Qiao, Z. S., Montefiori, D. C., Haynes, B. F., Reinherz, E. L. & Liao, H. X. (2005).** Comparison of HIV Type 1 ADA gp120 Monomers versus gp140 Trimers as Immunogens for the Induction of Neutralizing Antibodies. *AIDS Research and Human Retroviruses* **21**, 58-67.
- Kim, Y. B., Han, D. P., Cao, C. & Cho, M. W. (2003).** Immunogenicity and Ability of Variable Loop-Deleted Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins to Elicit Neutralizing Antibodies. *Virology* **305**, 124-137.
- Kirnbauer, R. (1996).** Papillomavirus-like particles for serology and vaccine development. *Intervirology* **39**, 54-61.
- Klasse, P. J. (2007).** Modeling how many envelope glycoprotein trimers per virion participate in human immunodeficiency virus infectivity and its neutralization by antibody. *Virology In Press, Corrected Proof*.

- Klinman, D. M., Currie, D., Gursel, I. & Verthelyi, D. (2004). Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological Reviews* **199**, 201-216.
- Koch, M., Pancera, M., Kwong, P. D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W. A., Sodroski, J. & Wyatt, R. (2003). Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**, 387-400.
- Koch, M., Frazier, J., Sodroski, J. & Wyatt, R. (2005). Characterization of antibody responses to purified HIV-1 gp120 glycoproteins fused with the molecular adjuvant C3d. *Virology* **340**, 277-284.
- Kofman, A., Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Kharazova, A., Wolf, H. & Wagner, R. (2003). HIV-1 gag expression is quantitatively dependent on the ratio of native and optimized codons. *Tsitologija* **45**, 86-93.
- Kong, W. P., Huang, Y., Yang, Z. y., Chakrabarti, B. K., Moodie, Z. & Nabel, G. J. (2003). Immunogenicity of Multiple Gene and Clade Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Vaccines. *J Virol* **77**, 12764-12772.
- Kotsopoulou, E., Kim, V. N., Kingsman, A. J., Kingsman, S. M. & 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.
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M. & Jansen, K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**, 1645-1651.
- Kovacs, J. A., Vasudevachari, M. B., Easter, M., Davey, R. T., Falloon, J., Polis, M. A., Metcalf, J. A., Salzman, N., Baseler, M., Smith, G. E. & et al (1993). Induction of humoral and cell-mediated anti-human immunodeficiency virus (HIV) responses in HIV sero-negative volunteers by immunization with recombinant gp160. *J Clin Invest* **92**, 919-928.
- Koyanagi, Y., Miles, S., Mitsuyasu, R. T., Merrill, J. E., Vinters, H. V. & Chen, I. S. (1987). Dual infection of the central nervous system by AIDS viruses with distinct cellular tropisms. *Science* **236**, 819-822.
- Kozono, Y., Duke, R. C., Schleicher, M. S. & Holers, V. M. (1995). Co-ligation of mouse complement receptors 1 and 2 with surface IgM rescues splenic B cells and WEHI-231 cells from anti-surface IgM-induced apoptosis. *Eur J Immunol* **25**, 1013-1017.
- Kozono, Y., Abe, R., Kozono, H., Kelly, R. G., Azuma, T. & Holers, V. M. (1998). Cross-linking CD21/CD35 or CD19 increases both B7-1 and B7-2 expression on murine splenic B cells. *J Immunol* **160**, 1565-1572.
- Krieg, A. M. (2002). CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA AND THEIR IMMUNE EFFECTS\*. *Annual Review of Immunology* **20**, 709-760.
- Kuate, S., Stahl-Hennig, C., Stoiber, H., Nchinda, G., Floto, A., Franz, M., Sauermann, U., Bredl, S., Deml, L., Ignatius, R., Norley, S., Racz, P., Tenner-Racz, K., Steinman, R. M., Wagner, R. & Uberla, K. (2006). Immunogenicity and efficacy of immunodeficiency virus-like particles pseudotyped with the G protein of vesicular stomatitis virus. *Virology* **351**, 133-144.
- Kumar, S., Yan, J., Muthumani, K., Ramanathan, M. P., Yoon, H., Pavlakis, G. N., Felber, B. K., Sidhu, M., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (2006). Immunogenicity Testing of a Novel Engineered HIV-1 Envelope Gp140 DNA Vaccine Construct. *DNA and Cell Biology* **25**, 383-392.
- Kurosaki, T. (1999). GENETIC ANALYSIS OF B CELL ANTIGEN RECEPTOR SIGNALING. *Annual Review of Immunology* **17**, 555-592.
- Kusano, M., Choi, N. H., Tomita, M., Yamamoto, K., Migita, S., Sekiya, T. & Nishimura, S. (1986). Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of rabbit complement component C3 alpha-chain. *Immunol Invest* **15**, 365-378.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Sattentau, Q. J., Sodroski, J. & Hendrickson, W. A. (2000). Oligomeric Modeling and Electrostatic Analysis of the gp120 Envelope Glycoprotein of Human Immunodeficiency Virus. *J Virol* **74**, 1961-1972.
- Kwong, P. D., Doyle, M. L., Casper, D. J., Cicala, C., Leavitt, S. A., Majeed, S., Steenbeke, T. D., Venturi, M., Chaiken, I., Fung, M., Katinger, H., Parren, P. W. I. H., Robinson, J., Van Ryk, D., Wang, L., Burton, D. R., Freire, E., Wyatt, R., Sodroski, J., Hendrickson, W. A. & Arthos, J. (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**, 678-682.

- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lambele, M., Labrosse, B., Roch, E., Moreau, A., Verrier, B., Barin, F., Roingeard, P., Mammano, F. & Brand, D. (2007). Impact of Natural Polymorphism within the gp41 Cytoplasmic Tail of Human Immunodeficiency Virus Type 1 on the Intracellular Distribution of Envelope Glycoproteins and Viral Assembly. *J Virol* **81**, 125-140.
- Lambris, J. D., Ganu, V. S., Hirani, S. & Muller-Eberhard, H. J. (1985). Mapping of the C3d Receptor (CR2)-Binding Site and a Neoantigenic Site in the C3d Domain of the Third Component of Complement. *PNAS* **82**, 4235-4239.
- Land, A. & Braakman, I. (2001). Folding of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* **83**, 783-790.
- LAND, A. A. F. K., ZONNEVELD, D. U. C. O. & BRAAKMAN, I. N. E. K. (2003). Folding of HIV-1 Envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. *FASEB J* **17**, 1058-1067.
- Lankar, D., Vincent-Schneider, H., Briken, V., Yokozeki, T., Raposo, G. & Bonnerot, C. (2002). Dynamics of Major Histocompatibility Complex Class II Compartments during B Cell Receptor-mediated Cell Activation. *J Exp Med* **195**, 461-472.
- Law, M., Cardoso, R. M. F., Wilson, I. A. & Burton, D. R. (2007). Antigenic and Immunogenic Study of Membrane-Proximal External Region-Grafted gp120 Antigens by a DNA Prime-Protein Boost Immunization Strategy. *J Virol* **81**, 4272-4285.
- Lechmann, M., Murata, K., Satoi, J., Vergalla, J., Baumert, T. F. & Liang, T. J. (2001). Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* **34**, 417-423.
- Lee, J., Sinkovits, R., Mock, D., Rab, E., Cai, J., Yang, P., Saunders, B., Hsueh, R., Choi, S., Subramaniam, S., Scheuermann, R. & in collaboration with the Alliance for Cellular Signaling (2006). Components of the antigen processing and presentation pathway revealed by gene expression microarray analysis following B cell antigen receptor (BCR) stimulation. *BMC Bioinformatics* **7**, 237.
- Lee, Y., Haas, K. M., Gor, D. O., Ding, X., Karp, D. R., Greenspan, N. S., Poe, J. C. & Tedder, T. F. (2005). Complement component C3d-antigen complexes can either augment or inhibit B lymphocyte activation and humoral immunity in mice depending on the degree of CD21/CD19 complex engagement. *J Immunol* **175**, 8011-8023.
- Lehner, T. & Anton, P. A. (2002). Mucosal immunity and vaccination against HIV. *AIDS* **16 Suppl 4**, S125-S132.
- Letvin, N. L., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Perry, H. C., Davies, M. E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D. C., Lord, C. I., Handt, L. K., Liu, M. A. & Shiver, J. W. (1997). Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9378-9383.
- Letvin, N. L. (2002). Strategies for an HIV vaccine. *J Clin Invest* **110**, 15-20.
- Letvin, N. L., Barouch, D. H. & Montefiori, D. C. (2002). Prospects for vaccine protection against hiv-1 infection and AIDS. *Annu Rev Immunol* **20**, 73-99.
- Letvin, N. L., Huang, Y., Chakrabarti, B. K., Xu, L., Seaman, M. S., Beaudry, K., Koriath-Schmitz, B., Yu, F., Rohne, D., Martin, K. L., Miura, A., Kong, W. P., Yang, Z. y., Gelman, R. S., Golubeva, O. G., Montefiori, D. C., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2004). Heterologous Envelope Immunogens Contribute to AIDS Vaccine Protection in Rhesus Monkeys. *J Virol* **78**, 7490-7497.
- Levy, S., Todd, S. C. & Maecker, H. T. (1998). CD81 (TAPA-1): A MOLECULE INVOLVED IN SIGNAL TRANSDUCTION AND CELL ADHESION IN THE IMMUNE SYSTEM. *Annual Review of Immunology* **16**, 89-109.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. (1994). Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**, 266-278.
- Li, Y., Bergeron, J. J., Luo, L., Ou, W. J., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. (1996). Effects of inefficient cleavage of the signal sequence of HIV-1 gp120 on its association with calnexin, folding, and intracellular transport. *PNAS* **93**, 9606-9611.

- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y. & Kang, C. Y. (2000). The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology* **272**, 417-428.
- Li, Y., Svehla, K., Mathy, N. L., Voss, G., Mascola, J. R. & Wyatt, R. (2006). Characterization of Antibody Responses Elicited by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Primary Isolate Trimeric and Monomeric Envelope Glycoproteins in Selected Adjuvants. *J Virol* **80**, 1414-1426.
- Liao, H. X., Sutherland, L. L., Xia, S. M., Brock, M. E., Scarce, R. M., Vanleeuwen, S., Alam, S. M., McAdams, M., Ma, B. J., Li, Y., Decker, J. M., Nabel, G. J., Montefiori, D. C., Hahn, B. H., Korber, B. T., Gao, F. & Haynes, B. F. (2006). A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and C HIV-1 primary viruses. *Virology* **353**, 268-282.
- Lieberman, J. & Frankel, F. R. (2002). Engineered *Listeria monocytogenes* as an AIDS vaccine. *Vaccine* **20**, 2007-2010.
- Lim, K. & Chae, C. B. (1989). A simple assay for DNA transfection by incubation of the cells in culture dishes with substrates for beta-galactosidase. *Biotechniques* **7**, 576-579.
- Lindhout, E., Mevissen, M. L., Kwekkeboom, J., Tager, J. M. & de Groot, C. (1993). Direct evidence that human follicular dendritic cells (FDC) rescue germinal centre B cells from death by apoptosis. *Clin Exp Immunol* **91**, 330-336.
- Liu, F., Mboudjeka, I., Shen, S., Chou, T. H., Wang, S., Ross, T. M. & Lu, S. (2004). Independent but not synergistic enhancement to the immunogenicity of DNA vaccine expressing HIV-1 gp120 glycoprotein by codon optimization and C3d fusion in a mouse model. *Vaccine* **22**, 1764-1772.
- Liu, M. A., Wahren, B. & Karlsson Hedestam, G. B. (2006). DNA vaccines: recent developments and future possibilities. *Hum Gene Ther* **17**, 1051-1061.
- Lockey, T. D., Slobod, K. S., Caver, T. E., D'Costa, S., Owens, R. J., McClure, H. M., Compans, R. W. & Hurwitz, J. L. (2000). Multi-envelope HIV vaccine safety and immunogenicity in small animals and chimpanzees. *Immunol Res* **21**, 7-21.
- Lodge, R., Gottlinger, H., Gabuzda, D., Cohen, E. A. & Lemay, G. (1994). The intracytoplasmic domain of gp41 mediates polarized budding of human immunodeficiency virus type 1 in MDCK cells. *J Virol* **68**, 4857-4861.
- Lodge, R., Lalonde, J. P., Lemay, G. & Cohen, E. A. (1997). The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* **16**, 695-705.
- Lori, F., Weiner, D., Calarota, S., Kelly, L. & Lisziewicz, J. (2006). Cytokine-adjuvanted HIV-DNA vaccination strategies. *Springer Seminars in Immunopathology* **28**, 231-238.
- Lou, D. & Kohler, H. (1998). Enhanced molecular mimicry of CEA using photoaffinity crosslinked C3d peptide. *Nat Biotech* **16**, 458-462.
- Lu, S., Santoro, J. C., Fuller, D. H., Haynes, J. R. & Robinson, H. L. (1995). Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* **209**, 147-154.
- Lu, S., Wyatt, R., Richmond, J. F., Mustafa, F., Wang, S., Weng, J., Montefiori, D. C., Sodroski, J. & Robinson, H. L. (1998). Immunogenicity of DNA vaccines expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein with and without deletions in the V1/2 and V3 regions. *AIDS Res Hum Retroviruses* **14**, 151-155.
- Lu, S. (2006). Combination DNA plus protein HIV vaccines. *Springer Seminars in Immunopathology* **28**, 255-265.
- Luckay, A., Sidhu, M. K., Kjekens, R., Megati, S., Chong, S. Y., Roopchand, V., Garcia-Hand, D., Abdullah, R., Braun, R., Montefiori, D. C., Pavlakis, G. N., Mathiesen, I., Israel, Z. R., Eldridge, J. H. & Egan, M. A. (2007). Effect of Plasmid DNA Vaccine Design and In Vivo Electroporation on the Resulting Vaccine-Specific Immune Responses in Rhesus Macaques. *J Virol* **81**, 5257-5269.
- Lyubchenko, T., dal Porto, J., Cambier, J. C. & Holers, V. M. (2005). Coligation of the B cell receptor with complement receptor type 2 (CR2/CD21) using its natural ligand C3dg: activation without engagement of an inhibitory signaling pathway. *J Immunol* **174**, 3264-3272.
- Lyubchenko, T., Dal Porto, J. M., Holers, V. M. & Cambier, J. C. (2007). Cutting Edge: Complement (C3d)-Linked Antigens Break B Cell Anergy. *J Immunol* **179**, 2695-2699.

- MacGregor, R. R., Ginsberg, R., Ugen, K. E., Baine, Y., Kang, C. U., Tu, X. M., Higgins, T., Weiner, D. B. & Boyer, J. D. (2002). T-cell responses induced in normal volunteers immunized with a DNA-based vaccine containing HIV-1 env and rev. *AIDS* **16**, 2137-2143.
- Mackay, F. & Browning, J. L. (1998). Turning off follicular dendritic cells. *Nature* **395**, 26-27.
- Malaspina, A., Moir, S., Orsega, S. M., Vasquez, J., Miller, N. J., Donoghue, E. T., Kottlil, S., Gezmu, M., Follmann, D., Vodeiko, G. M., Levandowski, R. A., Mican, J. M. & Fauci, A. S. (2005). Compromised B cell responses to influenza vaccination in HIV-infected individuals. *J Infect Dis* **191**, 1442-1450.
- Malm, M., Rollman, E., Ustav, M., Hinkula, J., Krohn, K., Wahren, B. & Blazevic, V. (2005). Cross-Clade Protection Induced by Human Immunodeficiency Virus-1 DNA Immunogens Expressing Consensus Sequences of Multiple Genes and Epitopes From Subtypes A, B, C, and FGH. *Viral Immunology* **18**, 678-688.
- Mammano, F., Ohagen, A., Hoglund, S. & Gottlinger, H. G. (1994). Role of the major homology region of human immunodeficiency virus type 1 in virion morphogenesis. *J Virol* **68**, 4927-4936.
- Mandel, T. E., Phipps, R. P., Abbot, A. P. & Tew, J. G. (1981). Long-term antigen retention by dendritic cells in the popliteal lymph node of immunized mice. *Immunology* **43**, 353-362.
- Manrique, A., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Kuster, H., Leemann, C., Niederost, B., Weber, R., Stiegler, G., Katinger, H., Gunthard, H. F. & Trkola, A. (2007). In Vivo and In Vitro Escape from Neutralizing Antibodies 2G12, 2F5, and 4E10. *J Virol* **81**, 8793-8808.
- Martin, D. R., Yuryev, A., Kalli, K. R., Fearon, D. T. & Ahearn, J. M. (1991). Determination of the structural basis for selective binding of Epstein-Barr virus to human complement receptor type 2. *J Exp Med* **174**, 1299-1311.
- Martoglio, B., Graf, R. & Dobberstein, B. (1997). Signal peptide fragments of preprolactin and HIV-1 p-gp160 interact with calmodulin. *EMBO J* **16**, 6636-6645.
- 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. & 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.
- Mascola, J. R., Frankel, S. S. & Brolden, K. (2000). HIV-1 entry at the mucosal surface: role of antibodies in protection. *AIDS* **14 Suppl 3**, S167-S174.
- Mascola, J. R. (2002). Passive transfer studies to elucidate the role of antibody-mediated protection against HIV-1. *Vaccine* **20**, 1922-1925.
- Masilamani, M., Kassahn, D., Mikkat, S., Glocker, M. O. & Illges, H. (2003). B cell activation leads to shedding of complement receptor type II (CR2/CD21). *Eur J Immunol* **33**, 2391-2397.
- Mayer, M. (1984). Complement. Historical perspectives and some current issues. *Complement* **1**, 2-26.
- Mc Cann, C. M., Song, R. J. & Ruprecht, R. M. (2005). Antibodies: can they protect against HIV infection? *Curr Drug Targets Infect Disord* **5**, 95-111.
- McBurney, S. P., Young, K. R. & Ross, T. M. (2007). Membrane embedded HIV-1 envelope on the surface of a virus-like particle elicits broader immune responses than soluble envelopes. *Virology* **358**, 334-346.
- McMichael, A. J. (2006). HIV VACCINES. *Annual Review of Immunology* **24**, 227-255.
- McNabb, D. S., Reed, R. & Marciniak, R. A. (2005). Dual Luciferase Assay System for Rapid Assessment of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1539-1549.
- Mitchell, J. A., Green, T. D., Bright, R. A. & Ross, T. M. (2003). Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine* **21**, 902-914.
- Mitsuyoshi, J. K., Hu, Y. & Test, S. T. (2005). Role of Complement Receptor Type 2 and Endogenous Complement in the Humoral Immune Response to Conjugates of Complement C3d and Pneumococcal Serotype 14 Capsular Polysaccharide. *Infect Immun* **73**, 7311-7316.

- Mochizuki, N., Otsuka, N., Matsuo, K., Shiino, T., Kojima, A., Matsuda, M. & Tatsumi, M. (1999). An infectious DNA clone of HIV type 1 subtype C. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 1321-1324.
- Modrow, S. F. D. (1997). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Molina, H., Holers, V. M., Li, B., Fang, Y. F., Mariathasan, S., Goellner, J., Strauss-Schoenberger, J., Karr, R. W. & Chaplin, D. D. (1996). Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *PNAS* **93**, 3357-3361.
- Mongini, P. K., Vilensky, M. A., Highet, P. F. & Inman, J. K. (1997). The affinity threshold for human B cell activation via the antigen receptor complex is reduced upon co-ligation of the antigen receptor with CD21 (CR2). *J Immunol* **159**, 3782-3791.
- Mongini, P. K., Tolani, S., Fattah, R. J. & Inman, J. K. (2002). Antigen receptor triggered upregulation of CD86 and CD80 in human B cells: augmenting role of the CD21/CD19 co-stimulatory complex and IL-4. *Cell Immunol* **216**, 50-64.
- Mongini, P. K. A., Jackson, A. E., Tolani, S., Fattah, R. J. & Inman, J. K. (2003). Role of Complement-Binding CD21/CD19/CD81 in Enhancing Human B Cell Protection from Fas-Mediated Apoptosis. *J Immunol* **171**, 5244-5254.
- Montefiori, D. C., Safrit, J. T., Lydy, S. L., Barry, A. P., Biliska, M., Robinson, H. L. & Rovinski, B. (2001). Induction of neutralizing antibodies and gag-specific cellular immune responses to an R5 primary isolate of human immunodeficiency virus type 1 in rhesus macaques. *J Virol* **75**, 5879-5890.
- Moog, C., Fleury, H. J., Pellegrin, I., Kirn, A. & Aubertin, A. M. (1997). Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J Virol* **71**, 3734-3741.
- Moosj, P., Nieuwenhuis, I. G., Knoop, C. J., Doms, R. W., Bogers, W. M. J. M., ten Haaf, P. J. F., Niphuis, H., Koornstra, W., Bieler, K., Kostler, J., Morein, B., Cafaro, A., Ensoli, B., Wagner, R. & Heeney, J. L. (2004). Qualitative T-Helper Responses to Multiple Viral Antigens Correlate with Vaccine-Induced Immunity to Simian/Human Immunodeficiency Virus Infection. *J Virol* **78**, 3333-3342.
- Moore, P. L., Crooks, E. T., Porter, L., Zhu, P., Cayan, C. S., Grise, H., Corcoran, P., Zwick, M. B., Franti, M., Morris, L., Roux, K. H., Burton, D. R. & Binley, J. M. (2006). Nature of Nonfunctional Envelope Proteins on the Surface of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **80**, 2515-2528.
- Morgan, B. P., Marchbank, K. J., Longhi, M. P., Harris, C. L. & Gallimore, A. M. (2005). Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett* **97**, 171-179.
- Morikawa, Y., Goto, T. & Sano, K. (1999). In Vitro Assembly of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein. *J Biol Chem* **274**, 27997-28002.
- Morikis, D. & Lambris, J. D. (2004). The Electrostatic Nature of C3d-Complement Receptor 2 Association. *J Immunol* **172**, 7537-7547.
- Morita, E. & Sundquist, W. I. (2004). RETROVIRUS BUDDING. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **20**, 395-425.
- Moulard, M., Hallenberger, S., Garten, W. & Klenk, H. D. (1999). Processing and routing of HIV glycoproteins by furin to the cell surface. *Virus Research* **60**, 55-65.
- Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H. T., Ananth, S. & Sukhatme, V. P. (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Mol Cell Biol* **17**, 5629-5639.
- Murakami, T. & Freed, E. O. (2000). The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *PNAS* **97**, 343-348.
- 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. & . (1989). A formalin-inactivated whole SIV vaccine confers protection in macaques. *Science* **246**, 1293-1297.
- Muthumani, K., Kudchodkar, S., Zhang, D., Bagarazzi, M. L., Kim, J. J., Boyer, J. D., Ayyavoo, V., Pavlakis, G. N. & Weiner, D. B. (2002). Issues for improving multiplasmid DNA vaccines for HIV-1. *Vaccine* **20**, 1999-2003.
- Mwau, M., Cebere, I., Sutton, J., Chikoti, P., Winstone, N., Wee, E. G. T., Beattie, T., Chen, Y. H., Bwayo, J. J., McMichael, A. J. & 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.

