

*Generierung neuer HIV-1 Impfstoffkandidaten  
zur Induktion breit neutralisierender Antikörper mit  
Cholera Toxin B als Trägerprotein*



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

Vorgelegt von Ruth Kapzan aus Landshut im Jahr 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 26. April 2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Ralf Wagner

---

Ruth Kapzan

Meiner Familie

Zusammenfassung .....	1
<b>A Einleitung</b> .....	2
A.1 Problematik und Stand der HIV Impfstoffentwicklung .....	2
A.1.1 HIV weist eine hohe Diversität und Variabilität auf .....	2
A.1.2 Das HIV-1 Hüllprotein Env ist für den ersten Schritt der Infektion verantwortlich .....	3
A.1.3 Für eine sterile Immunität gegen HIV ist die Induktion breit neutralisierender Antikörper erforderlich .....	4
A.1.3.1 Alle bisher identifizierten breit neutralisierenden Antikörper sind gegen vier Bereiche von Env gerichtet .....	5
A.1.3.2 Passive Immunisierungsstudien bewiesen die Wirksamkeit breit neutralisierender Antikörper .....	6
A.1.3.3 Rationales Antigen-Design könnte die Induktion breit neutralisierender Antikörper vermitteln .....	7
A.1.4 Humorale und zelluläre Immunantworten ergänzen sich bei der Virusbekämpfung .....	8
A.1.5 Virusähnliche Partikel sind eine vielversprechende Komponente der modernen Vakzineentwicklung .....	9
A.1.6 Heterologe <i>Prime-Boost</i> Strategien erhöhen das Potential von Vakzinekandidaten .....	10
A.1.7 Der mukosale Immunantwort wird eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle über HIV-Infektionen zugesprochen .....	11
A.2 Das molekulare Adjuvans Cholera Toxin B (CTB) .....	11
A.2.1 Adjuvantien verstärken die durch ein spezifisches Antigen induzierte Immunantwort .....	11
A.2.2 CTB ist die nicht-toxische Untereinheit des Enterotoxins von <i>Vibrio Cholerae</i> .....	12
A.2.3 CTB ist ein potenter Stimulator der mukosalen Immunantwort und birgt die Möglichkeit gleichzeitig als Antigen-Träger eingesetzt zu werden .....	12
A.3 Zielsetzung .....	13
<b>B Material und Methoden</b> .....	14
B.1 Molekularbiologie .....	14
B.2 Zellbiologie .....	15
B.2.1 Zelllinien und Kultivierung .....	15
B.2.2 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen .....	16
B.2.3 Ernte von HEK293T Zellen und Überständen für analytische Zwecke .....	17
B.2.4 FACS-Analyse .....	17
B.2.5 Produktion virusähnlicher Partikel (VLP) in humanen Zellen .....	18
B.2.6 Produktion von VLPs mit rekombinantem Bakulovirus .....	18
B.2.6.1 Vermehrung von Bakulovirusstocks .....	18
B.2.6.2 Infektion von High Five Zellen zur Produktion von VLPs .....	18
B.2.7. Anreicherung von VLPs über Ultrazentrifugation .....	18
B.3 Proteinbiochemie .....	19
B.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford .....	19
B.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	19
B.3.3 Western-Blot Analyse .....	19

B.3.4 Nachweis von Pr55 <sup>Gag</sup> mittels <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA).....	20
B.3.5 Quantifizierung von Proteinen über SDS-PAGE .....	21
B.3.6 Aufbereitung von VLPs über Zonalzentrifugation im Saccharosegradient.....	21
B.3.7 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure .....	21
B.3.8 Quantifizierung der Beladung von VLPs mit chimärem CTB .....	21
B.3.9 Immunogoldmarkierung und elektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs.....	22
B.3.10 Chemische Quervernetzung chimärerer CTB Proteine auf der VLP-Oberfläche .....	23
B.3.11 Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	23
B.3.12 GM1 ELISA.....	24
B.3.13 CTB ELISA .....	25
B.3.14 Chemische Kopplung von löslichem CTB an VLPs .....	26
B.3.14.1 Kopplung mittels Biotinylierung und Streptavidin .....	26
B.3.14.2 Kopplung mittels Sulfo-NHS.....	26
B.3.15 Test <i>in vivo</i> eingesetzter Proben auf Endotoxin.....	26
B.4 Immunologie .....	26
B.4.1 Haltung und Immunisierung von Versuchstieren .....	26
B.4.2 Auslesen humoraler Immunantworten .....	27
B.4.2.1 Gewinnung von Seren.....	27
B.4.2.2 Gesamtimmunglobulin ELISA .....	27
B.4.2.3 Auslesen neutralisierender Aktivität .....	28
B.4.3 Auslesen mukosaler Immunantworten .....	28
B.4.3.1 Bronchoalveolare Lavage (BAL) .....	28
B.4.3.2 IgA Antikörper ELISA .....	28
B.4.4 Auslesen zellulärer Immunantworten .....	29
B.4.4.1 Generierung primärer Maussplenozyten.....	29
B.4.4.2 Intrazelluläre IFN $\gamma$ Färbung mit FACS Analyse.....	29
<b>C Ergebnisse</b> .....	31
C.1 Konzeption und biochemische Charakterisierung chimärer CTB-Varianten.....	31
C.1.1 Präsentation von chimärem CTB auf der Oberfläche virusähnlicher Partikel mittels Transmembrandomäne .....	31
C.1.1.1 Entwicklung chimärer CTB-Varianten mit Transmembrandomäne .....	31
C.1.1.2 Die konstruierten CTB-Varianten werden exprimiert und auf der Zelloberfläche präsentiert.....	33
C.1.1.3 Das Mimotop der CTB-Varianten ist frei zugänglich und wird durch breit neutralisierende Antikörper gebunden .....	34
C.1.1.4 CTB-Varianten mit CD34-Transmembrandomäne werden effizient in VLPs eingebaut.....	36
C.1.1.5 Auf VLPs befindliches CTB oligomerisiert zu Pentameren.....	39
C.1.1.6 Länge und Sequenz integrierter Mimotope beeinflussen die Konformation von CTB und die Zugänglichkeit des Mimotops .....	41
C.1.2 Chimäres CTB in löslicher Form .....	44

C.1.2.1 Entwicklung chimärer CTB-Varianten in löslicher Form .....	44
C.1.2.2 Produktion der löslichen CTB-Varianten.....	45
C.1.2.3 Lösliches chimäres CTB bindet an GM1 und exponiert sein Mimotop frei zugänglich für breit neutralisierende Antikörper .....	46
C.1.2.4 Produktion der chimären CTB-Varianten in größerem Maßstab für Immunisierungsexperimente .....	47
C.1.3 Präsentation von chimärem CTB auf der Oberfläche virusähnlicher Partikel durch chemische Kopplung .....	48
C.1.4 Relative Quantifizierung der Beladung von VLPs mit CTB .....	49
C.2 Immunogenität chimärer CTB-Varianten.....	50
C.2.1 Adjuvans-Effekt von CTB .....	50
C.2.1.1 Im humanen System produzierte VLPs induzieren ohne Adjuvans keine Gag- spezifische mukosale Immunantwort .....	51
C.2.1.2 Die Präsentation von CTB auf VLPs mittels Transmembrandomäne sowie das Beimischen von CTB induzieren eine Gag-spezifische mukosale Immunantwort.....	53
C.2.1.3 Im bakuloviralen System produzierte VLPs sind aufgrund ihrer Verunreinigung mit Bakuloviren hoch immunogen und eignen sich daher nicht als Messgröße für einen CTB- spezifischen Adjuvans-Effekt.....	54
C.2.1.4 Der Adjuvans-Effekt von löslich beigemischem CTB auf Gag-spezifische Immunantworten bleibt bei Präsentation eines Mimotops erhalten .....	56
C.2.1.5 CTB ist im Stande, humorale und mukosale Immunantworten gegen ein fusioniertes Peptid zu induzieren .....	58
C.2.1.6 Mittels Transmembrandomäne auf VLPs verankertes CTB induziert auch bei Präsentation eines Mimotops Gag-spezifische humorale Immunantworten .....	60
C.2.2 Fokussierung der humoralen Immunantwort auf ein Env Epitop .....	61
C.2.2.1 Eine heterologe <i>Prime-Boost</i> -Immunisierung mit gp41 kodierender DNA und MNCTB <sub>GST</sub> führt zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper mit moderater <i>Clade</i> übergreifender Neutralisationsaktivität .....	62
C.2.2.2 Auch die Verabreichung von VLP/MNCTB-CD34 <sup>TM</sup> induziert nach einer <i>gp41</i> plus <i>gag</i> DNA Grundimmunisierung Mimotop-spezifische HIV-1 Env Antikörper .....	64
C.2.2.3 Die Immunisierung von Kaninchen bestätigt den Vorteil einer heterologen <i>gp41</i> DNA <i>Prime</i> und VLP/MNCTB-CD34 <sup>TM</sup> <i>Boost</i> Kombination.....	67
<b>D Diskussion</b> .....	68
D.1 Konzeption und biochemische Charakterisierung chimärer CTB-Varianten.....	68
D.1.1 Das präsentierte Mimotop enthält die hoch konservierten, linearen Epitope von zwei bekannten breit neutralisierenden Antikörpern.....	68
D.1.2 Das mukosale Adjuvans CTB ist ein ideales Trägerprotein zur Präsentation eines Mimotops .....	68
D.1.3 Durch das <i>Display</i> von chimärem CTB auf virusähnlichen Partikeln wird die native Virussituation nachgeahmt und das zelluläre Immunsystem angesprochen .....	69

D.1.4 Alle konstruierten chimären CTB-Varianten werden exprimiert und können durch eine Transmembrandomäne effizient auf der Zelloberfläche präsentiert werden.....	71
D.1.5 Die Präsentation eines Mimotops mittels CTB erzielt eine verbesserte Zugänglichkeit der Epitope von 2F5 und 4E10.....	72
D.1.6 Chimäre CTB-Varianten mit CD34 Transmembrandomäne werden effizient in VLPs eingebaut und in Form von Pentameren auf deren Oberfläche präsentiert.....	72
D.1.7 In löslicher Form produzierte chimäre CTB-Varianten weisen eine spezifische Bindung an GM1 auf.....	73
D.1.8 Chemische Kopplung ermöglicht die Präsentation von löslichen CTB-Varianten auf in verschiedenen Systemen produzierten VLPs.....	74
D.2 Immunogenität chimärer CTB-Varianten.....	75
D.2.1 Adjuvans-Effekt von CTB.....	76
D.2.1.1 Durch chemische Kopplung auf VLPs präsentiertes CTB erzielt nicht denselben Adjuvans-Effekt wie mittels Transmembrandomäne auf VLPs präsentiertes CTB.....	76
D.2.1.2 Im bakuloviralen System produzierte VLPs eignen sich nicht wie in humanen Zellen produzierte VLPs zur Messung des Adjuvans-Effekts von chimärem CTB.....	77
D.2.1.3 Der anhand Gag-spezifischer Immunantworten gezeigte Adjuvans-Effekt von mittels Transmembrandomäne auf VLPs verankertem sowie löslich beigemischem CTB bleibt bei Präsentation eines Mimotops erhalten.....	77
D.2.2 Fokussierung der humoralen Immunantwort auf ein Env Epitop.....	79
D.2.2.1 Eine heterologe <i>Prime-Boost</i> -Immunisierung mit <i>gp41</i> DNA und MNCTB <sub>GST</sub> führt zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper mit moderater <i>Clade</i> übergreifender Neutralisationsaktivität.....	79
D.2.2.2 Selbst eine heterologe <i>Prime-Boost</i> -Immunisierung mit <i>gag</i> DNA kann durch <i>Boost</i> mit einer Kombination aus VLPs und MNCTB <sub>GST</sub> zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper führen.....	80
D.2.2.3 Die Verabreichung von VLP/MNCTB-CD34 <sup>TM</sup> induziert nach einer DNA Grundimmunisierung Mimotop-spezifische HIV-1 Env Antikörper bei Mäusen und Kaninchen.....	81
D.3 Ausblick.....	82
<b>E Anhang</b> .....	83
E.1 Abkürzungsverzeichnis.....	83
E.2 DNA-Konstrukte.....	84
E.2.1 Vektoren.....	84
E.2.2 Chimäre CTB-Varianten mit Transmembrandomäne.....	84
E.2.3 Chimäre CTB-Varianten zur Produktion in löslicher Form.....	85
E.2.4 Weitere verwendete Konstrukte.....	86
E.3 Peptide.....	89
E.4 Ergänzende Abbildungen.....	90
E.5 Literaturverzeichnis.....	91
Danksagung.....	103

## Zusammenfassung

Die Entwicklung einer Vakzine gegen das humane Immundefizienz-Virus (HIV) ist von entscheidender Bedeutung für die Eindämmung der globalen AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) Epidemie. Eine sterile Immunität gegen HIV erfordert die Induktion breit neutralisierender monoklonaler Antikörper (bNAK) gegen das Hüllprotein (*Envelope*, Env), welche in der Lage sind eine Infektion zu verhindern. Aufgrund seiner starken Glykosylierung sowie einer Reihe an Konformationsänderungen sind distinkte neutralisationskompetente Bereiche in trimerem Env für das Immunsystem jedoch nur vorübergehend zugänglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Antigene entwickelt, bei denen ein kurzer Env Bereich (Mimotop), der bekanntermaßen von bNAKs erfasst wird, aus dem natürlichen antigenen Kontext herausgelöst wurde und stattdessen über das mukosale Adjuvans Cholera Toxin B (CTB) als Trägerprotein präsentiert wird. Das dargestellte Mimotop entstammt der MPER (*membrane proximal external region*) von gp41 (der Transmembranprotein-Untereinheit von Env) und enthält die hoch konservierten Epitope der beiden ersten identifizierten und zu Beginn dieser Arbeit auch als am potentesten geltenden bNAKs, 2F5 und 4E10. Um die natürliche Virussituation zu imitieren und darüber hinaus auch zelluläre Immunantworten zu stimulieren, wurde Mimotop tragendes CTB zusätzlich mit einer Transmembrandomäne fusioniert, wodurch die Präsentation auf HIV-1 Pr55<sup>Gag</sup> virusähnlichen Partikeln (*virus like particles*, VLPs) ermöglicht wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass chimäres CTB auf der Oberfläche der VLPs in Form von Pentameren vorliegt, womit die Voraussetzung für einen wichtigen Aspekt des Adjuvans-Effekts von CTB, die Bindung des Proteins an den Gangliosid-Rezeptor GM1, erfüllt ist. Zudem wurde bestätigt, dass die Präsentation des Mimotops mittels CTB, verglichen mit gp41, eine verbesserte Zugänglichkeit der Epitope von 2F5 und 4E10 erzielt. Auch die freie Zugänglichkeit des Mimotops von chimärem CTB ohne Transmembrandomäne sowie dessen Bindung an GM1 konnte demonstriert werden. Die Untersuchung des anhand Gag-spezifischer Immunantworten ausgelesenen Adjuvans-Effekts zeigte, dass das Beimischen von CTB zu VLPs den größten Effekt auf die Gag-spezifische mukosale und systemisch humorale Immunantwort hatte. Der zunächst anhand von Varianten ohne Mimotop demonstrierte Adjuvans-Effekt von chimärem CTB (mit und ohne Transmembrandomäne) blieb auch bei Präsentation eines Mimotops erhalten. In weiteren Immunisierungsexperimenten zeigte sich, dass die Immunantwort weitestgehend auf das verabreichte Mimotop fokussiert werden konnte. So führte eine heterologe *Prime-Boost* Strategie mit einer gp41 kodierenden DNA Vakzine, gefolgt von der Verabreichung des löslichen CTB-Mimotop Fusionsproteins zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper und einer moderaten, mehrere HIV-Klassen übergreifenden Neutralisationsaktivität. Selbst eine heterologe *Prime-Boost*-Immunisierung mit einer das Gruppen-spezifische Antigen (Gag) kodierenden DNA Vakzine und einer Kombination aus VLPs und löslichem CTB-Mimotop Fusionsprotein induzierte Mimotop-spezifische Antikörper. Die Verabreichung von über eine Transmembrandomäne auf VLPs präsentierendem CTB erzielte nach einer DNA Grundimmunisierung Mimotop-spezifische HIV-1 Env Antikörper bei Mäusen und Kaninchen. Das hier entwickelte System der Präsentation eines Mimotops durch chimäres CTB auf der Oberfläche von VLPs oder auch in löslicher Form ist somit ein vielversprechendes Konzept im Rahmen der HIV-Impfstoffentwicklung.

## A Einleitung

Dem UNAIDS Bericht 2010 zufolge sind derzeit weltweit etwa 33,3 Millionen Menschen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) infiziert. Obwohl die Inzidenz seit Ende der 90er Jahre um ca. 20 % zurückging, kam es 2009 immer noch zu ca. 2,6 Millionen Neuinfektionen. Trotz stetig fortschreitender Therapiemethoden starben 2009 etwa 1,8 Millionen an den Folgen der durch das Virus ausgelösten Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*). Während derzeit die Inzidenzrate in Osteuropa und Zentralasien am höchsten ist, sind nach wie vor die südafrikanischen Länder am stärksten betroffen <sup>101</sup>.

Die zur Verfügung stehenden antiretroviralen Medikamente können das Leben infizierter Individuen erheblich verlängern, jedoch bringt die Langzeit-Therapie nach wie vor Nebenwirkungen mit sich. Da eine Behandlung zudem sehr kostenintensiv ist und eine hohe *Compliance* erfordert profitieren noch immer überwiegend Betroffene in Industrieländern von der Therapie. Aufklärungskampagnen zur Prävention neuer Infektionen stellen ein relativ günstiges Instrument zur Eindämmung der Pandemie dar. Während diese Maßnahme in Industrienationen durchaus erfolgreich ist, stößt sie in anderen Ländern auf Hindernisse wie erschwerte Durchführbarkeit und Ablehnung. Die Entwicklung eines präventiven Impfstoffes ist daher von großem Interesse.

### A.1 Problematik und Stand der HIV Impfstoffentwicklung

Bereits wenige Jahre nach der erstmaligen Isolation des neuen Retrovirus mit dem heutigen Namen HIV <sup>42</sup> durch die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier <sup>13</sup> und Robert Gallo <sup>67</sup> im Jahre 1983, wurde mit der Entwicklung eines Impfstoffes begonnen. Bewährte Strategien der Vakzineentwicklung, wie der Einsatz attenuierter <sup>218</sup> oder inaktivierter Viren <sup>195</sup> sowie die Verwendung von rekombinantem Hüllprotein (*Envelope*, Env) <sup>72</sup>, schlugen jedoch fehl. Hauptursachen dafür sind die hohe Diversität und Variabilität des Virus sowie die strukturellen Eigenschaften von Env.

#### A.1.1 HIV weist ein hohe Diversität und Variabilität auf

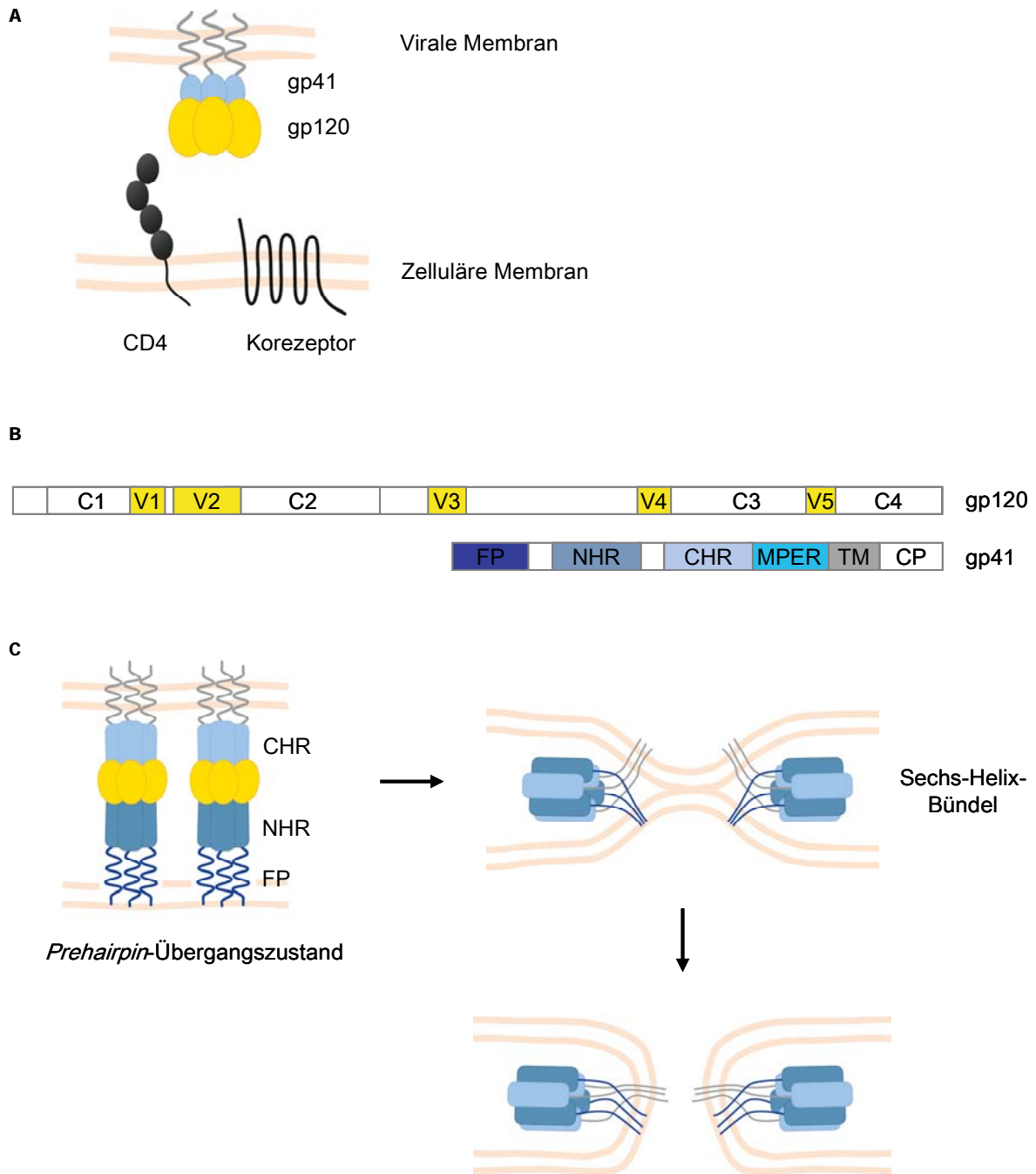
Bisher sind zwei übergeordnete HIV-Spezies, HIV-1 und HIV-2, bekannt. Das weniger virulente HIV-2 kursiert hauptsächlich in West-Afrika. Bei dem weiter verbreiteten HIV-1 unterscheidet man drei Hauptgruppen, M (*major*), O (*outlier*) und N (*non-M/non-O*). Gruppe M, welche die Pandemie dominiert, ist in die 9 Subtypen (*clades*) A, B, C, D, F, G, H, J und K unterteilt, denen z. T. weitere Sub-Subtypen untergeordnet sind. In Europa, Nordamerika und Australien ist Subtyp B prädominant, während in Afrika Subtyp C vorherrscht, welcher weltweit für die meisten Infektionen verantwortlich ist. Weiter ergänzt wird die Diversität von HIV-1 durch chimäre Viren. Diese sogenannten *circulating recombinant forms* (CRFs) entstehen bei Infektion derselben Zelle mit verschiedenen Subtypen durch Rekombination <sup>101,154,175,199</sup>.

Zu der hohen Diversität kommt eine enorme Variabilität des Virus, die in der Mutationsrate der zellulären RNA-Polymerase, die neue Virus-Genome produziert, begründet ist. In Kombination mit einer Vermehrungsrate von etwa  $10^9$  bis  $10^{10}$  Partikeln pro Tag entstehen dadurch ständig neue Virus-Varianten, auf die sich das Immunsystem immer neu einstellen muss <sup>26,91,163,217</sup>.

## A.1.2 Das HIV-1 Hüllprotein Env ist für den ersten Schritt der Infektion verantwortlich

Das HIV Hüllprotein Env ist ein Heterodimer aus dem transmembranen Glykoprotein gp41 und dem extrazellulären Glykoprotein gp120<sup>34</sup>. Auf der Oberfläche eines HIV Partikels befinden sich durchschnittlich 14 Env Trimere<sup>123,230</sup>. Diese sogenannten *Spikes* vermitteln die Bindung des Virus an CD4<sup>45</sup> (Abb. A-1 A). In seiner natürlichen Funktion ist CD4, das sich vornehmlich auf T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen und Dendriten befindet, Korezeptor des T-Zell-Rezeptors und damit beteiligt an der spezifischen Immunabwehr. Eine HIV Infektion beginnt mit dem Andocken der konservierten Region C3 von gp120 (Abb. A-1 B) an CD4. Durch die dadurch ausgelöste Konformationsänderung in gp120 wird die variable Domäne V3 exponiert. Diese ist zusammen mit den V1/V2 Domänen für die Bindung an einen der beiden Chemokinrezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 verantwortlich, welcher als Korezeptor der Infektion dient<sup>147</sup>. CXCR4, dessen natürlicher Ligand das Chemokin SDF (*stromal cell derived factor*) ist, wurde ursprünglich als Fusin bezeichnet<sup>60</sup> und befindet sich auf T-Lymphozyten. CCR5 dagegen, welches normalerweise mit den Chemokinen RANTES, MIP-1 $\alpha$  oder MIP-1 $\beta$  interagiert, sitzt in der Membran von Monozyten und Makrophagen. Die Sequenz der V3 Region bestimmt demnach den Zelltropismus eines HIV-Isolats, d. h. ob T-Lymphozyten (X4-trop) oder Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (R5-trop) infiziert werden können<sup>5,40</sup>.

Durch die Bindung an den Korezeptor kommt es zu einer weiteren Serie konformationeller Änderungen, diesmal in gp41. Die Umlagerungen ermöglichen das Einbringen des Fusionspeptids von gp41 (Abb. A-1 B) in die Membran der Zielzelle. Auf einen *Prehairpin*-Übergangszustand folgt die Bildung eines Sechs-Helix-Bündels, wodurch virale und zelluläre Membran in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden. Dies führt letztendlich zur Fusion der Membranen<sup>157</sup> (Abb. A-1 C). Aufgrund der Fülle an Konformationsänderungen sowie des starken Glykosylierungsgrades von gp41 und gp120 sind konservierte Bereiche des Hüllproteins maskiert und damit gegen das Immunsystem abgeschirmt<sup>114</sup>.



**Abb. A-1: Schematische Darstellung von HIV-1 Env und dem durch gp41 vermittelten Fusionsprozess.**  
 (A) Illustration eines trimeren Env-Komplexes auf der Oberfläche der viralen Membran. Der dargestellte Membranbereich der Zielzelle enthält den primären Rezeptor CD4 und einen Korezeptor. (B) Domänenstruktur von gp120 und gp41. (C) gp41 Konformationsintermediate auf dem Weg zur Fusion mit der Zielmembran. C = konservierte Region; V = Variable Region; FP = Fusionspeptid; NHR = *N-terminal heptad repeat*; CHR = *C-terminal heptad repeat*; MPER = *membrane proximal external region*; TM = Transmembrandomäne; CP = Cytoplasmatische Domäne. Modifiziert nach <sup>157,157</sup>, mit graphischer Unterstützung von T. Brodowski.