- Myers, G., Korber, B., Wain Hobson, S., Jeang, K. T., Henderson, L. E. & Pavlakis, G. N. (1994). *Human retroviruses and AIDS. A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences*. Los Alamos: Los Alamos National Laboratory.
- Myszka, D. G., Sweet, R. W., Hensley, P., Brigham-Burke, M., Kwong, P. D., Wyatt, R., Sodroski, J. & Doyle, M. L. (2000). Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *PNAS* **97**, 9026-9031.
- Nabel, G. J. (2005). IMMUNOLOGY: Close to the Edge: Neutralizing the HIV-1 Envelope. *Science* **308**, 1878-1879.
- Nagar, B., Jones, R. G., Diefenbach, R. J., Isenman, D. E. & Rini, J. M. (1998). X-ray Crystal Structure of C3d: A C3 Fragment and Ligand for Complement Receptor 2 &nbsp;. *Science* **280**, 1277-1281.
- Nakamura, Y., Kameoka, M., Tobiume, M., Kaya, M., Ohki, K., Yamada, T. & Ikuta, K. (1997). A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine* **15**, 489-496.
- Nakowitsch, S., Quendler, H., Fekete, H., Kunert, R., Katinger, H. & Stiegler, G. (2005). HIV-1 mutants escaping neutralization by the human antibodies 2F5, 2G12, and 4E10: in vitro experiments versus clinical studies. *AIDS* **19**, 1957-1966.
- Nanan, R., Ströbel, P., Haas, P., Marx, A. & Kreth, H. (2002). Autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with severe humoral immunodeficiency and monoclonal gammopathy. *Annals of Hematology* **81**, 332-335.
- Natuk, R. J., Chanda, P. K., Lubeck, M. D., Davis, A. R., Wilhelm, J., Hjorth, R., Wade, M. S., Bhat, B. M., Mizutani, S., Lee, S., Eichberg, J., Gallo, R. C., Hung, p. & Robert-Guroff, M. (1992). Adenovirus-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Envelope Recombinant Vaccines Elicit High-Titered HIV-Neutralizing Antibodies in the Dog Model. *PNAS* **89**, 7777-7781.
- Nayak, B. P., Sailaja, G. & Jabbar, A. M. (2006). Augmenting the immunogenicity of DNA vaccines: Role of plasmid-encoded Flt-3 ligand, as a molecular adjuvant in genetic vaccination. *Virology* **348**, 277-288.
- Negróni, M. & Buc, H. (2000). Copy-choice recombination by reverse transcriptases: Reshuffling of genetic markers mediated by RNA chaperones. *PNAS* **97**, 6385-6390.
- Nelson, J. D., Brunel, F. M., Jensen, R., Crooks, E. T., Cardoso, R. M. F., Wang, M., Hessel, A., Wilson, I. A., Binley, J. M., Dawson, P. E., Burton, D. R. & Zwick, M. B. (2007). An Affinity-Enhanced Neutralizing Antibody against the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp41 Recognizes an Epitope between Those of 2F5 and 4E10. *J Virol* **81**, 4033-4043.
- Newman, M., Suk, F. M., Cajimat, M., Chua, P. K. & Shih, C. (2003). Stability and Morphology Comparisons of Self-Assembled Virus-Like Particles from Wild-Type and Mutant Human Hepatitis B Virus Capsid Proteins. *J Virol* **77**, 12950-12960.
- Niedrig, M., Gelderblom, H. R., Pauli, G., Marz, J., Bickhard, H., Wolf, H. & Modrow, S. (1994). Inhibition of infectious human immunodeficiency virus type 1 particle formation by Gag protein-derived peptides. *J Gen Virol* **75**, 1469-1474.
- Nielsen, C. H., Fischer, E. M. & Leslie, R. G. Q. (2000). The role of complement in the acquired immune response. *Immunology* **100**, 4-12.
- Nielsen, C. H. & Leslie, R. G. Q. (2002). Complement's participation in acquired immunity. *J Leukoc Biol* **72**, 249-261.
- Nilsson, C., Makitalo, B., Thorstensson, R., Norley, S., Binniger Schinzel, D., Cranage, M., Rud, E., Biberfeld, G. & Putkonen, P. (1998). Live attenuated simian immunodeficiency virus (SIV)mac in macaques can induce protection against mucosal infection with SIVsm. *AIDS* **12**, 2261-2270.
- Nilsson, C., Makitalo, B., Berglund, P., Bex, F., Liljestrom, P., Sutter, G., Erfle, V., ten Haaf, P., Heeney, J., Biberfeld, G. & Thorstensson, R. (2001). Enhanced simian immunodeficiency virus-specific immune responses in macaques induced by priming with recombinant Semliki Forest virus and boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Vaccine* **19**, 3526-3536.
- Noad, R. & Roy, P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *Trends in Microbiology* **11**, 438-444.
- Nonaka, M. & Yoshizaki, F. (2004). Evolution of the complement system. *Molecular Immunology* **40**, 897-902.

- Nonaka, M. & Kimura, A. (2006).** Genomic view of the evolution of the complement system. *Immunogenetics* **58**, 701-713.
- Nothwehr, S. F. & Gordon, J. I. (1989).** Eukaryotic signal peptide structure/function relationships. Identification of conformational features which influence the site and efficiency of co-translational proteolytic processing by site-directed mutagenesis of human pre(delta pro)apolipoprotein A-II. *J Biol Chem* **264**, 3979-3987.
- Nothwehr, S. F. & Gordon, J. I. (1990).** Structural features in the NH2-terminal region of a model eukaryotic signal peptide influence the site of its cleavage by signal peptidase. *J Biol Chem* **265**, 17202-17208.
- Notka, F., Stahl-Hennig, C., Dittmer, U., Wolf, H. & Wagner, R. (1999).** Accelerated clearance of SHIV in rhesus monkeys by virus-like particle vaccines is dependent on induction of neutralizing antibodies. *Vaccine* **18**, 291-301.
- Oggioni, M. R., Medaglini, D., Romano, L., Peruzzi, F., Maggi, T., Lozzi, L., Bracci, L., Zazzi, M., Manca, F., Valensin, P. E. & Pozzi, G. (1999).** Antigenicity and immunogenicity of the V3 domain of HIV type 1 glycoprotein 120 expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *AIDS Res Hum Retroviruses* **15**, 451-459.
- Oran, A. E. & Robinson, H. L. (2003).** DNA Vaccines, Combining Form of Antigen and Method of Delivery to Raise a Spectrum of IFN- $\gamma$  and IL-4-Producing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T Cells. *J Immunol* **171**, 1999-2005.
- Otteken, A., Earl, P. L. & Moss, B. (1996).** Folding, assembly, and intracellular trafficking of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein analyzed with monoclonal antibodies recognizing maturational intermediates. *J Virol* **70**, 3407-3415.
- Pal, R., Yu, Q., Wang, S., Kalyanaraman, V. S., Nair, B. C., Hudacik, L., Whitney, S., Keen, T., Hung, C. L., Hocker, L., Kennedy, J. S., Markham, P. & Lu, S. (2006).** Definitive toxicology and biodistribution study of a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in rabbits. *Vaccine* **24**, 1225-1234.
- Paliard, X., Liu, Y., Wagner, R., Wolf, H., Baenziger, J. & Walker, C. M. (2000).** Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 273-282.
- Pancera, M., Lebowitz, J., Schon, A., Zhu, P., Freire, E., Kwong, P. D., Roux, K. H., Sodroski, J. & Wyatt, R. (2005).** Soluble Mimetics of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Viral Spikes Produced by Replacement of the Native Trimerization Domain with a Heterologous Trimerization Motif: Characterization and Ligand Binding Analysis. *J Virol* **79**, 9954-9969.
- Pantophlet, R. & Burton, D. R. (2006).** GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annual Review of Immunology* **24**, 739-769.
- Park, C. S. & Choi, Y. S. (2005).** How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology* **114**, 2-10.
- Parren, P. W., Gauduin, M. C., Koup, R. A., Poignard, P., Fiscaro, P., Burton, D. R. & Sattentau, Q. J. (1997).** Relevance of the antibody response against human immunodeficiency virus type 1 envelope to vaccine design. *Immunol Lett* **57**, 105-112.
- Parren, P. W., Mondor, I., Naniche, D., Ditzel, H. J., Klasse, P. J., Burton, D. R. & Sattentau, Q. J. (1998).** Neutralization of human immunodeficiency virus type 1 by antibody to gp120 is determined primarily by occupancy of sites on the virion irrespective of epitope specificity. *J Virol* **72**, 3512-3519.
- Parren, P. W., Moore, J. P., Burton, D. R. & Sattentau, Q. J. (1999).** The neutralizing antibody response to HIV-1: viral evasion and escape from humoral immunity. *AIDS* **13 Suppl A**, S137-S162.
- Pashov, A., Canziani, G., MacLeod, S., Plaxco, J., Monzavi-Karbassi, B. & Kieber-Emmons, T. (2005).** Targeting carbohydrate antigens in HIV vaccine development. *Vaccine* **23**, 2168-2175.
- Pashov, A., Perry, M., Dyar, M., Chow, M. & Kieber-Emmons, T. (2007).** Defining Carbohydrate Antigens as HIV Vaccine Candidates. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 185-201.
- Peet, N. M., McKeating, J. A., Ramos, B., Klonisch, T., De Souza, J. B., Delves, P. J. & Lund, T. (1997).** Comparison of nucleic acid and protein immunization for induction of antibodies specific for HIV-1 gp120. *Clin Exp Immunol* **109**, 226-232.

- Peleraux, A., Peyron, J. F. & Devaux, C. (1998).** Inhibition of HIV-1 Replication by a Monoclonal Antibody Directed toward the Complementarity Determining Region 3-Like Domain of CD4 in CD45 Expressing and CD45-Deficient Cells. *Virology* **242**, 233-237.
- Perlman, M. & Resh, M. D. (2006).** Identification of an Intracellular Trafficking and Assembly Pathway for HIV-1 Gag. *Traffic* **7**, 731-745.
- Perrin-Cocon, L. A., Villiers, C. L., Salamero, J., Gabert, F. & Marche, P. N. (2004).** B Cell Receptors and Complement Receptors Target the Antigen to Distinct Intracellular Compartments. *J Immunol* **172**, 3564-3572.
- Peters, B. S., Jaoko, W., Vardas, E., Panayotakopoulos, G., Fast, P., Schmidt, C., Gilmour, J., Bogoshi, M., Omosa-Manyonyi, G., Dally, L., Klavinskis, L., Farah, B., Tarragona, T., Bart, P. A., Robinson, A., Pieterse, C., Stevens, W., Thomas, R., Barin, B., McMichael, A. J., McIntyre, J. A., Pantaleo, G., Hanke, T. & Bwayo, J. (2007).** Studies of a prophylactic HIV-1 vaccine candidate based on modified vaccinia virus Ankara (MVA) with and without DNA priming: effects of dosage and route on safety and immunogenicity. *Vaccine* **25**, 2120-2127.
- Pfeiffer, T., Pisch, T., Devitt, G., Holtkotte, D. & Bosch, V. (2006).** Effects of signal peptide exchange on HIV-1 glycoprotein expression and viral infectivity in mammalian cells. *FEBS Letters* **580**, 3775-3778.
- Phogat, S. & Wyatt, R. (2007).** Rational Modifications of HIV-1 Envelope Glycoproteins for Immunogen Design. *Current Pharmaceutical Design* **13**, 213-227.
- Phogat, S., Wyatt, R. T. & Karlsson Hedestam, G. B. (2007).** Inhibition of HIV-1 entry by antibodies: potential viral and cellular targets. *Journal of Internal Medicine* **262**, 26-43.
- Piot, P., Bartos, M., Ghys, P. D., Walker, N. & Schwartzlander, B. (2001).** The global impact of HIV/AIDS. *Nature* **410**, 968-973.
- Pitisuttithum, P., Gilbert, P., Gurwith, M., Heyward, W., Martin, M., van Griensven, F., Hu, D., Tappero, J. W. & Choopanya, K. (2006).** Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis* **194**, 1661-1671.
- Pitt, J., Henrard, D., FitzGerald, G., Mofenson, L., Lew, J., Hillyer, G., Mendez, H., Cooper, E., Hanson, C. & Rich, K. C. (2000).** Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 antibodies in perinatal HIV-1 infection: association with human HIV-1 transmission, infection, and disease progression. For the Women and Infants Transmission Study. *J Infect Dis* **182**, 1243-1246.
- Poignard, P., Moulard, M., Golez, E., Vivona, V., Franti, M., Venturini, S., Wang, M., Parren, P. W. H. I. & Burton, D. R. (2003).** Heterogeneity of Envelope Molecules Expressed on Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 Particles as Probed by the Binding of Neutralizing and Nonneutralizing Antibodies. *J Virol* **77**, 353-365.
- Pollard, V. W. & Malim, M. H. (1998).** THE HIV-1 REV PROTEIN. *Annual Review of Microbiology* **52**, 491-532.
- Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. (1984).** Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- Prechl, J., Baiu, D. C., Horvath, A. & Erdei, A. (2002).** Modeling the presentation of C3d-coated antigen by B lymphocytes: enhancement by CR1/2-BCR co-ligation is selective for the co-ligating antigen. *Int Immunol* **14**, 241-247.
- Preston, B. D., Poiesz, B. J. & Loeb, L. A. (1988).** Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168-1171.
- Prodinger, W. M., Schwendinger, M. G., Schoch, J., Kochle, M., Larcher, C. & Dierich, M. P. (1998).** Characterization of C3dg Binding to a Recess Formed Between Short Consensus Repeats 1 and 2 of Complement Receptor Type 2 (CR2; CD21). *J Immunol* **161**, 4604-4610.
- Prota, A. E., Sage, D. R., Stehle, T. & Fingerroth, J. D. (2002).** The crystal structure of human CD21: Implications for Epstein-Barr virus and C3d binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10641-10646.
- Puau, A. L. & Michel, M. L. (2003).** New gene-based approaches for an AIDS vaccine. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **26**, 357-372.

- Qin, D., Wu, J., Carroll, M. C., Burton, G. F., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (1998).** Evidence for an important interaction between a complement-derived CD21 ligand on follicular dendritic cells and CD21 on B cells in the initiation of IgG responses. *J Immunol* **161**, 4549-4554.
- Qiu, J. T., Song, R., Dettenhofer, M., Tian, C., August, T., Felber, B. K., Pavlakis, G. N. & Yu, X. F. (1999).** Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J Virol* **73**, 9145-9152.
- Qiu, J. T., Liu, B., Tian, C., Pavlakis, G. N. & Yu, X. F. (2000).** Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. *J Virol* **74**, 5997-6005.
- Qiu, Z., Xing, H., Wei, M., Duan, Y., Zhao, Q., Xu, J. & Shao, Y. (2005).** Characterization of five nearly full-length genomes of early HIV type 1 strains in Ruili city: implications for the genesis of CRF07\_BC and CRF08\_BC circulating in China. *AIDS Res Hum Retroviruses* **21**, 1051-1056.
- Quan, F. S., Sailaja, G., Skountzou, I., Huang, C., Vzorov, A., Compans, R. W. & Kang, S. M. (2007).** Immunogenicity of virus-like particles containing modified human immunodeficiency virus envelope proteins. *Vaccine* **25**, 3841-3850.
- Radaelli, A., Zanotto, C., Perletti, G., Elli, V., Vicenzi, E., Poli, G. & Giuli Morghen, C. (2003).** Comparative analysis of immune responses and cytokine profiles elicited in rabbits by the combined use of recombinant fowlpox viruses, plasmids and virus-like particles in prime-boost vaccination protocols against SHIV. *Vaccine* **21**, 2052-2064.
- Rajcani, J., Mosko, T. & Rezuchova, I. (2005).** Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev Med Virol* **15**, 303-325.
- Rambout, L., Hopkins, L., Hutton, B. & Fergusson, D. (2007).** Prophylactic vaccination against human papillomavirus infection and disease in women: a systematic review of randomized controlled trials. *CMAJ*, cmaj.
- Ramqvist, T., Andreasson, K. & Dalianis, T. (2007).** Vaccination, immune and gene therapy based on virus-like particles against viral infections and cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* **7**, 997-1007.
- Rasmussen, R. A., Ong, H., Kittel, C., Ruprecht, C. R., Ferrantelli, F., Hu, S. L., Policano, P., McKenna, J., Moon, J., Travis, B. & Ruprecht, R. M. (2006).** DNA prime/protein boost immunization against HIV clade C: Safety and immunogenicity in mice. *Vaccine* **24**, 2324-2332.
- Rasmussen, R. A., Ong, H., Song, R., Chenine, A. L., Ayash-Rashkovsky, M., Hu, S. L., Polacino, P., Else, J. G., Novembre, F. J. & Ruprecht, R. M. (2007).** Efficacy of a multigenic protein vaccine containing multimeric HIV gp160 against heterologous SHIV clade C challenges. *AIDS* **21**, 1841-1848.
- 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. & et al (1985).** Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. *Nature* **313**, 277-284.
- Raux, M., Finkielsztejn, L., Salmon-Ceron, D., Bouchez, H., Excler, J. L., Dulioust, E., Grouin, J. M., Sicard, D. & Blondeau, C. (2000).** IgG subclass distribution in serum and various mucosal fluids of HIV type 1-infected subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 583-594.
- Raviv, Y., Viard, M., Bess, J. W., Jr., Chertova, E. & Blumenthal, R. (2005).** Inactivation of Retroviruses with Preservation of Structural Integrity by Targeting the Hydrophobic Domain of the Viral Envelope. *J Virol* **79**, 12394-12400.
- Rayevskaya, M. V. & Frankel, F. R. (2001).** Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J Virol* **75**, 2786-2791.
- Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., Swain, S. L., Spiegelberg, H. L. & Carson, D. A. (1996).** Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5141-5145.
- Reading, S. A. & Dimmock, N. J. (2007).** Neutralization of animal virus infectivity by antibody. *Archives of Virology* **152**, 1047-1059.
- Rehm, A., Stern, P., Ploegh, H. L. & Tortorella, D. (2001).** Signal peptide cleavage of a type I membrane protein, HCMV US11, is dependent on its membrane anchor. *EMBO J* **20**, 1573-1582.