### A.1.3 Für eine sterile Immunität gegen HIV ist die Induktion breit neutralisierender Antikörper erforderlich

In den meisten Fällen reicht für eine HIV-Infektion die Übertragung eines Virus und damit die Infektion einer einzigen Zelle aus <sup>1,106</sup>. Durch die Integration der viralen Erbinformation ins Genom CD4<sup>+</sup>-Zellen

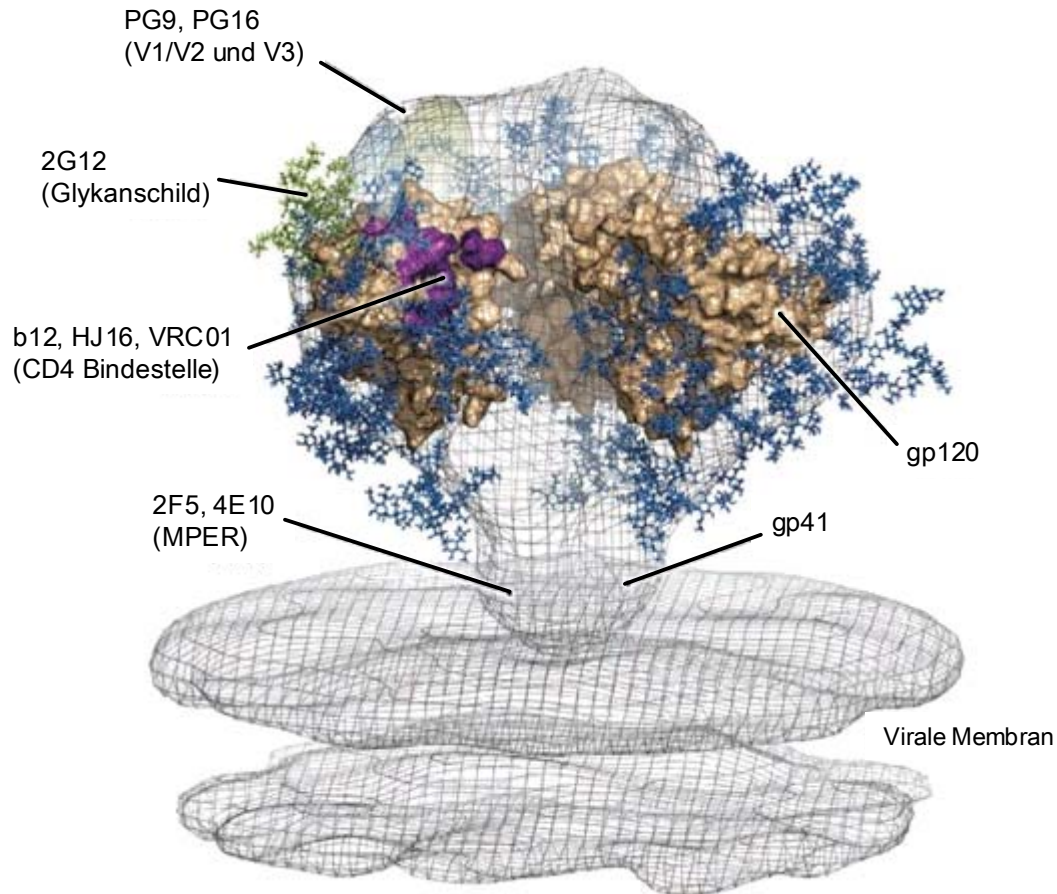
kann HIV lebenslang im Körper persistieren<sup>62</sup> und sich nach einer jahrelangen Latenz erneut vermehren. Voraussetzung für eine sterile Immunität gegen HIV ist daher die Induktion von Antikörpern, welche die primäre Infektion verhindern. Da das Hüllprotein Env für den ersten Schritt der Infektion verantwortlich ist, müssen diese sogenannten neutralisierenden Antikörper gegen Bereiche von Env gerichtet sein, die die Fusion von Virus- und Wirtsmembran vermitteln. Aufgrund der hohen Diversität von HIV ist es zudem erforderlich, dass die Antikörper *Clade*-übergreifend, also breit neutralisierend wirken.

### **A.1.3.1 Alle bisher identifizierten breit neutralisierenden Antikörper sind gegen vier Bereiche von Env gerichtet**

Es gibt einige wenige HIV-Infizierte, deren Immunsystem in der Lage ist die Viruslast ohne eine Therapie dauerhaft so gering zu halten, dass ein Fortschreiten der Infektion in Richtung AIDS ausbleibt. Aus den Seren solcher *Long Term Non Progressors* oder *Elite Controllers* konnten ein paar wenige Antikörper isoliert werden, die imstande sind, *Clade*-übergreifend Primärisolate zu neutralisieren<sup>131</sup>. Die Epitope dieser breit neutralisierenden Antikörper (bNAK) sind dabei auf vier Bereiche von Env begrenzt (siehe Abb. A-2). Einer davon ist die Bindestelle für CD4 innerhalb von gp120. Neben b12, dem als erstes identifizierten bNAK<sup>35</sup>, sind auch die kürzlich entdeckten breit neutralisierenden Antikörper HJ16<sup>44</sup> und VRC01<sup>222</sup> gegen (nicht identische) Epitope in diesem Bereich gerichtet. Während b12 und HJ16 jeweils etwa 40 % der getesteten Viren neutralisieren, ist VRC01 in der Lage, ca. 90 % der annähernd 200 getesteten Isolate zu neutralisieren. Damit ist er entgegen der bis vor kurzem geläufigen Annahme, dass Breite und Potenz der Neutralisation immer miteinander konkurrieren, der am breitesten und zusätzlich auch der am stärksten neutralisierende bNAK.

Auch der Bereich von Env, der für die Bindung an den Korezeptor verantwortlich ist (V3 zusammen mit V1/V2) enthält Epitope kürzlich identifizierter bNAKs<sup>209</sup>. Diese, PG9 und PG16, neutralisieren 79 % bzw. 73 % aller getesteten Viren.

In den 90ern wurden des Weiteren die breit neutralisierenden Antikörper 2G12, 2F5 und 4E10<sup>32,169</sup> identifiziert. Das Epitop von 2G12 ist eine konservierte Anordnung von Oligomannoseresten des Glykanschildes von gp120<sup>32,181,202</sup>. Wie b12 konnte auch 2G12 etwa 40 % der getesteten Isolate neutralisieren<sup>20</sup>. 2F5 und 4E10 sind gegen benachbarte Epitope innerhalb der sogenannten MPER (*membrane proximal external region*) von gp41 gerichtet<sup>146,231</sup>. Dieser Env Bereich ist an der Fusion von viraler und zellulärer Membran beteiligt. Während 2F5 67 % aller getesteten Viren neutralisieren kann, erreicht 4E10 sogar eine Neutralisationsbreite von 100 %, allerdings sind dafür vergleichsweise hohe Konzentrationen des Antikörpers erforderlich<sup>20</sup>.



**Abb. A-2: Die Epitope breit neutralisierender Antikörper auf einem Env Trimer.**

Das Modell wurde durch Kombination aus Kryoelektronentomographie<sup>123</sup>, Kristallographie<sup>229</sup> und Computeranalysen erstellt. Dargestellt ist die Kernstruktur von gp120 (braun) im Elektronendichtebild des Trimeres auf der viralen Membran. Zuckerreste sind blau gefärbt. Hervorgehoben sind V1/V2 und V3 von gp120 (hellgrün und hellblau), die CD4 Bindestelle (violett) und das glykanbasierte Epitop von 2G12 (grün). Nach Burton und Weiss<sup>36</sup>, abgeleitet von<sup>184,208</sup>.

### A.1.3.2 Passive Immunisierungsstudien bewiesen die Wirksamkeit breit neutralisierender Antikörper

Die schützende Funktion der identifizierten Breitneutralisierer konnte *in vivo* anhand passiver Immunisierungsexperimente mit Makaken bestätigt werden. So verhinderten 2F5, 4E10 und 2G12 sowohl in Kombination als auch alleine eine Infektion mit oral<sup>8,92</sup>, intravenös<sup>8,130</sup>, intravaginal<sup>134,162</sup> oder intrarectal<sup>89</sup> appliziertem SHIV (*simian-human immunodeficiency virus*)<sup>61,139</sup>. In einem weiteren Experiment wurden 11 von 16 untersuchten neugeborenen Tieren durch die intravenöse Verabreichung einer Kombination aus 3 oder 4 bNAKs selbst bei postexpositioneller Prophylaxe vor einer Infektion mit oral appliziertem SHIV geschützt<sup>177</sup>. Zudem lassen neueste Studien darauf schließen, dass weitaus niedrigere Serum-Titer als ursprünglich vermutet ausreichen, um eine Infektion zu verhindern<sup>87,88</sup>.

Eine Studie mit chronisch oder akut infizierten HIV Patienten zeigte, dass der passive Einsatz von bNAKs die virale Replikation verlangsamen kann. Allerdings entwickelten sich trotz der Kombination verschiedener bNAKs (2G12, 2F5 und 4E10) Virus-Varianten, die der Neutralisation entkommen konnten<sup>201</sup>. Um eine sterile Immunität zu gewährleisten, sollte eine Vakzine-induzierte

Antikörperantwort demnach gegen mehrere verschiedene Epitope gerichtet sein und besonders breit neutralisierend wirken.

### **A.1.3.3 Rationales Antigendesign könnte die Induktion breit neutralisierender Antikörper vermitteln**

Die Isolation von bNAKs aus Seren HIV-positiver Patienten beweist, dass das menschliche Immunsystem in der Lage ist, derartige Antikörper zu produzieren. Neueste Studien offenbaren, dass etwa 10 bis 30 % der untersuchten Personen im Laufe ihrer chronischen Infektion eine Antikörperantwort mit breit neutralisierender Kapazität entwickeln<sup>19,183</sup>. Dennoch waren bisherige Ansätze zur Induktion breit neutralisierender Antikörper durch aktive Immunisierung nicht erfolgreich<sup>204</sup>. Erste Versuche mit rekombinantem gp120 als Vakzine induzierten hohe Titer gp120-spezifischer Antikörper, die jedoch nicht imstande waren, die meisten der kursierenden HIV-Isolate zu neutralisieren<sup>133,144,220</sup>. Zwei klinische Phase III Studien mit rekombinantem gp120 (AIDSVAX) demonstrierten unterdessen, dass weder Infektionen verhindert, noch Viruslast oder Krankheitsfortschritt vermindert werden konnten<sup>63,166</sup>. Durch eine heterologe *Prime – Boost* Kombination des pockenviralen Vektors ALVAC-HIV mit dem rekombinanten gp120 AIDSVAX erzielte die kürzlich veröffentlichte klinische Phase III Studie RV144 in Thailand immerhin einen moderaten Schutz gegen HIV-Infektionen verglichen mit der Placebo behandelten Kontrollgruppe<sup>172</sup> (siehe A.1.6).

Auch der Einsatz nativer rekombinanter Env Trimere führte bisher nicht zur Induktion ausreichend breit neutralisierender Antikörper. Sicherlich ein Problem dabei ist die Instabilität der Env Trimere. Anhand diverser Modifikationen, wie z.B. der Einführung von Disulfidbrücken zwischen gp120 und gp41, der Deletion der Proteaseschnittstelle im gemeinsamen gp160 Vorläuferprotein von gp120 und gp41 sowie des Einbaus von Trimerisierungsmotiven, wurde bereits eine Erhöhung der Stabilität verfolgt<sup>165</sup>. Einige der modifizierten Trimere induzierten auch Antikörper, die in der Lage waren, heterologe Isolate zu neutralisieren, jedoch nur sehr moderat<sup>15,77,104,110</sup>. Ein oligomeres gp140, d.h. ein Fusionsprotein aus gp120 und gp41 ohne die Transmembran- und intrazelluläre Domäne von gp41, mit Deletion in der V2 Region vermittelte bei Makaken immerhin vollständigen Schutz vor einer homologen Infektion<sup>11</sup>.

Die durch eine natürliche HIV-Infektion induzierten Antikörper sind zum größten Teil gegen variable Regionen von Env gerichtet, da konservierte Bereiche durch die extensive Glykosylierung abgeschirmt sind und, bedingt durch Konformationsänderungen, erst spät kurzfristig exponiert werden. Um das Immunsystem auf die Epitope von bNAKs zu fokussieren, ist man daher aktuell zur reversen Entwicklung von Vakzineandidaten übergegangen. Dabei werden bekannte bNAKs alleine sowie im Komplex mit Env genau charakterisiert und darauf aufbauend Antigene entworfen, die wiederum die Produktion dieser bNAKs durch das menschliche Immunsystem hervorrufen sollen<sup>184</sup>. Um beispielsweise die Immunantwort auf das Epitop von b12 zu fokussieren, wurden gp120 und gp140 in diversen Studien durch Alanin-Substitutionen und Hyperglykosylierung mit dem Ziel verändert, die Bindung nicht neutralisierender Antikörper zu vermindern, ohne diejenige von b12 zu beeinträchtigen<sup>159-161</sup>. In Immunisierungsexperimenten mit Kaninchen konnten jedoch keine b12 ähnlichen Antikörper

induziert werden<sup>186</sup>. Da b12 primär mit der äußeren Domäne (*outer domain*, OD) von gp120 interagiert<sup>229</sup>, wurden des Weiteren Antigene entwickelt, die lediglich aus der isolierten OD von gp120 bestanden. Diese Konstrukte scheiterten allerdings an fehlender Bindung von b12<sup>223</sup>. Basierend auf der Kristallstruktur des b12-gp120 Komplexes wurde kürzlich ein membranverankertes gp120 OD-basierendes Antigen entwickelt<sup>221</sup>, welches derzeit als Vakzinekandidat getestet wird.

Zur Darstellung des 2G12 Epitopes, einer konservierten Anordnung von Oligomannoseresten, wurden zunächst chemisch synthetisierte Glykokonjugate eingesetzt, die jedoch in Kaninchen nur schwach immunogen waren und zudem vorwiegend nicht Oligomannose-spezifische Antikörperantworten hervorriefen<sup>150,210</sup>. Die Weiterentwicklung der Glykokonjugate führte zu Antigenen, die zwar 2G12 hochaffin binden und Oligomannose-spezifische Antikörper induzieren konnten, welche aber nicht neutralisierend wirkten<sup>6,102,212</sup>. Auch die Nachahmung der konservierten Oligomannose Anordnung durch die Modifikation anderer Glykoproteine führte bislang nicht zur Induktion einer neutralisierenden Antikörperantwort<sup>125</sup>. Vermutlich liegt die Schwierigkeit bei der Induktion 2G12 ähnlicher Antikörper in dessen einzigartiger Struktur. 2G12 liegt als im Fab-Bereich dimerisierter Antikörper vor, dessen variable Regionen der schweren Ketten einen außergewöhnlichen Domänen-Austausch aufweisen<sup>38</sup>. Die Kristallstrukturdaten von 2F5 und 4E10 im Komplex mit Peptiden, die die Kernepitope der Antikörper enthielten, ergaben, dass 2F5 eine lange Schleife erkennt<sup>152</sup>, während 4E10 an eine helikale Konformation bindet<sup>39</sup>. Darauf basierend wurden zyklische Peptide entworfen, in denen die lineare Erkennungssequenz von 2F5 (ELDKWAS) in eine Schleifenstruktur gezwungen werden sollte<sup>141</sup>. Es konnten aber keine 2F5 ähnlichen Antikörper induziert werden. Aufgrund der Vermutung, dass die virale Membran eine Bedeutung bei der Bildung derartiger Antikörper hat<sup>78</sup>, wurden verschiedene Antigene mit einer Membran-Umgebung entwickelt. 2007 veröffentlichten Kim *et al.* die Verwendung eines auf virusähnlichen Partikeln (VLPs; siehe A.1.5) präsentierten gp41 Derivats<sup>108</sup>. Phogat *et al.* fusionierten den MPER-Bereich mit dem Hepatitis B Oberflächenantigen, welches lipidhaltige Nanopartikel bildet<sup>164</sup> und Watson *et al.* versahen ein MPER Peptid mit verschiedenen Lipidankern um es auf Liposomen zu präsentieren<sup>216</sup>. Keiner der Ansätze führte jedoch zur Induktion 2F5 oder 4E10 ähnlicher Antikörper.

In jüngster Zeit wurden mit Hilfe neuer Ansätze neue, außerordentlich potente Breitneutralisierer (VRC01, PG9 und PG16) identifiziert<sup>209,222</sup>. Fundiertes Wissen über diese Antikörper, darunter die strukturelle Basis deren Interaktion mit ihren jeweiligen Epitopen<sup>228</sup>, dienen der zukünftigen rationalen Antigenentwicklung.

#### **A.1.4 Humorale und zelluläre Immunantworten ergänzen sich bei der Virusbekämpfung**

Für eine breite und lang anhaltende Immunität gegenüber der Vielfalt an HIV Isolaten sind beide Arme des adaptiven Immunsystems von Bedeutung. Die Induktion breit neutralisierender Antikörper ist für eine sterile Immunität, d.h. das Abfangen der Viruspartikel vor Infektion einer Zelle, erforderlich. Spezifische zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T-lymphocyte*, CTL) dagegen dienen der Eliminierung bereits infizierter CD4+ Zellen, die nicht durch neutralisierende Antikörper geschützt werden konnten<sup>191</sup>. Dadurch wird die Virusreplikation vermindert und das Fortschreiten einer Infektion in Richtung

AIDS verlangsamt <sup>75,81,111,113</sup>. Eine gesenkte Viruslast verringert zudem das Risiko der HIV-Übertragung auf Sexualpartner, was zur Eindämmung der Pandemie beiträgt.

Durch Ausschüttung von Cytokinen wird das Zusammenspiel von zellulärer und humoraler Immunantwort koordiniert. So setzen CTL unter anderem  $\text{IFN}\gamma$  frei, welches weitere CTL sowie T-Helferzellen aktiviert. Letztere wiederum werden durch antigenpräsentierende Zellen (wie Makrophagen oder dendritische Zellen), welche z.B. Virusbestandteile lysierter infizierter Zellen aufgenommen haben und virale Peptide über MHC-Klasse-II-Antigene präsentieren, stimuliert. T-Helferzellen des Typs  $\text{T}_{\text{H}2}$  schütten daraufhin andere Cytokine aus (IL-4, IL-5, IL-6, und IL-10), welche die Proliferation und Differenzierung von Prä-B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen stimulieren <sup>143</sup>.

Einen Hinweis auf die Bedeutung zytotoxischer T-Zellen bezüglich der Vorbeugung einer HIV-Infektion gaben Untersuchungen von Individuen, die trotz einer starken Exposition und damit eines hohen Ansteckungsrisikos nicht infiziert wurden. Blutproben dieser Personen enthielten HIV-spezifische CTL, aufgrund derer vermutlich eine Infektion verhindert werden konnte <sup>84,176</sup>. Auch das Auftreten von Immun-Flucht-Varianten mit Mutationen im Bereich wichtiger CTL-Epitope bei akut HIV-infizierten Patienten deutet auf die essentielle Funktion der zytotoxischen T-Zellen bei der Virusbekämpfung hin <sup>12,25,163</sup>. Studien mit Makaken belegten unterdessen, dass eine fehlende CTL-Aktivität zu erhöhter Viruslast und verstärkter Abnahme  $\text{CD4}^+$  Zellen führt <sup>135,185</sup>.

Entscheidend für den Erfolg der Kontrolle über eine HIV-Infektion ist die Qualität der T-Zellantworten. Denn während HIV-Patienten mit progressivem Infektionsverlauf vornehmlich akute Effektor-T-Zellen besitzen, weisen die Seren von *Long Term Non Progressors* zusätzlich langlebige polyfunktionale  $\text{IFN}\gamma$  und IL-2 produzierende Gedächtnis T-Zellen auf <sup>158</sup>. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Breite HIV-1 Capsid-spezifischer CTL-Antworten bei chronischen Infektionen indirekt proportional zur Viruslast ist <sup>107</sup>.

### **A.1.5 Virusähnliche Partikel sind eine vielversprechende Komponente der modernen Vakzineentwicklung**

Eine bewährte Strategie der Impfstoffentwicklung ist der Einsatz attenuierter Viren <sup>116</sup>. Aufgrund der hohen Mutationsrate und des dadurch bedingten Risikos von Rückmutationen sowie einer Rekombinationsgefahr mit humanen endogenen Retroviren ist dieser Ansatz für eine HIV Vakzine jedoch nicht geeignet <sup>117,174,225</sup>. Eine Alternative hierzu bieten HIV-1 virusähnliche Partikel (*virus like particles*, VLPs). Diese entstehen durch die eigenständige Anlagerung des HIV-1 Gruppenspezifischen Antigens  $\text{Pr55}^{\text{Gag}}$  an die Zellmembran und eine anschließende Abknospung von der Zelle <sup>71</sup>. VLPs gleichen mit einem Durchmesser von 100 bis 160 nm dem Erscheinungsbild eines immaturren HI-Virus <sup>69</sup>, sind jedoch Replikations-inkompetent und nicht infektiös <sup>207</sup>. Bei einer HIV-Infektion tragen VLPs zusätzlich Env und werden vermutlich von infizierten Zellen freigesetzt, um die Immunantwort von replikationsfähigen Virionen abzulenken <sup>128</sup>. Ursprünglich wurde dieses Phänomen bei Hepatitis B beschrieben <sup>14</sup>. Hepatitis B Antigen basierte Partikel wurden daraufhin zur Entwicklung eines Impfstoffes gegen das Hepatitis B Virus (HBV) herangezogen <sup>22</sup>. Seither wurden diverse virusähnliche Partikel als potentielle Impfstoffkandidaten untersucht. Eine auf VLPs basierte Vakzine gegen das

humane Papillomavirus (HPV) ist seit 2006 auf dem Markt, nachdem Sicherheit, Toleranz und die Induktion einer schützenden Immunantwort gezeigt werden konnten<sup>68</sup>.

Nicht nur im Hinblick auf die Erfolge von HBV und HPV Impfstoff sind Pr55<sup>Gag</sup> VLPs eine vielversprechende Komponente der HIV Vakzineentwicklung. Der Einsatz von VLPs ermöglicht die Präsentation nativer Env Trimere in ihrer natürlichen Membran-Umgebung, genau wie auf einem HI-Virus. Gegenüber der Darreichung in löslicher Form wird hierdurch die Stabilität und Immunogenität des Hüllproteins erhöht, wodurch die Chance der Induktion breit neutralisierender Antikörper verbessert werden sollte<sup>140</sup> (vergleiche A.1.3.3). Zudem erzielten erste Immunisierungsstudien mit Pr55<sup>Gag</sup> VLPs starke T<sub>H</sub>1 polarisierte zelluläre und humorale Immunantworten ohne die ergänzende Zugabe eines Adjuvans und induzierten Gag-spezifische CTL in Mäusen und Makaken<sup>156,205</sup>. Der Austausch zur Partikelbildung nicht relevanter Bereiche von Gag durch Sequenzen mit bekannten CTL Epitopen konnte das Potential von VLPs zusätzlich erweitern<sup>206</sup>. Darüber hinaus konnte die Immunogenität der virusähnlichen Partikel durch die Ausstattung mit verschiedenen kostimulatorischen Molekülen, wie Influenza Hämagglutinin (HA)<sup>79</sup>, Cholera Toxin B (CTB, siehe A.2)<sup>103</sup>, GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) oder CD40 Ligand (CD40L)<sup>189</sup> weiter verstärkt werden. Pr55<sup>Gag</sup> VLPs sind also ein ideales Instrument zur Induktion breit neutralisierender Antikörper und Gag-spezifischer CTL, die vermutlich nur gemeinsam in der Lage sind, einen lang anhaltenden Schutz gegen HIV zu gewähren.

Zur Produktion von VLPs können verschiedene Expressionssysteme herangezogen werden<sup>128</sup>. Die gängigste, da sehr ertragreiche Methode zur Gewinnung von HIV-1 VLPs ist die Infektion von Insektenzellen mit rekombinantem Bakulovirus<sup>207</sup>. Der Vorteil der Transfektion von Säugerzellen dagegen liegt in einer korrekteren Faltung und Glykosylierung präsentierter Antigene<sup>145</sup>. Zudem sind mittels Transfektion produzierte VLPs nicht mit Viren verunreinigt. Durch die Immunisierung mit für Gag kodierender Plasmid-DNA oder lentiviralen Vektoren ist es des Weiteren möglich, die Produktion von VLPs im lebenden Organismus zu induzieren und dadurch „vor Ort“ über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigene CTL-, T-Helfer- und B-Zellantworten zu stimulieren<sup>16,52</sup>.

### **A.1.6 Heterologe *Prime-Boost* Strategien erhöhen das Potential von Vakzineandidaten**

Diverse Studien weisen darauf hin, dass die Kombination einer DNA Vakzine, kodierend für das Hüllprotein Env (*Prime*) gefolgt von Immunisierungen mit Env Protein (*Boost*) höhere und länger anhaltende Titer Env-spezifischer Antikörper induziert als jede Komponente für sich. So konnten Makaken durch Grundimmunisierung mit *env* DNA verschiedener Isolate und *Boost* mit homologen Env Proteinen gegen eine Infektion mit homologem Virus geschützt werden<sup>96,155</sup>. Eine klinische Phase I Studie mit *env* DNA *Prime* und Env Protein *Boost* erzielte des Weiteren höhere Env-spezifische Antikörpertiter als zuvor durch mehrfach aufeinander folgende Immunisierungen mit Env Protein erreicht werden konnten<sup>211</sup>. Aufgrund der vielversprechenden Daten sind DNA *Prime* - Protein *Boost* Strategien derzeit Teil diverser aktueller und geplanter klinischer Phase I und II Studien.

Auch die Kombination aus DNA *Prime* und *Boost* mit viralen Vektoren (chimären Viren), wie pockenviralen oder adenoviralen Vektoren, erwies sich als erfolgreiches Konzept bei

Immunisierungsstudien. So induzierte ein *env* DNA *Prime* gefolgt von einem adenoviralen Vektor *Boost* bei Makaken höhere Titer neutralisierender Antikörper als jede Komponente alleine<sup>132</sup>. Durch eine *gag* DNA Grundimmunisierung gefolgt von einem *Boost* mit attenuierten pockenviralen Vektoren wurden bei Mäusen breite und lang anhaltende Immunantworten induziert<sup>74</sup>.

Alternativ werden auch Kombinationen aus *Prime* mit chimären Viren und *Boost* mit rekombinantem Protein eingesetzt. So erzeugte ein für *env* DNA kodierender adenoviraler Vektor bei Makaken nach *Boost* mit einem heterologen Env Protein vollständigen Schutz gegen die Infektion mit einem zum Protein *Boost* homologen SHIV<sup>24</sup>. Durch eine heterologe *Prime* – *Boost* Kombination des pockenviralen Vektors ALVAC-HIV mit dem rekombinanten gp120 AIDS-VAX erzielte die kürzlich veröffentlichte klinische Phase III Studie RV144 in Thailand einen moderaten Schutz gegen HIV-Infektionen verglichen mit der Placebo behandelten Kontrollgruppe<sup>172</sup>, wohingegen AIDS-VAX alleine in früher datierten klinischen Phase III Studien (siehe A.1.3.3) nicht in der Lage war, Infektionen zu verhindern.

### **A.1.7 Der mukosalen Immunantwort wird eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle über HIV-Infektionen zugesprochen**

90 % aller HIV-Infektionen weltweit werden durch Sexualkontakte über mukosale Oberflächen übertragen<sup>97</sup>. Dort anzutreffende Makrophagen, dendritische Zellen und Langerhans-Zellen sind wahrscheinlich die ersten Zielzellen des Virus<sup>46</sup>. Infizierte Makrophagen sind zudem eines der Hauptreservoirs persistierender Viren<sup>40</sup>. Untersuchungen nicht infizierter Individuen mit einer hohen HIV-Expositionsrate und einem damit hohen Infektionsrisiko deuten unterdessen darauf hin, dass HIV-spezifische IgA Antikörper<sup>31,105</sup> sowie mukosale zytotoxische T-Zellen<sup>4</sup> Korrelate einer sterilen Immunität darstellen. Komponenten einer präventiven Vakzine sollten daher auf jeden Fall das mukosale Immunsystem ansprechen, wozu vermutlich eine Applikation über mukosale Routen erforderlich ist<sup>66,86,100,187,224</sup>.

## **A.2 Das molekulare Adjuvans Cholera Toxin B (CTB)**

### **A.2.1 Adjuvantien verstärken die durch ein spezifisches Antigen induzierte Immunantwort**

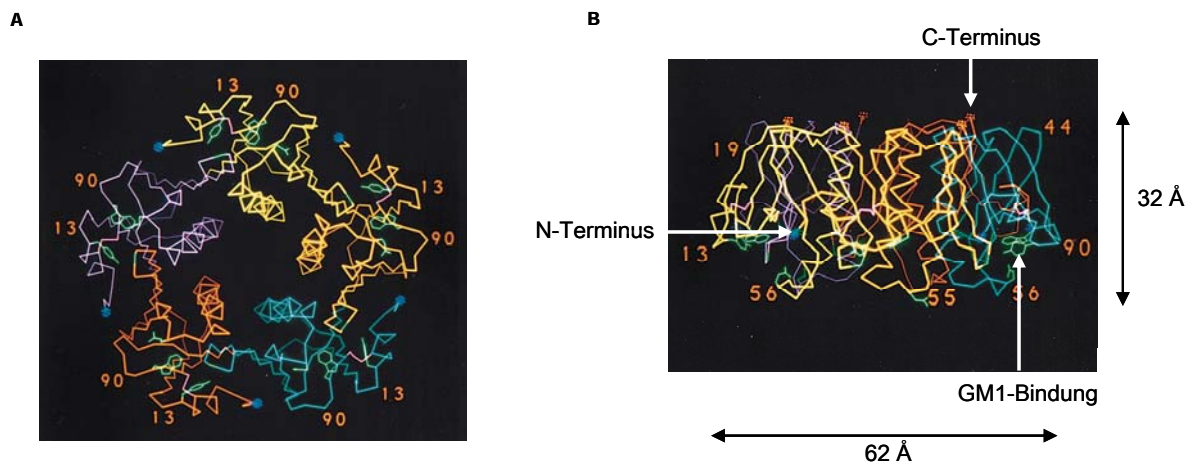
Während traditionelle Vakzinen, die aus inaktivierten oder attenuierten Viren bestehen, selbst ausreichend immunogen sind, benötigen Protein- oder DNA-basierte Impfstoffkandidaten in der Regel Adjuvantien zur Steigerung der Immunantwort. Diese fördern im Allgemeinen die Migration von Makrophagen, Monozyten sowie B- und T-Zellen an den Ort der Applikation. Für die Anwendung beim Menschen zugelassene Adjuvantien sind beispielsweise Aluminiumhydroxid (Alum), bestimmte Öl-Wasser-Emulsionen wie MF50 sowie verschiedene Toxoide, wie z. B. das Tetanustoxoid<sup>143</sup>.