- Ren, S., Li, M., Smith, J., DeTolla, L. & Furth, P. (2002). Low-volume jet injection for intradermal immunization in rabbits. *BMC Biotechnology* **2**, 10.
- Reth, M. & Wienands, J. (1997). INITIATION AND PROCESSING OF SIGNALS FROM THE B CELL ANTIGEN RECEPTOR. *Annual Review of Immunology* **15**, 453-479.
- Reynard, F., Willkomm, N., Fatmi, A., Vallon-Eberhard, A., Verrier, B. & Bedin, F. (2007). Characterization of the antibody response elicited by HIV-1 Env glycomutants in rabbits. *Vaccine* **25**, 535-546.
- Reynes, M., Aubert, J. P., Cohen, J. H., Audouin, J., Tricottet, V., Diebold, J. & Kazatchkine, M. D. (1985). Human follicular dendritic cells express CR1, CR2, and CR3 complement receptor antigens. *J Immunol* **135**, 2687-2694.
- Richmond, J. F. L., Mustafa, F., Lu, S., Santoro, J. C., Weng, J., O'connell, M., Fenyo, E. M., Hurwitz, J. L., Montefiori, D. C. & Robinson, H. L. (1997). Screening of HIV-1 Env Glycoproteins for the Ability to Raise Neutralizing Antibody Using DNA Immunization and Recombinant Vaccinia Virus Boosting. *Virology* **230**, 265-274.
- Richmond, J. F., Lu, S., Santoro, J. C., Weng, J., Hu, S. L., Montefiori, D. C. & Robinson, H. L. (1998). Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J Virol* **72**, 9092-9100.
- Rickert, R. C. (2005). Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr Opin Immunol* **17**, 237-243.
- Robbins, J. B., Schneerson, R. & Szu, S. C. (1995). Perspective: hypothesis: serum IgG antibody is sufficient to confer protection against infectious diseases by inactivating the inoculum. *J Infect Dis* **171**, 1387-1398.
- Robinson, H. L. & Pertmer, T. M. (2000). DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications. *Adv Virus Res* **55**, 1-74.
- Rodriguez, S. K., Sarr, A. D., MacNeil, A., Thakore-Meloni, S., Gueye-Ndiaye, A., Traore, I., Dia, M. C., Mboup, S. & Kanki, P. J. (2007). Comparison of Heterologous Neutralizing Antibody Responses of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)- and HIV-2-Infected Senegalese Patients: Distinct Patterns of Breadth and Magnitude Distinguish HIV-1 and HIV-2 Infections. *J Virol* **81**, 5331-5338.
- Rollman, E., Hinkula, J., Arteaga, J., Zuber, B., Kjerrstrom, A., Liu, M., Wahren, B. & Ljungberg, K. (2004). Multi-subtype gp160 DNA immunization induces broadly neutralizing anti-HIV antibodies. *Gene Ther* **11**, 1146-1154.
- Rollman, E., Brave, A., Boberg, A., Gudmundsdotter, L., Engstrom, G., Isagulians, M., Ljungberg, K., Lundgren, B., Blomberg, P., Hinkula, J., Hejdeman, B., Sandstrom, E., Liu, M. & Wahren, B. (2005). The rationale behind a vaccine based on multiple HIV antigens. *Microbes and Infection* **7**, 1414-1423.
- Rollman, E., Mathy, N., Brave, A., Boberg, A., Kjerrstrom, A., van Wely, C., Engstrom, G., Johansson, S., Aperia, K., Eriksson, L. E., Benthin, R., Ertl, P., Heeney, J., Hinkula, J., Voss, G. & Wahren, B. (2007). Evaluation of immunogenicity and efficacy of combined DNA and adjuvanted protein vaccination in a human immunodeficiency virus type 1/murine leukemia virus pseudotype challenge model. *Vaccine* **25**, 2145-2154.
- Rozenaal, R. & Carroll, M. C. (2007). Complement receptors CD21 and CD35 in humoral immunity. *Immunological Reviews* **219**, 157-166.
- Ross, T. M., Xu, Y., Bright, R. A. & Robinson, H. L. (2000). C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nat Immunol* **1**, 127-131.
- Ross, T. M., Xu, Y., Green, T. D., Montefiori, D. C. & Robinson, H. L. (2001). Enhanced avidity maturation of antibody to human immunodeficiency virus envelope: DNA vaccination with gp120-C3d fusion proteins. *AIDS Res Hum Retroviruses* **17**, 829-835.
- Roux, K. H. & Taylor, K. A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Current Opinion in Structural Biology* **17**, 244-252.
- Rueda, P., Martinez-Torrecuadrada, J. L., Sarraseca, J., Sedlik, C., del Barrio, M., Hurtado, A., Leclerc, C. & Casal, J. I. (1999). Engineering parvovirus-like particles for the induction of B-cell, CD4(+) and CTL responses. *Vaccine* **18**, 325-332.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Sailaja, G., Skountzou, I., Quan, F. S., Compans, R. W. & Kang, S. M. (2007). Human immunodeficiency virus-like particles activate multiple types of immune cells. *Virology* **362**, 331-341.
- Salzwedel, K., West, J. T., Jr., Mulligan, M. J. & Hunter, E. (1998). Retention of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein in the Endoplasmic Reticulum Does Not Redirect Virus Assembly from the Plasma Membrane. *J Virol* **72**, 7523-7531.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanders, R. W., Vesanen, M., Schuelke, N., Master, A., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Paluch, M., Berkhout, B., Maddon, P. J., Olson, W. C., Lu, M. & Moore, J. P. (2002). Stabilization of the Soluble, Cleaved, Trimeric Form of the Envelope Glycoprotein Complex of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **76**, 8875-8889.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Sarrias, M. R., Franchini, S., Canziani, G., Argyropoulos, E., Moore, W. T., Sahu, A. & Lambris, J. D. (2001). Kinetic Analysis of the Interactions of Complement Receptor 2 (CR2, CD21) with Its Ligands C3d, iC3b, and the EBV Glycoprotein gp350/220. *J Immunol* **167**, 1490-1499.
- Sato, S., Miller, A. S., Howard, M. C. & Tedder, T. F. (1997). Regulation of B lymphocyte development and activation by the CD19/CD21/CD81/Leu 13 complex requires the cytoplasmic domain of CD19. *J Immunol* **159**, 3278-3287.
- Sato, S. (1999). CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity. *Journal of Dermatological Science* **22**, 1-10.
- Scanlan, C. N., Pantophlet, R., Wormald, M. R., Ollmann Saphire, E., Stanfield, R., Wilson, I. A., Katinger, H., Dwek, R. A., Rudd, P. M. & Burton, D. R. (2002). The Broadly Neutralizing Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody 2G12 Recognizes a Cluster of  $\alpha$ 1-2 Mannose Residues on the Outer Face of gp120. *J Virol* **76**, 7306-7321.
- Scanlan, C. N., Offer, J., Zitzmann, N. & Dwek, R. A. (2007). Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **446**, 1038-1045.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-379.
- Schambach, A., Mueller, D., Galla, M., Versteegen, M. M. A., Wagemaker, G., Loew, R., Baum, C. & Bohne, J. (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther* **13**, 1524-1533.
- Scharf, O., Golding, H., King, L. R., Eller, N., Frazier, D., Golding, B. & Scott, D. E. (2001). Immunoglobulin G3 from Polyclonal Human Immunodeficiency Virus (HIV) Immune Globulin Is More Potent than Other Subclasses in Neutralizing HIV Type 1. *J Virol* **75**, 6558-6565.
- Scheerlinck, J. P. (2001). Genetic adjuvants for DNA vaccines. *Vaccine* **19**, 2647-2656.
- Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (2001). Papillomavirus-like particle vaccines. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 50-54.
- Schlienger, K., Mancini, M., Riviere, Y., Dormont, D., Tiollais, P. & Michel, M. L. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J Virol* **66**, 2570-2576.
- Schwab, J. & Illges, H. (2001). Regulation of CD21 expression by DNA methylation and histone deacetylation. *Int Immunol* **13**, 705-710.
- Schwarz, Y. X., Yang, M. y., Qin, D., Wu, J., Jarvis, W. D., Grant, S., Burton, G. F., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (1999). Follicular Dendritic Cells Protect Malignant B Cells from Apoptosis Induced by Anti-Fas and Antineoplastic Agents. *J Immunol* **163**, 6442-6447.

- Seaman, M. S., Xu, L., Beaudry, K., Martin, K. L., Beddall, M. H., Miura, A., Sambor, A., Chakrabarti, B. K., Huang, Y., Bailer, R., Koup, R. A., Mascola, J. R., Nabel, G. J. & Letvin, N. L. (2005). Multiclude Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Immunogens Elicit Broad Cellular and Humoral Immunity in Rhesus Monkeys. *J Virol* **79**, 2956-2963.
- Sedlik, C., Saron, M., Sarraseca, J., Casal, I. & Leclerc, C. (1997). Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 7503-7508.
- Selby, M. J., Doe, B. & Walker, C. M. (1997). Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte activity elicited by coimmunization with human immunodeficiency virus type 1 genes regulated by the bacteriophage T7 promoter and T7 RNA polymerase protein. *J Virol* **71**, 7827-7831.
- Sharma, V. A., Kan, E., Sun, Y., Lian, Y., Cisto, J., Frasca, V., Hilt, S., Stamatatos, L., Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Barnett, S. W. & Srivastava, I. K. (2006). Structural characteristics correlate with immune responses induced by HIV envelope glycoprotein vaccines. *Virology* **352**, 131-144.
- Sheets, R. L., Stein, J., Manetz, T. S., Duffy, C., Nason, M., Andrews, C., Kong, W. P., Nabel, G. J. & Gomez, P. L. (2006). Biodistribution of DNA Plasmid Vaccines against HIV-1, Ebola, Severe Acute Respiratory Syndrome, or West Nile Virus Is Similar, without Integration, despite Differing Plasmid Backbones or Gene Inserts. *Toxicol Sci* **91**, 610-619.
- Sheppard, N. C., Bates, A. C. & Sattentau, Q. J. (2007). A functional human IgM response to HIV-1 Env after immunization with NYVAC HIV C. *AIDS* **21**, 524-527.
- Shi, L., Sings, H. L., Bryan, J. T., Wang, B., Wang, Y., Mach, H., Kosinski, M., Washabaugh, M. W., Sitrin, R. & Barr, E. (2007). GARDASIL[reg]: Prophylactic Human Papillomavirus Vaccine Development - From Bench Top to Bed-side. *Clin Pharmacol Ther* **81**, 259-264.
- Shu, Y., Winfrey, S., Yang, Z. y., Xu, L., Rao, S. S., Srivastava, I., Barnett, S. W., Nabel, G. J. & Mascola, J. R. (2007). Efficient protein boosting after plasmid DNA or recombinant adenovirus immunization with HIV-1 vaccine constructs. *Vaccine* **25**, 1398-1408.
- Siemasko, K., Eisfelder, B. J., Williamson, E., Kabak, S. & CLARK, M. R. (1998). Cutting Edge: Signals from the B Lymphocyte Antigen Receptor Regulate MHC Class II Containing Late Endosomes. *J Immunol* **160**, 5203-5208.
- Sierra, S., Kupfer, B. & Kaiser, R. (2005). Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology* **34**, 233-244.
- Sin, J. I. & Weiner, D. B. (2000). Improving DNA vaccines targeting viral infection. *Intervirology* **43**, 233-246.
- Smith, J. M., Rao Amara, R., Campbell, D., Xu, Y., Patel, M., Sharma, S., Butera, S. T., Ellenberger, D. L., Yi, H., Chennareddi, L., Herndon, J. G., Wyatt, L. S., Montefiori, D., Moss, B., McClure, H. M. & Robinson, H. L. (2004). DNA/MVA Vaccine for HIV Type 1: Effects of Codon-Optimization and the Expression of Aggregates or Virus-Like Particles on the Immunogenicity of the DNA Prime. *AIDS Research and Human Retroviruses* **20**, 1335-1347.
- Smith, L. C., Clow, L. A. & Terwilliger, D. P. (2001). The ancestral complement system in sea urchins. *Immunological Reviews* **180**, 16-34.
- Spear, G. T., Takefman, D. M., Sharpe, S., Ghassemi, M. & Zolla Pazner, S. (1994). Antibodies to the HIV-1 V3 loop in serum from infected persons contribute a major proportion of immune effector functions including complement activation, antibody binding, and neutralization. *Virology* **204**, 609-615.
- Speck, R. F., Penn, M. L., Wimmer, J., Esser, U., Hague, B. F., Kindt, T. J., Atchison, R. E. & Goldsmith, M. A. (1998). Rabbit Cells Expressing Human CD4 and Human CCR5 Are Highly Permissive for Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol* **72**, 5728-5734.
- Spellberg, B. & Edwards, J. E., Jr. (2001). Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* **32**, 76-102.
- Srivastava, I. K., Stamatatos, L., Legg, H., Kan, E., Fong, A., Coates, S. R., Leung, L., Winingner, M., Donnelly, J. J., Ulmer, J. B. & Barnett, S. W. (2002). Purification and Characterization of Oligomeric Envelope Glycoprotein from a Primary R5 Subtype B Human Immunodeficiency Virus. *J Virol* **76**, 2835-2847.

- Srivastava, I. K., VanDorsten, K., Vojtech, L., Barnett, S. W. & Stamatatos, L. (2003).** Changes in the Immunogenic Properties of Soluble gp140 Human Immunodeficiency Virus Envelope Constructs upon Partial Deletion of the Second Hypervariable Region. *J Virol* **77**, 2310-2320.
- Srivastava, I. K., Ulmer, J. B. & Barnett, S. W. (2005).** Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum Vaccin* **1**, 45-60.
- Stahl-Hennig, C., Gundlach, B. R., Dittmer, U., ten Haaf, P., Heeney, J., Zou, W., Emilie, D., Sopper, S. & Uberla, K. (2003).** Replication, Immunogenicity, and Protective Properties of Live-Attenuated Simian Immunodeficiency Viruses Expressing Interleukin-4 or Interferon-[gamma]. *Virology* **305**, 473-485.
- Stamatatos, N. M., Mascola, J. R., Kalyanaraman, V. S., Louder, M. K., Frampton, L. M., Birx, D. L. & VanCott, T. C. (1998).** Neutralizing antibodies from the sera of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals bind to monomeric gp120 and oligomeric gp140. *J Virol* **72**, 9656-9667.
- Stanley, M. A. (2006).** Human papillomavirus vaccines. *Rev Med Virol* **16**, 139-149.
- Staropoli, I., Chanel, C., Girard, M. & Altmeyer, R. (2000).** Processing, Stability, and Receptor Binding Properties of Oligomeric Envelope Glycoprotein from a Primary HIV-1 Isolate. *J Biol Chem* **275**, 35137-35145.
- Stiegler, G., Kunert, R., Purtscher, M., Wolbank, S., Voglauer, R., Steindl, F. & Katinger, H. (2001).** A Potent Cross-Clade Neutralizing Human Monoclonal Antibody against a Novel Epitope on gp41 of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses* **17**, 1757-1765.
- Stiegler, G., Armbruster, C., Vcelar, B., Stoiber, H., Kunert, R., Michael, N. L., Jagodzinski, L. L., Ammann, C., Jager, W., Jacobson, J., Vetter, N. & Katinger, H. (2002).** Antiviral activity of the neutralizing antibodies 2F5 and 2G12 in asymptomatic HIV-1-infected humans: a phase I evaluation. *AIDS* **16**, 2019-2025.
- Su, L., Graf, M., Zhang, Y., von Briesen, H., Xing, H., Kostler, J., Melzl, H., Wolf, H., Shao, Y. & Wagner, R. (2000).** Characterization of a Virtually Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome of a Prevalent Intersubtype (C/B') Recombinant Strain in China. *J Virol* **74**, 11367-11376.
- Suradhat, S., Braun, R. P., Lewis, P. J., Babiuk, L. A., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Griebel, P. J. & Baca-Estrada, M. E. (2001).** Fusion of C3d molecule with bovine rotavirus VP7 or bovine herpesvirus type 1 glycoprotein D inhibits immune responses following DNA immunization. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **83**, 79-92.
- Szakonyi, G., Guthridge, J. M., Li, D., Young, K., Holers, V. M. & Chen, X. S. (2001).** Structure of complement receptor 2 in complex with its C3d ligand. *Science* **292**, 1725-1728.
- Tanner, J. E., Alfieri, C., Chatila, T. A. & Diaz-Mitoma, F. (1996).** Induction of interleukin-6 after stimulation of human B-cell CD21 by Epstein-Barr virus glycoproteins gp350 and gp220. *J Virol* **70**, 570-575.
- Tavel, J. A., Martin, J. E., Kelly, G. G., Enama, M. E., Shen, J. M., Gomez, P. L., Andrews, C. A., Koup, R. A., Bailer, R. T., Stein, J. A., Roederer, M., Nabel, G. J. & Graham, B. S. (2007).** Safety and immunogenicity of a Gag-Pol candidate HIV-1 DNA vaccine administered by a needle-free device in HIV-1-seronegative subjects. *J Acquir Immune Defic Syndr* **44**, 601-605.
- Tedder, T. F., Haas, K. M. & Poe, J. C. (2002).** CD19-CD21 complex regulates an intrinsic Src family kinase amplification loop that links innate immunity with B-lymphocyte intracellular calcium responses. *Biochem Soc Trans* **30**, 807-811.
- Terrazzini, N., Hannesdottir, S., Delves, P. J. & Lund, T. (2004).** DNA immunization with plasmids expressing hCG[beta]-chimeras. *Vaccine* **22**, 2146-2153.
- Test, S. T., Mitsuyoshi, J., Connolly, C. C. & Lucas, A. H. (2001).** Increased Immunogenicity and Induction of Class Switching by Conjugation of Complement C3d to Pneumococcal Serotype 14 Capsular Polysaccharide. *Infect Immun* **69**, 3031-3040.
- Thornton, B. P., Vetvicka, V. & Ross, G. D. (1994).** Natural antibody and complement-mediated antigen processing and presentation by B lymphocytes. *J Immunol* **152**, 1727-1737.
- Thornton, B. P., Vetvicka, V. & Ross, G. D. (1996).** Function of C3 in a humoral response: iC3b/C3dg bound to an immune complex generated with natural antibody and a primary antigen promotes antigen uptake and the expression of co-stimulatory molecules by all B cells, but only stimulates immunoglobulin synthesis by antigen-specific B cells. *Clin Exp Immunol* **104**, 531-537.

- Titti, F., Cafaro, A., Ferrantelli, F., Tripiciano, A., Moretti, S., Caputo, A., Gavioli, R., Ensoli, F., Robert-Guroff, M., Barnett, S. & Ensoli, B. (2007). Problems and emerging approaches in HIV/AIDS vaccine development. *Expert Opinion on Emerging Drugs* **12**, 23-48.
- Toapanta, F. R. & Ross, T. M. (2004). Mouse strain-dependent differences in enhancement of immune responses by C3d. *Vaccine* **22**, 1773-1781.
- Toapanta, F. R. & Ross, T. M. (2006). Complement-mediated activation of the adaptive immune responses: role of C3d in linking the innate and adaptive immunity. *Immunol Res* **36**, 197-210.
- Tobin, G. J., Nagashima, K. & Gonda, M. A. (1996). Synthesis and assembly of chimeric human immunodeficiency virus gag pseudovirions. *Intervirology* **39**, 40-48.
- Tolnay, M. & Tsokos, G. C. (1998). Complement receptor 2 in the regulation of the immune response. *Clin Immunol Immunopathol* **88**, 123-132.
- Tong, T., Fan, H., Tan, Y., Xiao, S., Ling, J., Chen, H. & Guo, A. (2006). C3d enhanced DNA vaccination induced humoral immune response to glycoprotein C of pseudorabies virus. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 845-851.
- Tonks, A. (2007). Quest for the AIDS vaccine. *BMJ* **334**, 1346-1348.
- Torres, C. A., Iwasaki, A., Barber, B. H. & Robinson, H. L. (1997). Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* **158**, 4529-4532.
- Trkola, A., Pomales, A. B., Yuan, H., Korber, B., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Katinger, H., Barbas, C. F., Burton, D. R., Ho, D. D. & et al (1995). Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol* **69**, 6609-6617.
- Trkola, A., Purtscher, M., Muster, T., Ballaun, C., Buchacher, A., Sullivan, N., Srinivasan, K., Sodroski, J., Moore, J. P. & Katinger, H. (1996). Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **70**, 1100-1108.
- Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., Manrique, A., Huber, M., Rehr, M., Oxenius, A., Weber, R., Stiegler, G., Vcelar, B., Katinger, H., Aceto, L. & Gunthard, H. F. (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med* **11**, 615-622.
- Tsoukas, C. D. & Lambris, J. D. (1988). Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **18**, 1299-1302.
- Tsoukas, C. D. & Lambris, J. D. (1993). Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today* **14**, 56-59.
- Tsubata, T. (1999). Co-receptors on B lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* **11**, 249-255.
- Tsunetsugu-Yokota, Y., Morikawa, Y., Isogai, M., Kawana-Tachikawa, A., Odawara, T., Nakamura, T., Grassi, F., Autran, B. & Iwamoto, A. (2003). Yeast-derived human immunodeficiency virus type 1 p55(gag) virus-like particles activate dendritic cells (DCs) and induce perforin expression in Gag-specific CD8(+) T cells by cross-presentation of DCs. *J Virol* **77**, 10250-10259.
- Tuomela, M., Malm, M., Wallen, M., Stanescu, I., Krohn, K. & Peterson, P. (2005). Biodistribution and general safety of a naked DNA plasmid, GTU(R)-MultiHIV, in a rat, using a quantitative PCR method. *Vaccine* **23**, 890-896.
- Tyler, D. S., Stanley, S. D., Zolla Pazner, S., Gorny, M. K., Shadduck, P. P., Langlois, A. J., Matthews, T. J., Bolognesi, D. P., Palker, T. J. & Weinhold, K. J. (1990). Identification of sites within gp41 that serve as targets for antibody-dependent cellular cytotoxicity by using human monoclonal antibodies. *J Immunol* **145**, 3276-3282.
- Ugolini, S., Mondor, I., Parren, P. W. H. I., Burton, D. R., Tilley, S. A., Klasse, P. J. & Sattentau, Q. J. (1997). Inhibition of Virus Attachment to CD4+ Target Cells Is a Major Mechanism of T Cell Line-adapted HIV-1 Neutralization. *J Exp Med* **186**, 1287-1298.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Deck, R. R., DeWitt, C. M. & Liu, M. A. (1995). Immunization against viral proteins with naked DNA. *Ann N Y Acad Sci* **772**, 117-125.
- Ulmer, J. B., Wahren, B. & Liu, M. A. (2006). DNA vaccines: recent technological and clinical advances. *Discov Med* **6**, 109-112.

- Ulrich, R., Gerlich, W. H. & Kruger, D. H. (1996). Chimaera and its modern virus-like descendants. *Intervirology* **39**, 126-132.
- van de Griend, R. J., Giphart, M. J., Van Krimpen, B. A. & Bolhuis, R. L. (1984). Human T cell clones exerting multiple cytolytic activities show heterogeneity in susceptibility to inhibition by monoclonal antibodies. *J Immunol* **133**, 1222-1229.
- VanCott, T. C., Veit, S. C., Kalyanaraman, V., Earl, P. & Birx, D. L. (1995). Characterization of a soluble, oligomeric HIV-1 gp160 protein as a potential immunogen. *J Immunol Methods* **183**, 103-117.
- VanCott, T. C., Mascola, J. R., Kaminski, R. W., Kalyanaraman, V., Hallberg, P. L., Burnett, P. R., Ulrich, J. T., Rechtman, D. J. & Birx, D. L. (1997). Antibodies with specificity to native gp120 and neutralization activity against primary human immunodeficiency virus type 1 isolates elicited by immunization with oligomeric gp160. *J Virol* **71**, 4319-4330.
- Vereshchagina, L. A., Tolnay, M. & Tsokos, G. C. (2001). Multiple Transcription Factors Regulate the Inducible Expression of the Human Complement Receptor 2 Promoter. *J Immunol* **166**, 6156-6163.
- Villa, L. L., Costa, R. L., Petta, C. A., Andrade, R. P., Ault, K. A., Giuliano, A. R., Wheeler, C. M., Koutsky, L. A., Malm, C., Lehtinen, M., Skjeldestad, F. E., Olsson, S. E., Steinwall, M., Brown, D. & Barr, E. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *The Lancet Oncology* **6**, 271-278.
- Villa, L. L. (2006). Prophylactic HPV vaccines: Reducing the burden of HPV-related diseases. *Vaccine* **24**, S23-S28.
- Villiers, M. B., Villiers, C. L., Laharie, A. M. & Marche, P. N. (1999). Amplification of the Antibody Response by C3b Complexed to Antigen Through an Ester Link. *J Immunol* **162**, 3647-3652.
- Villiers, M. B., Marche, P. N. & Villiers, C. L. (2003). Improvement of long-lasting response and antibody affinity by the complexation of antigen with complement C3b. *Int Immunol* **15**, 91-95.
- Vinner, L., Nielsen, H. V., Bryder, K., Corbet, S., Nielsen, C. & Fomsgaard, A. (1999). Gene gun DNA vaccination with Rev-independent synthetic HIV-1 gp160 envelope gene using mammalian codons. *Vaccine* **17**, 2166-2175.
- von Heijne, G. (1983). Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. *Eur J Biochem* **133**, 17-21.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences : The limits of variation. *Journal of Molecular Biology* **184**, 99-105.
- von Heijne, G. (1990). The signal peptide. *J Membr Biol* **115**, 195-201.
- von Heijne, G. (1992). Cleavage-site motifs in protein targeting sequences. *Genet Eng (N Y)* **14**, 1-11.
- Wagner, R., Fliessbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., von Brunn, A. & Wolf, H. (1992). Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch Virol* **127**, 117-137.
- Wagner, R., Deml, L., Fliessbach, H., Wanner, G. & Wolf, H. (1994a). Assembly and extracellular release of chimeric HIV-1 Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology* **200**, 162-175.
- Wagner, R., Deml, L., Schirmbeck, R., Reimann, J. & Wolf, H. (1994b). Induction of a MHC class I-restricted, CD8 positive cytolytic T- cell response by chimeric HIV-1 virus-like particles in vivo: implications on HIV vaccine development. *Behring Inst Mitt*, 23-34.
- Wagner, R., Deml, L. & Wolf, H. (1994c). Polyvalent, recombinant HIV-1 virus-like particles: novel HIV-1 vaccine strategies. *Antibiot Chemother* **46**, 48-61.
- Wagner, R., Deml, L., Notka, F., Wolf, H., Schirmbeck, R., Reimann, J., Teeuwsen, V. & Heeney, J. (1996a). Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and rhesus macaques. *Intervirology* **39**, 93-103.
- Wagner, R., Deml, L., Schirmbeck, R., Niedrig, M., Reimann, J. & Wolf, H. (1996b). Construction, expression and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology* **220**, 128-140.
- Wagner, R., Teeuwsen, V., Deml, L., Notka, F., Haaksma, A., Jhagjhoorsingh, S., Niphuis, H., Wolf, H. & Heeney, J. (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.