Bei der Entwicklung von Impfstoffen, die das mukosale Immunsystem ansprechen sollen, konnten in den letzten Jahren Fortschritte durch die Kopplung von Antigenen an immunstimulatorische Moleküle, die dadurch zugleich als Träger und Adjuvans dienen, erzielt werden. Beispiele solcher molekularer

Adjuvantien sind TLR (*toll-like receptor*) Liganden, verschiedene Cytokine und Chemokine sowie bakterielle Enterotoxine wie das Cholera Toxin (CT) <sup>171</sup>.

### A.2.2 CTB ist die nicht toxische Untereinheit des Enterotoxins von *Vibrio Cholerae*

Cholera Toxin, das Enterotoxin von *Vibrio Cholerae*, ist ein 86 kDa großes AB<sub>5</sub> Heterohexamer. Seine Toxizität ist auf die A Untereinheit (CTA) zurückzuführen. Diese katalysiert die ADP-Ribosylierung eines G-Proteins, welches hierdurch permanent die Adenylatcyklase aktiviert. Als Folge der dadurch ausgelösten Signalkaskade kommt es zu der für Cholera charakteristischen massiven Flüssigkeitsausscheidung. Cholera Toxin B (CTB) dagegen vermittelt durch Bindung an den Gangliosid-Rezeptor GM1 die endocytotische Aufnahme von Cholera Toxin in die Darmepithelzellen <sup>118</sup>. Die 11,5 kDa großen B Untereinheiten formen zylindrische Pentamere (siehe Abb. A-3), in deren Pore jeweils eine A Untereinheit über nicht kovalente Wechselwirkungen verankert ist <sup>226</sup>. Während sich die selbst im Darm hoch stabilen CTB Pentamere auch in Abwesenheit der A Untereinheit spontan zusammenlagern, führt ein nachträgliches Beifügen von CTA nicht zur Ausbildung des Holotoxins <sup>227</sup>. CTB selbst ist daher nicht toxisch <sup>148</sup> und als Komponente eines oral verabreichten Cholera Impfstoffes (Orochol, CVD 103-HgR) überdies bereits für die Anwendung im Menschen zugelassen <sup>178,196</sup>.



**Abb. A-3: Röntgenkristallstruktur eines CTB Pentamers** <sup>227</sup>.

Jede Untereinheit ist in einer anderen Farbe dargestellt. Die Aminosäurereste, welche die 5 GM1-Bindestellen umgeben, sind jeweils grün markiert. Die N-Termini sind als rote, die C-Termini als blaue Punkte gekennzeichnet. (A) In der Ansicht von oben ist die Zentralpore zu erkennen. (B) Die Ansicht von der Seite veranschaulicht die Positionen von GM1-Bindestellen und N- bzw. C-Termini.

### A.2.3 CTB ist ein potenter Stimulator der mukosalen Immunantwort und birgt die Möglichkeit gleichzeitig als Antigen-Träger eingesetzt zu werden

GM1 wird neben Darmepithelzellen auch auf vielen weiteren eukaryontischen Zellen präsentiert. So führt die Bindung von CTB an GM1 auch zur Aufnahme in dendritische Zellen, welche über ihre Pseudopodien zwischen Darmepithelzellen verankert sind <sup>173</sup>. Des Weiteren regt CTB die Migration

dendritischer Zellen zu B- und T-Zell-Regionen in Lymphknoten an, wo dann durch Antigenpräsentation B- und T-Zellen stimuliert werden<sup>58,188</sup>. Dass CTB nach mukosaler Applikation mukosale, humorale und zelluläre Immunantworten bei Mäusen und Menschen induziert, konnte mehrfach gezeigt werden<sup>18,58,126,214</sup>.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Adjuvantien birgt CTB den Vorteil, zusätzlich als Träger des Antigens zu fungieren<sup>53</sup>. Durch die Untersuchung von CTB Fusionsproteinen mit verschiedenen Antigenen am N- oder C-Terminus zeigte sich, dass die Rezeptorbindung bei C-terminalen Fusionsproteinen weniger beeinträchtigt wird als bei N-terminalen<sup>54,122,180</sup>. Allerdings war selbst ein duales Fusionsprotein, d. h. mit Antigen sowohl am N- als auch am C-Terminus noch in der Lage an GM1 zu binden<sup>122</sup>. Die immunstimulatorischen Eigenschaften von CTB (wie z.B. die Induktion Antigen-spezifischer systemischer und mukosaler Antikörperantworten) in solchen Fusionsproteinen konnten in diversen oralen, intranasalen, rektalen und vaginalen Immunisierungsstudien bei Mäusen und Menschen nachgewiesen werden<sup>70,95,112,168,180,215</sup>.

### A.3 Zielsetzung

Um eine HIV-Infektion zu verhindern, ist es von entscheidender Bedeutung, die Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle zu unterbinden. Eine effektive Vakzine sollte daher fähig sein, breit neutralisierende monoklonale Antikörper (bNAK) gegen das *Envelope* (Env) Protein zu induzieren. Trimeres Env präsentiert die Epitope breit neutralisierender Antikörper jedoch nur unzureichend. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Antigene basierend auf einem definierten kurzen Env Bereich mit Epitopen bekannter bNAKs (Mimotop) entworfen werden, um die Immunantwort gegen immundominante, aber nicht neutralisierende Bereiche von Env zu unterbinden und stattdessen auf ausgesuchte, neutralisationskompetente Epitope zu fokussieren. Da Peptide mit einem Molekulargewicht unter 3-4 kDa nicht in der Lage sind, die verschiedenen Immunreaktionen inklusive der Stimulation von antikörperproduzierenden B-Zellen effizient auszulösen, sollte das Mimotop über ein Trägerprotein präsentiert werden. Durch die Verwendung des molekularen Adjuvans Cholera Toxin B (CTB) als Träger sollte die Mimotop-spezifische Immunantwort zusätzlich unterstützt und insbesondere das mukosale Immunsystem stimuliert werden. Um die natürliche Virussituation zu imitieren und darüber hinaus auch zelluläre Immunantworten zu induzieren, sollten die chimären Proteine auf der Oberfläche von HIV-1 VLPs präsentiert werden. Hierfür sollte Mimotop tragendes CTB zusätzlich mit einer Transmembrandomäne fusioniert werden, die einen effektiven Einbau in VLPs vermittelt ohne die Ausbildung funktionaler CTB Pentamere zu beeinträchtigen. Alternativ zu einer Transmembrandomäne sollte Mimotop tragendes CTB auch durch chemische Kopplung kovalent mit VLPs verbunden oder bei Immunisierungsexperimenten in löslicher Form VLPs beigemischt werden. Ziel der durchgeführten Immunisierungsstudien war die Überprüfung der Adjuvans-Aktivität von CTB in den chimären Proteinen sowie die Induktion potentiell neutralisierender Mimotop-spezifischer Antikörper.

## B Material und Methoden

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka Chemie (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und VWR (Darmstadt) in der Reinheitsstufe *pro analysis* bezogen. Zellkulturmaterialien stammten von Invitrogen (Darmstadt), PAN Biotech (Aidenbach), und BD Biosciences (Heidelberg), sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Falcon (Osnabrück), Greiner (Frickhausen), Nunc (Langenselbold) und Sarstedt (Nümbrecht). Restriktionsendonukleasen und übrige Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt) bezogen. Tabelle B-1 enthält eine Übersicht häufig verwendeter Puffer.

Von vorangegangener Auflistung abweichend eingesetzte Reagenzien und Materialien sind an entsprechender Stelle vermerkt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
PBS	7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 130 mM NaCl
TBS	50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl
TTBS	TBS, 0,05% Tween-20

**Tab. B-1: Übersicht häufig verwendeter Puffer**

### B.1 Molekularbiologie

Zur Klonierung von DNA-Konstrukten wurden übliche molekularbiologische Techniken<sup>179</sup> eingesetzt. Anhang E.2 enthält eine Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten und erzeugten Konstrukte. Synthetische Gensequenzen wurden von der Geneart AG (Regensburg) produziert.

Nach Verdau der Ausgangsplasmide mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt) gemäß Herstellerangaben wurden die gewünschten Banden für Vektor-Rückgrat und *Insert* mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-System* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus einem Agarosegel extrahiert. Dabei erfolgte die Dephosphorylierung des Vektor-Rückgrats in unmittelbarem Anschluss an den Restriktionsverdau unter Verwendung von *Alkaline Phosphatase* (Roche, Mannheim) laut Herstellerangaben. Zur Ligation mittels *Quick Ligation Kit* (New England Biolabs, Frankfurt) wurden Vektor-Rückgrat und *Insert* im molaren Verhältnis 3:1 eingesetzt. Für die anschließende Transformation des Ligationsansatzes wurden chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Darmstadt, Nr. 18265-017) nach der RbCl-Methode<sup>80</sup> hergestellt. Die Anzucht transformierter Bakterien erfolgte in Luria-Bertani-Medium (LB-Medium, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,4) bzw. auf entsprechenden Kulturplatten (Luria-Bertani-Medium, 1,5 % Agar) bei 37°C. Zur Selektion wurden den Medien je nach transformiertem Plasmid verschiedene Antibiotika (siehe Tab. B-2) zugesetzt. Die Gewinnung von Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse, gefolgt von einer Isopropanol-Fällung<sup>21</sup>. Alle

klonierten Plasmide wurden mittels geeigneter Kontrollverdau und über DNA-Sequenzierung, durchgeführt bei der Geneart AG (Regensburg), nach dem Sanger-Verfahren<sup>182</sup> überprüft.

Zur Proteinexpression in *E. coli* eingesetzte Konstrukte wurden in die Stämme *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs, Frankfurt, Nr. C25271) bzw. *E. coli* Origami 2(DE3) (Novagen, Darmstadt, Nr. 71345-3) eingebracht. Die Archivierung transformierter Bakterien erfolgte über bei -80 °C gelagerte Glycerinkulturen, bestehend aus 600 µl Bakterienkultur versetzt mit 300 µl sterilem Glycerin (87 %). Größere Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad für Transfektionen wurden mit dem *Qiagen Plasmid Purification Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert. Um Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) zu vermeiden erfolgte die Präparation von Plasmid-DNA zur Immunisierung von Versuchstieren mittels des *EndoFree Plasmid Purification Mega* bzw. *Giga Kit* (Qiagen, Hilden). Dabei wurde die DNA in sterilem PBS aufgenommen.

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung isolierter DNA erfolgte über die Absorption bei 260 nm und das Lambert-Beersche Gesetz [ $A_{260} = 47,5 \mu\text{g dsDNA} / \text{ml}$ ] bzw. das Verhältnis  $A_{260} / A_{280}$ .

Bezeichnung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	12,5 µg/ml
Streptomycin (Strep)	50 µg/ml

**Tab. B-2: Übersicht der zur Selektion eingesetzten Antibiotika**

## B.2 Zellbiologie

### B.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Eukaryontische Zellen wurden nach gängigen Methoden in kommerziellem Flüssignährmedium kultiviert. Tabelle B-3 enthält eine Übersicht aller verwendeten Zelllinien mit Kurzbeschreibung und eingesetztem Medium.

Die Kultivierung der adhären wachsenden humanen HEK293T Zelllinie erfolgte bei 37 °C unter einer 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Vor Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 subkultiviert. Die an das Wachstum in Suspension angepassten 293-F Zellen wurden zusätzlich zur Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> bei 110 rpm geschüttelt. Hier erfolgte die Subkultivierung bei einer Zelldichte von 1 bis 3·10<sup>6</sup> Zellen, ebenfalls im Verhältnis 1:10.

SF-9 und High 5 Insektenzellen wurden bei 27 °C gehalten und vor Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:3 bis 1:5 subkultiviert.

Bezeichnung	Kurzbeschreibung	Medium
HEK293T	humane Ad5/SV40 (T) - transformierte Nierenepithelzellen (ATCC: CRL-11268)	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM, Invitrogen, Darmstadt), 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (FCS, Invitrogen, Darmstadt), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach)
293-F	humane Ad5- transformierte Nierenepithelzellen, angepasst an das Wachstum in Suspension (Invitrogen, Darmstadt, Nr. K9000-10)	<i>FreeStyle 293 Expression Medium</i> (Invitrogen, Darmstadt), 50 µg/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach), serumfrei
SF-9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Ovarzellen basierte Insektenzelllinie (ATCC: CRL-1711)	Sf-900 II SFM (Invitrogen, Darmstadt), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach), serumfrei
High Five	<i>Trichoplusia ni</i> Eizell-Homogenisat abgeleitete Insektenzelllinie (Invitrogen, Darmstadt, Nr. B855-02)	<i>InsectExpress</i> (BioWhittaker, Walkersville), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (PAN Biotech, Aidenbach), serumfrei

**Tab. B-3: Übersicht der verwendeten eukaryontischen Zelllinien**  
Die Inaktivierung von FKS erfolgte durch 30 min Inkubation bei 56 °C.

## B.2.2 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Das Einbringen von DNA in HEK293T Zellen erfolgte mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI, Polysciences, Eppelheim). Hierfür wurden ca. 16 h vor der Transfektion  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro Petrischale (Fläche: 56,7 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Unmittelbar vor Zugabe der DNA wechselte man das Medium durch DMEM ohne Zusätze aus. 12 µg der jeweils einzubringenden DNA verdünnt in DMEM wurden mit 48 µl PEI vermischt (Gesamtvolumen: 600 µl) und, nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur, unter Schwenken auf die Zellen getropft. Vier Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel (DMEM, 10 % FKS, 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin). Zellen und Zellüberstände wurden in der Regel 72 h nach Transfektion geerntet. Für kleinere oder größere Ansätze wurde die Menge an Zellen, DNA und PEI proportional zur Fläche des verwendeten Kulturgefäßes angepasst.

Alternativ zu PEI kamen auch *FuGene 6* und *FuGene HD Transfection Reagent* (Roche, Mannheim) nach Herstellerangaben zum Einsatz.

Die an das Wachstum in Suspension gewöhnten 293-F Zellen wurden ausschließlich zur Produktion von virusähnlichen Partikeln (*virus like particles*, VLPs) im Großmaßstab transfiziert. Dafür wurde, nach Einstellen der Zelldichte auf  $1 \cdot 10^6$ /ml mit *FreeStyle 293 Expression Medium* (Invitrogen, Darmstadt) ohne Zusätze, der Transfektionsansatz unter Schwenken zugetropft. Pro Kolben mit 30 ml Zellsuspension wurden davon 1,5 ml, bestehend aus 37,5 µg Gesamt-DNA und 120 µl PEI in DMEM ohne Zusätze, eingesetzt. Wie bei den HEK293T Zellen erfolgte ein Mediumwechsel (*FreeStyle 293 Expression Medium*, 50 µg/ml Penicillin, 50 U/ml Streptomycin) nach 4 h und die Ernte der VLPs nach 72 h.

### B.2.3 Ernte von HEK293T Zellen und Überständen für analytische Zwecke

Für Analysen im Western-Blot und ELISA wurden Kulturüberstände 72 h nach Transfektion abgenommen, über einen Filter der Porengröße 0,45 µm gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden mit kaltem PBS abgespült, 5 min bei 300-g und 4 °C pelletiert und einmal mit kaltem PBS gewaschen (300-g, 5 min, 4 °C). Nach Resuspension in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (w/v) Nonidet P40, 0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat; 1 Tablette Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Mannheim) pro 15 ml) folgten 30 min Inkubation auf Eis zur Zelllyse. Unlösliche Zelltrümmer wurden durch 5 min Zentrifugation bei 20.000-g und 4 °C sedimentiert, die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für die Analyse im Durchflusszytometer (FACS) wurden HEK293T Zellen 72 h nach Transfektion mit dem im Kulturgefäß befindlichen Medium abgespült, 5 min bei 300-g und 4 °C pelletiert und in 1 ml FACS-Puffer (PBS, 1 % FKS, 1 g/l NaN<sub>3</sub>) aufgenommen. Nach erneutem Waschen mit 1 ml FACS-Puffer folgte die unter B.2.4 beschriebene Färbung mit spezifischen Antikörpern.

### B.2.4 FACS-Analyse

Der Nachweis von Proteinen auf der Oberfläche von Zellen erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS).

Hierfür wurden, wie unter B.2.3 beschrieben, zweimal mit kaltem FACS-Puffer gewaschene Zellen zunächst mit einem spezifischen, in 100 µl FACS-Puffer verdünnten Primär-Antikörper, inkubiert (siehe Tabelle B-4). Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen mit einem, in 100µl FACS-Puffer verdünnten, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle B-5) gefärbt, erneut zweimal gewaschen und in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte an einem FACSCalibur oder FACSCanto II Gerät der Firma BD Biosciences (Heidelberg), wobei innerhalb der ausgewählten Population 10.000 Zellen gemessen wurden. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe des Programms FCS Express V3 ausgewertet.

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung, Inkubationsbedingungen	Beschreibung
Anti-CTB	GeneTex, Alton Parkway, USA (GTX21003)	1:100 30 min, 4 °C	Maus, monoklonal
2F5	Polymun, Wien, AT (AB001)	1:588 2 h, Raumtemperatur	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 ELDKWA
4E10	Polymun, Wien, AT (AB004)	1:588 2 h, Raumtemperatur	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 NWFDIT

**Tab. B-4: Übersicht der für FACS-Analysen verwendeten Primär-Antikörper**

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung, Inkubationsbedingungen	Beschreibung
Anti-Maus- APC	eBioscience, Frankfurt (17-4012)	1:60 30 min, 4 °C	Affe, polyklonal
Anti-Human-PE	BD Pharmingen, Heidelberg (555787)	1:6,7 1 h, 4 °C	Maus, monoklonal

**Tab. B-5: Übersicht der für FACS-Analysen verwendeten Sekundär-Antikörper**

## B.2.5 Produktion virusähnlicher Partikel (VLP) in humanen Zellen

Zur Produktion von VLPs im humanen System wurden HEK293T bzw. 293-F Zellen wie unter B.2.2 beschrieben mit pcDNA3.1*syngaglIIIB*, welches für das HIV Capsidprotein Gag codiert, transfiziert. Die Pseudotypisierung von VLPs erfolgte durch Cotransfektion von pcDNA3.1*syngaglIIIB* mit der für das gewünschte rekombinante Protein codierenden DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 ohne Veränderung der eingesetzten Gesamt-DNA-Menge. Die Ernte der VLPs erfolgte, wie unter B.2.7 beschrieben, 72 h nach Transfektion mittels Ultrazentrifugation.

## B.2.6 Produktion von VLPs mit rekombinantem Bakulovirus

Die Produktion von VLPs mittels des rekombinanten Bakulovirus b-p55<sup>207</sup> erfolgte durch Infektion von High Five Insektenzellen. Der hierfür notwendige Virusstock wurde in SF9 Insektenzellen vermehrt.

### B.2.6.1 Vermehrung von Bakulovirusstocks

Für die Infektion von SF9 Zellen mit dem rekombinanten Bakulovirus b-p55<sup>207</sup> ließ man pro Kulturflasche (Fläche: 75 cm<sup>2</sup>)  $8 \cdot 10^6$  Zellen sedimentieren. Nach Entfernung des Mediums wurden zunächst 3,5 ml Infektionsmedium, bestehend aus 0,5 ml Virusstock und 3 ml Kultiviermedium (siehe Tabelle B-3), und nach 45 min Schwenken bei Raumtemperatur weitere 8,5 ml Kultiviermedium zugegeben. Die Virusernte erfolgte 7 Tage nach Infektion. Hierfür wurden die Zellen pelletiert (300-g, 5 min, Raumtemperatur) und der Virus-enthaltende Überstand als neuer Virusstock bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### B.2.6.2 Infektion von High Five Zellen zur Produktion von VLPs

Die Infektion von High Five Zellen mit dem rekombinanten Bakulovirus b-p55<sup>207</sup> zur Produktion von VLPs im Insektenzellsystem erfolgte analog der Infektion von SF9 Zellen (siehe B.2.6.1). Die Ernte der VLPs erfolgte, wie unter B.2.7 beschrieben, 72 h nach Transfektion mittels Ultrazentrifugation.

## B.2.7. Anreicherung von VLPs über Ultrazentrifugation

Die Anreicherung von VLPs, produziert im humanen System oder über rekombinantes Bakulovirus, erfolgte mittels Ultrazentrifugation.

Hierfür wurden Kulturüberstände 72 h nach Transfektion bzw. Infektion zur Abtrennung von Zellen zunächst für 20 min bei 3220-g und 4 °C zentrifugiert. Nach Auftragen der Überstände auf ein 30-

prozentiges Saccharosekissen (PBS, 30 % (w/w) Saccharose) konnten die enthaltenen VLPs durch 2 h Ultrazentrifugation bei 100.000·g und 4 °C angereichert werden. Die pelletierten VLPs wurden in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen und bei Bedarf bei -80 °C gelagert. Für verschiedene Analysemethoden erfolgte eine Lyse der VLPs durch Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 (finale Konzentration) für 15 min bei Raumtemperatur.

## B.3 Proteinbiochemie

### B.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge diverser Proben erfolgte nach der Methode von Bradford <sup>27</sup> mit dem *BioRad Protein Assay* (BioRad, München) nach Herstellerangaben. Als Standard diente stets eine BSA-Verdünnungsreihe.

### B.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE <sup>115</sup> wurden geeignete Mengen der zu untersuchenden Proben je nach Bedarf mit fünffach, zweifach oder einfach konzentriertem SDS Probenpuffer (62,5 mM Tris, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,5 mM EDTA, 5 % (w/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Standard diente der *Precision Plus Protein All Blue Standard* (BioRad, München) bzw. der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot). Je nach erwünschtem Auftrennungsbereich wurden 1 mm dicke Gele mit 10, 12,5 oder 15 % Acrylamid eingesetzt.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder einer Western-Blot Analyse (siehe B.3.3) oder einer Coomassie-Färbung unterzogen. Für letzteres wurde 30 min in Coomassie-Färbelösung (0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) geschüttelt und anschließend über Nacht in Entfärbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt.

### B.3.3 Western-Blot Analyse

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im *Semi-Dry-Verfahren* <sup>179,200</sup> unter Verwendung einer *BlueFlash Blotting-Apparatur* (Serva, Heidelberg) nach Herstellerangaben aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm; Schleicher Schuell, Dassel) transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran über Nacht bei 4°C in Blockierungspuffer (TTBS, 5% (w/v) Magermilchpulver) geschüttelt. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur mit einem spezifischen Primär-Antikörper (siehe Tabelle B-6) wurde dreimal mit TTBS (10 min, Raumtemperatur) gewaschen. Mit dem verwendeten Sekundär-Antikörper, *Horseradish Peroxidase* (HRP) oder *Alkaline Phosphatase* (AP) gekoppelt (siehe Tabelle B-7), wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TTBS und einem Waschschriff mit TBS wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran im Fall eines HRP gekoppelten Sekundär-Antikörpers mit Hilfe des *SuperSignal West Femto* oder *Pico* Substrates (Thermo Fisher Scientific, Bonn) im Geldokumentationssystem ChemiLux Imager (Intas, Göttingen) detektiert. Bei AP

gekoppelten Sekundär-Antikörpern erfolgte die Detektion nach Zugabe von *NBT/BCIP Stock Solution* (Roche, Mannheim) in AP-Färbepuffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) durch Bildung eines rötlichen Niederschlages.

Im Falle der Detektion mittels HRP konnten Membranen für die anschließende Analyse mit anderen Antikörpern regeneriert werden. Hierfür wurde 30 min bei 50 °C mit Regenerierungspuffer (62,5 mM Tris/HCl pH 6,7, 100 mM β-Mercaptoethanol, 2 % SDS) inkubiert und anschließend zweimal mit TTBS gewaschen.

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-CTB	Sigma, Deisenhofen (C 3062)	1:5000	Kaninchen, polyklonal
2F5	Polymun, Wien, AT (AB001)	1:2000	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 ELDKWA
4E10	Polymun, Wien, AT (AB004)	1:2000	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 NWFDIT
Anti-HIV-1 Pr55 <sup>gag</sup>	Wolf et al., 1990 <sup>219</sup>	1:500	Maus, monoklonal 13/5 (p24/55 <sup>IIIB</sup> , AS 147-154)
Anti-GST	Rockland, Gilbertsville, USA (100-101-200)	1:5000	Ziege, polyklonal
Anti-gp64	eBioscience, Frankfurt (14-6995)	1:500	Maus, monoklonal AcV5 (Bakulovirus env gp64)

**Tab. B-6: Übersicht der im Western-Blot verwendeten Primär-Antikörper**

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Kaninchen-HRP	Thermo Fisher Scientific, Bonn (31460)	1:5000	Ziege, polyklonal
Anti-Human-HRP	Dako, Hamburg (P0214)	1:1000	Kaninchen, polyklonal
Anti-Ziege-HRP	Dako, Hamburg (P0449)	1:5000	Kaninchen, polyklonal
Anti-Maus-AP	BioRad, München (170-6520)	1:2000	Ziege, polyklonal
Anti-Ziege-AP	Jackson, Newmarket, UK (305-055-003)	1:5000	Kaninchen, polyklonal

**Tab. B-7: Übersicht der im Western-Blot verwendeten Sekundär-Antikörper**

### B.3.4 Nachweis von Pr55<sup>Gag</sup> mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA)

Der Nachweis von Pr55<sup>Gag</sup> in nicht angereicherten Kulturüberständen erfolgte über einen HIV-1 Capsidantigen-spezifischen ELISA <sup>127</sup>. Diese Methode ist sehr sensitiv, jedoch spezifisch für

prozessiertes Capsid, weshalb die Quantifizierung der Pr55<sup>Gag</sup> Menge angereicherter VLPs im Allgemeinen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (siehe B.3.2) durchgeführt wurde.

Zur Ermittlung eines Faktors zwischen prozessiertem Capsid und Pr55<sup>Gag</sup> wurde rekombinante HIV-1 Protease (Bachem, Weil am Rhein) zu Hilfe gezogen. Dafür wurden angereicherte VLPs zunächst durch Zugabe von 0,5 % Triton X-100 für 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die VLPs in 50 bis 250fachem Volumen Proteasepuffer (0,1M NaAc, pH 5,0, 0,5 M NaCl, 4 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1% Triton X-100 (w/v)) aufgenommen und mit einem Überschuss an HIV-1 Protease für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Vollständigkeit der Prozessierung wurde im Western-Blot (siehe B.3.3) mit den im Capsidantigen-spezifischen ELISA verwendeten Antikörpern überprüft. Prozessierte und unprozessierte Proben wurden im ELISA verglichen.

### **B.3.5 Quantifizierung von Proteinen über SDS-PAGE**

Die Bestimmung der Pr55<sup>Gag</sup> Menge verschiedener, über Ultrazentrifugation angereicherter VLP-Chargen sowie die Bestimmung der CTB Menge in *E. coli* exprimierter und aufgereinigter CTB-Varianten, erfolgte über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe B.3.2). Die Pr55<sup>Gag</sup> bzw. CTB Bande wurde mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe quantifiziert. Zur Auswertung wurde das Programm *Gel-Pro Analyzer 6.0* (MediaCybernetics, Bethesda, USA) verwendet.

### **B.3.6 Aufbereitung von VLPs über Zonalzentrifugation im Saccharosegradient**

Über Ultrazentrifugation angereicherte VLPs wurden für diverse Analysen einer Zonalzentrifugation unterzogen.

Hierfür wurden die VLPs auf einen 10 bis 50 prozentigen Saccharosegradienten (PBS, 10-50 % (w/w) Saccharose) geschichtet. Nach 2,5 h Zentrifugation bei 100.000-g und 16 °C wurden, von oben beginnend, Fraktionen à 500 µl abgenommen. Für eine Analyse im Western-Blot wurden die einzelnen Fraktionen mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt (siehe B.3.7). In allen anderen Fällen wurden die VLP enthaltenden Fraktionen zusammengeführt und zur Entfernung der Saccharose mit PBS versetzt und erneut bei 100.000-g und 4 °C für 2 h zentrifugiert. Die pelletierten VLPs wurden in einem geeigneten Volumen PBS aufgenommen und bei Bedarf bei -80 °C gelagert.

### **B.3.7 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure**

Zu fällende Proben wurden mit einem Viertel Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt, für 10 min bei 4 °C inkubiert und anschließend bei 20.000-g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 200 µl kaltem Aceton gewaschen (20.000-g, 4 °C, 5 min) und ca. 10 min bei 95 °C getrocknet. Für die anschließende Analyse im Western-Blot wurden die gefällten Proteine in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit 5 µl fünffach konzentriertem SDS Probenpuffer (siehe B.3.2) versetzt. Im Falle einer Gelbfärbung des Puffers (niedriger pH) wurde der pH durch Zugabe von 1 M Tris/HCl pH 8,0 neutralisiert.

### **B.3.8 Quantifizierung der Beladung von VLPs mit chimärem CTB**

Zur Bestimmung der Menge an chimären CTB Proteinen pro VLP wurden über Zonalzentrifugation aufbereitete VLPs (siehe B.3.6) eingesetzt. Dabei wurde die Menge an Pr55<sup>Gag</sup> wie unter B.3.5

beschrieben ermittelt. Die Quantifizierung von CTB erfolgte mittels Western-Blot Analyse (siehe B.3.3). Hierfür wurde ein zur Bestimmung der Pr55<sup>Gag</sup> Menge identisches Volumen derselben VLP-Charge aufgetragen. Das enthaltene CTB wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe von kommerziellem CTB (Sigma, Deisenhofen), nach spezifischer Markierung über einen anti-CTB Antikörper (siehe Tabelle B-6), quantifiziert. Zur Auswertung wurde das Programm *Gel-Pro Analyzer 6.0* (MediaCybernetics, Bethesda, USA) verwendet. Bei der Ermittlung der Stöchiometrie CTB pro VLP wurde nach Briggs et al., 2004<sup>29</sup> ein Verhältnis von 5000 Pr55<sup>Gag</sup> Proteinen pro VLP mit einbezogen.

### B.3.9 Immunogoldmarkierung und elektronenmikroskopische Aufnahme von VLPs

Zur Visualisierung chimärer CTB Proteine auf der Oberfläche von VLPs wurden Immunmarkierungen mit anschließender Analyse im Elektronenmikroskop durchgeführt.

Hierfür wurden 300 µg (bezogen auf Pr55<sup>Gag</sup>, siehe B.3.5) über Ultrazentrifugation angereicherte VLPs mit dem gewünschten Primär-Antikörper (siehe Tabelle B-8) 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Um anschließend ungebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die markierten VLPs über Zonalzentrifugation im Saccharosegradient (siehe B.3.6) aufbereitet. Alle weiteren Schritte, inklusive der Inkubation mit einem Gold-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle B-9), wurden vom Zentralen Labor für Elektronenmikroskopie (ZEM) der Universität Regensburg durchgeführt. Alternativ wurde die gesamte Markierung, ohne zwischengeschaltete Zonalzentrifugation, vom ZEM durchgeführt.

Als Kontrolle für die spezifische Markierung wurden Proben nur mit Sekundär-Antikörper bzw. mit einem nicht für den Primär-Antikörper spezifischen Sekundär-Antikörper behandelt. Als weitere Kontrolle dienten VLPs ohne chimäres CTB auf der Oberfläche.

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-CTB	Sigma, Deisenhofen (C 3062)	1:500 - 1:5000	Kaninchen, polyklonal
2F5	Polymun, Wien, AT (AB001)	1:100 – 1:1000	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 ELDKWA

**Tab. B-8: Übersicht der für Immunogoldmarkierungen verwendeten Primär-Antikörper**

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Kaninchen-Gold	Aurion, Biotrend, Köln (810.066)	1:20	Ziege, polyklonal 10 nm Gold
Anti-Human-Gold	Aurion, Biotrend, Köln (810.011)	1:20	Ziege, polyklonal 10 nm Gold

**Tab. B-9: Übersicht der für Immunogoldmarkierungen verwendeten Sekundär-Antikörper**

### B.3.10 Chemische Quervernetzung chimärer CTB Proteine auf der VLP-Oberfläche

Um die Pentamerisierung chimärer CTB Proteine auf der Oberfläche von VLPs zu überprüfen, wurde eine chemische Quervernetzung benachbarter Oberflächenproteine durchgeführt.

Hierfür wurden über Ultrazentrifugation angereicherte VLPs mit einer finalen Konzentration von 4 oder 8 mM Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate (BS<sup>3</sup>, Thermo Fisher Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben behandelt. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von Tris/HCl pH 7,5 (Endkonzentration 20mM) und weiteren 15 min bei Raumtemperatur abgestoppt. Für eine Analyse im Western-Blot wurden die Proben mit einfachem Volumen fünffach konzentriertem SDS Probenpuffer (siehe) versetzt (final also 2,5fach konzentriert) und 5 min bei 95 °C erhitzt. Kommerzielles CTB (Sigma, Deisenhofen) sowie nicht mit BS3 behandelte Proben dienten als Kontrolle.

### B.3.11 Proteinexpression in *E. coli*

Die Produktion rekombinanter CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne erfolgte mit dem pET-49b(+) Vektorsystem (Novagen, Darmstadt) in den Bakterienstämmen *E. coli* BL21(DE3) (New England Biolabs, Frankfurt, Nr. C25271) bzw. *E. coli* Origami 2(DE3) (Novagen, Darmstadt, Nr. 71345-3). Das Kontrollprotein GST wurde mit Hilfe des Vektors pGEX-KG (GE Healthcare, München) in *E. coli* BL21(DE3) produziert.

Aus einer über-Nacht-Kultur der jeweiligen Bakterien wurde frisches LB-Medium angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Tabelle B-10 enthält eine Übersicht der optimierten Expressionsbedingungen jedes Konstruktes. Die Proteinproduktion wurde bei der jeweils angegebenen OD<sub>595</sub> durch Zugabe von IPTG (finale Konzentration 1 mM) induziert. Nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Ernte der Bakterien durch 15 min Zentrifugation bei 6.000-g und 4 °C.

Protein	Bakterienstamm	Antibiotika	Kulturvolumen pro 5 l Kolben	OD <sub>595</sub> bei Induktion	Temperatur bei Induktion	Inkubationszeit
GST	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Amp	400 ml	0,6	37 °C	2 h
CTB <sub>GST</sub>	<i>E. coli</i> Origami 2(DE3)	Kan, Tet, Strep	500 ml	0,5	20 °C	1,5 h
mCTB <sub>GST</sub>	<i>E. coli</i> Origami 2(DE3)	Kan, Tet, Strep	500 ml	0,5	20 °C	1,5 h

**Tab. B-10: Übersicht der optimierten Expressionsbedingungen**

Das Bakterienpellet wurde in 20 ml kaltem NETN-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 % (v/v) Nonidet P-40, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF) resuspendiert, bei -80 °C eingefroren, wieder aufgetaut, mit 400 µl Lysozym (50 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris, pH 8,0) versetzt und 30 min bei 4 °C unter Rotieren inkubiert. Nach Ultraschall-Behandlung (Bandelin Sonoplus, 5 min, Cycle 5, Intensität 60 %, auf Eis) wurden unlösliche Bestandteile durch 1 h Zentrifugation bei 20.000-g und 4 °C abgetrennt.

Da die rekombinanten CTB-Varianten als GST-Fusionsproteine konstruiert wurden, konnte zur affinitätschromatographischen Aufreinigung der Proteine Glutathion-Sepharose (Glutathion-Sepharose 4B, GE Healthcare, München) verwendet werden. Pro 20 ml Lysat wurden dabei 0,25 ml Glutathion-Sepharose eingesetzt. Zur Äquilibrierung wurde die Sepharose 3x mit 25 ml NETN-Puffer gewaschen (5x invertieren, 500-g, 7 min, 16 °C). Nach Inkubation von Lysat und Sepharose über Nacht bei 4 °C unter Rotieren wurde erneut zentrifugiert und das Protein-tragende Sepharose-Pellet zunächst dreimal mit 25 ml NETN-Puffer, dann dreimal mit 25 ml Waschpuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Zur Elution wurde die Glutathion-Sepharose in eine Säule überführt, in einem der Sepharose entsprechenden Volumen Elutionspuffer (Waschpuffer mit 20 mM Glutathion) resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnten Elutionsfraktionen à 1 ml gesammelt werden. Durch wiederholte Resuspension in Elutionspuffer wurden auf diese Weise so lange Fraktionen gesammelt bis eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe B.3.1) auf eine deutliche Abnahme der Konzentration eluierten Proteins hinwies.

Die einzelnen Schritte der Proteinproduktion und Aufreinigung wurden durch Analyse entnommener Aliquots mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western-Blot kontrolliert.

Für Immunisierungsexperimente erfolgte die Proteinproduktion in größerem Maßstab. Hierbei wurde die Menge aller verwendeten Reagenzien und Lösungen proportional zum eingesetzten Kulturvolumen erhöht. Proteinenthaltende Elutionsfraktionen wurden vereinigt und dreimal gegen je 3 l PBS dialysiert (Größenausschluss abgestimmt auf die jeweilige Proteingröße). Anschließend filtrierte man über einen 0,22 µm Sterilfilter speziell für proteinhaltige Proben (Millex GP, Millipore, Bedford, USA) und quantifizierte die Menge an gereinigtem Protein mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (siehe B.3.2). Unter Verwendung von *Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Devices* (Millipore, Bedford, USA) konnte die für Immunisierungen erforderliche Konzentration, überprüft mittels erneuter Quantifizierung über SDS-PAGE, eingestellt werden.

### **B.3.12 GM1 ELISA**

Um die Funktionalität rekombinater CTB Proteine zu überprüfen, wurden diese einem ELISA unterzogen, bei dem Platten mit dem Monosialogangliosid GM1 beschichtet wurden. Die Detektion an GM1 gebundenen Proteins erfolgte mit einem CTB-spezifischen, einem GST-spezifischen sowie mit dem HIV-1 gp41 MPER-spezifischen Antikörper 2F5.

Um eine Konzentration von 2,5 ng/µl GM1 (Sigma, Deisenhofen) zu erhalten, wurde dieses in Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub> pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) verdünnt. Die verwendeten 96-Napf Maxisorp Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer mit 100 µl Verdünnung pro Napf inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (300µl pro Napf und Waschschrift) der beschichteten Platten mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) erfolgte eine einstündige Inkubation mit je 200 µl Blockierungspuffer (PBS, 0,5 % Gelatine). Von den zu untersuchenden Proteinen wurden serielle 1:10 Verdünnungen (Start mit 0,1 µg/µl) in PBS hergestellt. Die Platten wurden mit 100 µl Verdünnung pro Napf 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 100 µl 2F5, anti-CTB oder anti-GST Antikörper (siehe Tabelle B-11), jeweils verdünnt in Verdünnungspuffer (PBS, 0,05 % Gelatine). Nach zehnmalem Waschen wurde mit je

100 µl eines, für den verwendeten Primär-Antikörper spezifischen, HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (siehe Tabelle B-11), verdünnt in Verdünnungspuffer, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und wieder zehnmal gewaschen. Das Anfärben der Antikörperkonjugate erfolgte mit 100 µl TMB-Substratlösung (BD Pharmingen, Heidelberg). Nach ausreichender Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (deutliche blaue Farbentwicklung) wurde die Reaktion mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-CTB	Sigma, Deisenhofen (C 3062)	1:1.000	Kaninchen, polyklonal
Anti-GST	Rockland, Gilbertsville, USA (100-101-200)	1:1.500	Ziege, polyklonal
2F5	Polymun, Wien, AT (AB001)	1:200	Human, monoklonal Epitop: HIV-1 gp41 ELDKWA
Anti-Kaninchen-HRP	Thermo Fisher Scientific, Bonn (31460)	1:2.000	Ziege, polyklonal
Anti-Ziege-HRP	Dako, Hamburg (P0449)	1:10.000	Kaninchen, polyklonal
Anti-Human-HRP	Dako, Hamburg (P0214)	1:6.000	Kaninchen, polyklonal

**Tab. B-11: Übersicht der im GM1 ELISA verwendeten Antikörper**

### B.3.13 CTB ELISA

Die Qualität der Bindung des in diversen Experimenten eingesetzten CTB-spezifischen Antikörpers C 3062 (Kaninchen, polyklonal; Sigma, Deisenhofen) an die verschiedenen rekombinanten CTB-Varianten wurde mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs untersucht.

Zum Beschichten der verwendeten 96-Napf Maxisorp Platten (Nunc, Wiesbaden) wurde ein GST-spezifischer Antikörper (siehe Tabelle B-11) in Carbonatpuffer (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5 eingestellt mit 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) verdünnt. Die Platten wurden mit 100 µl Verdünnung pro Napf über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Von den zu untersuchenden Proteinen wurden serielle 1:10 Verdünnungen (Start mit 0,1 µg/µl) in PBS hergestellt. Nach dreimaligem Waschen (300 µl pro Napf und Waschschrift) der beschichteten Platten mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) wurde mit 100 µl Probenverdünnung pro Napf 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit je 100 µl anti-CTB Antikörper (siehe Tabelle B-11), jeweils verdünnt in Verdünnungspuffer (PBS, 1 % BSA). Nach zehnmalem Waschen wurde mit je 100 µl eines, für den verwendeten Primär-Antikörper spezifischen, HRP-gekoppelten Sekundär-Antikörpers (siehe Tabelle B-11), verdünnt in Verdünnungspuffer, 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und wieder zehnmal gewaschen. Das Anfärben der Antikörperkonjugate erfolgte mit 100 µl TMB-Substratlösung (BD Pharmingen, Heidelberg). Nach ausreichender Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (deutliche

blaue Farbentwicklung) wurde die Reaktion mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

### **B.3.14 Chemische Kopplung von löslichem CTB an VLPs**

Verschiedene rekombinante CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne wurden mit Hilfe chemischer Reaktionen auf die Oberfläche von VLPs aufgebracht.

#### **B.3.14.1 Kopplung mittels Biotinylierung und Streptavidin**

Zunächst wurden sowohl über Ultrazentrifugation angereicherte VLPs als auch kommerzielles CTB (Sigma, Deisenhofen) unter Verwendung von Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Fisher Scientific, Bonn) nach Herstellerangaben biotinyliert. Nach Abtrennung von ungebundenem Biotin über *Zeba Desalt Spin Columns* (Thermo Fisher Scientific, Bonn) erfolgte die Kopplung beider Komponenten analog Kang et al., 2003 durch Zugabe von Streptavidin<sup>103</sup>. Zur Analyse wurden die gekoppelten VLPs u. a. einer Immunogoldmarkierung unterzogen (siehe B.3.9).

#### **B.3.14.2 Kopplung mittels Sulfo-NHS**

Die Kopplung von CTB an VLPs mittels Sulfo-NHS und EDC (Thermo Fisher Scientific, Bonn) erfolgte nach Herstellerangaben. Die jeweils eingesetzte rekombinante CTB-Variante wurde dabei zunächst in einen aminreaktiven NHS-Ester überführt. Die Reaktion der NHS-Ester mit freien Aminogruppen auf VLPs resultierte dann in der kovalenten Bindung zwischen CTB und VLPs. Für Analysen bzw. zur weiteren Verwendung wurden die gekoppelten VLPs über Zonalzentrifugation im Saccharosegradient (siehe B.3.6) aufbereitet oder einer Immunogoldmarkierung unterzogen (siehe B.3.9).

### **B.3.15 Test *in vivo* eingesetzter Proben auf Endotoxin**

Die Nicht-Überschreitung der zulässigen Menge an bakteriellem Endotoxin<sup>30</sup> aller *in vivo* eingesetzter Proben wurde unter Verwendung des *Limulus Amebocyte Lysate* QCL-1000 (Lonza, Basel, CH) nach Herstellerangaben kontrolliert.

## **B.4 Immunologie**

### **B.4.1 Haltung und Immunisierung von Versuchstieren**

Für Immunisierungsstudien im Mausmodell wurden weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrl (H-2<sup>d</sup>) (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage des Universitätsklinikums Regensburg gehalten. Falls nicht anders vermerkt, folgten auf eine Grundimmunisierung (*Prime*) im Alter von 8 Wochen zwei weitere Immunisierungen (*Boost*), vier und sieben Wochen nach dem *Prime*. Zur intramuskulären (i.m.) und nasalen (i.n.) Immunisierung wurden die Tiere zunächst mittels des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter, Unterschleißheim) betäubt. Für i.m. Immunisierungen wurde die Region um die Einstichstelle rasiert und die gewünschte Menge eines entsprechenden Antigens in einem Volumen von je 50 µl langsam in beide Schienbeinmuskeln

(*tibialis anterior*) injiziert. Bei i.n. Verabreichung wurde das entsprechende Antigen, in einem Volumen von 25 µl in die Nase der betäubten Mäuse eingetrofft.

Die Immunisierung der Kaninchen (*New Zealand White*) wurde an der *University of Cambridge* in der Arbeitsgruppe von Professor Jonathon Heeney durchgeführt.

## B.4.2 Auslesen humoraler Immunantworten

### B.4.2.1 Gewinnung von Seren

Soweit nicht anders vermerkt, wurde den Versuchstieren jeweils einen Tag vor *Prime* und erstem *Boost* sowie 2 Wochen nach dem erstem und 1 Woche nach dem zweitem *Boost* Blut entnommen. Dazu wurde die Schwanzvene nach Erwärmung mittels einer Rotlichtlampe mit einem sterilen Skalpell angeritzt und 100-500 µl Blut wurden direkt in einem Probengefäß aufgefangen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut zunächst 1 h bei 37 °C und anschließend 1 h bei 4 °C inkubiert. Der klare Überstand nach Zentrifugation (20.000-g, 4 °C, 15 min) wurde in frische Probengefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Gewinnung von Seren bei Kaninchen erfolgte an der *University of Cambridge* in der Arbeitsgruppe von Professor Jonathon Heeney.

### B.4.2.2 Gesamtimmunglobulin ELISA

Die Bestimmung Antigen-spezifischer Antikörpertiter (Gesamtimmunglobulin) von Maus- bzw. Kaninchenserum erfolgte mittels Endpunktdilutions-ELISA. Hierbei wurden Antworten gegen HIV-1 IIB Pr55<sup>Gag</sup>, CTB oder das MPER Mimotop ausgelesen.

Zum Beschichten der verwendeten 96-Napf Maxisorp Platten (Nunc, Wiesbaden) wurde das entsprechende Antigen (siehe Tabelle B-12) in Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) verdünnt. Die Platten wurden mit 100 µl Verdünnung pro Napf über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Von den Seren wurden 12 serielle 1:2 Verdünnungen (Start je nach Versuch mit 1:10, 1:20, 1:100 usw., maximale Verdünnung 1:3.072.000) in Verdünnungspuffer (PBS, 2 % (v/v) FCS; 3 % (v/v) Tween-20) hergestellt. Nach fünfmaligem Waschen (300 µl pro Napf und Waschschrift) der beschichteten Platten mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) wurden pro Napf 100 µl Serumverdünnung aufgetragen. Im Anschluss an 2 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde mit je 100 µl eines HRP-gekoppelten anti-Maus Ig Antikörpers (Kaninchen, polyklonal; Dako, Hamburg; 1:2.000 verdünnt in Verdünnungspuffer) bzw. 100 µl eines HRP-gekoppelten anti-Kaninchen Ig Antikörpers (Ziege, polyklonal; Thermo Fisher Scientific, Bonn; 1:2.000 verdünnt in Verdünnungspuffer) 1 h bei 37 °C inkubiert und wiederum fünfmal gewaschen. Zum Entwickeln einer Farbreaktion wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD Pharmingen, Heidelberg) zugegeben. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu einer deutlichen blauen Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Der Antikörpertiter wurde ermittelt als der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnung, bei der die gemessene Absorption gerade noch dreimal so hoch ist, wie die des auf derselben Platte parallel gemessenen Präimmunserums.

Bezeichnung	Bezugsquelle	finale Konzentration
HIV-1 IIIB Pr55 <sup>Gag</sup> VLP	Eigenproduktion	1ng/µl
CTB	Sigma, Deisenhofen	2,5ng/µl
MPER Peptid	Pepscan, Lelystad, NE (Sequenz siehe E.3)	2,5ng/µl

**Tab. B-12: Übersicht der zur Beschichtung verwendeten Antigene**

### B.4.2.3 Auslesen neutralisierender Aktivität

Zum Auslesen der neutralisierenden Aktivität von Seren mit MPER-spezifischen Antikörpern wurden die Proben einem TZM.bl Neutralisationstest unterzogen (durchgeführt vom *CAVD Neutralizing Antibody Laboratory, Harvard Medical School*). Dabei werden TZM.bl Zellen, die neben CD4 beide möglichen Corezeptoren für eine HIV-Infektion tragen, zunächst mit den potentiell neutralisierenden Seren und anschließend mit verschiedenen Virus Isolaten inkubiert. Der Messung erfolgter Infektion dient ein, durch den HIV LTR Promotor regulierter Reporter<sup>119</sup>. Untersucht wurde die Neutralisation folgender *Clades*: SHIV-89.6P (*Tier 2, Clade B*), MN (*Tier 1, Clade B*), MW965.26 (*Tier 1, Clade C*) und TV1.21 (*Tier 1, Clade C*).

### B.4.3 Auslesen mukosaler Immunantworten

#### B.4.3.1 Bronchoalveolare Lavage (BAL)

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Versuchstiere acht Tage nach der letzten Immunisierung durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet. Bei den auf Styropor fixierten Mäusen wurde nach Desinfektion des Halsbereichs mit Ethanol durch Entfernung von Fell und Gewebe die *Trachea* freigelegt. Mittels eines kleinen, kopfnahen Schnittes wurde eine abgestumpfte Kanüle ca. 6 mm tief in die *Trachea* eingeführt und mit einem Stück Bindfaden fixiert. Über die Kanüle wurde die Lunge mit insgesamt 1 ml 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) zweimal gespült und die Spülflüssigkeit in ein Probengefäß überführt. Der klare Überstand nach Zentrifugation (20.000-g, 4 °C, 15 min) wurde in frischen Probengefäßen bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

#### B.4.3.2 IgA Antikörper ELISA

Die Bestimmung Antigen-spezifischer IgAs erfolgte mittels Endpunktdilutions-ELISA. Hierbei wurden Antworten gegen HIV-1 IIIB Pr55<sup>Gag</sup>, CTB oder das MPER Mimotop ausgelesen.

Zum Beschichten der verwendeten 96-Napf Maxisorp Platten (Nunc, Wiesbaden) wurde das entsprechende Antigen (siehe Tabelle B-12) in Carbonatpuffer (0,2 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,5 eingestellt mit 0,2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) verdünnt. Die Platten wurden mit 100 µl Verdünnung pro Napf über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer inkubiert. Von den zu untersuchenden BALs wurden serielle 1:2 Verdünnungen (Start je nach Versuch mit 1:2, 1:10, 1:100 usw., maximale Verdünnung 1:3.072.000) in Verdünnungspuffer (PBS, 2 % (v/v) FCS, 3 % (v/v) Tween-20) hergestellt. Nach fünfmaligem Waschen (300 µl pro Napf und Waschschrift) der beschichteten Platten mit Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) wurden 100 µl der hergestellten BAL Verdünnungen aufgetragen. Im Anschluss an 2 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen. Danach wurde mit je 100 µl

eines Biotin-gekoppelten anti-Maus IgA Antikörpers (Ratte, monoklonal; BD Pharmingen, Heidelberg; 1:1000 verdünnt in Verdünnungspuffer) 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend zehnmal gewaschen. Mit je 100 µl eines Streptavidin-HRP-Konjugates (Roche, Mannheim; verdünnt auf 0,05 U/ml in Verdünnungspuffer) wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut sechsmal gewaschen. Zum Entwickeln einer Farbreaktion wurden je 100 µl TMB-Substratlösung (BD Pharmingen, Heidelberg) zugegeben. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur bis zu einer deutlichen blauen Farbentwicklung wurde die Reaktion mit 50 µl 1 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt und die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch bestimmt.

Der Antikörpertiter wurde ermittelt als der reziproke Wert derjenigen BAL-Verdünnung, bei der die gemessene Absorption gerade noch zweimal so hoch ist, wie die einer auf derselben Platte parallel gemessenen Negativkontrolle. Als Negativkontrolle dienten BALs nicht immunisierter Mäuse.

## **B.4.4 Auslesen zellulärer Immunantworten**

### **B.4.4.1 Generierung primärer Maussplenozyten**

Direkt im Anschluss an die bronchoalveolare Lavage (siehe B.4.3.1) wurde die Milz jeder Maus unter Verwendung eines sterilen Präparationsbestecks entnommen und in 5 ml Waschpuffer (PBS, 1 % FCS) aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen, für die Zellkultivierung gängigen Bedingungen ausgeführt. Die Milzen wurden inklusive Waschpuffer in Petrischalen überführt und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze in einem Nylonfilter (100 µm Porengröße) zerrieben. Nach Überführung der entstandenen Zellsuspension in ein 50 ml Gefäß wurden die Zellen pelletiert (300-g, Raumtemperatur, 5 min), zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) in 5 ml Lysepuffer (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 erneut pelletiert (300-g, Raumtemperatur, 5 min). Die zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschenen (300-g, Raumtemperatur, 5 min) Zellen wurden in Kompletmedium (RPMI-1640, 5 % FCS, 100 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM, 50 µM β-Mercaptoethanol) aufgenommen und unmittelbar zur Bestimmung IFN<sub>γ</sub> produzierender Splenozyten mittels intrazellulärer IFN<sub>γ</sub> Färbung und anschließender FACS Analyse (siehe B.4.4.2) eingesetzt.

### **B.4.4.2 Intrazelluläre IFN<sub>γ</sub> Färbung mit FACS Analyse**

Die Anzahl IFN<sub>γ</sub> produzierender, CD8<sup>+</sup> Zellen nach Restimulation der Splenozyten ist ein Maß für die Stärke der durch die Immunisierung induzierten zellulären Immunantwort. Die Quantifizierung IFN<sub>γ</sub> produzierender, CD8<sup>+</sup> Zellen erfolgte mittels intrazellulärer IFN<sub>γ</sub> Färbung und anschließender FACS Analyse.

Hierfür wurden die zu untersuchenden primären Maussplenozyten auf eine Konzentration von 2·10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellt und in eine 96-Napf Zellkulturplatte mit Flachboden (100 µl pro Napf) überführt. Zur Restimulation der HIV-1 IIB Pr55<sup>Gag</sup> spezifischen zellulären Immunantwort wurden 100 µl Stimulationslösung (Kompletmedium (siehe B4.4.1), 0,02 mM A9I Peptid (Sequenz siehe E.3) 0,01 µg/µl Brefeldin A (BFA)) zugegeben. Dabei verhindert das zugesetzte BFA die IFN<sub>γ</sub> Sezernierung und ermöglicht so die intrazelluläre Anreicherung und somit bessere Anfärbung des Proteins in den stimulierten Zellen. Als Negativkontrolle wurden Splenozyten mit 100 µl Kompletmedium (inklusive

BFA) ohne Zugabe des Peptids behandelt. Zur unspezifischen Stimulation (Positivkontrolle) wurden 100 µl einer PMA/Iono-Lösung (Komplettmedium, 0,1 µg/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), 1 µg/ml Ionomycin (Iono)) zugegeben. Nach 6h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer (PBS, 1 % FCS, 1 g/l NaN<sub>3</sub>) gewaschen (300-g, 5 min, Raumtemperatur) und anschließend in eine 96-Napf Platte mit Rundboden überführt.

Im Folgenden wurde mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter, spezifischer Antikörper (siehe Tabelle B-13) eine Oberflächenfärbung der CD4- und CD8-Rezeptoren sowie eine intrazelluläre Färbung von IFN<sub>γ</sub> durchgeführt. Um zunächst die Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Zellen für 10 min bei 4 °C mit je 100 µl CD16/32 Antikörperlösung (1:100 verdünnt in FACS-Puffer) inkubiert. Danach wurden je 10 µl anti-CD4-FITC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer) und anti-CD8-APC (1:20 verdünnt in FACS-Puffer) zugegeben. Nach Inkubation für 25 min bei 4 °C im Dunkeln wurden die angefärbten Splenozyten zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer-II (PBS, 1 mg/ml NaN<sub>3</sub>) gewaschen (300-g, 5 min, Raumtemperatur), anschließend in 250 µl Cytofix/Cytoperm (PBS, 4 % PFA, 1 % Saponin) aufgenommen und weitere 20 min bei 4 °C inkubiert. Zur Anfärbung von intrazellulärem IFN<sub>γ</sub> wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen (500 g, 5 min, 4 °C) mit je 200 µl Perm/Wasch-Puffer (PBS, 0,1 % Saponin) mit 100 µl anti- IFN<sub>γ</sub>-PE (1:200 verdünnt in Perm/Wasch-Puffer) behandelt und für 25 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit je 200 µl Perm/Wasch-Puffer (500-g, 5 min, 4 °C) wurden die Splenozyten in einer geeigneten Menge FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACScalibur; BD Pharmingen, Heidelberg) analysiert.