- Wagner, R., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., Grunwald, T., Foley, P. & Uberla, K. (2000).** Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of HIV-1 and SIV: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **11**, 2403-2413.
- Walport, M. J. (2001a).** Complement- First of Two Parts. *N Engl J Med* **344**, 1058-1066.
- Walport, M. J. (2001b).** Complement- Second of Two Parts. *N Engl J Med* **344**, 1140-1144.
- Walter, P. & Lingappa, V. R. (1986).** Mechanism of Protein Translocation Across the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Annual Review of Cell Biology* **2**, 499-516.
- Wang, L., Sunyer, J. O. & Bello, L. J. (2004a).** Fusion to C3d enhances the immunogenicity of the E2 glycoprotein of type 2 bovine viral diarrhea virus. *J Virol* **78**, 1616-1622.
- Wang, L. X., Xu, W., Guan, Q. D., Chu, Y. W., Wang, Y. & Xiong, S. D. (2004b).** Contribution of C3d-P28 repeats to enhancement of immune responses against HBV-preS2/S induced by gene immunization. *World J Gastroenterol* **10**, 2072-2077.
- Wang, X. L., Li, D. J., Yuan, M. M., Yu, M. & Yao, X. Y. (2004c).** Enhancement of humoral immunity to the hCG beta protein antigen by fusing a molecular adjuvant C3d3. *J Reprod Immunol* **63**, 97-110.
- Wang, L., Oriol, S. J. & Bello, L. J. (2005a).** Immunogenicity of a bovine viral diarrhea virus E2-C3d fusion protein containing a bovine homolog of C3d. *Dev Comp Immunol* **29**, 907-915.
- Wang, S., Arthos, J., Lawrence, J. M., Van Ryk, D., Mboudjeka, I., Shen, S., Chou, T. H., Montefiori, D. C. & Lu, S. (2005b).** Enhanced Immunogenicity of gp120 Protein When Combined with Recombinant DNA Priming To Generate Antibodies That Neutralize the JR-FL Primary Isolate of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **79**, 7933-7937.
- Wang, F. X., Sun, Y., Wang, L. & Liu, J. (2006a).** HIV-1 DNA vaccine with adjuvant cytokines induces specific immune responses against HIV-1 infection in mice. *Chin Med J (Engl)* **119**, 1034-1037.
- Wang, S., Farfan-Arribas, D. J., Shen, S., Chou, T. H., Hirsch, A., He, F. & Lu, S. (2006b).** Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine* **24**, 4531-4540.
- Wang, S., Pal, R., Mascola, J. R., Chou, T. H., Mboudjeka, I., Shen, S., Liu, Q., Whitney, S., Keen, T., Nair, B. C., Kalyanaraman, V. S., Markham, P. & Lu, S. (2006c).** Polyvalent HIV-1 Env vaccine formulations delivered by the DNA priming plus protein boosting approach are effective in generating neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from subtypes A, B, C, D and E. *Virology* **350**, 34-47.
- Wang, X. L., Zhao, X. R., Yu, M., Yuan, M. M., Yao, X. Y. & Li, D. J. (2006d).** Gene conjugation of molecular adjuvant C3d3 to hCGbeta increased the anti-hCGbeta Th2 and humoral immune response in DNA immunization. *J Gene Med* **8**, 498-505.
- Wang, B. Z., Liu, W., Kang, S. M., Alam, M., Huang, C., Ye, L., Sun, Y., Li, Y., Kothe, D. L., Pushko, P., Dokland, T., Hahn, B. H. & Compans, R. W. (2007).** Incorporation of High Levels of Chimeric Human Immunodeficiency Virus Envelope Glycoproteins into Virus-like Particles. *J Virol*, JVI.
- Watanabe, I., Ross, T. M., Tamura, S., Ichinohe, T., Ito, S., Takahashi, H., Sawa, H., Chiba, J., Kurata, T., Sata, T. & Hasegawa, H. (2003).** Protection against influenza virus infection by intranasal administration of C3d-fused hemagglutinin. *Vaccine* **21**, 4532-4538.
- Weber, T. H., Aro, H. & Nordman, C. T. (1972).** Characterization of lymphocyte-stimulating blood cell-agglutinating glycoproteins from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Biochim Biophys Acta* **263**, 94-105.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D. & Shaw, G. M. (2003).** Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307-312.
- WHO-Bericht (2006).** Die AIDS-Epidemie. Statusbericht: Dezember 2006. WHO Library Data.
- Wienands, J. (2000).** The B-cell antigen receptor: formation of signaling complexes and the function of adaptor proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* **245**, 53-76.
- Wild, J., Bojak, A., Deml, L. & Wagner, R. (2004).** Influence of polypeptide size and intracellular sorting on the induction of epitope-specific CTL responses by DNA vaccines in a mouse model. *Vaccine* **22**, 1732-1743.

- Willey, R., Bonifacino, J., Potts, B. Martin, M. & Klausner, R. (1988). Biosynthesis, Cleavage, and Degradation of the HIV-1 Envelope Glycoprotein gp160. *PNAS* **85**, 9580-9584.
- Wouters, S., Decroly, E., Vandenbranden, M., Shober, D., Fuchs, R., Morel, V., Leruth, M., Seidah, N. G., Courtoy, P. J. & Ruyschaert, J. M. (1999). Occurrence of an HIV-1 gp160 endoproteolytic activity in low-density vesicles and evidence for a distinct density distribution from endogenously expressed furin and PC7/LPC convertases. *FEBS Letters* **456**, 97-102.
- Wrin, T., Crawford, L., Sawyer, L., Weber, P., Sheppard, H. W. & Hanson, C. V. (1994). Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus. *J Acquir Immune Defic Syndr* **7**, 211-219.
- Wu, J., Qin, D., Burton, G. F., Szakal, A. K. & Tew, J. G. (1996). Follicular dendritic cell-derived antigen and accessory activity in initiation of memory IgG responses in vitro. *J Immunol* **157**, 3404-3411.
- Wyatt, L. S., Earl, P., Liu, J., Smith, J., Montefiori, D., Robinson, H. & Moss, B. (2004). Multiprotein HIV Type 1 Clade B DNA and MVA Vaccines: Construction, Expression, and Immunogenicity in Rodents of the MVA Component. *AIDS Research and Human Retroviruses* **20**, 645-653.
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R., Robinson, J., Hendrickson, W. A. & Sodroski, J. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**, 705-711.
- Wyatt, R. & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* **280**, 1884-1888.
- Xin, K. Q., Sekimoto, Y., Takahashi, T., Mizuguchi, H., Ichino, M., Yoshida, A. & Okuda, K. (2007). Chimeric adenovirus 5/35 vector containing the clade C HIV gag gene induces a cross-reactive immune response against HIV. *Vaccine* **25**, 3809-3815.
- Xu, R., Srivastava, I. K., Kuller, L., Zarkikh, I., Kraft, Z., Fagrouch, Z., Letvin, N. L., Heeney, J. L., Barnett, S. W. & Stamatatos, L. (2006). Immunization with HIV-1 SF162-derived Envelope gp140 proteins does not protect macaques from heterologous simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6P infection. *Virology* **349**, 276-289.
- Xu, X., Press, B., Wagle, N. M., Cho, H., Wandinger-Ness, A. & Pierce, S. K. (1996). B cell antigen receptor signaling links biochemical changes in the class II peptide-loading compartment to enhanced processing. *Int Immunol* **8**, 1867-1876.
- Yachnin, S. & Svenson, R. H. (1972). The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from *Phaseolus vulgaris*. *Immunology* **22**, 871-883.
- Yamamoto, H. (2007). Post-Infection Immunodeficiency Virus Control by Neutralizing Antibodies. *PLoS ONE* **2**, e540.
- Yamshchikov, G. V., Ritter, G. D., Vey, M. & Compans, R. W. (1995). Assembly of SIV virus-like particles containing envelope proteins using a baculovirus expression system. *Virology* **214**, 50-58.
- Yan, J., Yoon, H., Kumar, S., Ramanathan, M. P., Corbitt, N., Kutzler, M., Dai, A., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (2007). Enhanced Cellular Immune Responses Elicited by an Engineered HIV-1 Subtype B Consensus-based Envelope DNA Vaccine. *Mol Ther* **15**, 411-421.
- Yang, C., Spies, C. P. & Compans, R. W. (1995). The Human and Simian Immunodeficiency Virus Envelope Glycoprotein Transmembrane Subunits are Palmitoylated. *PNAS* **92**, 9871-9875.
- Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R. & Sodroski, J. (2000). Characterization of Stable, Soluble Trimers Containing Complete Ectodomains of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins. *J Virol* **74**, 5716-5725.
- Yang, X., Lee, J., Mahony, E. M., Kwong, P. D., Wyatt, R. & Sodroski, J. (2002). Highly Stable Trimers Formed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Fused with the Trimeric Motif of T4 Bacteriophage Fibritin. *J Virol* **76**, 4634-4642.
- Yang, Z. y., Chakrabarti, B. K., Xu, L., Welcher, B., Kong, W. P., Leung, K., Panet, A., Mascola, J. R. & Nabel, G. J. (2004). Selective Modification of Variable Loops Alters Tropism and Enhances Immunogenicity of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope. *J Virol* **78**, 4029-4036.
- Yao, Q., Kuhlmann, F. M., Eller, R., Compans, R. W. & Chen, C. (2000). Production and characterization of simian-human immunodeficiency virus-like particles. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 227-236.
- Yao, Q., Vuong, V., Li, M. & Compans, R. W. (2002). Intranasal immunization with SIV virus-like particles (VLPs) elicits systemic and mucosal immunity. *Vaccine* **20**, 2537-2545.

- Yao, Q., Bu, Z., Vzorov, A., Yang, C. & Compans, R. W. (2003).** Virus-like particle and DNA-based candidate AIDS vaccines. *Vaccine* **21**, 638-643.
- Yoshida, K., van den Berg, T. K. & Dijkstra, C. D. (1993).** Two functionally different follicular dendritic cells in secondary lymphoid follicles of mouse spleen, as revealed by CR1/2 and FcR gamma II-mediated immune-complex trapping. *Immunology* **80**, 34-39.
- Young, K. R. & Ross, T. M. (2003).** Particle-based vaccines for HIV-1 infection. *Curr Drug Targets Infect Disord* **3**, 151-169.
- Young, K. R., Smith, J. M. & Ross, T. M. (2004).** Characterization of a DNA vaccine expressing a human immunodeficiency virus-like particle. *Virology* **327**, 262-272.
- Young, K. R., McBurney, S. P., Karkhanis, L. U. & Ross, T. M. (2006).** Virus-like particles: Designing an effective AIDS vaccine. *Methods* **40**, 98-117.
- Zhan, X., Slobod, K. S., Surman, S., Brown, S. A., Lockey, T. D., Coleclough, C., Doherty, P. C. & Hurwitz, J. L. (2003).** Limited Breadth of a T-Helper Cell Response to a Human Immunodeficiency Virus Envelope Protein. *J Virol* **77**, 4231-4236.
- Zhang, C. W. H., Chishti, Y., Hussey, R. E. & Reinherz, E. L. (2001).** Expression, Purification, and Characterization of Recombinant HIV gp140. THE gp41 ECTODOMAIN OF HIV OR SIMIAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS IS SUFFICIENT TO MAINTAIN THE RETROVIRAL ENVELOPE GLYCOPROTEIN AS A TRIMER. *J Biol Chem* **276**, 39577-39585.
- Zhang, L., Mallik, B. & Morikis, D. (2007a).** Immunophysical Exploration of C3d-CR2(CCP1-2) Interaction Using Molecular Dynamics and Electrostatics. *Journal of Molecular Biology* **369**, 567-583.
- Zhang, P. F., Cham, F., Dong, M., Choudhary, A., Bouma, P., Zhang, Z., Shao, Y., Feng, Y. R., Wang, L., Mathy, N., Voss, G., Broder, C. C. & Quinnan, G. V., Jr. (2007b).** Extensively cross-reactive anti-HIV-1 neutralizing antibodies induced by gp140 immunization. *PNAS* **104**, 10193-10198.
- Zhao, Q., Chen, P., Manson, M. E. & Liu, Y. (2006).** Production of active recombinant mitogen-activated protein kinases through transient transfection of 293T cells. *Protein Expression and Purification* **46**, 468-474.
- Zhou, J., Sun, X. Y., Stenzel, D. J. & Frazer, I. H. (1991).** Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* **185**, 251-257.
- Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Chertova, E., Lifson, J. D., Ofek, G. A., Taylor, K. A. & Roux, K. H. (2006).** Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-852.
- Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B. & Ding, J. L. (2005).** The ancient origin of the complement system. *EMBO J* **24**, 382-394.
- Zinkernagel, R. M. (2002).** On differences between immunity and immunological memory. *Current Opinion in Immunology* **14**, 523-536.
- Zolla-Pazner, S. (2004).** Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat Rev Immunol* **4**, 199-210.
- zur Megede J., Chen, M., Doe, B., Schaefer, M., Greer, C., Selby, M., Otten, G. & Barnett, S. (2000).** Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J Virol* **74**, 2628-2635.
- zur Megede, J., Otten, G. R., Doe, B., Liu, H., Leung, L., Ulmer, J. B., Donnelly, J. J. & Barnett, S. W. (2003).** Expression and Immunogenicity of Sequence-Modified Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype B pol and gagpol DNA Vaccines. *J Virol* **77**, 6197-6207.
- Zwick, M. B., Labrijn, A. F., Wang, M., Spenlehauer, C., Saphire, E. O., Binley, J. M., Moore, J. P., Stiegler, G., Katinger, H., Burton, D. R. & Parren, P. W. H. I. (2001).** Broadly Neutralizing Antibodies Targeted to the Membrane-Proximal External Region of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Glycoprotein gp41. *J Virol* **75**, 10892-10905.

# Lebenslauf

---

## Persönliche Daten

Name	Veronika Julia Wanninger
Adresse	Blaue Liliengasse 2, 93047 Regensburg
E-mail	vwanninger@web.de
Geburtsdatum	27. Februar 1976
Geburtsort	München
Familienstand	ledig

## Ausbildung

### Hochschulabschlüsse

10/2007	<u>Promotion:</u>  Strategien zur Modulation der Immunogenität des HIV-1 Hüllproteins als Vakzinekomponente  am Institut für Medizinischer Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof.Dr.R.Wagner
02/2002	<u>Diplom, Note 1,2</u>  Diplomarbeit: Etablierung einer Methode zur Messung der Bindungsstärke zwischen HBsAg und spezifischen Antikörpern mit dem Schwingquarzbiosensor  am Institut für Medizinischer Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg unter Anleitung von Prof.Dr.W.Jilg
03/2003 – 11/2007	<b>Promotion</b> , Universität Regensburg
10/1996 – 02/2002	<b>Diplomstudiengang Biologie</b> , Universität Regensburg
09/1986 – 07/1995	<b>Tassilo-Gymnasium</b> , Simbach am Inn <u>Allgemeine Hochschulreife, Note 1,9</u>
09/1982 – 07/1986	<b>Grundschule</b> , Stammham

## Praktische Erfahrungen

10/2002 – 02/2003	<b>Universität Regensburg, AG Dr. Petra Lindner</b> DNA-Chip-Analyse
06/2002 – 08/2002	<b>Entelechon GmbH</b> Produktion synthetischer Gene
10/2000	<b>Max-Delbrück-Zentrum Berlin, AG Dr. Thomas Willnow</b> Proteinexpression und -aufreinigung
09/1999 – 10/1999	<b>Public Health Laboratory Service London, AG Dr. Bernard Cohen</b> Forschungsprojekt mit Report: „Quantitative PCR tests for Parvovirus B19“
05/1996 - 08/1996	<b>HITECH Inc Camden, Arkansas, USA</b> Laborpraktikum
02/1996 – 04/1996	<b>Sanofi Bio Industries, Grasse</b> Laboranalysen von Lebensmittelaromen
09/1995 – 11/1995	<b>Daimler Benz Aerospace AG, Paris</b> Assistenz des Sekretariats

## Besondere Kenntnisse

Methoden	<b>FACS-Analytikurs:</b> Messung phosphorylierter Signaltransduktionsproteine und intrazellulärer Zytokine  <b>Elektronenmikroskopiekurs:</b> Molekulare Immunzytologie  <b>Kurs Biologische Sicherheit:</b> Fortbildungsveranstaltung für Projektleiter gentechnischer Arbeiten und Beauftragte für Biologische Sicherheit nach §§ 15 und 17 Gentechnikverordnung
EDV	<b>EDV-Ergänzungsausbildung:</b> Grund- und Fortgeschrittenenausbildung an der Universität Regensburg, Bioinformatikschule Göttingen (MS Office, DNASTAR, DNAMAN, VECTORNTI, WINMDI, GRAPHPAD, BLAST, SIGMABLOT, ADOBE PHOTOSHOP, COREL DRAW, HTML, SPSS)
Sprachkenntnisse	<b>Englisch:</b> fließend in Wort und Schrift  <b>Französisch:</b> Gute Kenntnisse  <b>Italienisch:</b> Grundkenntnisse

# Veröffentlichungen

---

## Posterpräsentationen bei Fachtagungen:

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2004)  
Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies Based on High Level Expression of gp120/C3d Fusion Proteins.  
AIDS Vaccine International Conference, Lausanne, Switzerland, 30.08.-01.09.2004

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2004)  
Enhanced Expression of gp120/C3d Fusion Proteins as a Basis for Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
3rd European Conference on Viral Diseases (ConVir2004) 14.05.-16.05.2004

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2004)  
Enhanced Expression of gp120/C3d Fusion Proteins as a Basis for Induction of High Affinity, Broadly Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
12th Annual Congress of the ESGT in Tampere, Finland 04.-07.11.2004

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2004)  
Enhanced Expression of gp120/C3d Fusion Proteins as a Basis for Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
Forimmun Würzburg 29.02.-03.03.2004

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2004)  
Enhanced Expression of gp120/C3d Fusion Proteins as a Basis for Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
Annual Meeting German Society of Virology, Tübingen 17.-20.03.2004

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2005)  
Effects of gp120/C3d Fusion Proteins on Expression, Interaction with CD21 and Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
Abschlußbegutachtung Forimmun, Westerham 02.-03.10.2005

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2005)  
Effects of gp120/C3d Fusion Proteins on Expression, Interaction with CD21 and Induction of High Affinity, Broadly Cross Neutralizing HIV-Specific Antibodies.  
Annual Meeting German Society of Virology, Hannover 16.-19.03.2005

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2006)  
Effects of C3d Fusion Proteins on the Expression and Immunogenicity of HIV-1 gp120 DNA Vaccines.  
Aids Vaccine Conference 2006 Amsterdam, Niederlande 29.08.-01.09.2006

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2006)  
Effects of C3d Fusions on the Expression and Immunogenicity of HIV-1 gp120 DNA Vaccines.  
Annual Meeting German Society of Virology, München 15.-18.03.2006

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2007)  
C-terminal fusion of C3d to gp120 reduces expression, secretion and immunogenicity of the codon optimized C-clade Env gp120(CN54) DNA vaccine.  
DNA Vaccine Congress Malaga, Spanien 23.-24.05.2007

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2007)  
C-terminal fusion of a triple-C3d coding sequence motif reduces expression and immunogenicity of a RNA- and codon optimized Env-gp120 DNA vaccine.  
Deutsch-Österreichischer Kongress (DÖAK) Frankfurt 27.-30.06.2007

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2007)  
Fusion of human C3d<sub>3</sub> results in a reduced expression, secretion and immunogenicity of a codon optimized C-clade Env gp120<sub>CN54</sub> DNA vaccine.  
DGGT Heidelberg 18.-20.07.2007

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2007)  
Fusion of human C3d<sub>3</sub> results in a reduced expression, secretion and immunogenicity of a codon optimized C-clade Env gp120<sub>CN54</sub> DNA vaccine.  
AIDS Vaccine Conference 2007 Seattle, USA 20.-23.08.2007

Wanninger V., Bieler K., Notka F., Graf M., Wild J., Jeffs S. and Wagner R. (2007)

Fusion of human C3d<sub>3</sub> results in a reduced expression, secretion and immunogenicity of a codon optimized C-clade Env gp120<sub>CN54</sub> DNA vaccine

Eurovirology Nürnberg 01.-05.09.2007

**Artikel in Fachzeitschriften:**

Wanninger V., Bieler K., Graf M., Wild J., Ludwig C., Jeffs S., Vieira S. and Wagner R.

Effects of C3d Fusions on the Expression and Immunogenicity of HIV-1 gp120 DNA Vaccines (Manuskript in Vorbereitung)

# Dank

---

Zunächst bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner, der mir diese Promotion ermöglicht hat. Er hat neben der Finanzierung und Betreuung der Arbeit mir darüber hinaus die Chance gegeben, an Kongressen teilzunehmen und dort meine Arbeit vorzustellen. Trotz der großen Arbeitsbelastung fand er immer Zeit für anregende Gespräche und Diskussionen und ließ mir dabei den nötigen akademischen Freiraum zum selbstständigen wissenschaftlichen Arbeiten.

Darüber hinaus gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans Wolf für die Bereitstellung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer danke ich für die bereitwillige und unkomplizierte Übernahme des Erstgutachtens. Herrn Prof. Dr. Richard Warth und Herrn Prof. Dr. Günter Hauska möchte ich für die schnelle Zusage als Drittprüfer und als Vorsitzender für meine Promotionsprüfung danken.

Desweiteren gilt mein Dank Herrn Dr. Simon Jeffs, der die Antigen- und teilweise auch die Antikörper-ELISA für mich durchführte und immer interessante Anregungen für mich hatte. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn PD Dr. Fritz Schwarzmann bedanken, der mir sämtliche in der Arbeit verwendeten B-Zelllinien überlassen hat.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Korrekturlesern Dietmar Bernek, Franziska Wanninger, Manuela Bonfissuto und Dr. Jens Wild, die sich unermüdlich durch meine schriftlichen Entwürfe gekämpft haben. Bei Dr. Jens Wild möchte ich mich zudem für seine Unterstützung bei den immunologischen Versuchen und für die Durchsicht des Manuskripts bedanken. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Dr. Christine Ludwig bedanken, sie hat sich trotz ihrer vielfältigen Aufgaben immer die Zeit genommen, mit mir zu diskutieren, mein Manuskript zu verbessern und mich in negativen Phasen wieder aufzubauen. Danke auch an Dr. Kurt Bieler, der mich in die Geheimnisse der Klonierung eingeführt hat. Ebenfalls vielen Dank an Sabine Feiner, die mich in allen formellen Dingen unterstützte und immer ein offenes Ohr für meine Anliegen hatte.

Bei meinen Kollegen der AG Wagner möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, Kollegialität und schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere die Kaffeepausen mit euch und unsere abendlichen Unternehmungen haben mich aus kleinen Motivationstiefs gerettet. Schön war's mit euch zu arbeiten!

Der größte Dank gilt meinen Eltern und meiner ganzen Familie, die mich mit ihrem Vertrauen, sowie moralisch und finanziell stets unterstützt haben. Meiner Schwester rechne ich hoch an, dass sie trotz der unverständlichen Fachwörter diese Arbeit durchgelesen hat.

Meinem Freund Didi danke ich für seine Liebe und Unterstützung. Vielen Dank für Deine Geduld mit mir, Deine Aufmunterung in Motivationstiefs und die unentwegte Korrekturlesearbeit mit den erfrischenden Randbemerkungen.

# F Anhang

---

## F.1 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5'→3'-Orientierung angegeben. Start- und Stopkodons sind unterstrichen und kursiv dargestellt.

### Oligonukleotide zur Klonierung der DNA-Expressionsplasmide

Name:	Sequenz:
cenvF1	GCGGTACCCGTCTCACC <sup>GGTGGGCAACCTGTGGGTGACCGTGTAC</sup>
cenvF2	GCGGTACCCGTCTCACC <sup>GGTGGGCAACCTGTGGGTGACCGTGTAC</sup>
cenvF3	CGGTACCGTCTCACC <sup>GGTCTTATCAAGTTATTGTGGGCAACCTGTGGGTGACCGTGTACTACGGC</sup>
cenvF1_A	GCGGTACCCGTCTCAGCGCC <sup>GTGGGCAACCTGTGGGTGACCGTGTAC</sup>
cenvB	CGGAGCTCGGGCCCCCTCTTCTCCCTCTCCACCACCCT
tpa_G_hC3d	CCAAGCTTCGTCTCCCCGGGCTCCCCTCCTAAAC
tpa_Stop	GCGATATCCTATTAGGGCCCTCTAGACTCGAGGAATTGGA
tpa_Nhe	GCTAGCATGGATGCAATGAAGCGG

### Oligonukleotide zur Klonierung des pDisplay-Konstrukts

Name	Sequenz
cenvFXma	GCCCCGGGGTGGGCAACCTGTGGGTGACC
cenvBAcc	CGGTCGACCCTCTTCTCCCTCTCCACCAC

### Oligonukleotide zur Sequenzierung

Name	Sequenz
envCN54	
cenv481f	ACCGTGGTGAGGGACAGGAAGC
cenv981f	CCAGAACAAGACCATCAAGTTC
cenv1259f	CGGCGGCACCGAGCCCAACGAC
cenv1350f	CATCACCGGCCTGCTGCTGGT
cenv70r	GAACAGGGTGGTGGTGGCGC
cenv110r	CACGCAGGCGTGGGTGGCCACACG

**Vektor pcDNA3.1**

741f	AAATGTCGTAACAACCTCCGC
T7 Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH rev	AAGGCACAGTCGAGG
1141r	TGACACCTACTCAGACAATG
2001f	GCCGCCTCTGCCTCTGAGCT
3140r	GCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGC
101f	GGAGGTCAGTACTGACTAGTG

**Humanes C3d**

hC3d_300r	GATGAGGTTGACGGCCAGACT
hC3d_860f	GGCTACCTTTATGGTCTTTTCAGGCCCTGG

**Vektor pcDNA3.1luc**

lucfwd	GGATGAGGATCGTTTCGC
--------	--------------------

**Oligonukleotide zur Synthese der Signalsequenz von HIV Env**

Name:	Sequenz:
Leader_A-L1	GCGGTACCGCTAGCATGAGGGTGACCGGCATCCGGAAGAAC
Leader_A-L2	TACCGGCACCTGTGGAGATGGGGCACCATGCTGCTGGGCATG
Leader_A-L3	CTGATGATCAGCAGCGCCGAGACGAAGCTTGAGCTCGC
Leader_A-m1	CTCCACAGGTGCCGGTAGTTCTTCCGGATGCCGG
Leader_A-m2	GCGCTGCTGATCATCAGCATGCCCAGCAGCATG
Leader_A-pb	GCGAGCTCAAGCTTCGTC
Leader_A-pf	GCGGTACCGCTAGCATGA

**Oligonukleotide zur Klonierung der VLP Konstrukte**

Name:	Sequenz:
<b>Humanes C3d</b>	
hC3drev_linkerb	GCGAGCTCGGGCCCAGATCCGCCTCCCCGGACCCGCC
hC3dfwd	GCGGTACCCGTCTCACCGGATGCTGGATGCTGAACGGCTGA
hC3dfwd_linker	GCGATATCGGAAGCGCGGAGGGGGTCT
<b>Murines C3d</b>	
mC3dfwd	GCGGTACCCGTCTCACCGGATGCTGGACGGCGAGAGGCTG
mC3drev_linkerb	GCGACCTCGGGCCCCTTCCGCTTCCCTCCGCC
<b>Transmembran- domäne HIV</b>	
TMbackStop	CGGAGCTCGTTTAAACTTCGAATTATCAGTAGCCCTGCCTCACCCGTGT
TMfwd	GCGGTACCGGGCCCAGATATCTGGAAGAACCTGTGGAGCTGGTTC

**Transmembran-  
domäne gp64**

TM<sub>gp64</sub>fwd GCGGTACCGGGCCCGATATCACCAGCTTCATGTTCGGCCACGTG

TM<sub>gp64</sub>back CGGAGCTCGTTTAAACTTCGAATTATCACCAGTTCCGGATCATGCAGTA

**env<sub>CN54</sub>**

cenv120BsrGI\_1350f CCGGTACCTGTACAAGTACAAGGTGGTGAGATCAA

cenv120\_F5: GCGGTACCGGGCCCGTGGGCAACCTGTGGGTGACC

cenv120\_Blinker CGGAGCTCGGGCCCGCTGCCTCCCCCCCCAGACCCCCCTCCGCCGCTTCCGATATCCCTCTTCTCC

cenv120BMCS CCGTTTAAACTTCGAAGATATCGGGCCCCCTCTT

**Syngag<sub>IIIb</sub>**

SyngagB\_fwd CGGGATCCATGGGCGCCAGGGCCAGCGTGCTGA

SyngagB\_rev CGCTCGAGCTATCACTGGCTGCTGGGGTCGTTGCCGAAC

**Signalsequenzen**

HIV\_fwd CCGCTAGCCCCGGGATGAGGGTGACCGGCATC

tpa\_fwd CCGCTAGCCCCGGGATGGATGCAATGAAGCGG

StopMCS CCGTTTAAACTTCGAAGATATCCTATTAGGGCCC

**F.2 Sequenzen****Sequenzen der DNA-Vakzinekonstrukte**

Start- und Stopkodons sind unterstrichen und kursiv dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind kursiv und rot dargestellt.

**Kodonoptimierte Sequenz tpa1hC3d<sub>3</sub> mit MCS:**

```

1      GCTAGCATGG ATGCAATGAA GCGGGCCCTG TGCTGTGTGC TGCTGTGTGC TGGCGCCGTG
61     TTCGTGAGCC CTTCCCAGGA AATTCACGCT AGGTTTAGGA GGGGAGCCCG GGAGACGAAG
121    CTTGGATCCG AATTCCTCGA GTCTAGAGGG CCCGATATCG GAAGCGCCGG AGGGGGGTCT
181    GGGGGGGGAG GCAGCGGCAG TATGCTGGAT GCTGAACGGC TGAAGCACCT CATTGTGACA
241    CCTAGTGGAG CCGGGGAGCA GAACATGATT GGGATGACTC CTACTGTGAT CGCTGTCCAT
301    TACCTGGATG AAACCGAGCA GTGGGAGAAG TTTGGGCTCG AAAAGAGGCA GGGGGCTCTG
361    GAACTCATCA AAAAGGGGTA TACTCAGCAG CTGGCTTTTA GGCAGCCCTC TAGTGCCTTT
421    GCCGCTTTTCG TGAAGAGAGC CCCTTCAACC TGGCTCACTG CCTATGTCTG GAAAGTCTTT
481    AGTCTGGCCG TCAACCTCAT CGCTATTGAT TCCCAGGTGC TGTGTGGGGC CGTGAAATGG
541    CTCATCCTGG AAAAAACAGAA ACCCGATGGA GTCTTTCAGG AGGATGCCCC TGTCATCCAC
601    CAGGAGATGA TTGGAGGACT GCGCAATAAC AACGAGAAAG ATATGGCTCT CACCGCATTT
661    GTCCTCATTA GCCTGCAGGA AGCCAAGGAC ATTTGTGAAG AGCAGGTCAA CTCCCTCCCC
721    GGATCAATTA CCAAGGCTGG AGACTTTCTG GAGGCAAAC ACATGAATCT GCAGAGGTCC
781    TATACCGTGG CAATTGCTGG CTACGCTCTC GCCCAGATGG GGCGGCTCAA GGGACCCCTG
841    CTCAACAAGT TCCTCACCAC AGCCAAGGAT AAGAATAGAT GGGAGGACCC CGGTAACAG
901    CTGTATAACG TCGAAGCTAC CTCTTATGCC CTCCTGGCTC TGCTCCAGCT GAAGGACTTT
961    GATTTCGTGC CCCCCGTCTG GAGATGGCTG AACGAGCAGC GGTATTACGG AGGGGGCTAT
1021   GGGAGTACCC AGGCTACCTT TATGGTCTTT CAGGCCCTGG CCCAGTATCA GAAAGATGCC
1081   CCTGGGTCTG GCGGAGGCGG GTCCGGGGGA GCGGATCTG GAAGCATGCT GGACCGCGAA
1141   AGGCTCAAAC ACCTCATTGT GACCCCTAGC GGGGCAGGGG AGCAGAACAT GATTGGAATG
1201   ACACCCACCG TGATCGCCGT GCATTATCTG GATGAAACCG AGCAGTGGGA AAAGTTCGGG
1261   CTGGA AAAAC GGCAGGGCGC TCTGGA ACTC ATCAAGA AAGG GGTATACTCA GCAGCTGGCT

```

```

1321 TTTCCGGCAGC CTCTCTCTGC TTTCGCCGCA TTTGTGAAAA GGGCACCCCTC TACCTGGCTC
1381 ACCGCTTATG TGGTGAAGGT GTTCTCCTCG GCTGTGAACC TCATTGCCAT CGATAGTCAG
1441 GTGCTGTGTG GCGCCGTGAA ATGGCTCATC CTGGAGAAAC AGAAAACCCGA TGGCGTCTTT
1501 CAGGAAGATG CTCCCCTGAT CCATCAGGAG ATGATTGGAG GACTCCGCAA TAACAACGAG
1561 AAAGACATGG CCCTCACCGC CTTCGTCTCT ATTAGCCTGC AGGAAGCTAA GGACATTTGT
1621 GAGGAGCAGG TCAACTCACT CCCAGGCAGC ATTACCAAGG CCGGCATTTT CCTCGAAGCC
1681 AACTACATGA ATCTGCAGCG CTCTTATACA GTCGCAATCG CCGGATATGC CCTGGCCCAG
1741 ATGGGCCGGC TCAAGGGACC CCTGCTCAAC AAGTTCCTCA CCACAGCCAA AGATAAGAAT
1801 CGCTGGGAGG ACCTTGGGAA ACAGCTGTAC AATGTGGAAG CCACCTCTTA CGCTCTCCTG
1861 GCACTGCTCC AGCTGAAGGA CTTTGATTTT GTCCCCCCCG TGGTGCCTGT GCTGAACGAG
1921 CAGCGGTATT ACGCCGGAGG CTATGGCTCC ACCCAGGCCA CCTTTATGGT GTTTCAGGCA
1981 CTCGCACAGT ATCAGAAAGA TGCCCTGGC AGTGGGGGGG GAGGCTCCGG AGGCGGGGGA
2041 AGTGGCTCTA TGCTGGACGC CGAAAGGCTC AAACATCTCA TTGTGACCCC CTCCGGGGCA
2101 GGGGAGCAGA ACATGATTGG AATGACACCC ACCGTGATCG CCGTGCATTA CCTGGACGAA
2161 ACCGAGCAGT GGGAGAAGTT TGGGCTCGAA AAGCGGCAGG GGGCTCTGGA ACTCATAAA
2221 AAGGGGTATA CTCAGCAGCT GGCCTTTCGG CAGCCTTCTT CTGCTTTCGC CGCTTTTGTG
2281 AAAAGAGCAC CCTCTACATG GCTCACTGCC TATGTCTGTA AAGTCTTTTC CCTCGCCGTG
2341 AACCTCATCG CTATTGATAG TCAGGTGCTC TGCGGCCTGT TGAATGGCTC CATCTTGAA
2401 AAGCAGAAAC CAGACGGCGT GTTCCAGGAA GATGCCCCCG TGATTATGCA GGAGATGATT
2461 GCGGACTCC GGAATAACAA TGAAAAAGAC ATGGCCCTCA CCGCCTTTGT CCTCATTAGC
2521 CTGCAGGAAG CCAAGGACAT TTGTGAGGAA CAGGTCAACA GCCTGCCCAG ATCTATTACT
2581 AAAGCAGGAG ACTTCCTGGA GGCAACTAC ATGAATCTGC AGAGATCTTA CACCGTCGCC
2641 AATTGTGGGT ATGCCCTGGC CCAGATGGGC CGGCTGAAGG GACCCCTGTC GAACAAGTTT
2701 CTCACTACCG CCAAGGATAA GAATAGATGG GAGGACCCCG GCAAACAGCT GTATAACGTC
2761 GAGGCCACCT CTATGCTCTT CCTGGCTCTG CTCCAGCTGA AGGACTTTGA CTTTGTGCC
2821 CCGGTGGTGA GATGGCTGAA CGAGCAGCGG TATTACGGGG GAGGATACGG GTCCACCCAG
2881 GCCACCTTTA TGGTGTCCA GGCTCTGGCT CAGTATCAGA AAGATGCCCC TTGATAAGTT
2941 TAAAC

```

An der Stelle 111 wurde für die *BsmBI*-Klonierung von gp120 noch ein G mit dem Oligonukleotid tpa\_G\_C3d eingefügt.

#### Kodonoptimierte Sequenz von Env gp120 Isolat CN54:

```

1 GTGGGCAACC TGTGGGTGAC CGTGTACTAC GGCCTGCCCC TGTGGAAGGG CGCCACCACC
61 ACCCTGTTCT GCGCCAGCGA CGCCAAGGCC TACGACACCG AGGTGCACAA CGTGTGGGCC
121 ACCCAGCCTT GCGTGCCCGC CGACCCCAAC CCCCAGGAGA TGGTGTCTGA GAACGTGACC
181 GAGAACTTCA ACATGTGGAA GAACGAGATG GTGAACCAGA TGCAGGAGGA CGTCATCAGC
241 CTGTGGGACC AGAGCCTGAA GCCCTGCGTG AAGCTGACCC CCCTGTGCGT GAACCTGGAG
301 TGCAGGAACG TGAGCAGCAA CAGCAACGAC ACCTACCACG AGACCTACCA CGAGAGCATG
361 AAGGAGATGA AGAACTGCAG CTTCAACGCC ACCACCCTGG TGAGGGACAG GAAGCAGACC
421 GTGTACGCCC TGTCTACAG GCTGGACATC GTGCCCTTGA CCAAGAAGAA CTACAGCGAG
481 AACAGCAGCG AGTACTACAG GCTGATCAAC TGCAACACCA GCGCCATCAC CCAGGCCTGC
541 CCCAAGGTGA CCTTCGACCC CATCCCCATC CACTACTGCA CCCCCGCCGG CTACGCCATC
601 CTGAAGTGCA ACGACAAGAT CTTCAACGGC ACCGGCCCTT GCCACAACGT GAGCACCGTG
661 CAGTGCACCC ACGGCATCAA GCCCGTGGTG AGCACCAGC TGCTGTCTGA CCGCAGCCTG
721 GCGGAGGGCG AGATCATCAT CAGGAGCGAG AACCTGACCA ACAACGTGAA AACCATCATC
781 GTGCACCTGA ACCAGAGCGT GGAGATCGTG TGCACCAGGC CCGGCAACAA CACCAGGAAG
841 AGCATCAGGA TCGGCCCCCG CCAGACCTTC TACGCCACCG GCGACATCAT CCGGCAGCATC
901 AGGCAGGCC ACTGCAACT CAGCGAGGAC AAGTGGAACG AGACCCTGCA GAGGGTGGAG
961 AAGAAGCTTG CCGAGCACTT CCAGAACAAG ACCATCAAGT TCGCCAGCAG CAGCGCGCGC
1021 GACCTGGAGG TGACCACCCA CAGCTTCAAC TGCAGGGGCG AGTTCTTCTA CTGCAACACC
1081 AGCGGCCTGT TCAACGGCGC CTACACCCCC AACGGCACCA AGAGCAACAG CAGCAGCATC
1141 ATCACCATCC CCTGCAGGAT CAAGCAGATC ATCAACATGT GGCAGGAGGT GGGCAGGGCC
1201 ATGTACGCCC CTCCCATCAA GGGCAACATC ACCTGCAAGA GCAACATCAC CCGCCTGCTG
1261 CTGGTGAGGG ACGGCGGCAC CGAGCCCAAC GACACCGAGA CCTTCAGGCC CCGCGGCGGC
1321 GACATGAGGA ACAACTGGAG GAGCGAGCTG TACAAGTACA AGGTGGTGGG GATCAAGCCC
1381 CTGGGCGTGG CCCCACCAC CACCAAGAGG AGGGTGGTGG AGAGGGAGAA GAGG

```

#### Kodonoptimierte HIV-1 Env-Signalsequenz des Isolats CN54:

```

1 GCGGTACCGC TAGCATGAGG GTGACCGCGA TCCGGAAGAA CTACCGGCAC CTGTGGAGAT
61 GGGGCACCAT GCTGTGGGCG ATGCTGATGA TCAGCAGCGC CGAGACGAG CTTGAGCTCG
121 C

```

**Sequenzen der VLP-Vakzinekonstrukte****Kodonoptimierte Sequenz von Syngaq Isolat IIIB:**

```

1      ATGGGGCGCCA GGGCCAGCGT GCTGAGCGGC GGCAGCTGG ACAGGTGGGA GAAGATCAGG
61     CTGAGGCCCG GCGCAAGAA GAAGTATAAG CTGAAGCACA TCGTGTGGGC CAGCAGGGAG
121    CTGGAGAGGT TCGCCGTGAA CCCC GGCCCTG CTGGAGACCA GCGAGGGCTG CAGGCAGATC
181    CTGGGCCAGC TGCAGCCAG CCTGCAGACC GGCAGCGAGG AGCTGAGGAG CCTGTACAAC
241    ACCGTGGCCA CCCTGTACTG CGTGCACCAG AGGATCGAGA TCAAGGACAC CAAGGAGGCC
301    CTGGACAAGA TCGAGGAGGA GCAGAACAAG TCCAAGAAGA AGGCCAGCA GGCCCGCC
361    GACACCGGCC ACAGCAGCCA GGTGAGCCAG AACTACCCCA TCGTGCAGAA CATCCAGGGC
421    CAGATGGTGC ACCAGGCCAT CAGCCCCAGG ACCCTGAACG CCTGGGTGAA GGTGTGGGAG
481    GAGAAGGCCT TCAGCCCCGA GGTGATCCCC ATGTTTCAAG CCCTGAGCGA GGGAGCCACC
541    CCCAGGACC TGAACACCAT GCTGAACACC GTGGGCGGCC ACCAGGCCG CATGCAGATG
601    CTGAAGGAGA CCATCAACGA GGAGGCCGCC GAGTGGGACA GGGTGCACCC CGTGCACGCC
661    GGCCCATCG CCCC GGCCGATG GATGAGGGAG CCCC GGCCGCA GCGACATCGC CGGCACCACC
721    AGCACCCCTG AGGAGCAGAT CGGCTGGATG ACCAACCAAC CCCC CATCCG CTGTGGCGAA
781    ATCTACAAGA GGTGATCAT CCTGGGCTG AACAAGATCG TGAGGATGTA CAGCCCCCAT
841    AGCATCCTGG ATATCAGGCA GGGCCCCAAA GAGCCCTTCA GGGACTACGT GGACAGGTTT
901    TACAAGACC TGCGCGCGA GCAGGCCAGC CAGGAGGTGA AGAAGTGGAT GACCGAGACC
961    CTGTGGTGC AGAACGCCAA CCCC GACTGC AAGACCATCC TGAAAGCCCT GGGACCCGCC
1021   GCCACCCCTG AGGAGATGAT GACCCGCTGC CAGGGCGTGG GCGGCCCGG CCACAAGGCC
1081   AGGTGCTGG CCGAGGCCAT GAGCCAGGTG ACCAACACCG CCACCATCAT GATGCAGAGG
1141   GGCAACTTCA GGAACCAGAG GAAGATGGTG AAGTGCTTCA ACTGCGGCAA GGAGGGCCAC
1201   ACCGCCAGGA ACTGCCGCGC CCCCAGGAAG AAGGGCTGCT GGAAGTGGCG CAAGGAGGGC
1261   CACCAGATGA AGGACTGCAC CGAGAGGCAG GCCAACTTCC TGGGCAAGT CTGGCCAGC
1321   TACAAGGGA GGCCCGGCAA CTTCTGCAG AGCAGGCCCG AGCCCCACCG CCCCCTTTC
1381   CTGCAGAGCA GGCCCGAGCC CACCGCCCC CCGAGGAGA GCTTCAGGAG CGGCGTGGAG
1441   ACCACCACC CCCC CAGAAA GCAGGAGCCC ATCGACAAGG AGCTGTACCC CCTGACCAG
1501   CTGAGGAGCC TGTTCGGCAA CGACCCAGC AGCCAGTGA