Bezeichnung	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Maus CD16/32	BD Pharmingen, Heidelberg (01241A)	1:100	Ratte, monoklonal Erkennung von Maus Fc-Rezeptoren
Anti-Maus CD8a APC-gekoppelt	BD Pharmingen, Heidelberg (01049A)	1:200	Ratte, monoklonal
Anti-Maus CD4 FITC-gekoppelt	BD Pharmingen, Heidelberg (01064D)	1:200	Ratte, monoklonal
Anti-Maus IFN <sub>γ</sub> PE-gekoppelt	BD Pharmingen, Heidelberg (18115A)	1:200	Ratte, monoklonal

**Tab. B-13: Übersicht der zum Auslesen zellulärer Immunantworten verwendeten Antikörper**

## C Ergebnisse

### C.1 Konzeption und biochemische Charakterisierung chimärer CTB-Varianten

Um eine HIV-Infektion zu verhindern, ist es von entscheidender Bedeutung, die Fusion der Membranen von Virus und Wirtszelle zu unterbinden. Eine effektive Vakzine sollte daher fähig sein, breit neutralisierende Antikörper (bNAK) gegen das *Envelope* (Env) Protein zu induzieren. Grundvoraussetzung dafür ist die Präsentation essentieller Epitope. Volllänge-Env erfüllt diese Bedingung u. a. aufgrund einer Serie von Konformationsänderungen während des Fusionsprozesses unzureichend<sup>191,98,65,114</sup>. Daher wurden in dieser Arbeit Antigene entworfen, bei denen ein kurzer Env Bereich mit Epitopen bekannter Breitneutralisierer (Mimotop) dem Immunsystem über ein Trägerprotein präsentiert wird. Hierfür wurde CTB, die nicht toxische Untereinheit des Cholera Toxins, ausgewählt. Wie in A.2 ausführlich beschrieben, ist CTB als molekulares Adjuvans bekannt und sollte daher zusätzlich zur Trägerfunktion die Mimotop-spezifische Immunantwort unterstützen. Das Anfügen einer Transmembrandomäne ermöglicht die Präsentation chimärer CTB-Varianten auf der Zelloberfläche bzw. den Einbau in Virus-ähnliche Partikel (*virus like particles*, VLPs), wodurch sich die natürliche Virussituation imitieren lässt.

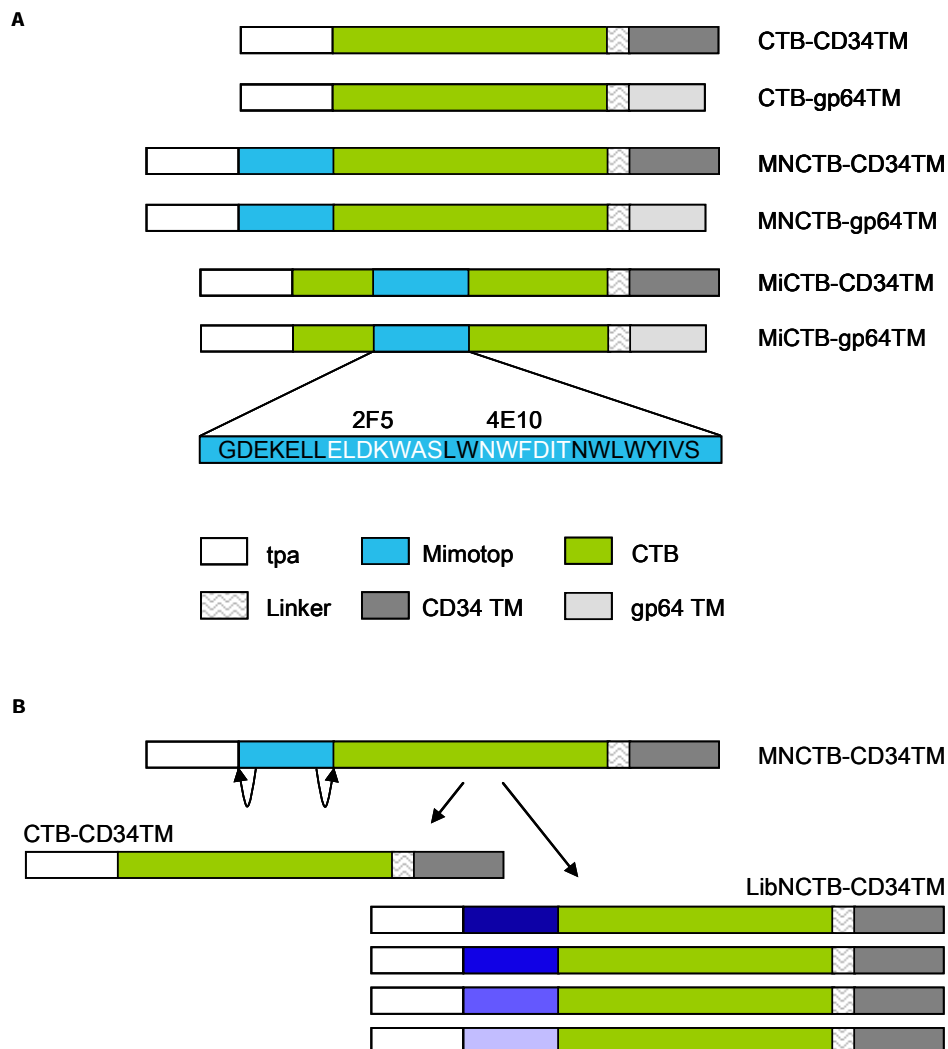
#### C.1.1 Präsentation von chimärem CTB auf der Oberfläche virusähnlicher Partikel mittels Transmembrandomäne

##### C.1.1.1 Entwicklung chimärer CTB-Varianten mit Transmembrandomäne

Bei dem Entwurf der Konstrukte wurden diverse Gesichtspunkte berücksichtigt. Um eine hohe Produktionsrate in den humanen Zelllinien HEK293T bzw. 293-F (siehe B.2.1) zu erzielen, wurden die Nukleinsäuresequenzen dem humanen Kodon-Gebrauch angepasst. Das Anbringen der Signalsequenz des *tissue plasminogen activator* (tpa) am Aminoterminus gewährleistet in Kombination mit einer Transmembrandomäne (TM) die Präsentation auf der Zelloberfläche. Ein flexibler Glycin-Serin *Linker* zwischen CTB und der carboxyterminalen Transmembrandomäne sollte es CTB ermöglichen, trotz der Fixierung auf der Zelloberfläche funktionale Pentamere zu bilden.

Um einen möglichst effektiven Einbau der Proteine in VLPs zu erzielen, wurden zwei verschiedene Transmembrandomänen getestet. Bei der Auswahl wurden zahlreiche Kandidaten bezüglich verschiedener Faktoren analysiert. Um die Pentamerisierung von CTB nicht zu beeinträchtigen, sollte zum einen aus sterischen Gründen der cytoplasmatische Anteil nicht zu lange sein, zum anderen darf die TM selbst keine Oligomere oder Komplexe mit anderen zellulären Proteinen formen. Weiterhin wurden bereits in der Literatur bekannte Daten zur Zytotoxizität sowie zur Effizienz des Einbaus in die Plasmamembran bzw. in virale Partikel oder Viren berücksichtigt. Bei Beachten der genannten Kriterien stellten sich die Transmembrandomänen des zellulären CD34 und des viralen gp64 als geeignete Kandidaten heraus<sup>57,197,50,51,213,28,153</sup>.

Das ausgewählte Mimotop ist 30 Aminosäuren lang und enthält die Kernepitope der beiden bNAKs 2F5 und 4E10<sup>169, 194, 231</sup>. Bei der Festlegung der Mimotop-Insertionsposition innerhalb von CTB wurde mit einbezogen, dass die Epitope zum einen gut zugänglich sein müssen, zum anderen aber keine Bereiche betroffen sein dürfen, die an der Pentamerisierung oder der Bindung an den Gangliosid-Rezeptor GM1 beteiligt sind. So wurde das Env Mimotop nach Analyse bekannter Strukturdaten von CTB<sup>227</sup> an den Aminoterminus von CTB (zwischen tpa und CTB) gehängt. Alternativ wurde eine Oberflächen-exponierte Schleife von CTB (8 Aminosäuren) durch das Mimotop ersetzt<sup>9,10</sup>. Abb. C-1 A zeigt eine schematische Darstellung der entworfenen CTB-Varianten mit Transmembrandomäne sowie die Nukleinsäuresequenz des Mimotops. Dieses enthält, neben den bereits genannten Epitopen für 2F5 und 4E10, am 3'- und 5'-Ende jeweils eine *Bsm*BI Erkennungs-Sequenz, die zusammen die nahtlose Entfernung oder den Austausch des Mimotops ermöglichen. Auf diese Weise könnte auch eine beliebige Mimotop-Bibliothek eingebaut werden (siehe Abb. C-1 B).



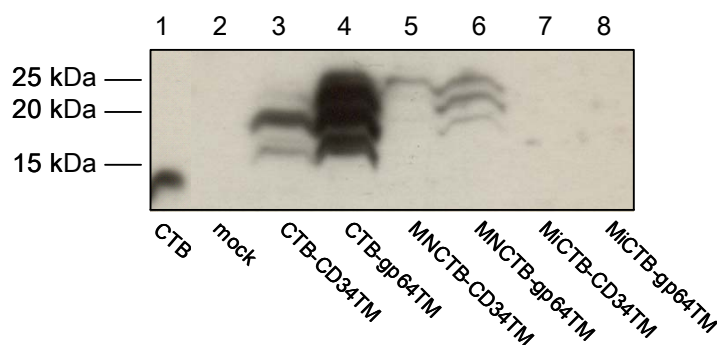
**Abb. C-1: Schematische Darstellung der entworfenen chimären CTB-Varianten mit Transmembrandomäne.**

(A) Alle Konstrukte tragen aminoterminal die Signalsequenz des *tissue plasminogen activator* (tpa, weiß), welche während der Proteinproduktion den sekretorischen Weg vermittelt. Das 30 AS lange Mimotop (blau) enthält die Kernepitope der bekannten bNAbs 2F5 und 4E10 (weißer Text) und befindet sich entweder aminoterminal von CTB (MNCTB) oder ersetzt eine interne 8 AS lange Region des Proteins (MiCTB). Eine flexible *Linker*-Region (gewellt) verbindet CTB mit der Transmembrandomäne (TM) von CD34 (dunkelgrau) bzw. gp64 (hellgrau). (B) Die im Mimotop enthaltenen Erkennungssequenzen für *Bsm*BI (Startpunkt der gebogenen Pfeile) ermöglichen bei allen in A dargestellten Konstrukten die nahtlose Entfernung des Mimotops (links) oder den Einbau einer Mimotopbibliothek (LibNCTB-CD34TM, rechts). Dargestellt ist dieser Vorgang exemplarisch für MNCTB-CD34TM.

Die Kodon-Optimierung der CTB-Varianten MNCTB-CD34TM, MNCTB-gp64TM, MiCTB-CD34TM und MiCTB-gp64TM inklusive Synthese erfolgte durch die Geneart AG. Zur Expression in humanen Zellen wurden die Konstrukte über die Schnittstellen *NheI* und *KpnI* in den Vektor pcDNA3.1 eingebracht (siehe Anhang E.2). Zur Herstellung von CTB-CD34TM und CTB-gp64TM wurde das Mimotop durch Verwendung von *BsmBI* aus MNCTB-CD34TM bzw. MNCTB-gp64TM ausgeschnitten. Die überhängenden Enden wurden durch Behandlung mit *Klenow Enzyme* (Roche, Mannheim) aufgefüllt und die entstandenen glatten Enden ligiert (siehe B.1).

### C.1.1.2 Die konstruierten CTB-Varianten werden exprimiert und auf der Zelloberfläche präsentiert

Um die Expression der chimären CTB-Varianten mit Transmembrandomäne zu überprüfen, wurden HEK293T Zellen wie unter B.2.2 beschrieben transfiziert. 72 h später wurden die Zellysate (siehe B.2.3) im Western-Blot mit einem CTB-spezifischen Antikörper (siehe B.3.3) untersucht. Als Negativkontrolle wurden mit pcDNA3.1 (Leervektor) transfizierte Zellen (mock) aufgetragen. Kommerzielles CTB (Sigma, Deisenhofen) diente als Positivkontrolle. Wie Abb. C-2 zeigt, ist das Signal der Varianten ohne Mimotop (CTB-CD34TM und CTB-gp64TM) am stärksten. Die mittlere Bande entspricht jeweils der erwarteten Größe der Proteine nach Abspaltung des tpa-Signals (17 bzw. 16kDa). Die zusätzlichen Banden sind zum einen auf nicht abgespaltenes tpa (+ 4 kDa), zum anderen vermutlich auf z. T. degradiertes Protein zurückzuführen. Auch die Konstrukte mit aminoterminalen Mimotop (MNCTB-CD34TM und MNCTB-gp64TM) wurden spezifisch detektiert (erwartete Größe ohne tpa: 21 bzw. 20 kDa). Möglicherweise aufgrund einer niedrigeren Expression aber auch aufgrund einer schlechteren Erkennung durch den verwendeten CTB-spezifischen Antikörper (vergleiche u. a. Abb. C-4, C-5 und Abschnitt D.1.4) konnten die CTB-Varianten mit internem Mimotop (MiCTB-CD34TM und MiCTB-gp64TM; erwartete Größe ohne tpa: 20 kDa bzw. 19 kDa) nicht detektiert werden.

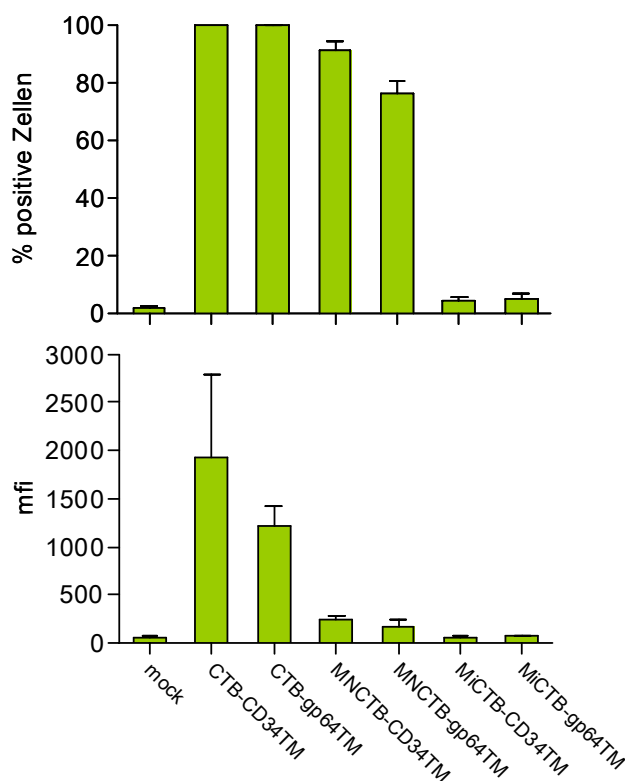


**Abb. C-2: Western-Blot Analyse zum Nachweis der Produktion der chimären CTB-Varianten.**

HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten transfiziert und nach 72h lysiert. Je 200 µg des Zellysats wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem CTB-spezifischen Antikörper im Western-Blot analysiert. 0,2 µg kommerzielles CTB wurden als Positivkontrolle geladen (Spur 1). Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen (mock, Spur 2).

Für den gewünschten Einbau der CTB-Varianten in VLPs ist die Präsentation der exprimierten Proteine auf der Zelloberfläche Voraussetzung. Daher wurde auf der Außenseite der Zellen

befindliches CTB 72 h nach Transfektion mit einem CTB-spezifischen Antikörper und einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe B.2.4) angefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Abb. C-3 zeigt den Prozentsatz der Zellen, die jeweils CTB auf der Oberfläche präsentieren (oben) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (unten), ein relatives Maß für die Anzahl der auf der Oberfläche detektierten CTB-Moleküle. Es ist zu erkennen, dass, analog zur Expression (siehe Abb. C-2), die Varianten ohne Mimotop (CTB-CD34<sup>TM</sup> und CTB-gp64<sup>TM</sup>) sehr effizient auf der Oberfläche präsentiert werden. Ein aminoterminaleres Mimotop (MNCTB-CD34<sup>TM</sup> und MNCTB-gp64<sup>TM</sup>) reduziert den Prozentsatz der positiven Zellen nur geringfügig, die mittlere Fluoreszenzintensität geht allerdings stärker zurück. Die beiden Proteine mit integriertem Mimotop (MiCTB-CD34<sup>TM</sup> und MiCTB-gp64<sup>TM</sup>) konnten wie auch schon im Western-Blot kaum detektiert werden.



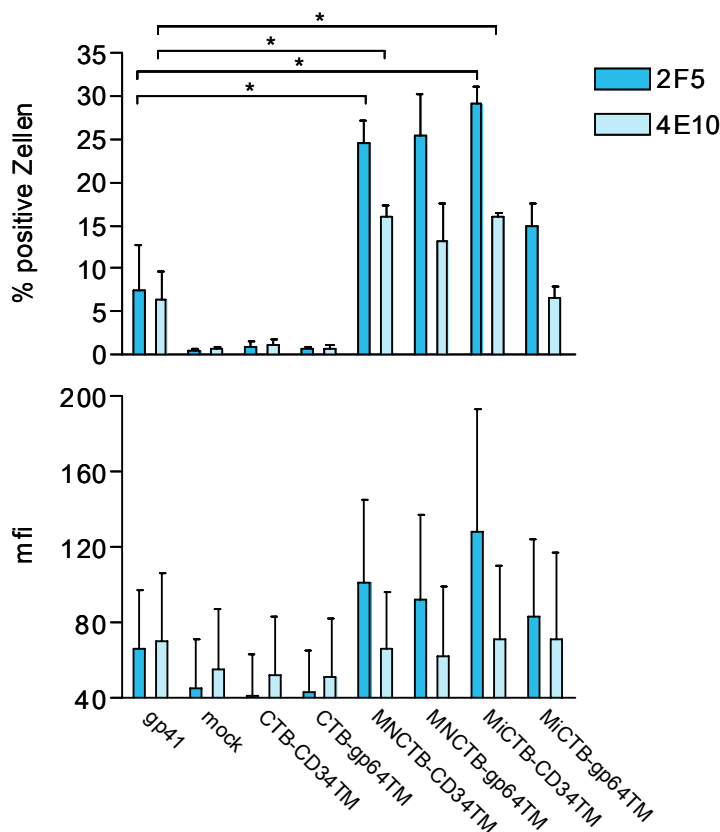
**Abb. C-3: Nachweis der Präsentation chimärer CTB-Varianten auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse.**

HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit einem CTB-spezifischen Antikörper und einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper angefärbt (Oberflächenmarkierung) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Prozentzahl der CTB-positiven Zellen (oben) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (mfi) der positiven Zellen, ein Maß für die Expressionsstärke (unten). Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor transfizierte Zellen (mock). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung.

### C.1.1.3 Das Mimotop der CTB-Varianten ist frei zugänglich und wird durch breit neutralisierende Antikörper gebunden

Für die CTB-Varianten mit integriertem Mimotop konnte mit den verwendeten CTB-spezifischen Antikörpern im Western-Blot keine Expression, bei der FACS-Analyse kaum Präsentation auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (siehe C.1.1.2). Eine Oberflächenmarkierung transfizierter HEK293T Zellen mit den beiden bNAKs 2F5 bzw. 4E10 mit anschließender durchflusszytometrischer

Untersuchung (siehe B.2.2 und B.2.4) ergab jedoch eine spezifische Färbung aller Mimotop-tragenden Konstrukte (siehe Abb. C-4). Dieses Ergebnis spricht, wie unter C.1.1.2 bereits angesprochen, für eine verminderte Detektion der CTB-Varianten mit integriertem Mimotop durch die CTB-spezifischen Antikörper. Offensichtlich werden alle Varianten auf der Zelloberfläche präsentiert. Das Env-Mimotop jeder CTB-Variante ist frei zugänglich und wird durch 2F5 und 4E10 spezifisch erkannt. Bemerkenswert ist ein Vergleich mit Zellen, die als Positivkontrolle mit gp41 (pcDNA3.1/*tpa-gp41*(89.6); zur Verfügung gestellt von T. Benen<sup>17</sup>, siehe E.2) transfiziert wurden. Das verwendete Konstrukt ist wie die CTB-Varianten an den humanen Kodon-Gebrauch angepasst, besitzt ein *tpa*-Signal und enthält die Mimotop-Sequenz (siehe Abb. C-1 A). Vor allem das 2F5 Signal ist bei allen CTB-Varianten mit Mimotop deutlich stärker als bei gp41 (statistisch signifikant bei den Varianten mit CD34 TM). Aber auch im Falle von 4E10 sind mindestens genau so viele bis doppelt so viele Zellen positiv wie bei gp41 (ebenfalls statistisch signifikant bei den Varianten mit CD34 TM). Verantwortlich hierfür ist wohl eine verglichen mit gp41 gesteigerte Oberflächenpräsentation der chimären CTB-Varianten (siehe D.1.4) sowie eine verbesserte Zugänglichkeit der Epitope von 2F5 und 4E10 in Mimotop tragendem CTB (siehe D.1.5). Insgesamt wurden in diesem Experiment beide Konstrukte mit aminoterminalen Mimotop (MNCTB-CD34TM und MNCTB-gp64TM) sowie MiCTB-CD34TM ähnlich gut durch die bNAKs erkannt. Im Falle von MiCTB-gp64TM konnten insgesamt weniger Zellen durch 2F5 und 4E10 gebunden werden.



**Abb. C-4: FACS-Analyse zum Nachweis der Mimotop-Zugänglichkeit und –Funktionalität in chimären CTB-Proteinen.** HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten transfiziert und nach 72 h mit den Mimotop-spezifischen Antikörpern 2F5 (blau) bzw. 4E10 (hellblau) und einem Fluoreszenz-gekoppelten Sekundär-Antikörper angefärbt (Oberflächenmarkierung). Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Prozentzahl der angefärbten Zellen (oben) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (mfi, unten). Als Positivkontrolle dienten mit gp41, als Negativkontrolle mit Leervektor transfizierte Zellen (mock). Gezeigt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung. Signifikanz (zweiseitiger *Student`s t-test*): \* ( $P \leq 0,1$ ).

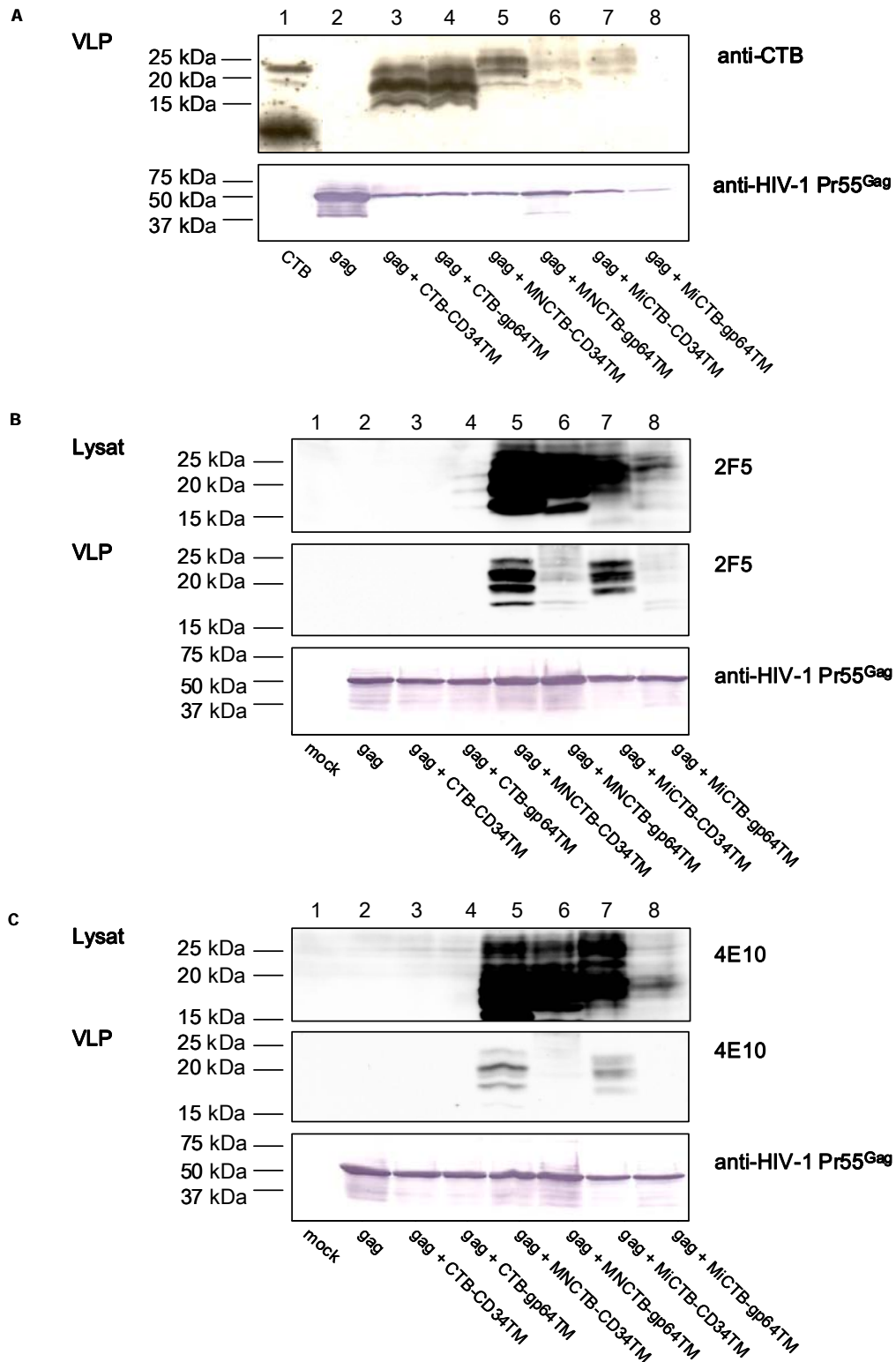
### C.1.1.4 CTB-Varianten mit CD34-Transmembrandomäne werden effizient in VLPs eingebaut

Wie in A.1.5 beschrieben führt die Expression von Pr55<sup>Gag</sup> zur Abknospung Virus-ähnlicher Partikel von der Zelle. Um zu überprüfen, ob chimäres CTB in solche VLPs eingebaut wird, wurden HEK293T Zellen wie unter B.2.5 beschrieben mit pcDNA3.1syngagIIIB und jeweils einer CTB-Variante cotransfiziert. 72h später wurden die Überstände abgenommen und enthaltene VLPs mittels Ultrazentrifugation angereichert (siehe B.2.7). Zelllysate sowie VLPs wurden im Western-Blot mit einem CTB-spezifischen Antikörper, 2F5, 4E10 und einem Pr55<sup>Gag</sup>-spezifischen Antikörper untersucht (siehe Abb. C-5). Wie bereits für Abb. C-2 erläutert entspricht die mittlere Bande jeweils der erwarteten Größe der Proteine nach Abspaltung des tpa-Signals. Die zusätzlichen Banden sind zum einen auf nicht abgespaltenes tpa (+ 4 kDa), zum anderen vermutlich auf z. T. degradiertes Protein zurückzuführen. Mit Ausnahme von MiCTB-gp64TM konnten alle Varianten mit dem CTB-spezifischen Antikörper in den angereicherten VLPs nachgewiesen werden (Abb. C-5 A). Die vergleichende Analyse von Zelllysaten und VLPs mittels 2F5 bzw. 4E10 ergab, dass chimäres CTB mit CD34-Transmembrandomäne wesentlich effizienter in VLPs eingebaut wird als CTB mit gp64-Transmembrandomäne (siehe Abb. C-5 B bzw. C). Aus diesem Grund wurden die weitere Charakterisierung und anschließende Immunisierungsexperimente mit den Varianten mit CD34 TM durchgeführt.