```

**Kodonoptimierte Sequenz von Env gp140 Isolat CN54:**

```

1      GTGGGCAACC TGTGGGTGAC CGTGTACTAC GGCCTGCCCC TGTGGAAGGG CGCCACCACC
61     ACCCTGTTCT GCGCCAGCGA CGCCAAGGCC TACGACACCG AGGTGCACAA CGTGTGGGCC
121    ACCCAGCCTT GCGTGCCCGC CGACCCCAAC CCCCAGGAGA TGGTGTGGA GAACGTGACC
181    GAGAACTTCA ACATGTGAA GAACGAGATG GTGAACCAGA TGCAGGAGGA CGTCATCAGC
241    CTGTGGGACC AGAGCCTGAA GCCCTGCGTG AAGCTGACCC CCCTGTGCGT GACCCTGGAG
301    TGAGGAAACG TGAGCAGCAA CAGCAACGAC ACCTACCACG AGACCTACCA CGAGAGCATG
361    AAGGAGATGA AGAAGTGCAG CTTCAACGCC ACCACCGTGG TGAGGGACAG GAAGCAGACC
421    GTGTACGCC TGTCTACAG GCTGGACATC GTGCCCTGTA CCAAGAAGAA CTACAGCGAG
481    AACAGCAGCG AGTACTACAG GCTGATCAAC TGCAACACCA GCGCCATCAC CCAGGCCTGC
541    CCCAAGGTGA CCTTCGACC CATCCCATC CACTACTGCA CCCC GGCCG CTACGCCATC
601    CTGAAGTGCA ACGACAAGAT CTTCAACGCC ACCGGCCCTT GCCACAACGT GAGCACCCTG
661    CAGTGCACCC ACGGCATCAA GCCCGTGGTG AGCACCAGC TGCTGTGAA CGGCAGCCTG
721    GCCGAGGGCG AGATCATCAT CAGGAGCGAG AACCTGACCA ACAACGTGAA AACCATCATC
781    GTGCACCTGA ACCAGAGCGT GGAGATCGTG TGCACCAGG CCGGCAACAA CACCAGGAAG
841    AGCATCAGGA TCGGCCCGG CCAGACCTT TACGCCACCG GCGACATCAT CGGCAGATC
901    AGGAGGCCCC ACTGCAACAT CAGCGAGGAC AAGTGAACG AGACCTGCA GAGGTTGAGC
961    AAGAAGCTTG CCGAGCACTT CCAGAACAAG ACCATCAAGT TCGCCAGCAG CAGCGGCCG
1021   GACCTGGAGG TGACCACCA CAGCTTCAAC TGCAGGGCG AGTTCTTCTA CTGCAACACC
1081   AGCGGCCTGT TCAACGGCGC CTACACCCC AACGGCACC AGAGCAACAG CAGCAGCATC
1141   ATCACCATCC CTTGCAGGAT CAAGCAGATC ATCAACATGT GGCAGGAGGT GGGCAGGGCC
1201   ATGTACGCC CTTCCATCAA GGGCAACATC ACCTGCAAGA GCAACATCAC CGGCCTGCTG
1261   CTGTGAGGG ACGCGGCAC CGAGCCCAAC GACACCAGG CTTTACGGC CCGCGCCG
1321   GACATGAGGA ACAAAGTGGAG GAGCGAGCTG TACAAGTACA AGGTGGTGGG GATCAAGCCC
1381   CTGGCGTGG CCCCACCAC CACCAAGAGG AGGGTGGTGG AGAGGAGAA GAGGGCCGTG
1441   GGCATCGGCG CCGTGTTCCT GGGCTTCTG GCGTGGCCG GCAGCACCAT GGGCGCCGCC
1501   AGCATCACCC TGACCGTGA GGCAGGCAG CTGCTGAGC GCATCGTGA CAGCAGAGC
1561   AACCTGCTGA GGGCCATCGA GGCCAGCAG CACCTGCTGC AGCTGACCGT GTGGGGCATC
1621   AAGCAGCTGC AGACCAGGT GCTGGCCATC GAGAGGTACC TGAAGGACCA GCAGCTGCTG
1681   GGCATCTGGG GCTGCAGCG CAAGCTGATC TGCACCACCG CCGTGCCTG GAACAGCAGC
1741   TGGAGCAACA AGAGCCAGAA GGAGTCTGG GACAACATGA CCTGGATGCA GTGGGACAAG
1801   GAGATCAGCA ACTACACCA CACCGTGTAC AGGCTGCTGG AGGAGAGCCA GAACAGCAGC
1861   GAGAGGAACC AGAAG

```

Kodonoptimierte murine C3d-Sequenz:

```

1      ATGCTGGACG GCGAGAGGCT GAAGCACCTG ATCGTGACCC CTGCCGGCTG CGGCGAGCAG
61     AACATGATCG GCATGACCCC CACCGTGATC GCCGTGCACT ACCTGGACCA GACCGAGCAG
121    TGGGAGAAGT TCGGCATCGA GAAGAGGCAG GAGGCCCTGG AGCTGATCAA GAAGGGCTAC
181    ACACAGCAGC TGGCCTTCAA GCAGCCCAGC AGCGCCTACG CCGCCTTCAA CAACAGGCCC
241    CCCAGCACCT GGCTGACCGC CTACGTGGTG AAGGTGTTC AAGCTGGCCG CAACCTGATC
301    GCCATCGACA GCCACGTGCT GTGCGGGCGT GTGAAGTGGC TGATCCTGGA GAAGCAGAAA
361    CCCGACGGCG TGTCCAAGA GGACGGGCC GTGATCCACC AGGAGATGAT CGGCGGTTTC
421    AGGAACGCCA AGGAAGCCGA CGTGAGCCTG ACAGCCTTCG TGCTGATCGC CCTGCAGGAG
481    GCCAGGGACA TCTGCGAGGG CCAGGTGAAC AGCCTGCCCG GCAGCATCAA CAAGGCCGGC
541    GAGTACATCG AGGCCAGCTA CATGAACCTG CAGAGGCCCT ACACCGTGGC CATCGCCGGC
601    TACGCCCTGG CCTGATGAA CAAGCTGGAG GAGCCCTACC TGGGCAAGTT CCTGAACACC
661    GCCAAGGACA GAAACAGATG GGAGGAGCCT GACCAGCAGC TGTAACAACGT GGAGGCCACC
721    TCCTACGCCC TGTGGCTCT GCTGCTGCTG AAGGACTTCG ACAGCGTGCC CCCCCTGGTG
781    CGGTGGCTGA ACGAGCAGAG GTACTACGGC GGAGGATACG GCAGCACCCA GGCCACCTTC
841    ATGGTGTTC AGGCCCTGGC CCAGTACCAG ACCGACGTGC CTGGCTCTGG CGGCGGAGGA
901    TCTGGCGGCG GAGGAAGCGG AAGCGGGCCC

```

Synthetische Signalsequenz CD5:

```

1      ATGGACAGGG CCAAGCTGCT GCTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGCTGCCCA GGCCAGGCC

```

Kodonoptimierte Sequenz der Transmembrandomäne von HIV-1 Env (TM<sub>HIV</sub>):

```

1      TGGAAGAACC TGTGGAGCTG GTTCGACATC ACCAACTGGC TGTGGTACAT CAAGATCTTC
61     ATCATCATCG TGGCGGGCCT GATCGGCCTG AGGATCATCT TCGCCGTGCT GAGCATCGTG
121    AACAGGGTGA GGCAGGGCTA CTGA

```

Kodonoptimierte Sequenz der Transmembrandomäne von gp64 (TM<sub>gp64</sub>):

```

1      ACCAGCTTCA TGTTCGGCCA CGTGGTGAAC TTCGTGATCA TCCTGATCGT GATCCTGTTC
61     CTGTACTGCA TGATCCGGAA CCGGTGA

```

Linkersequenz 1 zwischen Env gp120/ gp140 und hC3d:

```

1      GGAAGCGGCG GAGGGGGGTC TGGGGGGGGA GGCAGCGGCA GT

```

Linkersequenz 2 zwischen Env gp120, Env gp140, hC3d, mC3d und den Transmembrandomänen:

```

1      GGGTCTGGCG GAGGCGGGTC CGGGGGAGGC GGATCT

```

## Aminosäuresequenzvergleich

### Aminosäuresequenzvergleich von humanem und murinem C3d:

Übereinstimmende Aminosäuren wurden mit einem Strich gekennzeichnet (-), bei Aminosäureaustauschen wurde die jeweilige Aminosäure als Kleinbuchstabe dargestellt. Fehlende Aminosäuren sind als Punkt (.) gezeigt. Die murine C3d-Sequenz entspricht denjenigen von (Dempsey *et al.*, 1996; Tong *et al.*, 2006) die humane C3d-Sequenz derjenigen von (Szakonyi *et al.*, 2001). Die C3d-Sequenz von Kaninchen wurde aus (Kusano *et al.*, 1986) entnommen. Die Bindestellen an humanes und murines CD21 sind rot hinterlegt (Hannan *et al.*, 2005; Szakonyi *et al.*, 2001). Fett dargestellte Aminosäuren sind an der Formation einer elektronegativen Grube beteiligt (Hannan *et al.*, 2005; Szakonyi *et al.*, 2001).

Humanes_C3d	MLDAERLKHLIVTPSGAGEQNMIGMPTPTVIAVHYLDETEQ	40
Murines_C3d	---g-----a-c-----q---	40
Kaninchen_C3d	ai-g-----g--c-----a--h-----h---	40
Humanes_C3d	WEKFGLEKRQGALELIKKGYTQQLAFRQPS <sup>S</sup> SAFAAFVKRA	80
Murines_C3d	----i---e-----k---y---nn-p	80
Kaninchen_C3d	-d--s-----e-----k--n--y---ln--	80
Humanes_C3d	PSTWLTAYVVKVFLAVNLIAIDSQVLCGAVKWL <sup>L</sup> <sup>L</sup> <sup>E</sup> <sup>K</sup> <sup>K</sup>	120
Murines_C3d	-----a-----h-----	120
Kaninchen_C3d	-----m-----	120
Humanes_C3d	PDGVFQ <sup>E</sup> DAPVIHQEMIGGLRNNNEKDMALTAFVLISLQE	160
Murines_C3d	-----g-----f--ak-a-vs-----a---	160
Kaninchen_C3d	-----q--sv--er-----a---	160
Humanes_C3d	AKDICEEQV <sup>N</sup> SLPGSIT <sup>N</sup> AGDFLEANYMNLQRSYTVAIAG	200
Murines_C3d	--r---g-----n---eyi---s-----p-----	200
Kaninchen_C3d	-re-----aa--n--sr---a-----p-s-----a	200
Humanes_C3d	YALAQMGRLKGPLLNKFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEAT	240
Murines_C3d	----l-nk-ee-y-g---n---r---e-dq-----	240
Kaninchen_C3d	--w--qdk-r-af-----sk--e-----e--qr-----s	240
Humanes_C3d	SYALLALLQLKDFDFVPPVVRWLNEQRYGGGGYSTQATF	280
Murines_C3d	-----l-----s-----	280
Kaninchen_C3d	-----l-r---s-----	280
Humanes_C3d	MVFQALAQYQKD.....	292
Murines_C3d	-----t-.....	292
Kaninchen_C3d	-g-----t-.....	292

### F.3 Sequenzen eukaryontischer Expressionsplasmide

#### pcDNA3.1(+) 5428bp

(Invitrogen, Cat. no: V79020)

```

1      GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61     CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTGTGTGTGT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121    CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181    TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241    GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301    TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
361    CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421    ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481    ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541    ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTAATTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601    TCGCTATTAC CATGGTGTAT GGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG
661    ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721    AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
781    GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841    CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901    GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATCTGTC
961    AGATATCCAG CACAGTGGCG GCCGCTCGAG TCTAGAGGGC CCGTTTAAAC CCGCTGATCA
1021   GCCTCGACTG TGCTTCTTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC
1081   TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTCT CTTTCCCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG
1141   CATGTCTGTA GTAGGTGTC TTTATTCTG GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG
1201   GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG
1261   GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG TATCCCACAG CGCCCTGTAG CGGCGCATT
1321   ACCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCCTCA CACTTGCCAG CGCCCTAGCG
1381   GCGCTCCTT TCGTTTTCTT CCCTTCCCTT CTCGCCACGT TCGCCGGCTT TCCCCTGCAA
1441   GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG CTTTACGGCA CCTCGACCCC
1501   AAAAACTTGA ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT
1561   CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTTCCT AACCTGGAACA
1621   ACACCTCAAC CTATCTCGGT CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGCC GATTTGCGCC
1681   TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA AAATTTAACG CGAATTAATT CTGTGGAATG
1741   TGTGTCAGTT AGGTGTGGA AAGTCCCAG GCTCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAGCA
1801   TGATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA
1861   GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT CCCGCCCTCA ACTCGCCGCA
1921   TCCCGCCCTT AACTCCGCCC AGTTCGCCCC ATTCTCCGCC CCATGGCTGA CTAATTTTTT
1981   TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCCTCT CCTCTGAGCT ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG
2041   GCTTTTTTGG AGCCCTAGGC TTTTGCAAAA AGCTCCCGGG AGCTTGATATA TCCATTTTTG
2101   GATCTGATCA AGAGACAGGA TGAGGATCGT TTCGCATGAT TGAACAAGAT GGATGACAG
2161   CAGGTTCTCC GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCCGCTA TACTGGGCA CAACAGACAA
2221   TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCCGGC TGTCAGCGCA GGGGCGCCCG GTTCTTTTTG
2281   TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAGGA CGAGGCAGCG CGGCTATCTG
2341   GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CCTTGCAGC CTGTGCTCGA CGTTGTACTG GAAGCGGGAA
2401   AACTGTTGCT GCTATTGGGC GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCTACT CACTTGTCTC
2461   CTGCCGAGAA AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTTGATCCGG
2521   CTACCTGCCA ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT ACTCGGATGG
2581   AAGCCGGTCT TGTGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG
2641   AACTGTTGCT CAGGCTCAAG GCGCGCATGC CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG
2701   GCGATGCCCT CTTGCCGAAT ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTTCTGGA TTCATCGACT
2761   GTGGCCGGCT GGGTGTGGCG GACCCGTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG
2821   CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGCTGACC GCTTCTCTGT GCTTTACGTT ATCGCCGCTC
2881   CCGATTCGCA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA GTTCTTCTGA GCGGGACTCT
2941   GGGGTTGCAA ATGACCGACC AAGCGACGCC CAACCTGCCA TCACGAGATT TCGATTCCAC
3001   CGCCGCTTTC TATGAAAGGT TGGGCTTCGG AATCGTTTTT CCGGACGCCC GCTGGATGAT
3061   CCTCCAGCGC GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTCCGCCAC CCCAACTTGT TTATTGACG
3121   TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAAATTT CACAAAATAAG CATTTTTTTT
3181   ACTGCATCTT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA TCTTATCATG TCTGTATACC
3241   GTCGACCTCT AGCTAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCCTG TGTGAAATTG
3301   TTATCCGCTC ACAATCCAC ACAACATACG AGCCGGAAGC ATAAAGTGTG AAGCCTGGGG
3361   TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCGTTGCGC TCACTGCCCC CTTTCCAGTC
3421   GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT
3481   GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCTGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCCGGT
3541   GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA
3601   TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAAG CCAGCAAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC
3661   CGCGTTGCTG GCGTTTTTTC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG
3721   CCAAGTCAG AAGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACGAGGCGT TTCCCCTGG

```

3781	AAGCTCCCTC	GTGCGCTCTC	CTGTTCCGAC	CCTGCCGCTT	ACCGGATACC	TGTCGCCCTT
3841	TCTCCCTTCG	GGAAGCGTGG	CGCTTCTCA	TAGCTCACGC	TGTAGGTATC	TCAGTTCGGT
3901	GTAGGTCGTT	CGCTCCAAGC	TGGGCTGTGT	GCACGAACCC	CCCGTTCAGC	CCGACCGCTG
3961	CGCCTTATCC	GGTAACTATC	GTCTTGAGTC	CAACCCGGTA	AGACACGACT	TATCGCCACT
4021	GGCAGCAGCC	ACTGGTAACA	GGATTAGCAG	AGCGAGGTAT	GTAGGCGGGT	CTACAGAGTT
4081	CTTGAAGTGG	TGGCCTAACT	ACGGCTACAC	TAGAAGAACA	GTATTTGGTA	TCTGCGCTCT
4141	GCTGAAGCCA	GTACCTTCG	GAAAAAGAGT	TGGTAGCTCT	TGATCCGGCA	AACAAACCAC
4201	CGCTGGTAGC	GGTTTTTTTG	TTTGCAAGCA	GCAGATTACG	CGCAGAAAAA	AAGGATCTCA
4261	AGAAGATCCT	TTGATCTTTT	CTACGGGGTC	TGACGCTCAG	TGGAACGAAA	ACTCACGTTA
4321	AGGGATTTTG	GTCATGAGAT	TATCAAAAAA	GATCTTCACC	TAGATCCTTT	TAAATTAATA
4381	ATGAAGTTT	AAATCAATCT	AAAGTATATA	TGAGTAAACT	TGGTCTGACA	GTTACCAATG
4441	CTTAATCAGT	GAGGCACCTA	TCTCAGCGAT	CTGTCTATTT	CGTTCATCCA	TAGTTGCCCTG
4501	ACTCCCCGTC	GTGTAGATAA	CTACGATACG	GGAGGGCTTA	CCATCTGGCC	CCAGTGCTGC
4561	AATGATACCG	CGAGACCCAC	GCTCACCGGC	TCCAGATTTA	TCAGCAATAA	ACCAGCCAGC
4621	CGGAAGGGCC	GAGCGCAGAA	GTGGTCTGTC	AACTTTATCC	GCCTCCATCC	AGTCTATTAA
4681	TTGTTGCCGG	GAAGCTAGAG	TAAGTAGTTC	GCCAGTTAAT	AGTTTGCSCA	ACGTTGTTGC
4741	CATTGCTACA	GGCATCGTGG	TGTCACGCTC	GTCGTTTGGT	ATGGCTTCAT	TCAGTCCCGG
4801	TTCCCAACGA	TCAAGGCGAG	TTACATGATC	CCCCATGTTG	TGCAAAAAAG	CGGTTAGTCT
4861	CTTCGGTCTT	CCGATCGTGG	TCAGAAGTAA	GTGGCCGCA	GTGTTATCAC	CTCATGTTAT
4921	GGCAGCACTG	CATAATTCTC	TTACTGTTCAT	GCCATCCGTA	AGATGCTTTT	CTGTGACTGG
4981	TGAGTACTCA	ACCAAGTCAT	TCTGAGAATA	GTGTATGCGG	CGACCGAGTT	GCTCTTGCCC
5041	GGCGTCAATA	CGGGATAATA	CCGCGCCACA	TAGCAGAACT	TAAAAAGTGC	TCATCATTTG
5101	AAAACGTTCT	TCGGGGCGAA	AACTCTCAAG	GATCTTACCG	CTGTTGAGAT	CTCATTCGAT
5161	GTAACCCACT	CGTGCACCCA	ACTGATCTTC	AGCATCTTTT	ACTTTTACCA	GCGTTTCTGG
5221	GTGAGCAAAA	ACAGGAAGGC	AAAATGCCGC	AAAAAAGGGA	ATAAGGGCGA	CACGGAAATG
5281	TTGAATACTC	ATACTCTTCC	TTTTTCAATA	TTATTGAAGC	ATTTATCAGG	GTTATTGTCT
5341	CATGAGCGGA	TACATATTTG	AATGTATTTA	GAAAAATAAA	CAAATAGGGG	TTCCGCGCAC
5401	ATTTCCCCGA	AAAGTGCCAC	CTGACGTC			

**pcDNA3.1luc 6286bp**

(Geneart AG)

1	GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTGCACCTC	CAGTACAATC	TGCTCTGATG
61	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG
121	CGAGCAAAAT	TTAAGCTACA	ACAAGGCAAG	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC
181	TTAGGGTTAG	CGGTTTTGCG	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT
241	GATTATTGAC	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTTCAT	AGCCCATATA
301	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC
361	CCGCCCCATT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	AACGCCAATA	GGGACTTTCC
421	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT
481	ATCATATGCC	AAGTACGCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	CCCTGGCATT
541	ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGCCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA
601	TCGTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG
661	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC
721	AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAACCTCCG	CCCATTGACG	AGCCATGGCG
781	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA
841	CTGTTACTG	GCTTATCGAA	ATTAATACGA	CTCACATATG	GGAGACCCAA	GCTGGCTAGC
901	GTTTAAACTT	AAGCTTG GTA	CCGAGCTCGG	ATCCACTAGT	CCAGTGTGGT	GGAATTTCTG
961	AGATATCCAG	CACAGTGGCG	GCCGCTCGAG	TCTAGAGGGC	CCGTTTAAAC	CCGCTGATCA
1021	GCCTCGACTG	TGCCCTTAG	TTGCCAGCCA	TCTGTTGTTT	GCCCCTCCCC	CGTGCCTTCC
1081	TTGACCCTGG	AAGGTGCCAC	TCCCACGTGC	CTTTCCTAAT	AAAATGAGGA	AATTGCATCG
1141	CATTGTCTGA	GTAGGTGTCA	TTCTATTTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGGA	CAGCAAGGGG
1201	GAGGATTGGG	AAGACAATAG	CAGGCATGCT	GGGGATGCGG	TGGGCTCTAT	GGCTTCTGAG
1261	GCGGAAAGAA	CCAGCTGGGG	CTCTAGGGGG	TATCCCCACG	CGCCCTGTAG	CGGCGCATTA
1321	AGCGCGGCGG	GTGTGGTGGT	TACGCGCAGC	GTGACCCTCA	CACTTGCCAG	CGCCCTAGCG
1381	CCCGCTCCTT	TCGCTTTCTT	CCCTTCCTTT	CTCGCCACGT	TCGCCGGCTT	TCCCCTCAA
1441	GCTTAAATC	GGGGCTCCC	TTTAGGGTTC	CGATTTAGTG	CTTTACGGCA	CCCTGACCCC
1501	AAAAAACTTG	ATTAGGGTGA	TGGTTCACGT	AGTGGGCCAT	CGCCCTGATA	GACGGTTTTT
1561	CGCCCTTTGA	CGTTGGAGTC	CACGTTCTTT	AATAGTGGAC	TCTTGTTCCTA	AACTGGAACA
1621	AACTCAACC	CTATCTCGGT	CTATTCTTTT	GATTTATAAG	GGATTTTGCC	GATTTCCGGC
1681	TATTGGTTAA	AAAATGAGCT	GATTTAACAA	AAATTTAACG	CGAATTAATT	CTGTGGAATG
1741	TGTGTCAAGT	AGGGTGTGGA	AAGTCCCACG	GCTCCCACG	AGGCAGAAAT	ATGCAAGACA
1801	TGCATCTCAA	TTAGTCAGCA	ACCAGGTGTG	GAAAGTCCCC	AGGCTCCCCA	GCAGGCAGAA
1861	GTATGCAAAG	CATGCATCTC	AATTAGTCAG	CAACCATAGT	CCCGCCCTTA	ACTCCGCCCA
1921	TCCCGCCCTT	AACTCCGCC	AGTTCGCCCC	ATTCTCCGCC	CCATGGCTGA	CTAATTTTTT
1981	TTATTTATGC	AGAGGCCGAG	GCCGCCCTGT	CCTCTGAGCT	ATTCCAGAAG	TAGTGAGGAG
2041	GCTTTTTTGG	AGGCCTAGGC	TTTTGCAAAA	AGCTCCCGGG	AGCTTGTATA	TCCATTTTCG
2101	GATCTGATCA	AGAGACAGGA	TGAGGATCGT	TTTCGATGGA	AGACGCCAAA	AACATAAAGA
2161	AAGGCCCGGC	GCCATCTAT	CCTCTAGAGG	ATGGAACCGC	TGGAGAGCAA	CTGCATAAGG
2221	CTATGAAGAG	ATACGCCCTG	GTTCCTGGAA	CAATTGCTTT	TACAGATGCA	CATATCGGAG

2281	TGAACATCAC	GTACGCGGAA	TACTTCGAAA	TGTCCGTTTCG	GTTGGCAGAA	GCTATGAAAC
2341	GATATGGGCT	GAATACAAAT	CACAGAAATCG	TCGTATGCAG	TGAAAACCTCT	CTTCAATCTT
2401	TTATGCCCGT	GTGGGCGCG	TTATTTATCG	GAGTTGCAGT	TGCGCCCGCG	AACGACATTT
2461	ATAATGAACG	TGAATTGCTC	AACAGTATGA	ACATTTTCGCA	GCCTACCCTGA	GTGTTTGTTT
2521	CCAAAAAGGG	GTGCAAAAA	ATTTTGAACG	TGCAAAAAAA	ATTACCAATA	ATCCAGAAAA
2581	TTATTATCAT	GGATTCTAAA	ACGGATTACC	AGGGATTTC	GTCGATGTAC	ACGTTTCGTCA
2641	CATCTCATCT	ACCTCCCGGT	TTAATGAAT	ACGATTTTGT	ACCAGAGTCC	TTTGATCGTG
2701	ACAAAACAAT	TGCACTGATA	ATGAATTCCT	CTGGATCTAC	TGGGTTACCT	AAGGGTGTGG
2761	CCCTTCCGCA	TAGAACTGCC	TGCGTCAGAT	TCTCGCATGC	CAGAGATCCT	ATTTTTGGCA
2821	ATCAAAATCAT	TCCGGATACT	GCGATTTTAA	GTGTTGTTCC	ATTCCATCAC	GGTTTTGGAA
2881	ACGTAATAC	ACTCGGATAT	TTGATATGTG	GATTTTCGAGT	CGTCTTAATG	TATAGATTTG
2941	AAGAAGAGCT	GTTTTTACGA	TCCCTTCAGG	ATTACAAAAT	TCAAAGTGCG	TTGCTAGTAC
3001	CAACCCATAT	TTCAATCTTC	GCCAAAAGCA	CTCTGATTGA	CAAATACGAT	TTATCTAATT
3061	TACACGAAAT	TGCTTCTGGG	GGCGCACCTC	TTTCGAAAAGA	AGTCGGGGAA	CGCGTTGCAA
3121	AACGCTTCCA	TCTTCCAGG	ATACACAAG	GATATGGCT	CACTGAGACT	ACATCAGATA
3181	TTCTGATTAC	ACCCGAGGGG	GATGATAAAC	CGGGCGCGGT	CGGTAAGGTT	GTTCCATTTT
3241	TTGAAGCGAA	GGTTGTGGAT	CTGGATACCG	GGAAAACGCT	GGGCGTTAAT	CAGAGAGGCG
3301	AATTATGTGT	CAGAGGACCT	ATGATTATGT	CCGGTTATGT	AAACAATCCG	GAAGCGACCA
3361	ACGCCTTGAT	TGACAAGGAT	GGATGGCTAC	ATTCTGGAGA	CATAGCTTAC	TGGGACGAAG
3421	ACGAACACTT	CTTCATAGTT	GACCGCTTGA	AGTCTTTAAT	TAAATACAAA	GGATATCAGG
3481	TGGCCCCCG	TGAATTGGAA	TGATATATGT	TACAACACCC	CAACATCTTC	GACGCGGGCG
3541	TGGCAGGCT	TCCCGACGAT	GACGCGGGTG	AACTTCCCGC	CGCCGTTGTT	GTTTTGGAGC
3601	TCGGAAAAG	GATGACGGAA	AAAGAGATCG	TGGATTACGT	CGCCAGTCAA	TGTAACAACCC
3661	CGAAAAAGTT	GCGCGGAGGA	GTTGTGTTTG	TGGACGAAGT	ACCGAAAAGT	CTTACC GGAA
3721	AACTCGACGC	AAGAAAAATC	AGAGAGATCC	TCATAAAGGC	CAAGAAGGGC	GGAAAGTCCA
3781	AATTGTAAGC	GGGACTCTGG	GGTTCGAAAT	GACCGACCAA	GCGACGCCCA	ACCTGCCATC
3841	ACGAGATTTC	GATTCACCCG	CCGCCTTCTA	TGAAAAGGTTG	GGCTTCGGAA	TCGTTTTCCG
3901	GGACGCCGGC	TGGATGATCC	TCCAGCGCGG	GGATCTCATG	CTGGAGTTCT	TCGCCACCCC
3961	CAACTTGTTT	ATGTCAGCTT	ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	CAAAATTCAC
4021	AAATAAAGCA	TTTTTTTTCAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	TCCAAACTCA	TCAATGTATC
4081	TTATCATGTC	TGTATACCGT	CGACCTCTAG	CTAGAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT
4141	GTTTCTGTG	TGAAAATTGTT	ATCCGCTCAC	AATTCCACAC	AACATACGAG	CCGGAAGCAT
4201	AAAGTGTA	GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGCTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC
4261	ACTGCCCGCT	TTCCAGTCCG	GAAACCTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG
4321	CGGGGGGAGA	GGCGGTTTGC	GTATTGGGCG	CTCTTCCGCT	TCCTCGTCA	GCTCATAGCT
4381	GCGCTCGGTC	GTTCGGCTGC	GGCGAGCGGT	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATACGGTT
4441	ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	ACGCAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAAGGCC	AGCAAAGGCC
4501	CAGGAACCGT	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCCGCC	CCCCTGACGA
4561	GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAC	TATAAAGATA
4621	CCAGGCGTTT	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	GTTCCGACCC	TGCCCGTTAC
4681	CGGATACCTG	TCCGCTTTC	TCCCTTCGGG	AAGCGTGGCG	CTTTCTCATA	GCTCAGCTG
4741	TAGGTATCTC	AGTTCCGGTGT	AGGTCGTTFC	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAAACCCC
4801	CGTTCAGCCC	GACCGCTCGC	CCTTATCCCG	TAAGTATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG
4861	ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT
4921	AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	GGCTACACTA	GAAGAACAGT
4981	ATTTGGTATC	TGCGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCGGA	AAAAGAGTTG	GTAGCTCTTG
5041	ATCCGGCAAA	CAAACCACCG	CTGGTAGCGG	TTTTTTTGTG	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG
5101	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	AAGATCCCTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG
5161	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTACCTA
5221	GATCCTTTTA	AATTAATAAT	GAAGTTTFAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG
5281	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTCC
5341	TTCATCCATA	GTGCTTGC	TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC
5401	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC
5461	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC
5521	CTCCATCCAG	TCTATTAAT	GTTGCCGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCG	CAGTTAATAG
5581	TTTGGCGAAC	GTTGTTGCCA	TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTTGGTAT
5641	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG
5701	CAAAAAAGCG	GTAGCTCCT	TCGGTCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGAGT
5761	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	CAGCACTGCA	TAATTTCTTT	ACTGTTCATG	CATCCGTAAG
5821	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGCGG
5881	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCGG	CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT
5941	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT
6001	GTTGAGATCC	AGTTTCGATGT	AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTTTTAC
6061	TTTACCAGC	GTTTCTGGGT	GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT
6121	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	GAATACTCAT	ACTCTTCTCT	TTTCAATATT	ATTGAAGCAT
6181	TTATCAGGGT	TATGTCTCA	TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTAGA	AAAATAAACA
6241	AATAGGGGTT	CCGCGCACAT	TTCCCGGAAA	AGTGCCACCT	GACGTC	

Das anstelle des Neomycingens eingefügte Luciferasegen ist grau unterlegt.

**pDisplay 5325bp**

(Invitrogen, Cat. no: V66020)

```

1      GCGCGCGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG
61     TTCATAGCCC ATATATGGAG TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT
121    GACCGCCCAA CGACCCCGCG CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
181    CAATAGGGAC TTCCATTGA CGTCAATGGG TGGACTATTT ACGGTAAACT GCCCACTTGG
241    CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT TGACGTCAAT GACGGTAAAT
301    GGCCTGCTG GCATTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA CTTTCTACT TGGCAGTACA
361    TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC
421    GTGGATAGCG GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTTCAATGGGA
481    GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC TCCGCCCAT
541    TGACGCAAAAT GGGCGGTAGG CGTGACGGT GGGAGGTCTA TATAAGCAGA GCTCTCTGGC
601    TAACTAGAGA ACCCACTGCT TACTGGCTTA TCGAAATTA TACGACTCAC TATAGGGAGA
661    CCAAGCTTGC GTACCGAGCT CGGATCCACT AGTAAACGGC GCCAGTGTGC TCGCAATTCG
721    CTTGGGGATA TCCACCATGG AGACAGACAC ACTCCTGCTA TGGGTACTGC TGCTCTGGGT
781    TCCAGGTTCC ACTGGTGAAT ATCCATATGA TGTTCCAGAT TATGCTGGGG CCCAGCCGGC
841    CAGATCTCCC GGGATCCGCG GCTGCAGGTC GACGAACAAA AACTCATCTC AGAAGAGGAT
901    TCGAATGCTG TGGCCAGGA CACGACAGGAG GTCATCGTGG TGCCCACTC GGCCTTTTTC
961    AAGGTGGTGG TGATCTCAGC CATCCTGGCC CTGGTGGTGC TCACCATCAT CTCCCTTATC
1021   ATCCTCATCA TGCTTTGGCA GAAGAAGCCA CGTTAGGCGG CCGCTCGAGA TCAGCTCGA
1081   CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG TTTGCCCTC CCCCGTGCCT TCCTTGACCC
1141   TGAAGGTTGC CACTCCCCT GTCCCTTCTT AATAAAATGA GGAAATGCA TCGCATTTGC
1201   TGAGTAGGTG TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG GGGGAGGATT
1261   GGAAGACAAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CGGTGGGCTC TATGGCTTCT GAGGCGGAAA
1321   GAACCAAGTG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG
1381   TGAGCAAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAGG CCGCGTGTCT GGCCTTTTTC
1441   CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA
1501   AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCTG GAAGTCCCTC CGTGCCTCTC
1561   CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCCGATAC CTGTCCGCTT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG
1621   GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGTCTGT TCGCTCCAAG
1681   CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCCGTTTCC CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT
1741   CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC
1801   AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC
1861   TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGTTG ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC
1921   GGA AAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT
1981   TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
2041   TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAA CAAAATCTAC GTTAAGGGAT TTTGGTCTAG
2101   AGAATATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAAATGAA TTTTAAATCA
2161   ATCTAAAGTA TATATGAGTA ACCTGAGGCT ATGGCAGGGC CTGCCGCCCC GACGTTGGCT
2221   GCGAGCCCTG GCCTTCCACC CGAACTTGGG GGGTGGGGTG GGGAAAAGGA AGAAACCGCG
2281   GCGTATTGGC CCCAATGGGG TCTCGGTGGG GTATCGACAG AGTGCCAGCC CTGGGACCGA
2341   ACCCGCGT TATGAACAAA CGACCCAACA CCGTGCCTTT TATTTGTCT TTTTATTGCC
2401   GTCATAGCGC GGGTTCTTTC CGGTATTGTC TCCTTCCGTG TTTTCAAGTT CCTCCCTTA
2461   GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGCGCTCC
2521   CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAAATC GAAATCTCGT
2581   GATGGCAGGT TGGCGTTCG TTGGTTCGGT ATTTGCAACC CCAGATFCCC CTGACAGAAG
2641   ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATG GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA
2701   GCACGAGGAA GCGGTACGCC CATTGCGCCG CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA
2761   ACCTATATGC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGGC ACAGTTCGATG AATCCAGAAA
2821   AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTCGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTG ACCAGGAGAT
2881   CCTCGCCGTC GGGCATGCTC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC GCGAGCCCT
2941   GATGCTCTTG ATCATCTGTA TCGACAAGAC CGGCTTCCAT CCGAGTACGT GCTCGCTCGA
3001   TCGGATGTTT CGCTTGGTGG TCGAATGGGC AGGTAGCCGG ATCAAGCGTA TGCAGCCGCT
3061   GCATTGCAAT AGCCATGATG GATACTTTCT CGGCAGGAGC AAGGTGAGAT GAGTAGGAGT
3121   CCTGCCCCGG CACTTCGCCC AATAGCAGCC AGTCCCTTCC CGCTTCAAGT ACAACGTCGA
3181   GCACAGCTGC GCAAGGAACG CCGTCTGTTG CCAGCCACGA TAGCCGCGCT GCCTCGTCTT
3241   GCAGTTCATT CAGGGCACCG GACAGGTTCG TCTTGACAAA AAGAACCAGG CAGCCCTGCG
3301   CTGACAGCCG GAACACGGCG GCATCAGAGC AGCCGATGTT CTGTTGTGCC CTGCTATAGC
3361   CGAATAGCCT CTCCACCCAA GCGGCCGGAG AACCTGCGTG CAATCCATCT TGTTCATCA
3421   TGGAAACGA TCCTCATCCT GTCTCTTGAT CGATCTTTGC AAAAGCCTAG GCCTCCAAA
3481   AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGTCA GAGGCCGAGG AGGCGGCTC GGCCTCTGCA
3541   TAAATAAAAA AAATTAGTCA GCCATGGGCG GGAGAATGGG CGGAACCTGG CCGAGTTAGG
3601   GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT
3661   TGCATACTTC TGCTTGCTGG GGAGCCTGGG GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG
3721   AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCTAAC
3781   TGACACACAT TCCACAGCTG GTCTTTCCG CCTCAGGACT CTTCTTTTTC CAATAAATCA
3841   ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAA CTGACGAGCA
3901   CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCTGTGAG
3961   ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
4021   CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC
4081   AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCTTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT

```

4141	AGAGTAAGTA	GTCGCCAGT	TAATAGTTG	CGCAACGTTG	TGCCATTGC	TACAGGCATC
4201	GTGGTGTAC	GCTCGTCGT	TGGTATGGT	TCATTAGCT	CCGGTTCCCA	ACGATCAAGG
4261	CGAGTTACAT	GATCCCCCAT	GTGTGCAAAA	AAAGCGGTTA	GCTCCTTCGG	TCCTCCGATC
4321	GTGTGCAGAA	GTAAGTTGGC	CGCAGTGTTA	TCACTCATGG	TTATGGCAGC	ACTGCATAAT
4381	TCTCTTACTG	TCATGCCATC	CGTAAGATGC	TTTTCTGTGA	CTGGTGAGTA	CTCAACCAAG
4441	TCATTCTGAG	AATAGTGTAT	GCGGCGACCG	AGTTGCTCTT	GCCCCGGCTC	AATACGGGAT
4501	AATACCCGCG	CACATAGCAG	AACTTTAAAA	GTGCTCATCA	TTGGAAAACG	TTTTCGGGG
4561	CGAAAACCTCT	CAAGGATCTT	ACCGCTGTTG	AGATCCAGTT	CGATGTAACC	CACTCGTGCA
4621	CCCAACTGAT	CTTCAGCATC	TTTTACTTTC	ACCAGCGTTT	CTGGGTGAGC	AAAAACAGGA
4681	AGGCAAAATG	CCGCAAAAAA	GGGAATAAGG	GCGACACGGA	AATGTTGAAT	ACTCATACTC
4741	TTCCTTTTTC	AATATTATG	AAGCATTAT	CAGGGTTATT	GTCTCATGAG	CGGATACATA
4801	TTTGAATGTA	TTTAGAAAAA	TAAACAAATA	GGGGTTCCGC	GCACATTTCC	CCGAAAAGTG
4861	CCACTGACG	CGCCTGTAG	CGGCGCATTA	AGCGCGCGCG	GTGTGGTGGT	TACGCGCAGC
4921	GTGACCGCTA	CACTTGCCAG	CGCCCTAGCG	CCCCTCCTT	TCGCTTTCTT	CCCTTCCTTT
4981	CTCGCCACGT	TCGCCGGCTT	TCCCCGTCAA	GCTCTAAATC	GGGGGCTCCC	TTTAGGGTTC
5041	CGATTTAGTG	CTTACGGCA	CCTCGACCCC	AAAAAACTTG	ATTAGGGTGA	TGGTTCACGT
5101	AGTGGGCCAT	CGCCTGATA	GACGGTTTTT	CGCCCTTGA	CGTTGGAGTC	CACGTTCTTT
5161	AATAGTGGAC	TCTTGTTC	AACCTGGAACA	ACACTCAACC	CTATCTCGGT	CTATTCTTTT
5221	GATTTATAAG	GGATTTTGCC	GATTTTCGGC	TATTGGTTAA	AAAATGAGCT	GATTTAACAA
5281	AAATTTAACG	CGAATTTTAA	CAAAATATTA	ACGCTTACAA	TTTAC	

**pcDNA5/FRT 5070bp**

(Invitrogen, Cat. no: V6010-20)