Wie schon in Abb. C-2 bzw. C-3 konnten die CTB-Varianten mit integriertem Mimotop nur schwach (MiCTB-CD34TM) bzw. nicht (MiCTB-gp64TM) mit dem CTB-spezifischen Antikörper detektiert werden. Der Nachweis mit 2F5 und 4E10 (Abb. C-4 und C-5 B, C) lässt darauf schließen, dass dies, zumindest im Falle des Konstrukts mit CD34 TM, nur geringfügig an schwächerer Expression liegt. Verantwortlich könnte eher eine Konformationsänderung durch die Insertion von 30 AS sein. Da eine korrekte Faltung von CTB für die Adjuvans-Funktion bei Immunisierungen aber von Bedeutung ist, wurde MNCTB-CD34TM, also die Variante mit aminoterminalen Mimotop und CD34 TM, für die Immunisierungsexperimente und damit die weitere Charakterisierung ausgewählt. Unter Abschnitt C.1.1.6 wurde zudem der Einfluss eines verkürzten integrierten Mimotops analysiert.

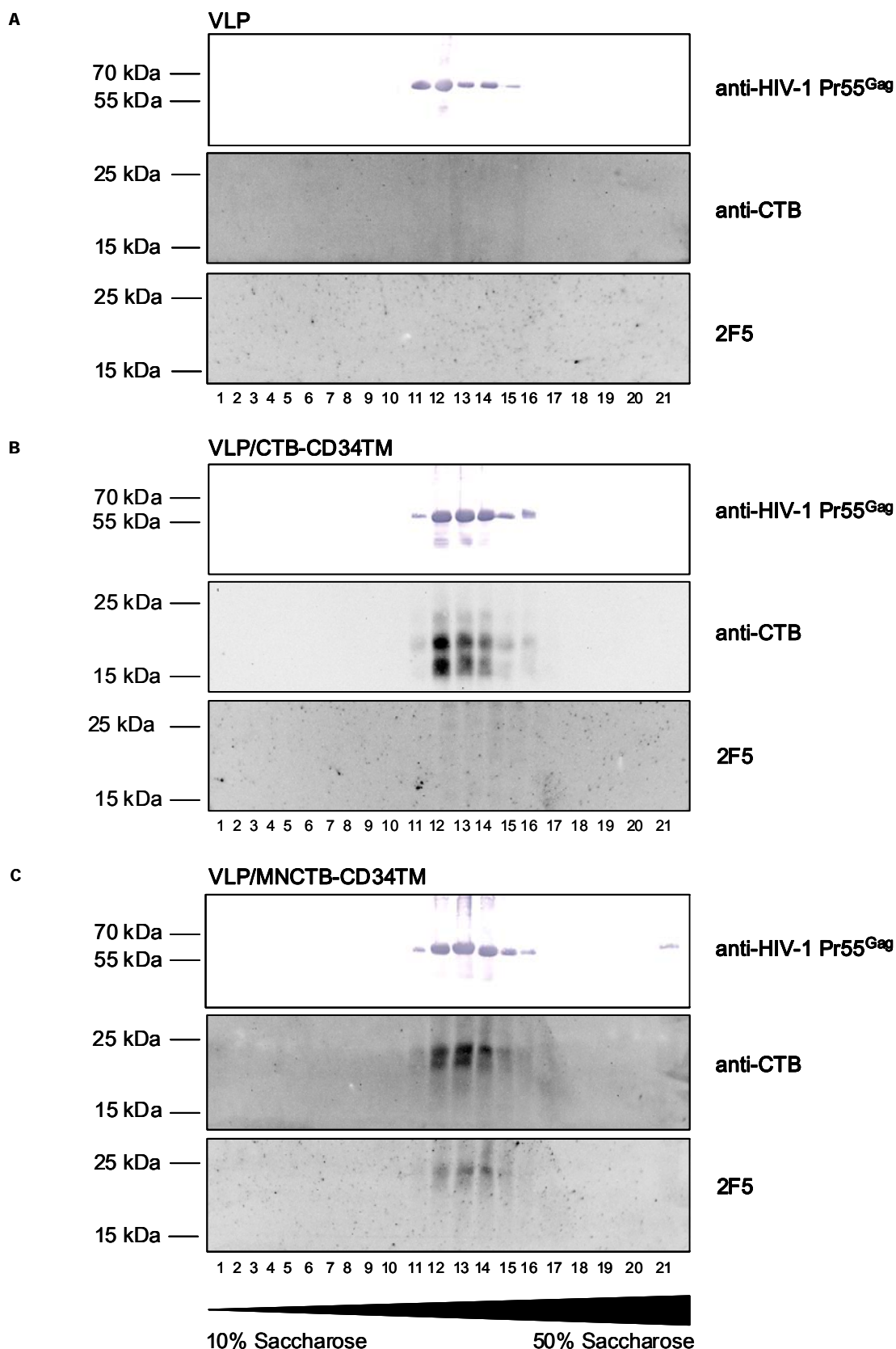
Zur präziseren Analyse wurden VLPs mittels Zonalzentrifugation im Saccharosegradient aufbereitet (siehe B.3.6). Die einzelnen Fraktionen wurden im Western-Blot auf Vorhandensein von Pr55<sup>Gag</sup> und CTB sowie Mimotop untersucht. Wie Abb. C-6 zeigt konzentrieren sich Pr55<sup>Gag</sup> und damit die VLPs in wenigen definierten Fraktionen. Der spezifische Nachweis von CTB bzw. dem Mimotop in denselben Fraktionen beweist die Inkorporation der untersuchten CTB-Varianten CTB-CD34TM und MNCTB-CD34TM in VLPs.

Noch einen Schritt weiter führt die Visualisierung von VLPs im Elektronenmikroskop (siehe B.3.9). Durch Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper konnte CTB (CTB-CD34TM und MNCTB-CD34TM) eindeutig auf der Oberfläche der VLPs nachgewiesen werden (siehe Abb. C-7). Die vereinzelt Goldkugeln in Abb. C-7 B, die sich sichtlich nicht auf VLPs befinden, lassen sich vermutlich durch Reste beschädigter VLPs erklären. Die Detektion des Mimotops mit 2F5 bestätigt, wie schon für die Zelloberfläche gezeigt (vergleiche Abb. C-4), die Zugänglichkeit des Mimotops für bNAKs (Abb. C-7 C).

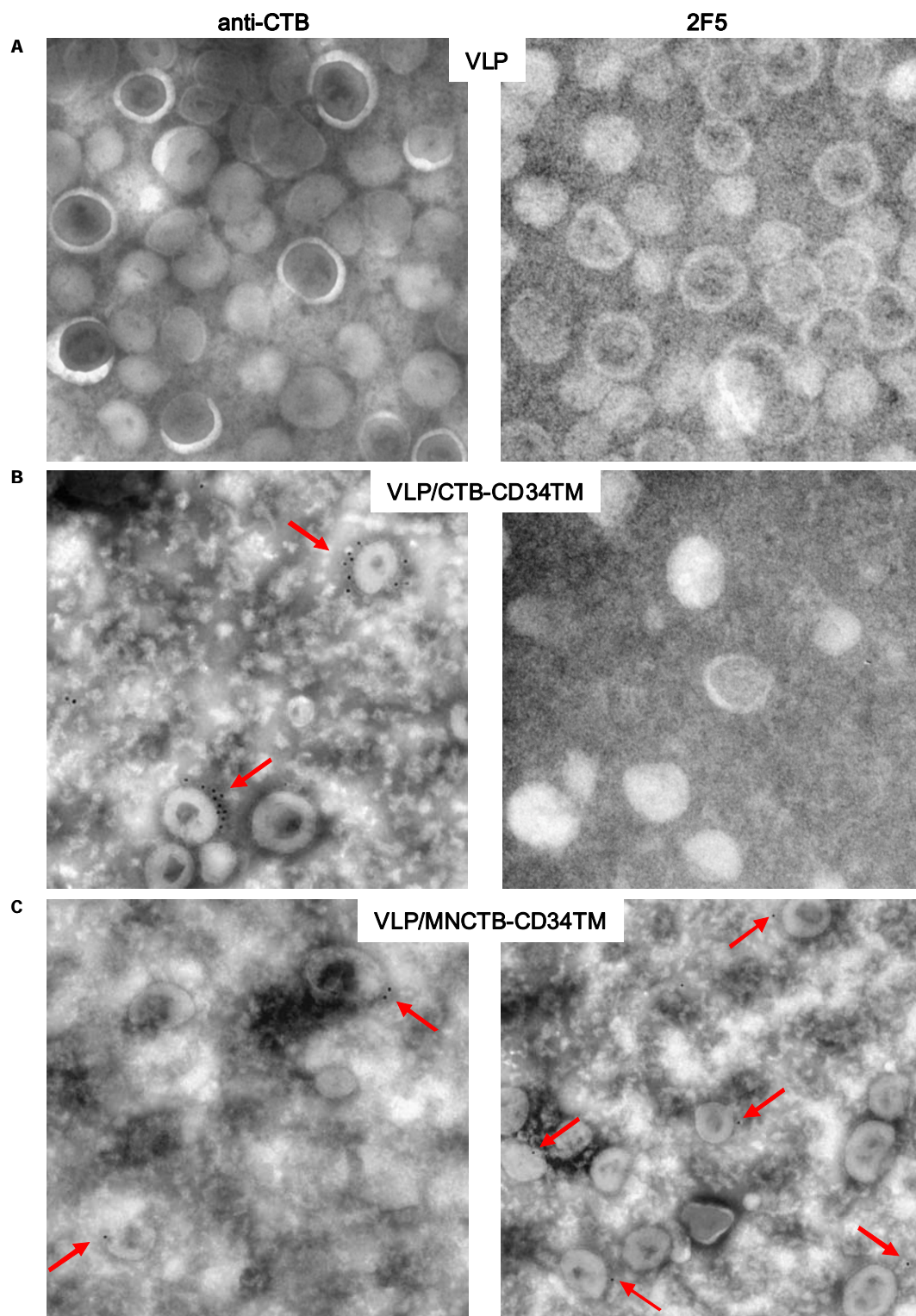


**Abb. C-5: Western-Blot Analyse zur Überprüfung des Einbaus chimärer CTB-Varianten in VLPs.**

HEK293T Zellen wurden mit *syngagIIIB* (*gag*), codierend für das HIV Capsidprotein Gag, und den angegebenen CTB-Varianten cotransfiziert. 72h nach Transfektion wurden Zellen und Überstände geerntet. Mittels Ultrazentrifugation der Überstände wurden die produzierten virusähnlichen Partikel (*virus like particle*, VLP) angereichert. (A) Je 15 µg angereicherte VLPs (Gesamtprotein) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und zunächst mit einem CTB-spezifischen (oben), anschließend mit einem Gag-spezifischen Antikörper (unten) im Western-Blot analysiert. 0,25 µg kommerzielles CTB wurden als Positivkontrolle geladen (Spur 1). Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor und *syngagIIIB* cotransfizierte Zellen (Spur 2). (B,C) Je 80 µg des Zelllysats (jeweils oben) bzw. 20 µg angereicherte VLPs (jeweils Mitte) wurden im Western-Blot nach SDS-PAGE mit 2F5 bzw. 4E10 analysiert. Die Membranen mit VLPs wurden im Anschluss zusätzlich mit einem Gag-spezifischen Antikörper behandelt (jeweils unten). Als Negativkontrollen dienten nicht transfizierte Zellen (*mock*, Spur 1) sowie mit Leervektor und *syngagIIIB* cotransfizierte Zellen (Spur 2).



**Abb. C-6: Aufbereitung von VLPs durch Zonalzentrifugation im Saccharosegradient zum Nachweis des Einbaus chimärer CTB-Varianten.** 293-F Zellen wurden mit *syngag11B* (A) alleine bzw. in Kombination mit (B) CTB-CD34TM oder (C) MNCTB-CD34TM transfiziert. Nach 72h wurden die produzierten VLPs mittels Ultrazentrifugation der Überstände angereichert. 150 µg VLPs wurden anschließend einer Zonalzentrifugation im Saccharosegradient (10-50 %) unterzogen. Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western-Blot wurde in den einzelnen Gradientenfraktionen enthaltenes Protein mittels Trichloressigsäure gefällt. Die Detektion im Western-Blot erfolgte nacheinander mit einem CTB-spezifischen Antikörper, 2F5 und einem Gag-spezifischen Antikörper.



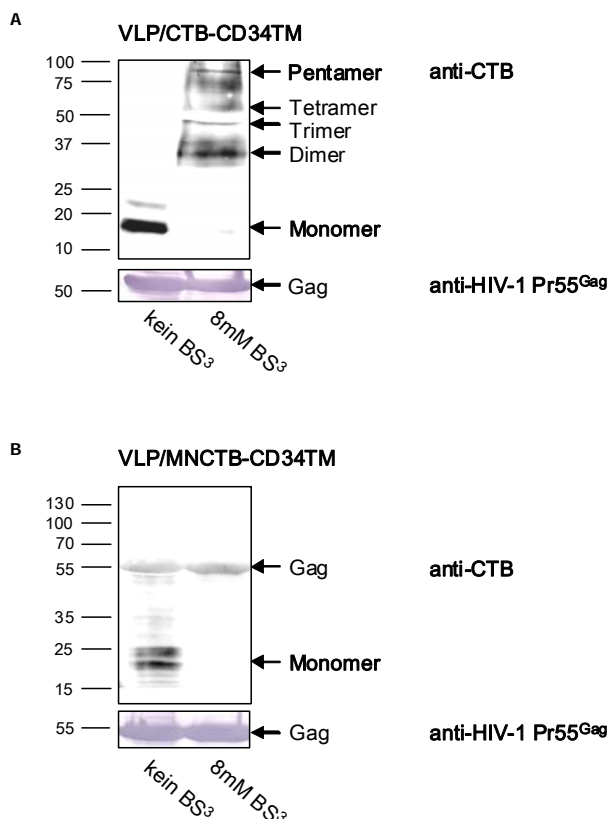
**Abb. C-7: Nachweis der Präsentation chimärer CTB-Varianten auf der Oberfläche von VLPs mittels elektronenmikroskopischer Aufnahme nach Immunogoldmarkierung.** 293-F Zellen wurden mit *syngagIIIB* (A) alleine bzw. in Kombination mit (B) CTB-CD34TM oder (C) MNCTB-CD34TM transfiziert. Nach 72h wurden die produzierten VLPs mittels Ultrazentrifugation der Überstände angereichert. Für elektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgte eine Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper (links) bzw. 2F5 (rechts). Dargestellt sind exemplarische Aufnahmen in 20.000facher Vergrößerung.

### C.1.1.5 Auf VLPs befindliches CTB oligomerisiert zu Pentameren

Wie unter A.2 erläutert, ist die Bindung von CTB an den Gangliosid-Rezeptor GM1 ein wichtiger Aspekt des Adjuvans-Effekts von CTB. Voraussetzung dafür ist die Pentamerisierung des Proteins<sup>99</sup>.

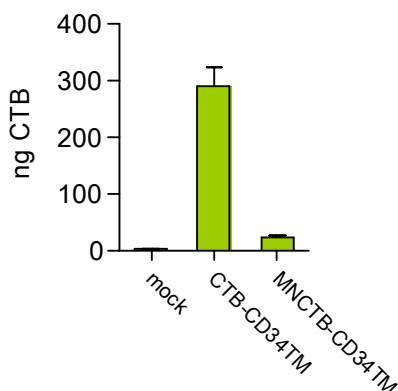
Daher wurde unter Verwendung des quervernetzenden Reagens Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate (BS<sup>3</sup>) der Oligomerisierungsgrad von CTB untersucht. BS<sup>3</sup> enthält im Abstand von ca. 11 Å zwei amin-reaktive Ester, die mit primären Aminogruppen stabile Amid-Bindungen eingehen. Auf diese Weise können normalerweise nicht kovalente Proteininteraktionen für die Analyse im Western-Blot konserviert werden.

Über Zonalzentrifugation im Saccharosegradient aufbereitete, CTB präsentierende VLPs wurden wie unter B.3.10 beschrieben mit 8 mM BS<sup>3</sup> inkubiert und anschließend einem Western-Blot mit CTB-spezifischem Antikörper unterzogen. Wie Abb. C-8 zeigt, ist die in der unbehandelten Probe detektierte Bande für CTB-Monomere nach Anwendung von BS<sup>3</sup> nicht mehr nachweisbar. Bei VLPs, welche CTB ohne Mimotop präsentieren (VLP/CTB-CD34TM), konnten stattdessen Banden nachgewiesen werden, die auf der berechneten Höhe von CTB-Oligomeren, inklusive Pentameren, anzufinden sind (Abb. C-8 A). Bei Untersuchung von VLPs, welche CTB mit aminoterminalen Mimotop präsentieren (VLP/MNCTB-CD34TM), wurden keine Banden für CTB-Oligomere detektiert (Abb. C-8 B). Allerdings muss beachtet werden, dass bei Analyse identischer Mengen VLPs (siehe Zweit-Inkubation mit anti-Pr55<sup>Gag</sup>) bereits in den unbehandelten Proben das CTB-spezifische Signal (Monomer) bei VLP/CTB-CD34TM (Abb. C-8 A) etwa 10x intensiver ist als bei VLP/MNCTB-CD34TM (Abb. C-8 B). Eine Aufteilung von CTB auf mehrere oligomere Formen hat daher vermutlich den Verlust des CTB-spezifischen Signals zur Folge.



**Abb. C-8: Nachweis der Pentamerisierung chimärer CTB-Varianten durch chemische Quervernetzung benachbarter Oberflächenproteine und Analyse im Western Blot.** HEK293T Zellen wurden mit *syngagIIIB*, codierend für das HIV Capsidprotein Gag, und CTB-CD34TM (A) bzw. MNCTB-CD34TM (B) cotransfiziert. 72h nach Transfektion wurden die produzierten VLPs mittels Ultrazentrifugation der Überstände angereichert. Je 60 µg VLPs wurden zur Quervernetzung benachbarter Oberflächenproteine mit 8 mM Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate (BS<sup>3</sup>) behandelt und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion im Western-Blot erfolgte nacheinander mit einem CTB-spezifischen (jeweils oben) und einem Gag-spezifischen Antikörper (jeweils unten). Als Negativkontrolle dienten nicht mit BS<sup>3</sup> behandelte VLPs (Spur 1). Links befinden sich jeweils Größenangaben in kDa. Pfeile auf der rechten Seite zeigen spezifische Banden an.

Neben der Pentamerisierung von CTB wurde auch die Bindung der membranfusionierten CTB-Varianten an GM1 selbst untersucht. Hierfür wurden, wie unter B.3.12 beschrieben, 96-Napf Platten mit GM1 beschichtet. CTB präsentierende, mittels Ultrazentrifugation angereicherte VLPs wurden vor dem Auftragen lysiert (siehe B.2.7). Die Detektion von gebundenem CTB erfolgte mit einem CTB-spezifischen Antikörper. Die in Abb. C-9 dargestellten Werte beziehen sich jeweils auf 500 ng Gag, welches mit Hilfe des unter B.3.4 beschriebenen Capsidantigen-spezifischen ELISAs bestimmt wurde. Die verschiedenen VLP-Proben sind also miteinander vergleichbar, jedoch sind die Werte, wie unter B.3.4 erläutert, nicht als absolut anzusehen.



**Abb. C-9: Analyse der Bindung chimärer CTB-Varianten an GM1 mittels ELISA.**

HEK293T Zellen wurden mit *syngagIIIB*, codierend für das HIV Capsidprotein Gag, und den angegebenen CTB-Varianten cotransfiziert. 72h nach Transfektion wurden die produzierten VLPs durch Ultrazentrifugation der Überstände angereichert, lysiert und im ELISA untersucht. Dabei wurden Platten mit GM1 beschichtet, die Detektion erfolgte mit einem CTB-spezifischen Antikörper. Als Negativkontrolle dienten mit Leervektor und *syngagIIIB* cotransfizierte Zellen (mock). Alle Werte wurden auf 500 ng Gag normalisiert (ermittelt im Capsidantigen-spezifischen ELISA). Gezeigt ist der Mittelwert von drei Experimenten mit Standardabweichung.

Abb. C-9 lässt zunächst darauf schließen, dass beide untersuchten CTB-Varianten an GM1 binden, wobei das Signal bei gleichen Mengen analysierter VLPs für das Konstrukt ohne Mimotop 10x stärker ist. Die Detektion identisch behandelter Proben mit 2F5 anstelle des CTB-spezifischen Antikörpers ergab jedoch eine unspezifische Bindung der Proben an GM1 (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle wurden dabei gp41 präsentierende, lysierte VLPs verwendet, die nicht an GM1 hätten binden sollen, gp41 wurde jedoch durch 2F5 detektiert. Der Unterschied zwischen CTB mit und ohne Mimotop in Abb. C-9 wurde wohl lediglich durch die unterschiedlich starke Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers an die verschiedenen Varianten verursacht (siehe D.1.4). Trotz diverser Optimierungsversuche (Variation von Blockierung und Waschbedingungen) konnte das unspezifische Signal, welches auf die Bindung von Membranfragmenten an GM1 zurückzuführen sein könnte, nicht eliminiert werden. Daher kann keine Aussage über die Bindung der CTB-Varianten an GM1 getroffen werden. Die Pentamerisierung der chimären CTB-Varianten ist jedoch ein Indiz für deren Funktionalität.

### C.1.1.6 Länge und Sequenz integrierter Mimotope beeinflussen die Konformation von CTB und die Zugänglichkeit des Mimotops

Aufgrund der in C.1.1.4 beschriebenen Ergebnisse wurde MNCTB-CD34<sup>TM</sup> für die später beschriebenen Immunisierungsexperimente ausgewählt. Die Varianten mit gp64-Transmembran-

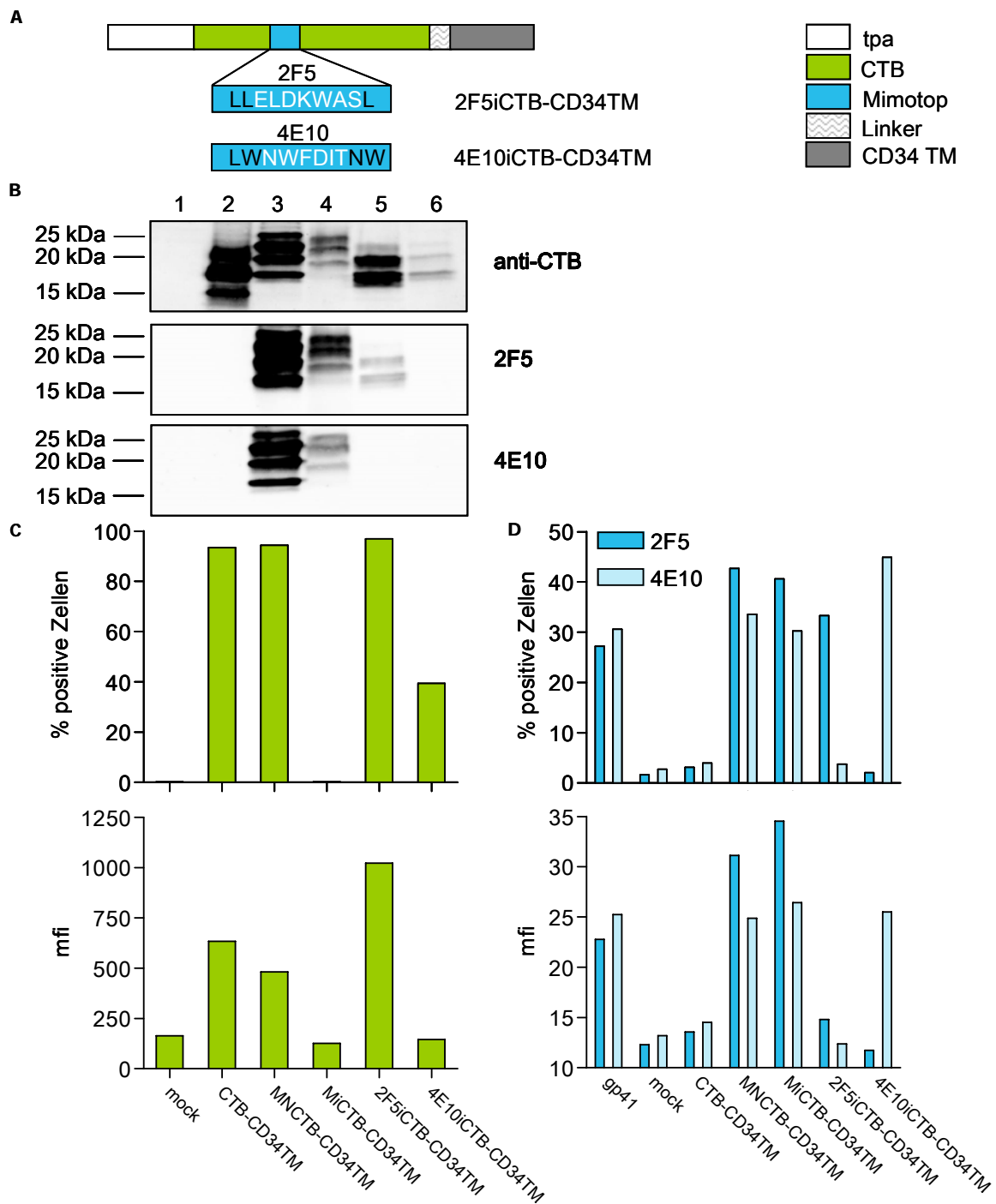
domäne wurden aufgrund ihrer ineffizienten Integration in VLPs ausgeschlossen. Die schlechte Detektion von MiCTB-CD34TM mit CTB-spezifischen Antikörpern lässt darauf schließen, dass die Insertion von 30 AS eine teilweise inkorrekte Faltung von CTB verursacht. Deshalb wurde hier der Einfluss von Länge und Sequenz des integrierten Mimotops auf die Konformation von CTB sowie die Zugänglichkeit des Mimotops untersucht.

Dazu wurden zwei CTB-Varianten hergestellt, bei denen jeweils 10 AS das 30 AS Mimotop von MiCTB-CD34TM (vgl. Abb. C-1) ersetzen, wobei 4E10iCTB-CD34TM das Kernepitop von 4E10, 2F5iCTB-CD34TM dagegen dasjenige von 2F5 enthält (siehe Abb. C-10 A). Die Synthese der, für die verkürzten Mimotope codierenden, DNA erfolgte durch die Geneart AG. Zum Mimotop-Austausch wurden die flankierenden *BsmBI* Schnittstellen herangezogen.

Wie Western-Blot (Abb. C-10 B) und FACS-Analyse (Abb. C-10 C) der mit den unterschiedlichen CTB-Varianten transfizierten Zellen zeigen, bewirkt die Verkürzung des integrierten Mimotops im Falle von 2F5iCTB-CD34TM eine deutlich verbesserte Erkennung durch CTB-spezifische Antikörper. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität übersteigt sogar den Wert der CTB-Variante ohne Mimotop. Im Falle von 4E10iCTB-CD34TM wird zumindest die Bindung des im FACS verwendeten CTB-spezifischen Antikörpers möglich. Eine Verkürzung des Mimotops von 30 auf 10 Aminosäuren scheint also einen positiven Effekt auf die Konformation von CTB zu haben, wobei neben der Länge auch die Sequenz des integrierten Mimotops eine Rolle spielt.

Unter Berücksichtigung des Anteils positiver Zellen ist die Zugänglichkeit enthaltener Kernepitope bei beiden CTB-Varianten mit verkürztem Mimotop vergleichbar mit derjenigen der Varianten mit 30 AS Mimotop. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität von 2F5iCTB-CD34TM ist jedoch deutlich schwächer als die von MiCTB-CD34TM (Abb. C-10 D).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Länge als auch die Sequenz des integrierten Mimotops zum einen die Konformation von CTB selbst, zum anderen die Zugänglichkeit des Mimotops beeinflussen. Keines der verkürzten integrierten Mimotope stellt eine Verbesserung gegenüber der unter C.1.1.4 für Immunisierungsexperimente ausgewählten Variante MNCTB-CD34TM dar.



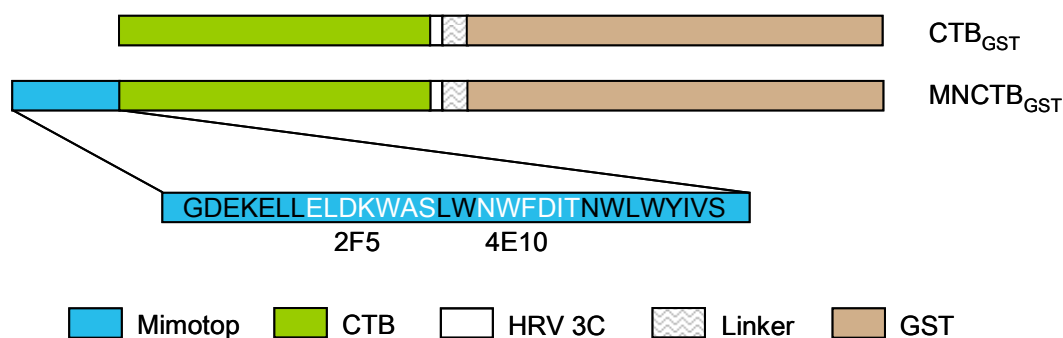
**Abb. C-10: Schematische Darstellung und biochemische Analyse chimärer CTB-Varianten mit verkürztem Mimotop.** (A) Schematische Darstellung der Konstrukte. Beide Varianten unterscheiden sich von dem zuvor beschriebenen MiCTB-CD34TM lediglich durch ihre Mimotop-Sequenz: das 10 AS lange Mimotop (blau) enthält entweder das Kernpitop von 2F5 oder 4E10 (weißer Text). (B) Western-Blot Analyse zum Nachweis der Produktion der chimären CTB-Varianten. HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten (Beschriftung siehe C) transfiziert und nach 72h lysiert. Je 40 µg des Zellysats wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem CTB-spezifischen Antikörper (oben) bzw. 2F5 (Mitte) oder 4E10 (unten) im Western-Blot analysiert. Als Negativkontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Zellen (mock, Spur 1). (C) Analyse der Präsentation chimärer CTB-Varianten auf der Zelloberfläche mittels FACS. HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten transfiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit einem CTB-spezifischen Antikörper und einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörper angefärbt (Oberflächenmarkierung) und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die Prozentzahl der CTB-positiven Zellen (oben) sowie die mittlere Fluoreszenzintensität (mfi) der positiven Zellen, ein Maß für die Expressionsstärke (unten). Als Negativkontrolle dienen mit Leervektor transfizierte Zellen (mock). (D) Analyse der Mimotop-Zugänglichkeit und -Funktionalität mittels FACS. HEK293T-Zellen wurden mit den angegebenen CTB-Varianten transfiziert und nach 72 h mit den Mimotop-spezifischen Antikörpern 2F5 (blau) bzw. 4E10 (hellblau) und einem Fluoreszenzgekoppelten Sekundär-Antikörper angefärbt (Oberflächenmarkierung). Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind die Prozentzahl der angefärbten Zellen (oben) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (mfi, unten). Als Positivkontrolle dienen mit gp41, als Negativkontrolle mit Leervektor transfizierte Zellen (mock).

## C.1.2 Chimäres CTB in löslicher Form

Als Alternative zu den über eine Transmembrandomäne auf VLPs präsentierten CTB-Varianten wurden auch chimäre Proteine, die in löslicher Form vorliegen, entworfen. Dies ermöglicht, wenngleich auf Kosten der Nachahmung eines natürlichen Virus, die Verabreichung höherer Konzentrationen an Mimotop-tragendem CTB bei Immunisierungsexperimenten.

### C.1.2.1 Entwicklung chimärer CTB-Varianten in löslicher Form

Die löslichen CTB-Varianten wurden aufgrund der einfacheren Kultivierungsbedingungen und des schnelleren Wachstums von Prokaryonten zur Produktion in *E. coli* entworfen. Daher wurde die Nukleinsäuresequenz dem Kodon-Gebrauch von *E. coli* angepasst. Zur erleichterten Aufreinigung sowie zur Erhöhung der Löslichkeit wurde CTB carboxyterminal mit einem GST-*tag* fusioniert. Um die Pentamerisierung von CTB möglichst nicht zu beeinträchtigen, wurde wie bei den Varianten mit Transmembrandomäne ein flexibler Glycin-Serin *Linker* eingebaut. Eine spezifische Proteaseschnittstelle (HRV 3C) zwischen CTB und *Linker* hält des Weiteren die Möglichkeit der Abspaltung von GST offen. Analog zu MNCTB-CD34<sup>TM</sup> befindet sich das 30 Aminosäuren lange Mimotop mit den Kernepitopen von 2F5 und 4E10 (siehe Abb. C-11) am Aminoterminus von CTB. Die im Mimotop enthaltenen *Bsm*BI Erkennungs-Sequenzen (vgl. C.1.1.1) ermöglichen auch hier den Austausch des Mimotops.



**Abb. C-11: Schematische Darstellung der entworfenen, löslichen CTB-Varianten.**

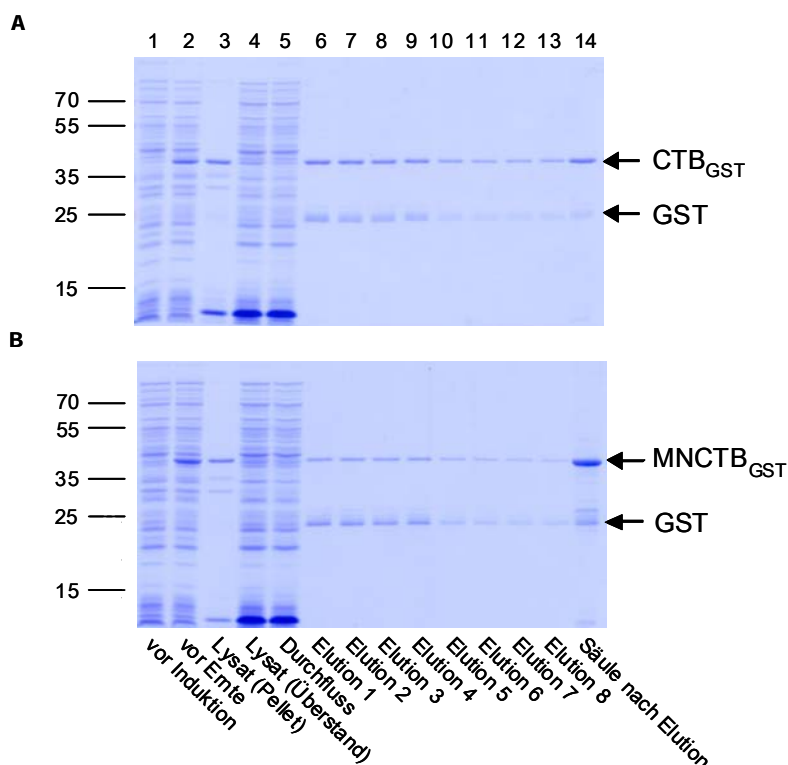
Bei beiden Konstrukten ist CTB über eine flexible *Linker*-Region (gewellt) mit einem GST-*tag* (hellbraun) verbunden, welcher für die Affinitätsaufreinigung eingesetzt wurde. Eine Proteaseschnittstelle (HRV 3C, weiß) ermöglicht das Abspalten von GST. MNCTB<sub>GST</sub> trägt aminoterminal das zuvor schon beschriebene 30 AS lange Mimotop (blau) mit den Kernepitopen von 2F5 und 4E10 (weißer Text).

Rekombinantes lösliches CTB ist nur ohne GST-*tag* kommerziell erhältlich, weshalb neben dem bisher beschriebenen MNCTB<sub>GST</sub> (mit aminoterminalen Mimotop) zu Kontrollzwecken auch CTB<sub>GST</sub> (ohne Mimotop) entworfen wurde (siehe Abb. C-11).

Die Synthese von MNCTB<sub>GST</sub> inklusive Kodon-Optimierung erfolgte durch die Geneart AG. CTB<sub>GST</sub> wurde unter Verwendung von *Bsm*BI, *Klenow Enzyme* (Roche, Mannheim) und Ligation der glatten Enden (siehe B.1) aus MNCTB<sub>GST</sub> hergestellt. Zur Expression in *E. coli* wurden die Konstrukte über die Schnittstellen *Nde*I und *Xho*I in den Vektor pET-49b(+) eingebracht (siehe E.2).

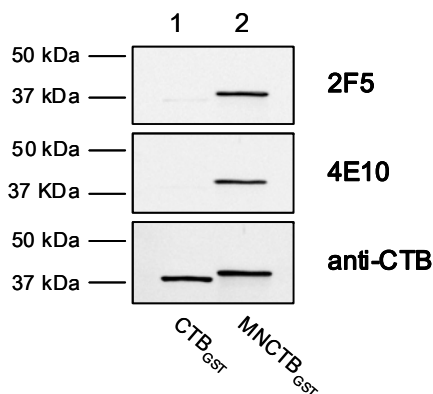
### C.1.2.2 Produktion der löslichen CTB-Varianten

CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub> wurden wie in B.3.11 beschrieben in *E. coli* exprimiert und affinitätschromatographisch über Glutathion-Sepharose aufgereinigt. Die einzelnen Schritte von Proteinproduktion und -reinigung wurden durch Analyse entnommener Aliquots mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western-Blot kontrolliert. Wie Abb. C-12 zeigt, werden beide Proteine in errechneter Größe (40 bzw. 43 kDa) exprimiert. Durch Variation von Kultur- und Expressionsbedingungen (Bakterienstamm, Bakteriendichte, Expressionsdauer, Temperatur, Luftzufuhr) konnte eine maximale Ausbeute von ca. 1,5 mg (CTB<sub>GST</sub>) bzw. 1 mg (MNCTB<sub>GST</sub>) rekombinantem Protein pro Liter Bakterienkultur erzielt werden. Selbst durch eine Aufreinigung mit Hilfe des nicht-denaturierenden Detergens CHAPS aus den unlöslichen Bestandteilen des Lysats (*inclusion bodies*) konnte die Ausbeute nicht weiter gesteigert werden. *E. coli* BL21(DE3) bzw. *E. coli* Origami 2(DE3), die beiden getesteten Bakterienstämme, lieferten denselben Ertrag. Bei zuletzt genanntem sind zwei Reduktasen deletiert, wodurch die Bildung von Disulfidbindungen im Zytoplasma ermöglicht wird. Da natives CTB eine Disulfidbrücke pro Monomer besitzt, liefert der Origami-Stamm vermutlich korrekter gefaltetes Protein und wurde daher für die Produktion der CTB-Varianten verwendet. Abb. C-12 zeigt Expression und Reinigungsverlauf von CTB<sub>GST</sub> (C-12 A) und MNCTB<sub>GST</sub> (C-12 B). Die in den Elutionsfraktionen zusätzlich enthaltene Bande auf Höhe von 25 kDa entspricht GST, einem häufigen Nebenprodukt bei der Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.



**Abb. C-12: Analyse von Expression und Reinigungsverlauf der löslichen CTB-Varianten in *E. coli* mittels SDS-PAGE.** Mit CTB<sub>GST</sub> (A) bzw. MNCTB<sub>GST</sub> (B) transformierte *E. coli* Origami 2(DE3) wurden zur Proteinproduktion mit IPTG induziert und 1,5 h später geerntet. Der Überstand nach Lyse wurde mittels Glutathion-Sepharose aufbereitet. Während des Verlaufs von Expression und Aufreinigung entnommene Proben wurden per SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Eine vergleichende Analyse von eluiertem Protein im Western-Blot (Abb. C-13) zeigt unter Verwendung eines CTB-spezifischen Antikörpers den Größenunterschied zwischen CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub>. Das Mimotop konnte spezifisch mit 2F5 und 4E10 nachgewiesen werden.



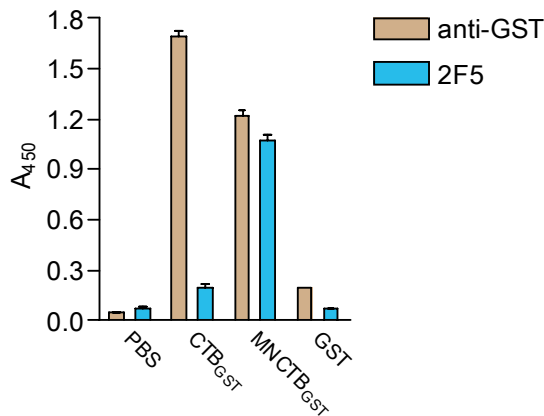
**Abb. C-13: Western-Blot Analyse aufgereinigter löslicher CTB-Varianten.**

CTB<sub>GST</sub> bzw. MNCTB<sub>GST</sub> wurden in *E. coli* Origami 2(DE3) produziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Jeweils 0,5 µg eluiertes Protein wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot nacheinander mit 2F5 (oben) oder 4E10 (Mitte) und einem CTB-spezifischen Antikörper (unten) analysiert.

### C.1.2.3 Lösliches chimäres CTB bindet an GM1 und exponiert sein Mimotop frei zugänglich für breit neutralisierende Antikörper

Zur funktionellen Charakterisierung der in *E. coli* produzierten und affinitätschromatographisch gereinigten CTB-Varianten wurde zunächst, wie schon unter C.1.1.5 für die Varianten mit Transmembrandomäne beschrieben, die Pentamerisierung der Proteine mit Hilfe von BS<sup>3</sup> untersucht. Im Western-Blot mit CTB-spezifischem Antikörper wird auch hier nach Anwendung von BS<sup>3</sup> die in der unbehandelten Probe vorhandene Bande für CTB-Monomere nicht mehr detektiert. Wie bereits im Falle von MNCTB-CD34<sup>TM</sup> beobachtet wurden aber keine Banden für CTB-Oligomere nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). So ist die nicht mehr detektierbare Monomer-Bande zumindest ein Indiz für das Vorliegen von Pentameren.

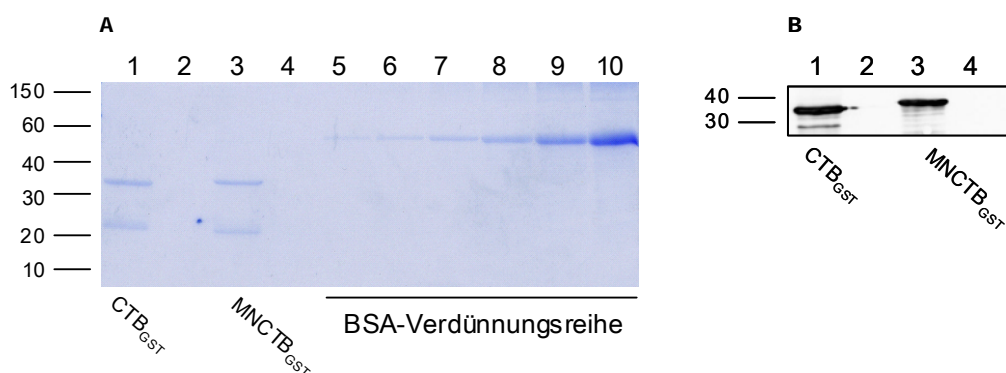
Ein Nachweis für die Bildung funktionaler Pentamere, die an den Gangliosid-Rezeptor GM1 binden, konnte mit Hilfe eines GM1 ELISAs erbracht werden. Hierfür wurden, wie unter B.3.12 beschrieben, 96-Napf Platten mit GM1 beschichtet. Die Detektion von gebundenem, chimärem CTB erfolgte mit einem GST-spezifischen Antikörper. Zur Kontrolle wurde auch die Bindung von GST untersucht, welches ebenfalls in *E. coli* produziert und affinitätschromatographisch gereinigt wurde (siehe B.3.11). Durch Verwendung des GST-spezifischen Antikörpers konnte hier die Problematik der unterschiedlich starken Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers an verschiedene CTB-Varianten umgangen werden (siehe dazu Abschnitt D.1.4). Neben der spezifischen Bindung beider CTB-Varianten an GM1 konnte unter Einsatz von 2F5 zur Detektion auch die Zugänglichkeit des Mimotops von MNCTB<sub>GST</sub> nachgewiesen werden (Abb. C-14).



**Abb. C-14: Nachweis der GM1-Bindung und Mimotop-Exposition chimärer CTB-Varianten mittels ELISA.** CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub> wurden in *E. coli* Origami 2(DE3) produziert und mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und im ELISA analysiert. Dabei wurden Platten mit GM1 beschichtet, die Detektion erfolgte mit einem GST-spezifischen Antikörper bzw. 2F5. Als Negativkontrolle diente ebenfalls über Affinitätschromatografie gereinigtes GST. Gezeigt ist der Mittelwert von drei Experimenten mit Standardabweichung.

### C.1.2.4 Produktion der chimären CTB-Varianten in größerem Maßstab für Immunisierungsexperimente

Für den Einsatz in Mausmodell wurden die CTB-Varianten, wie unter B.3.11 beschrieben, nach affinitätschromatographischer Reinigung und Dialyse gegen PBS sterilfiltriert und auf die für intranasale Applikationen erforderliche Konzentration von mindestens 0,4 µg/µl eingestellt. Die Quantifizierung erfolgte über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung mit Hilfe einer BSA-Verdünnungsreihe (siehe B.3.5). Abb. C-15 zeigt repräsentativ die Analyse jeweils einer im Tierversuch eingesetzten Charge von CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub> im Coomassie-gefärbten Gel und im Western-Blot mit CTB-spezifischem Antikörper.

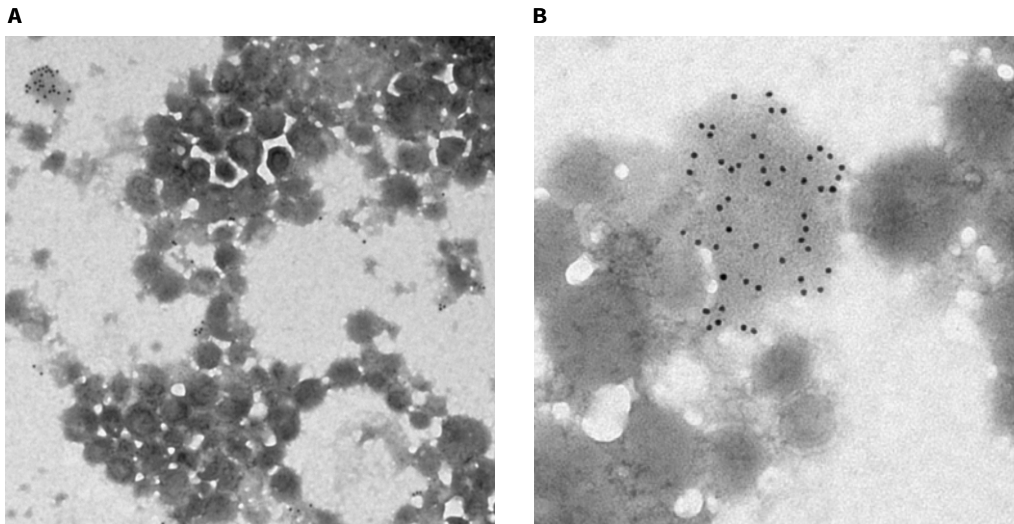


**Abb. C-15: Quantifizierung und Qualitätsanalyse von, für Immunisierungsexperimente produzierten, löslichen CTB-Varianten mittels SDS-PAGE und Western-Blot.** (A) CTB<sub>GST</sub> bzw. MNCTB<sub>GST</sub> wurden in *E. coli* Origami 2(DE3) produziert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt, sterilfiltriert und aufkonzentriert. Zur Quantifizierung wurden jeweils 5 µl Protein per SDS-PAGE aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Als Standard wurden jeweils 5 µl einer seriellen 1:2 BSA-Verdünnungsreihe, ausgehend von 5 µg/µl BSA (Spur 5-10) aufgetragen. In Spur 2 und 4 wurde jeweils der Durchfluss der Aufkonzentrationssäulen analysiert. Links befinden sich Größenangaben in kDa. (B) Western-Blot Analyse der Proben aus (A) mit einem CTB-spezifischen Antikörper.

### C.1.3 Präsentation von chimärem CTB auf der Oberfläche virusähnlicher Partikel durch chemische Kopplung

Neben der Verwendung in löslicher Form wurden die CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne durch den Einsatz von Kopplungs-Reagenzien auch auf VLPs präsentiert, welche bei der Anwendung *in vivo* über MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigene CTL-, T-Helfer- und B-Zellantworten stimulieren (siehe A.1.5). Ein potentieller Vorteil gegenüber den Transmembran-Varianten könnte dabei eine gesteigerte Beladung von VLPs mit CTB sein. Zudem ermöglicht die Methode auch die Präsentation von CTB auf im bakuloviralen System produzierten VLPs (Bak VLPs), ohne CTB-Mimotop-kodierende rekombinante Bakuloviren generieren zu müssen.

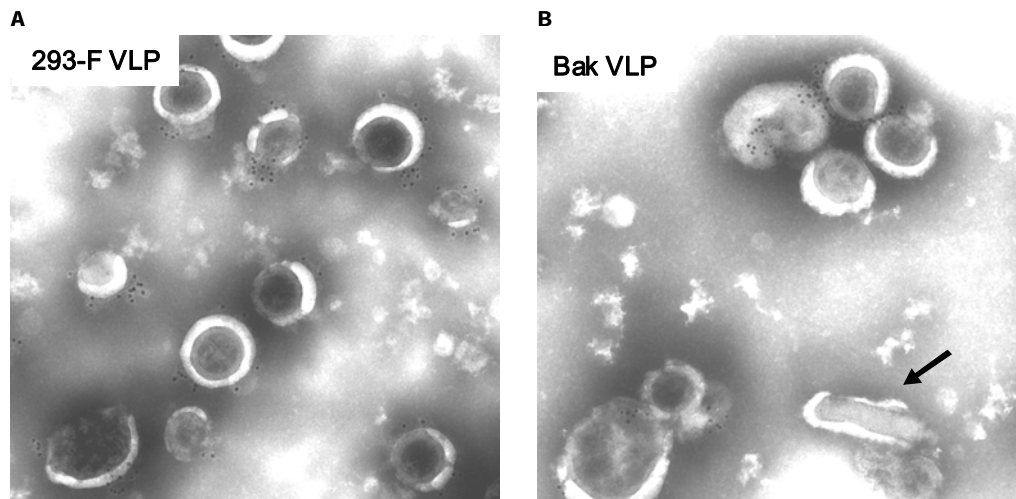
In einem ersten Anlauf wurden, wie unter B.3.14.1 beschrieben, im humanen bzw. bakuloviralen System produzierte VLPs und CTB biotinyliert und durch Zugabe von Streptavidin gekoppelt. Die Analyse der Biotinylierung erfolgte im Western-Blot mit HRP-gekoppeltem Streptavidin. Zur Überprüfung der Kopplung wurden die VLPs mittels Zonalzentrifugation im Saccharosegradient aufbereitet und im Western Blot mit CTB-spezifischem sowie Gag-spezifischem Antikörper untersucht (Daten nicht gezeigt). Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper zeigten, dass neben der Bindung von CTB an VLPs als Nebenprodukte VLP- und CTB-Aggregate entstehen. Abb. C-16 A zeigt exemplarisch VLPs, die über Streptavidin an andere VLPs gekoppelt wurden, Abb. C-16 B ein CTB-Aggregat das wiederum zwei VLP-Aggregate miteinander verbindet.



**Abb. C-16: Elektronenmikroskopische Analyse der Präsentation von CTB auf der VLP-Oberfläche nach Kopplung mittels Biotinylierung und Streptavidin.** 293T Zellen wurden mit syngagIIIB transfiziert. Nach 72h wurden die produzierten VLPs mittels Ultrazentrifugation des Überstands angereichert. Die Kopplung von CTB an VLPs erfolgte mittels Biotinylierung beider Komponenten und Zugabe von Streptavidin. Zur Abtrennung ungebundenen CTBs wurden die VLPs einer Zonalzentrifugation im Saccharosegradient (10-50 %) unterzogen. Für elektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgte eine Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper. Dargestellt sind zwei exemplarische Aufnahmen in 10.000facher (A) bzw. 30.000facher (B) Vergrößerung.

Um die Entstehung solcher Nebenprodukte zu vermeiden, wurde alternativ eine Kopplung mittels Sulfo-NHS durchgeführt (siehe B.3.14.2). Dabei kommt es nach Überführung von CTB in einen aminreaktiven NHS-Ester zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen CTB und VLP. Gekoppelte VLPs wurden zur Analyse mittels Zonalzentrifugation im Saccharosegradient aufbereitet und im

Western Blot mit CTB-spezifischem sowie Gag-spezifischem Antikörper untersucht (Daten nicht gezeigt). Abb. C-17 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von mit kommerziellem CTB gekoppelten VLPs nach Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper. Mit Hilfe der Sulfo-NHS Methode konnten analog auch im humanen und im bakuloviralen System produzierte VLPs mit CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub> gekoppelt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. C-17: Elektronenmikroskopische Analyse der Präsentation von CTB auf der VLP-Oberfläche nach Kopplung mittels Sulfo-NHS.** Die Kopplung von CTB an VLPs, produziert im humanen System (A) oder über rekombinantes Bakulovirus (B), erfolgte mittels Überführung von CTB in einen aminreaktiven NHS-Ester welcher freien Aminogruppen auf VLPs eine kovalente Bindung bildet. Zur Abtrennung ungebundenen CTBs wurden die VLPs einer Zonalzentrifugation im Saccharosegradient (10-50 %) unterzogen. Für elektronenmikroskopische Aufnahmen erfolgte eine Immunogoldmarkierung mit einem CTB-spezifischen Antikörper. Dargestellt ist je eine exemplarische Aufnahme in 20.000facher Vergrößerung. Der schwarze Pfeil in B kennzeichnet ein in der VLP-Präparation enthaltenes Bakulovirus.

#### C.1.4 Relative Quantifizierung der Beladung von VLPs mit CTB

Für einen Vergleich der auf unterschiedliche Weise CTB präsentierenden VLPs im Kleintiermodell sollte die Menge an jeweils enthaltenem CTB berücksichtigt werden. Daher wurde versucht, die Beladung von VLPs mit CTB zu quantifizieren.

Hierfür wurde zunächst eine Kombination aus zwei ELISA Varianten eingesetzt. Die Bestimmung der Gag Menge einer VLP Probe erfolgte dabei über einen HIV-1 Capsidantigen nachweisenden ELISA (siehe B.3.4). Da dieser spezifisch für prozessiertes Capsid ist, wurde zur Übertragung der Ergebnisse auf die Pr55<sup>gag</sup> Menge, wie unter B.3.4 beschrieben, mit Hilfe von rekombinanter HIV-1 Protease ermittelt, dass das Signal für prozessiertes Capsid 2,4-mal stärker ist als dasjenige für die gleiche Menge Pr55<sup>gag</sup>.

Zur Quantifizierung der CTB Menge einer VLP Probe wurde ein ELISA entworfen, bei dem Platten mit einem *murinen* CTB-spezifischen Antikörper (GTX21003, siehe B.2.4, Tab. B-4) beschichtet wurden. Nach Auftragen der lysierten VLPs erfolgte die Detektion des gebundenen CTB über ein CTB-spezifisches Antiserum (C 3062, siehe B.3.12, Tab. B-11). Trotz diverser Variationen von Blockierung, Antikörperverdünnung und Inkubationsbedingungen ließen sich allerdings weder ein starkes Hintergrundsignal eliminieren noch die Qualität der Eichgerade im CTB ELISA ausreichend optimieren, um reproduzierbare Werte für die Beladung von VLPs mit CTB zu ermitteln.

Daher wurde die Quantifizierung wie unter B.3.8 beschrieben mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot durchgeführt. Die Bestimmung der Gag Menge einer Probe erfolgte dabei anhand eines BSA-Standards im Coomassie-gefärbten Gel. Diese Methode umgeht die entstehende Ungenauigkeit aus Capsidantigen ELISA und Protease Behandlung. Die CTB Menge wurde mit Hilfe eines Standards aus kommerziellem CTB ermittelt. Da sowohl über eine Transmembrandomäne als auch über chemische Kopplung auf VLPs präsentiertes CTB nicht in einem Coomassie-gefärbten Gel sichtbar sind, wurden die entsprechenden Banden nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit Hilfe eines CTB-spezifischen Antikörpers detektiert.

Die wiederholte Durchführung dieser Quantifizierungsmethode ergab Schwankungen der absoluten Werte. Ein reproduzierbares Ergebnis lieferte aber der Vergleich auf einem Gel nebeneinander aufgetragener Proben. So konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen produzierte VLPs über eine Transmembrandomäne etwa doppelt so viel CTB tragen wie VLPs nach chemischer Kopplung. Diese wiederum präsentieren etwa 5x so viel CTB wie mittels rekombinatem Bakulovirus in Insektenzellen produzierte VLPs nach Kopplung. Tabelle C-1 enthält als Richtwerte anzusehende, aus zwei unabhängigen Experimenten ermittelte Ergebnisse der Beladung auf unterschiedliche Weise CTB präsentierender VLPs.

VLP	µg CTB pro 30 µg VLP
293-F VLP/CTB-CD34TM	1,22
293-F VLP/CTB-CD34 gekoppelt	0,72
Bak VLP/CTB-CD34 gekoppelt	0,13

**Tab. C-1: Richtwerte der Beladung von VLPs mit CTB**

Die angegebenen Werte ergeben sich als Mittelwert zweier unabhängiger Experimente.