1	GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTGCCTCT	CAGTACAATC	TGCTCTGATG
61	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG
121	CGAGCAAAAT	TTAAGCTACA	ACAAGGCAAG	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC
181	TTAGGGTTAG	CGGTTTTGCG	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT
241	GATATTGAC	TAGTTATTA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTTAT	AGCCCATATA
301	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCCGC	TGGCTGACCG	CCCAACGACC
361	CCGCCCCATT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT	AACGCCAATA	GGGACTTTCC
421	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT
481	ATCATATGCC	AAGTACGCC	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCCC	GCCTGGCATT
541	ATGCCCAGTA	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA
601	TCGTATTAC	CATGGTGATG	CGGTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA	TAGCGGTTTG
661	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC
721	AAAATCAACG	GGACTTTCCA	AAATGTCGTA	ACAACCTCCG	CCCATTGACG	AGAAATGGCG
781	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA
841	CTGCTTACTG	GCTTATCGAA	ATTAATACGA	CTCACATATAG	GGAGACCCAA	GCTGGCTAGC
901	GTTTAAACTT	AAGCTTGGTA	CCGAGCTCGG	ATCCACTAGT	CCAGTGTGGT	GGAATTCCTG
961	AGATATCCAG	CACAGTGGCG	GCCGCTCGAG	TCTAGAGGGC	CCGTTTAAAC	CCGCTGATCA
1021	GCCTCGACTG	TGCCTTCTAG	TTGCCAGCCA	TCTGTTGTTT	GCCCCTCCCC	CGTGCCTTCC
1081	TTGACCCTGG	AAGGTGCCAC	TCCCACGTGC	CTTTCCTAAT	AAAATGAGGA	AATTGCATCG
1141	CATTGTCTGA	GTAGGTGTCA	TTCTATTCTG	GGGGGTGGGG	TGGGGCAGGA	CAGCAAGGGG
1201	GAGGATTGGG	AAGACAATAG	CAGGCATGCT	GGGGATGCGG	TGGGCTTATG	GCTTCTGAG
1261	GCGGAAAGAA	CCAGCTGGGG	CTCTAGGGGG	TATCCCCACG	CGCCCTGTAG	CGGCGCATTA
1321	AGCGCGCGCG	GTGTGGTGGT	TACGCGCAGC	GTGACCCTA	CACTTGCCAG	CGCCCTAGCG
1381	CCCGCTCCTT	TCGCTTTCTT	CCCTTCCTTT	CTCGCCACGT	TCGCGGGCTT	TCCCCGTCAA
1441	GCTCTAAATC	GGGGCTCC	TTTAGGGTTC	CGATTTAGTG	CTTTACGGCA	CCTCGACCCC
1501	AAAAAACTTG	ATTAGGGTGA	TGGTTCACGT	ACCTAGAAGT	TCCTATTCCG	AAGTTCCTAT
1561	TCTCTAGAAA	GTATAGGAAC	TTCTTTGGCC	AAAAAGCCTG	AACTCACCGC	GACGTCTGTC
1621	GAGAAGTTTC	TGATCGAAAA	GTTCGACAGC	GTCTCCGACC	TGATGCAGCT	CTCGGAGGGC
1681	GAAGAATCTC	GTGCTTTCAG	CTTCGATGTA	GGAGGGCGTG	GATATGTCCT	GCGGGTAAAT
1741	AGCTGCGCCG	ATGGTTTCTA	CAAAGATCGT	TATGTTTATC	GGCACTTTGC	ATCGGCGCGG
1801	CTCCCGATTC	CGGAAGTGT	TGACATTGGG	GAATTCAGCG	AGAGCCTGAC	CTATTGCATC
1861	TCCCGCCGTG	CACAGGGTGT	CACGTTGCAA	GACCTGCCTG	AAACCGAAT	GCCCGCTGTT
1921	CTGCAGCCGG	TCGCGGAGCG	CATGGATGCG	ATCGCTGCGG	CCGATCTTAC	CCAGACGATG
1981	GGGTTCCGGC	CATTCCGGAC	GCAAGGAATC	GGTCAATACA	CTACATGGCG	TGATTTTATA
2041	TGCGCGATTG	CTGATCCCA	TGTGTATCAC	TGGCAAACCTG	TGATGGACGA	CACCGTCAGT
2101	CGTCCCGTCG	CGCAGGCTCT	CGATGAGCTG	ATGCTTTGGG	CCGAGGACTG	CCCCGAAGTC
2161	CGGCACTTCG	TGCACGCGGA	TTTCGGCTCC	AACAATGTCC	TGACGGACAA	TGGCGCATA
2221	ACAGCGGTCA	TTGACTGGAG	CGAGGCGATG	TTTCGGGGATT	CCCAATACGA	GGTCGCCAAC
2281	ATCTTCTTCT	GGAGGCCGTG	GTTGGCTTGT	ATGGAGCAGC	AGACGCGCTA	CTTCGAGCGG
2341	AGGCATCCGG	AGCTTGCAGG	ATCGCCGCGG	CTCCGGGCGT	ATATGCTCCG	CATTGGTCTT
2401	GACCAACTCT	ATCAGAGCTT	GGTTGACGGC	AATTTTCGATG	ATGCAGCTTG	GGCGCAGGGT
2461	CGATGCGACG	CAATCGTCCG	ATCCGGAGCC	GGGACTGTTCG	GGCGTACACA	AATCGCCCGC
2521	AGAAGCGCGG	CCGTCTGGAC	CGATGGCTGT	GTAGAAGTAC	TCGCCGATAG	TGGAACCCGA
2581	CGCCCCAGCA	CTCGTCCGAG	GGCAAAGGAA	TAGCACGTAC	TACGAGATTT	CGATTTCCACC
2641	GCCGCTTCT	ATGAAAGGTT	GGGCTTCGGA	ATCGTTTTCC	GGGACGCGG	CTGGATGATC
2701	CTCCAGCGCG	GGGATCTCAT	GCTGGAGTTC	TTCCGCCACC	CCAACTTGTT	TATTGCAGCT

```

2761 TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTC ACAAATAAAGC ATTTTTTTTCA
2821 TCGACCTCTA GTTGTGGTFT GTCCAAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGTATACCG
2881 TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GGCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTTTCTGT GTGAAATTGT
2941 TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT
3001 GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG
3061 GGAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG
3121 CGTATTGGGC GCTCTCCGCT TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG
3181 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGGG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
3241 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
3301 GCCTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
3361 TCAAGTCAGA GTGGCGGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCTGGA
3421 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
3481 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCAT AGCTCAGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
3541 TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCC CCGTTCAGCC CGACCCTGC
3601 GCCTTATCCG GTAACATCG TCTTGAGTCC AACCCGTA GACACGACT ATCCGCTGC
3661 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
3721 TTGAAGTGGT GGCTAACTA CGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
3781 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
3841 CCGTGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
3901 CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCACGT
3961 TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTAA
4021 AAATGAAGTT TTAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA
4081 TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC
4141 TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
4201 GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA
4261 GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT GCAACTTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTATT
4321 AATGTGTTGC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTGCG CATAGTTGTT
4381 GCCATTGCTA CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
4441 GGTTCCCAAC GATCAAGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGTTAGC
4501 TCCTTCGGTC CTCGATCGT TGTCAGAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGT
4561 ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
4621 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC
4681 CCGCGTCAA TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAGT GCTCATCATT
4741 GGAAAACGTT CTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG
4801 ATGTAACCCA CTCGTGACC CACTGATCT TCAGCATCTT TFACTTTTAC CAGCGTTTCT
4861 GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
4921 TGTGAAATAC TCATACTCT CTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT
4981 CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
5041 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC

```

**pOG44 5785bp**

(Invitrogen Cat. no: V6005-20)

```

1 CCGCGTCTT TCGGACTTTT GAAAGTGATG GTGGTGGGG AAGGATTCGA ACCTTCGAAG
61 TCGATGACGG CAGATTTAGA GTCTGCTCCC TGCTTGTGTG TTGGAGGTCG CTGAGTAGTG
121 CGCGAGCAA ATTTAAGCTA CAACAAGGCA AGGCTTGACC GACAATTGCA TGAAGAATCT
181 GCTTAGGGTT AGGCGTTTTG CGCTGCTTCG CGATGTACGG GCCAGATATA CGCGTTGACA
241 TTGATTATTG ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCATA
301 TATGGAGTTC CGGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC CGCCCAACGA
361 CCCCCGCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCCATA GTAACGCCA TAGGGACTTT
421 CCATTGACGT CAATGGGTGG AGTATTTACG GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT
481 GTATCATATG CCAAGTACGC CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCTGGCA
541 TTATGCCAG TACATGACCT TATGGGACTT TCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
601 CATCGCTATT ACCATGGTGA TGCGGTTTTG GCAGTACATC AATGGGCGTG GATAGCGGTT
661 TGACTCACGG GGATTTCCAA GTCTCCACCC CATTGACGTC AATGGGAGTT TGTTTTGGCA
721 CCAAAATCAA CGGGACTTTC CAAAATGTG TAACAACCTC GCCCATTTGA CGCAAATGGG
781 CAGTAGGCGT GTACGGTGGG AGGCTATAT AAGCAGAGCT CTCTGGCTAA CTAGAGACGA
841 CACTGCTTAC TGGCTTATCG AAATTAATAC GACTACTAT AGGGAGACCC AAGCTTCTAG
901 AATTCGCTGT CTGCGAGGGC CAGCTGTTGG GGTGAGTACT CCCTCTCAA AGCGGGCATG
961 ACTTCTGCGC TAAGATTGTC AGTTTCCAAA AACGAGGAGG ATTTGATATT CACCTGGCCC
1021 GCGGTGATGC CTTGAGGGT GGCCGCTCC ATCTGGTCAG AAAAGACAAT CTTTTGTTG
1081 TCAAGCTTGA GGTGTGGCAG GCTTGAGATC TGGCCATACA CTTGAGTGAC AATGACATCC
1141 ACTTTGCCTT TCTCTCCACA GGTGTCCACT CCCAGGTCCA ACTGCAGCCC AAGCTTCCAC
1201 CATGCCACAA TTTGATATAT TATGTAAAC ACCACCTAAG GTGCTTGTTC GTCAGTTTGT
1261 GGAAGGTTT GAAAGACTT CAGGTGAGAA AATAGCATA TGTGCTGCTG AACTAACCTA
1321 TTTATGTTGG ATGATTACAC ATAACGGAAC AGCAATCAAG AGAGCCACAT TCATAGCTA
1381 TAATACTATC ATAAGCAATT CGCTGAGTTT GGATATTGTC AACAAAGTCA TGCAGTTTAA
1441 ATACAAGACG CAAAAGCAA CAATTCTGGA AGCCTCATT AAGAAATTGA TTCCTGCTTG
1501 GGAATTTACA ATTATTCCTT ACTATGGACA AAAACATCAA TCTGATATCA CTGATATTGT
1561 AAGTAGTTTG CAATTACAGT TCGAATCATC GGAAGAAGCA GATAAGGGAA ATAGCCACAG

```

1621 TAAAAAATG CTTAAAGCAC TTCTAAGTGA GGGTGAAAGC ATCTGGGAGA TCACTGAGAA  
 1681 AATACTAAAT TCGTTTGAGT ATACTTCGAG ATTTACAAAA ACAAAAATT TATACCAATT  
 1741 CCTCTTCCTA GCTACTTTCA TCAATTGTGG AAGATTCAGC GATATTAAGA ACGTTGATCC  
 1801 GAAATCATTT AAATTAGTCC AAAATAAGTA TCTGGGAGTA ATAATCCAGT GTTTAGTGAC  
 1861 AGAGACAAAG ACAAGCGTTA GTAGGCACAT ATACTTCTTT AGCGCAAGGG GTAGGATCGA  
 1921 TCCACTTGTA TATTTGGATG AATTTTTGAG GAATTCGTAA CCAGTCTAA AACGAGTAAA  
 1981 TAGGACCGGC AATCTTCAA GCAACAAGCA GGAATACCAA TTATTAAGA ATAACTTAGT  
 2041 CAGATCGTAC AACAAAGCTT TGAAGAAAA TGCGCCTTAT TCAATCTTTG CTATAAAAA  
 2101 TGGCCAAAA TCTCACATG GAAGACATTT GATGACCTCA TTTCTTCAA TGAAGGGCCT  
 2161 AACGGAGTTG ACTAATGTTG TGGGAAATTG GAGCGATAAG CGTGTCTCTG CCGTGGCCAG  
 2221 GACAACGTAT ACTCATCAGA TAACAGCAAT ACCTGATCAC TACTTCGCAC TAGTTTCTCG  
 2281 GTACTATGCA TATGATCCAA TATCAAAGGA AATGATAGCA TTGAAGGATG AGACTAATCC  
 2341 AATTGAGGAG TGGCAGCATA TAGAACAGCT AAAGGGTAGT GCTGAAGGAA GCATACGATA  
 2401 CCCCGCATGG AATGGGATAA TATCACAGGA GGTACTAGAC TACCTTTCAT CCTACATAAA  
 2461 TAGACGCATA TAAGTACGCA TTTAAGCATA AACACGCACT ATGCCGTTCT TCTCATGTAT  
 2521 ATATATATAC AGGCAACACG CAGATATAGG TCGACGTGA ACAGTGAGCT GTATGTGCGG  
 2581 GTACCGAGCT CCTCGAGGAT CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG GACAACCAC  
 2641 AACTAGAATG CAGTGA AAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA TTGCTTTAT  
 2701 TGTAACTTAT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TATCCTCGAG GAGCTCATGA CTGCGCTCGT  
 2761 CGGCGTGGGT ATGGTGGCAG GCCCGTGGCC GGGGGACTGT TGGGCGCCAT CTCCTTGCAT  
 2821 GCACCATTCC TTGCGCGCGC GGTGCTCAAC GGCCCTCAAC TACTACTGGG CTGCTTCCCTA  
 2881 ATGCAGGAGT CGCATAAGGG AGAGCGTCTG CCTCGAGGGG GGGCCCGGTA CCCAGCTTTT  
 2941 GTTCCCTTTA GTGAGGGTTA ATFGCGCGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCTCTG  
 3001 TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCAC ACAACATACG AGCCGGGAGC ATAAAGTGTA  
 3061 AAGCCTGGGG TGCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TCGTGTGCGC TCACCTGCCG  
 3121 CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA  
 3181 GAGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTCCG CTTCCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG  
 3241 TCGTTCCGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG TTATCCACAG  
 3301 AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC  
 3361 GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCTGAC GAGCATCACA  
 3421 AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAGA TACCAGCGT  
 3481 TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT ACCGGATACC  
 3541 TGTCCGCTT TCTCTCCGG AAGCGTGGCG CTTTCTCATA GCTCAGCTG TAGGTATCTC  
 3601 AGTTCGGTGT AGGTGCTTCG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCT CGTTCAGCC  
 3661 GACCTGCGC CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCAA CCCGGTAAAG CACGACTTAT  
 3721 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GCGGTGCTA  
 3781 CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CTAACCTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA TTTGTTATCT  
 3841 CGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACTTCGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGAAAACA  
 3901 AACCGCTGGT AGCGGTGGTT TTTTGTGTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAG  
 3961 ATCTCAAGAA GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAAATC  
 4021 ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA  
 4081 TTAATAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAA TATATATGAG TAAACTTGGT CTGACAGTTA  
 4141 CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTCTGT CATCCATAGT  
 4201 TGCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GCTTTACCAT CTGGCCCTAG  
 4261 TGCTGCAATG ATACCGCAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAACCA  
 4321 GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCTTGCAACT TTATCCGCTT CCATCCAGT  
 4381 TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TGCGCAACGT  
 4441 TGTTCCTATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTG ACCTGCTGTC TTTGGTATGG CTTTCTTACG  
 4501 CTCCGTTTCC CAACGATCAA GCGGAGTTAC ATGATCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT  
 4561 TAGTCTCTTC GGTCTCCGA TCGTTGTGAG AAGTAAGTTG GCCGCAAGT TACTACTCAT  
 4621 GGTATGGA GCACTGCATA ATCTCTTAC TGTATGCCA TCCGTAAGAT TCCGTTCTGT  
 4681 GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGCGCAC CGAGTTGCTC  
 4741 TTGCCCGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAATTTAA AAGTGTCTCAT  
 4801 CATTGAAAA CGTTCTTCGG GCGGAAAAC CTCAAGGATC TTACCCTGTG TGAGATCCAG  
 4861 TTCGATGTA CCCACTCGT CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT  
 4921 TTCTGGGTGA GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG  
 4981 GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATT ATCAGGGTTA  
 5041 TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA TAGGGTTTCC  
 5101 GCGCACATTT CCCCAGAAA TGCCACTAAA TTGTAAGCGT TAATATTTG TTAATAATCC  
 5161 CGTTAAATTT TTGTTAAATC AGCTCATTTT TTAACCAATA GCGCGAAATC GCGAAAATCC  
 5221 CTTATAAATC AAAAGAATAG ACCGAGATAG GGTGAGTGT TGTTCAGTT TGGAACAAGA  
 5281 GTCCACTATT AAAGAACGTG GACTCCAACG TCAAAGGGCG AAAAAACGTC TATCAGGGCG  
 5341 ATGGCCACT ACGTGAACCA TCACCCTAAT CAAGTTTTTT GGGTTCGAGG TGCCGTAAG  
 5401 CACTAAATCG GAACCCTAAA GGGAGCCCCC GATTTAGAGC TTAGCGGGGA AAGCCGGCGA  
 5461 ACGTGGCGAG AAAGGAAGGG AAGAAAGCGA AAGGAGCGGG CGCTAGGGCG CTGGCAAGTG  
 5521 TAGCGGTAC GCTGCGGTA ACCACCACAC CCGCCGCGCT TAATGCGCCG CTACAGGGCG  
 5581 CGTCCCATTG GCCATTCAG CTGCGCAACT GTTGGGAAG GCGATCGGTG CCGGCTCTT  
 5641 CGTATTACG CCAAGTGGCG AAAGGGGGAT GTGCTGCAAG GCGATTAAAT TGGGTAACCG  
 5701 CAGGGTTTTT CCAAGTACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGAGCGCGCG TAATACGACT  
 5761 CACTATAGGG CGAATTGGAG CTCCA

# Abkürzungsverzeichnis

---

$\alpha$	Anti-
A	Ampère
aa	<i>amino acid</i> , Aminosäure
acc no	<i>Genbank accession number</i>
ADCC	<i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> ; Antikörpervermittelte Zytotoxizität
AIDS	<i>Acquired immune deficiency syndrome</i> ; Erworbenes Immunschwächesyndrom
AP	alkalische Phosphatase
APC	<i>antigen presenting cells</i> ; Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<b>BCIP</b>	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyolphosphat
BCR	<i>B-cell receptor</i> , B-Zell Rezeptor
BFA	Brefeldin A
BGH	bovine growth hormone
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serume albumine</i> ; Bovines Serumalbumin
BVDV	Bovine Diarrhoe Virus Typ II
bzw.	beziehungsweise
<b>°C</b>	Grad Celsius
ca.	circa
CA	Capsid
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
CaP	Calciumphosphat
Cat.no	Katalognummer
CD	Oberflächenmarker; <i>Cluster of differentiation</i>
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CHO	Chinese hamster ovaries
CII	Kollagen Typ II
cm	Zentimeter
CR	<i>complement receptor</i> , Komplementrezeptor
CsCl	Cäsiumchlorid

---

CSP	Zirkumsporozoitenprotein des Malariaerregers
CTB /-H	Choleratoxin B / Choleratoxin B Holotoxin
CTL	<i>Cytotoxic T-lymphocytes</i> , zytotoxische T-Zellen
<b>d</b>	Desoxy-
Da	Dalton
<i>dam</i> <sup>-</sup>	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> ( <i>dam</i> -Methylase)
DC	dendritische Zelle
<i>dcm</i> <sup>-</sup>	Methylierungsdefekt in <i>E.coli</i> ( <i>dcm</i> -Methylase)
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
DT	Diphtherietoxin B
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ELISPOT	<i>Enzyme Linked Immuno Spot Technique</i>
<i>Env</i>	<i>envelope</i> ; Genabschnitt, der für die viralen Hüllproteine kodiert
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	und andere
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell sorting</i> ; , Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FDC	<i>follicular dendritic cells</i> ; follikuläre dendritische Zellen
FKS	Fötales Kälberserum
FRT	<i>Flp recombination target</i>

fwd	<i>forward</i> , vorwärts
× g	-fache Erdbeschleunigung, g entspricht 9,81 m/s <sup>2</sup>
g	Gramm
Gag	<i>group specific antigen</i> ; Genabschnitt, der für die viralen Strukturproteine kodiert
GC	<i>germinal centers</i> ; Keimzentren
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp	Glykoprotein
<b>h</b>	Stunde oder human
H	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	destilliertes Wasser
HA	Hämagglutinin
HBV	Hepatitis-B-Virus
hC3d	humanes C3d
hCGβ	human chorionic gonadotropin β
hCMV	humanes Cytomegalievirus
HeBs	HEPES <i>buffered saline</i>
HEL	Hen egg lysozyme
HIV	<i>humane immune deficiency virus</i> ; Humanes Immundefizienzvirus
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> ; Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettichperoxidase
<b>i.m.</b>	intramuskulär
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase

lono	Ionomycin
<b>k</b>	kilo ( $10^3$ )
<b>l</b>	Liter
lacZ	$\beta$ -Galaktosidasegen
LB	Luria-Bertani (Medium)
LPS	Lipopolysaccharid, Polysaccharid in der Zellwand gramnegativer Bakterien
LTR	<i>long terminal repeats</i>
luc	Luciferase
<b>m</b>	milli ( $10^{-3}$ ) oder murin
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
M	Molar
MA	Matrix
MAC	<i>membrane attac complex</i> ; Membranangriffskomplex
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i> ; Magnetische Zellsortierung
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i> ; schleimhautassoziierte lymphoide Gewebe
max.	maximal
mC3d	murines C3d
MCS	<i>multiple cloning site</i> ; Multipler Klonierungsbereich
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i> ; Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute(n)
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
MRC	<i>Medical Research Council</i> , UK
mRNA	<i>messenger RNA</i> ; Boten-RNA

<b>n</b>	nano ( $10^{-9}$ )
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NC	Nucleocapsid
Nef	<i>negative factor</i>
NFκB	Nukleärer Faktor κB
NIH	<i>National Institute of Health, USA</i>
NK	Natürliche Killerzelle
nt	Nukleotide
<b>OD</b>	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> ; Offener Leserahmen
OVA	Ovalbumin
<b>PAGE</b>	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	<i>peripher blood mononuclear cells</i> ; periphere mononukleäre Zellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pH	pH-Wert, pondus Hydrogenii, Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
<i>Pol</i>	<i>polymerase</i> ; Genabschnitt, der für die viralen Enzyme kodiert
PPS	Kapselpolysaccharid von <i>Streptococcus pneumoniae</i>
PR	Protease
Prl	Propidiumjodid
<b>RbCl</b>	Rubidiumchlorid
rev	<i>reverse</i> , rückwärts

Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation analysis buffer
RIMMH	Regensburger Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene
RLU	<i>Relative Light Units</i> ; Relative Lichteinheiten
rMVA	rekombinantes Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
RNA	<i>ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>rev responsive element</i>
rSFV	rekombinantes Semliki Forest Virus
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
<b>s</b>	<i>soluble</i> ; löslich
SAC	<i>Staphylococcus aureus cells</i>
SCR	<i>short consensus repeat</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SFC	spot forming cell
SIV	<i>simian immune deficiency virus</i> ; Simianes Immundefizienzvirus
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
ss	einzelsträngig
SV40	<i>simian virus</i> ; Simianes Virus
<b>Taq</b>	DNA-abhängige DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>transactivating response element</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TB	<i>Terrific broth</i> (Medium)
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Trisgepufferte Kochsalzlösung
TD	<i>thymus dependent</i> ; thymusabhängig

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>trans-golgi network</i> ; Transgolginetzwerk
T <sub>H</sub>	T-Helferzelle
TI	<i>thymus independent</i> , thymusunabhängig
tm	transmembran
TM	Transmembrandomäne
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF	Tumornekrosefaktor
tpa	<i>tissue plasminogen activator</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
<b>U</b>	<i>Unit</i> ; Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
usw.	und so weiter
UV	ultraviolett
<b>V</b>	Volt
V3	dritte variable Domäne des äußeren Hüllproteins HIVgp120
Vif	<i>virus infectivity factor</i>
VLP	<i>virus-like particle</i> , Virusähnlicher Partikel
Vpr	<i>viral protein r</i>
Vpu	<i>viral protein u</i>
v/v	<i>volume per volume</i> ; Volumeneinheit pro Volumeneinheit
<b>W</b>	Watt
WHO	<i>world health organisation</i> ; Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> ; Gewichtseinheit pro Volumeneinheit

---

w/w	<i>weight per weight</i> ; Gewichtseinheit pro Gewichtseinheit
<b>X-Gal</b>	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
<b>z.B.</b>	zum Beispiel

**Kurzschreibweisen der Aminosäuren**

Ala	A	Alanin
Arg	R	Arginin
Asn	N	Asparagin
Asp	D	Asparaginsäure
Cys	C	Cystein
Gln	Q	Glutamin
Glu	E	Glutaminsäure
Gly	G	Glycin
His	H	Histidin
Ile	I	Isoleucin
Leu	L	Leucin
Lys	K	Lysin
Met	M	Methionin
Phe	F	Phenylalanin
Pro	P	Prolin
Ser	S	Serin
Thr	T	Threonin
Trp	W	Tryptophan
Tyr	Y	Tyrosin
Val	V	Valin

**Kurzschreibweise der DNA Basen**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