## C.2 Immunogenität chimärer CTB-Varianten

Für die Immunisierungsexperimente wurden VLPs, wie unter B.2.5 (293-F VLP) bzw. B.2.6 (Bak VLP) beschrieben, sowie lösliches chimäres CTB, wie unter B.3.11 und C.1.2.4 erläutert, in Großansätzen produziert. Alle eingesetzten Chargen wurden im Coomassie-gefärbten Gel quantifiziert (siehe B.3.5) und mittels Western-Blot analysiert. Des Weiteren wurde bei jeder Probe die Nicht-Überschreitung der zulässigen Menge an bakteriellem Endotoxin<sup>30</sup> kontrolliert (siehe B.3.15).

Die durchgeführten *in vivo* Studien erfolgten im Hinblick auf zwei Fragestellungen, den Adjuvans-Effekt des Trägerproteins CTB einerseits und die Fokussierung der Immunantworten auf den durch das Mimotop dargestellten Env-Bereich andererseits.

### C.2.1 Adjuvans-Effekt von CTB

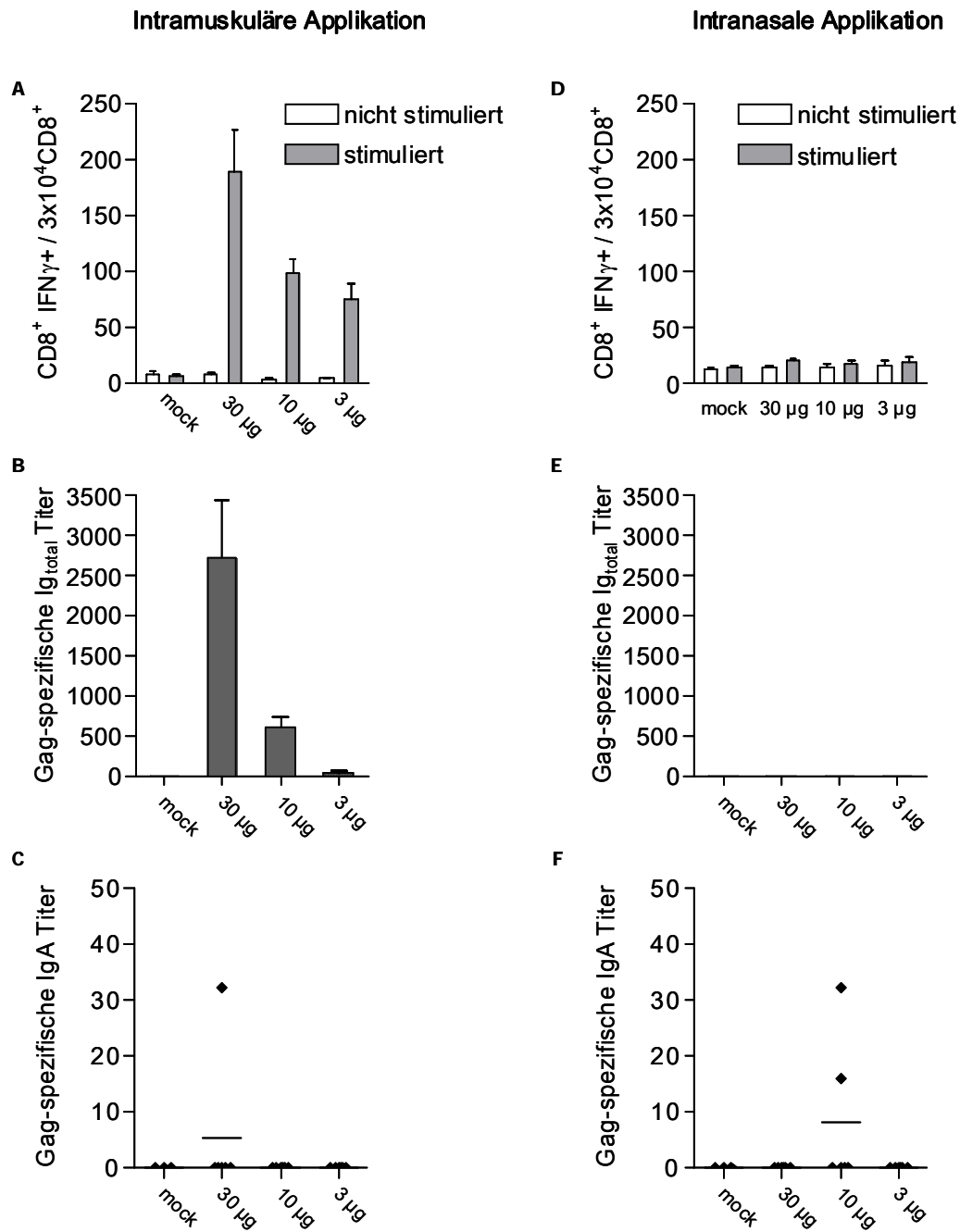
Die Messung des Adjuvans-Effekts von CTB erfolgte vornehmlich durch Untersuchung des Einflusses chimärer CTB-Varianten auf Gag-spezifische Immunantworten.

### **C.2.1.1 Im humanen System produzierte VLPs induzieren ohne Adjuvans keine Gag-spezifische mukosale Immunantwort**

Vor Analyse des Adjuvans-Effekts verschiedener CTB-Varianten wurde zunächst die durch VLPs an sich induzierte Gag-spezifische Immunantwort untersucht. Da in der Regel mukosale Oberflächen als Eintrittspforte von HIV fungieren, muss eine neutralisierende Vakzine in der Lage sein, mukosale Immunantworten zu induzieren. Offenbar ist dafür die Darreichung der Immunogene über mukosale Routen erforderlich<sup>66,86,100,187,224</sup>, weshalb die intranasale Applikation von VLPs getestet wurde. Zur Kontrolle erfolgte die geläufige Injektion in den Muskel. In beiden Fällen wurden BALB/c Mäuse zweimal mit je 3, 10 bzw. 30 µg im humanen System produzierter VLPs (Quantifizierung von Gag nach B.3.5) immunisiert. Dabei folgte einer Grundimmunisierung nach sieben Wochen eine *Booster*-Immunsierung. Drei Wochen später wurden die Milzen entnommen, jeweils zwei Milzen pro Gruppe vereint und Gag-spezifische zelluläre Immunantworten, wie unter B.4.4 beschrieben, mittels FACS Analyse bestimmt (siehe Abb. C-18 A und D). Zum Auslesen humoraler Immunantworten wurde den Mäusen vor der Grundimmunisierung sowie 3 Wochen nach der *Booster*-Immunsierung Blut entnommen und das daraus gewonnene Serum (siehe B.4.2.1) mittels Gesamtimmunglobulin ELISA analysiert (siehe B.4.2.2; Abb. C-18 B und E). Für mukosale Immunantworten wurden Bronchoalveolare Lavagen (BAL), wie unter B.4.3.1 beschrieben, gewonnen und im IgA Antikörper ELISA untersucht (siehe B.4.3.2; Abb. C-18 C und F).

Nach intramuskulärer Applikation von VLPs ließ sich für zelluläre und systemisch humorale Immunantworten ein Dosis-abhängiger Effekt zeigen (Abb. C-18 A und B), eine mukosale Antwort konnte wie erwartet nicht nachgewiesen werden. Lediglich eine einzelne Maus wies bei i.m. Immunisierung mit der höchsten Dosis einen Gag-spezifischen Antikörpertiter auf (Abb. C-18 C).

Ohne die Präsenz eines Adjuvans war bei keiner der eingesetzten Dosen VLPs eine Gag-spezifische Immunantwort nach intranasaler Immunisierung nachweisbar. Lediglich zwei Einzelmäuse hatten einen schwachen Gag-spezifischen IgA Titer (Abb. C-18 F). In weiteren Immunisierungen zeigte sich allerdings, dass die Stärke der Antworten insgesamt von Experiment zu Experiment variiert, wodurch z. T. Gag-spezifische systemisch humorale Immunantworten nach i.n. Applikation von VLPs ohne Adjuvans nachgewiesen werden konnten (siehe z.B. Abb. C-19 B). Eine mukosale Immunantwort ließ sich jedoch durch im humanen System produzierte VLPs ohne Adjuvans in keinem der durchgeführten Experimente induzieren.



**Abb. C-18: Gag-spezifische Immunantworten nach intramuskulärer bzw. intranasaler Immunisierung mit verschiedenen Dosen im humanen System produzierter VLPs.** 6 Mäuse pro Gruppe wurden zweimal mit je 3, 10 bzw. 30  $\mu$ g VLPs intramuskulär (A-C) bzw. intranasal (D-F) immunisiert. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienen als Negativkontrolle. (A, D)  $2 \cdot 10^7$  Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid (stimuliert) oder ohne Peptid (nicht stimuliert) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen pro 30.000 CD8<sup>+</sup> Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. (B, E) Zur Ermittlung der Gag-spezifischen humoralen Immunantworten (Ig<sub>total</sub>) wurden Seren der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. (C, F) Die Bestimmung Gag-spezifischer mukosaler Immunantworten (IgA) erfolgte durch Analyse der Bronchoalveolaren Lavagen (BAL) im ELISA. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse ( $\blacklozenge$ ) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie).

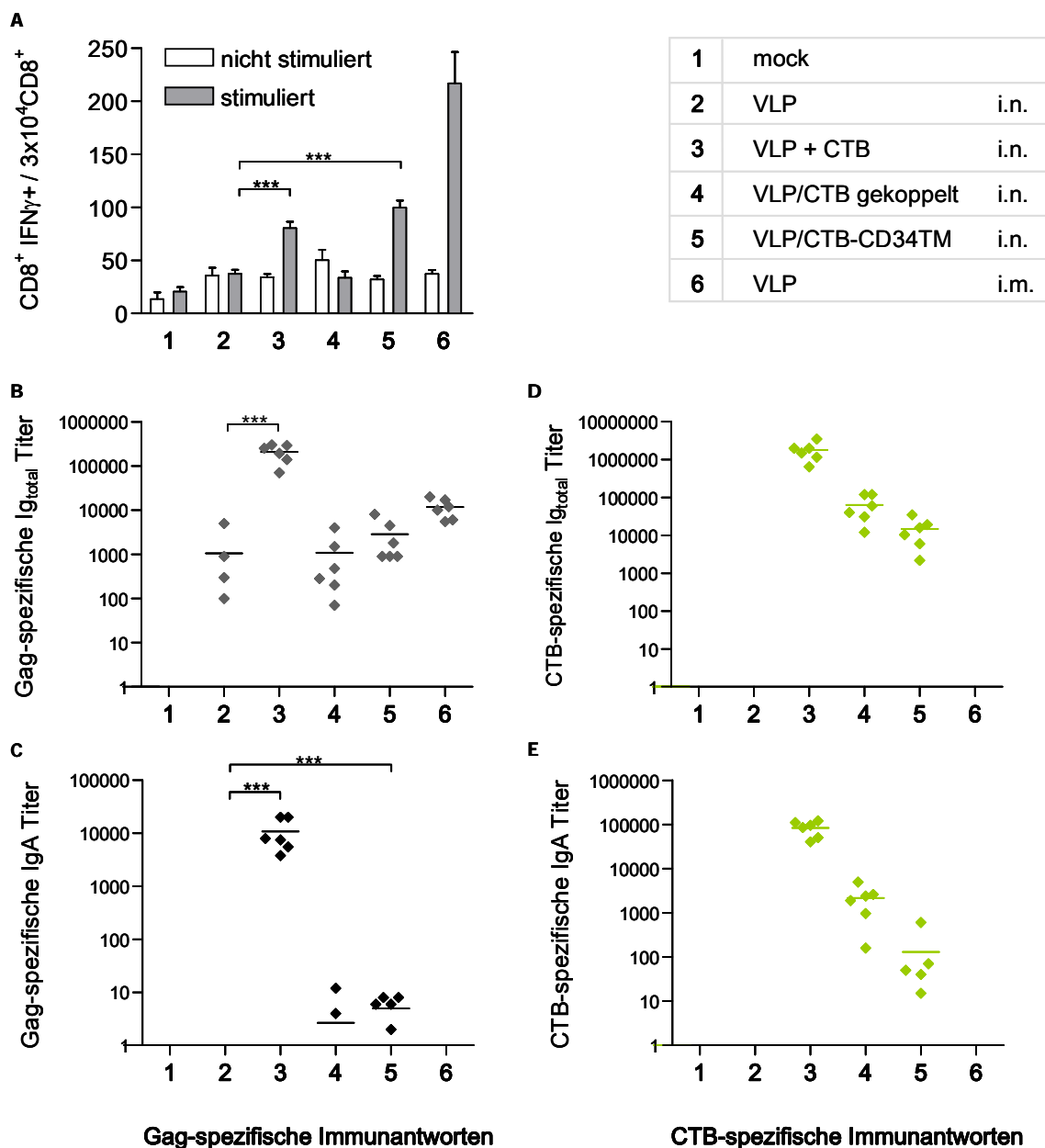
### **C.2.1.2 Die Präsentation von CTB auf VLPs mittels Transmembrandomäne sowie das Beimischen von CTB induzieren eine Gag-spezifische mukosale Immunantwort**

Im Folgenden wurde der Einfluss von CTB, zunächst ohne Anwesenheit eines Mimotops, auf Gag-spezifische Immunantworten untersucht. BALB/c Mäuse wurden intranasal mit je 30 µg im humanen System produzierter VLPs immunisiert, wobei entweder 10 µg kommerzielles CTB in löslicher Form beigemischt wurden oder die VLPs CTB über eine Transmembrandomäne bzw. nach chemischer Kopplung auf der Oberfläche präsentierten. Zum Vergleich verabreichte man Mäusen VLPs ohne CTB. Nicht behandelte Mäuse (mock) sowie i.m. mit VLPs immunisierte Mäuse dienten als weitere Kontrollen (Abb. C-19). Einer Grundimmunisierung folgten zwei homologe *Booster*-Immunisierungen nach 4 und 7 Wochen. Eine Woche nach der finalen Applikation wurden Milzen entnommen und BALs durchgeführt. Seren wurden vor der Grundimmunisierung sowie nach jeder einzelnen Immunisierung gewonnen. Die Analyse im ELISA zeigte eine kontinuierliche Zunahme der Gag- und CTB-spezifischen Antikörpertiter über die Zeit (nicht gezeigt). In Abb. C-19 B bzw. D sind die Titer der Seren dargestellt, die eine Woche nach der finalen Immunisierung gewonnen wurden.

Wie bereits im vorangehenden Abschnitt angesprochen, reagierten hier vier von sechs Mäusen auf eine i.n. Immunisierung mit VLPs ohne Anwesenheit von CTB durch Produktion Gag-spezifischer Antikörper (Abb. C-19 B, Gr. 2). Das Beimischen von löslichem CTB konnte den  $Ig_{total}$  Titer um mehr als zwei Potenzen erhöhen (Gr. 3) und übertrifft damit sogar die Reaktion auf i.m. applizierte VLPs (Gr. 6). Die Präsentation von CTB über eine Transmembrandomäne (Gr. 5) verbesserte die Gag-spezifische humorale Immunantwort zumindest etwa um eine halbe Potenz, wohingegen mit CTB gekoppelte VLPs keinen Einfluss hatten (Gr. 4).

Durch jede Form der Präsenz von CTB in VLP-Proben konnten Gag-spezifische mukosale Immunantworten *de novo* induziert werden (Abb. C-19 C), wobei bei einem Titer von etwa 10.000 bei beigemischttem CTB der Effekt von TM gebundenem oder gekoppeltem CTB relativ gering ausfiel (ca. 10 bzw. 5). Die Untersuchung der CTB-spezifischen Antikörperantworten (Abb. C-19 D bzw. E) diente als zusätzliche Kontrolle der Präsenz von CTB in den verabreichten Proben.

Auch Gag-spezifische zelluläre Immunantworten konnten durch das Beimischen sowie die Präsentation von CTB über eine Transmembrandomäne induziert werden (Abb. C-19 A). Hierbei hatte die TM-Variante sogar den größeren Effekt. Gekoppeltes CTB konnte dagegen keine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort induzieren.



**Abb. C-19: Nachweis eines Adjuvans-Effekts von CTB auf Gag-spezifische Immunantworten nach intranasaler Immunisierung von BALB/c Mäusen.** 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben dreimal mit je 30  $\mu$ g VLPs immunisiert. In Gruppe 3 wurden den VLPs bei jeder Immunisierung je 10  $\mu$ g lösliches CTB beigemischt. Nicht immunisierte (mock) sowie i.m. mit VLPs immunisierte Mäuse dienten als Kontrolle. (A)  $2 \cdot 10^7$  Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid (stimuliert) oder ohne Peptid (nicht stimuliert) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen pro 30.000 CD8<sup>+</sup> Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. (B-E) Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden Seren (B, D) bzw. BALs (C, E) der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die Gag-spezifischen (B, C) bzw. CTB-spezifischen (D, E) Antikörpertiter der Einzelmäuse (♦) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Signifikanz (zweiseitiger *Student's t-test*): \* (0,05 < P ≤ 0,1), \*\* (0,01 ≤ P ≤ 0,05), \*\*\* (P < 0,01).

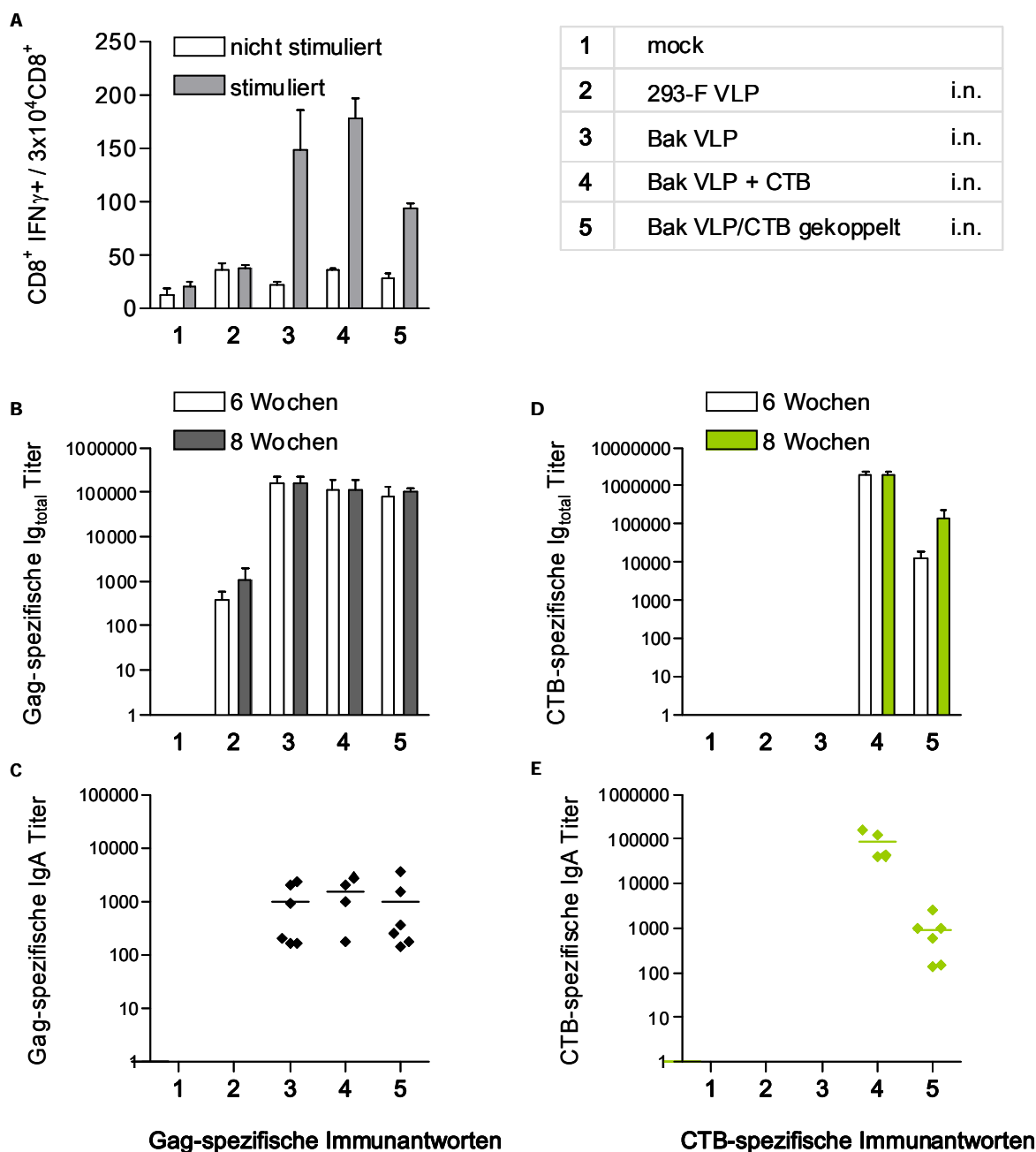
### C.2.1.3 Im bakuloviralen System produzierte VLPs sind aufgrund ihrer Verunreinigung mit Bakuloviren hoch immunogen und eignen sich daher nicht als Messgröße für einen CTB-spezifischen Adjuvans-Effekt

Neben den im humanen System produzierten VLPs (293-F VLPs) wurden wie unter C.1.3 beschrieben auch mit Hilfe von Bakuloviren in Insektenzellen hergestellte VLPs (Bak VLPs) mit CTB gekoppelt. Um den Adjuvans-Effekt von CTB auch bei Bak VLPs zu testen, wurde ein zu dem im vorangegangenen

Abschnitt identisches Immunisierungsexperiment mit Bak VLPs durchgeführt. Zum direkten Vergleich wurden einer Gruppe 293-F VLPs verabreicht. Die Applikation der Proben erfolgte ausschließlich intranasal (Abb. C-20).

Es zeigte sich sowohl bei den Gag-spezifischen T-Zell-Antworten (Abb. C-20 A) als auch bei den systemischen und mukosalen Antikörperantworten (Abb. C-20 B bzw. C), dass in Insektenzellen mit Hilfe von Bakuloviren produzierte VLPs bereits ohne CTB so hoch immunogen sind, dass die Präsenz von CTB in jeglicher Form keine weitere Steigerung bewirken konnte. Die Kopplung von CTB hatte sogar einen negativen Effekt auf die zelluläre Immunantwort (Abb. C-20 A, Gr. 5). Des Weiteren konnte außer bei der CTB-spezifischen Antwort der gekoppelten VLPs bei keiner mit Bak VLPs immunisierten Gruppe eine Zunahme der Antikörpertiter (Gag- und CTB-spezifisch) in den final gewonnenen Seren gegenüber denjenigen nach der ersten *Booster*-Immunisierungen festgestellt werden (Abb. C-20 B, D).

Der verglichen mit den 293-F VLPs starke immunstimulatorische Effekt der Bak VLPs lässt sich wohl auf die Verunreinigung von Bak VLPs mit Bakuloviren zurückführen (siehe Abb. C-17 B und D.2.1.2). Versuche in der Arbeitsgruppe, Bakuloviren aus der VLP-Präparation abzutrennen, erwiesen sich als erfolglos<sup>28</sup>, weshalb die Verwendung von Bak VLPs zumindest zur Messung des Adjuvans-Effekts von CTB nicht geeignet ist. Daher wurden alle weiteren Immunisierungsversuche ausschließlich mit im humanen System produzierten VLPs durchgeführt.



**Abb. C-20: Immunantworten nach intranasaler Verabreichung von bakuloviral produzierten VLPs.**

6 Mäuse pro Gruppe wurden wie angegeben dreimal mit je 30 µg VLPs immunisiert. Nicht immunisierte Mäuse (mock) und solche, die mit im humanen System produzierten VLPs immunisiert wurden, dienten als Kontrolle. (A)  $2 \cdot 10^7$  Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid (stimuliert) oder ohne Peptid (nicht stimuliert) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFNγ<sup>+</sup> Zellen pro 30.000 CD8<sup>+</sup> Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. (B, D) Zur Ermittlung der humoralen Gag-spezifischen (B) und CTB-spezifischen (D) Immunantworten (Ig<sub>total</sub>) wurden Seren der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse nach der ersten (6 Wochen) und der zweiten (8 Wochen) *Booster*-Immunisierung. (C, E) Die Bestimmung Gag-spezifischer (C) und CTB-spezifischer (E) mukosaler Immunantworten (IgA) erfolgte durch Analyse der Bronchoalveolaren Lavagen (BAL) im ELISA. Dargestellt sind die Antikörpertiter der Einzelmäuse (♦) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie).

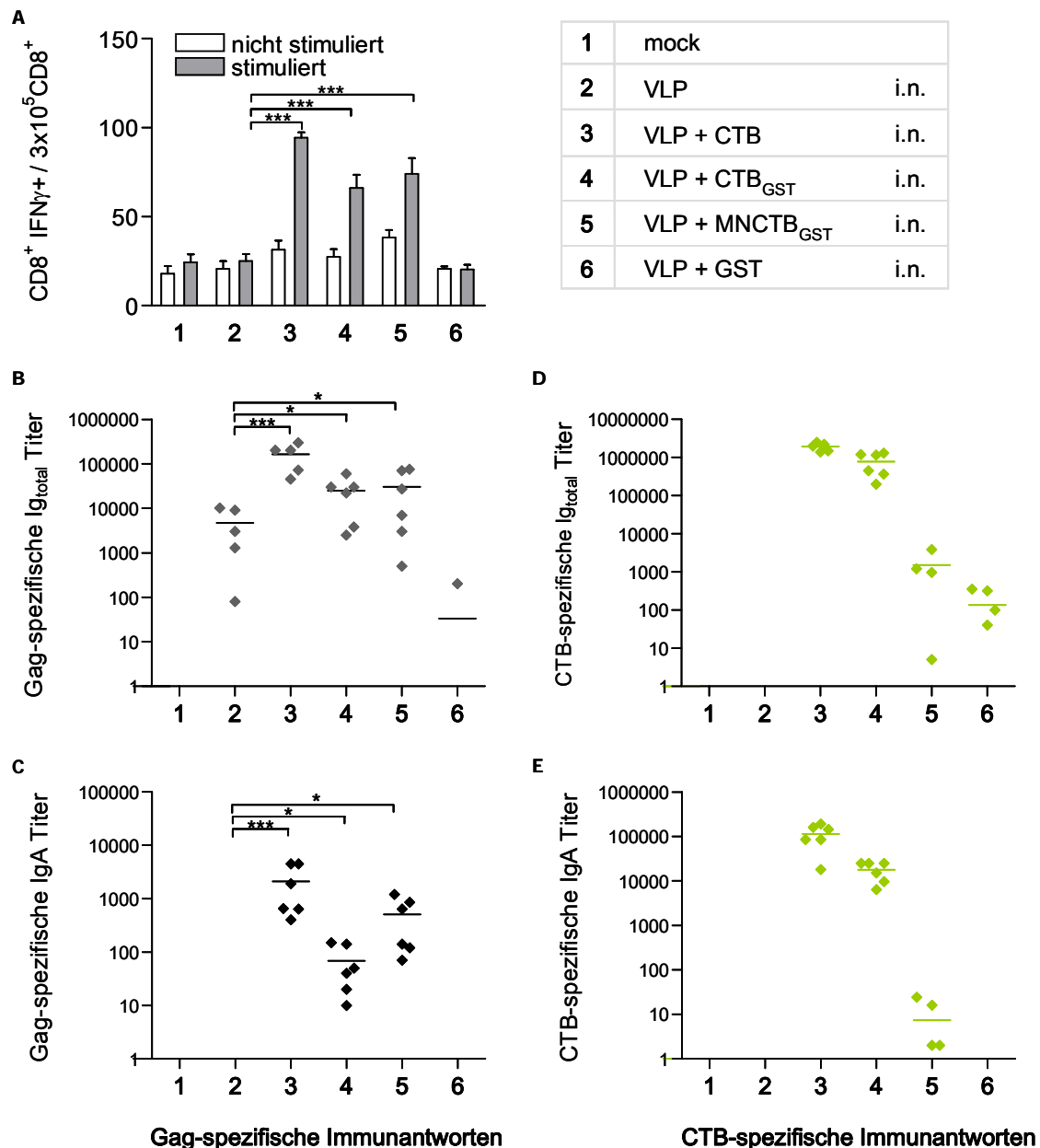
#### C.2.1.4 Der Adjuvans-Effekt von löslich beigemischem CTB auf Gag-spezifische Immunantworten bleibt bei Präsentation eines Mimotops erhalten

Wie unter C.2.1.2 beschrieben hat das Beimischen von CTB einen stark positiven Effekt auf die Gag-spezifische Immunantwort intranasal applizierter VLPs. Darauf aufbauend wurde untersucht, welchen

Einfluss es auf diesen Adjuvans-Effekt hat, wenn CTB ein Mimotop trägt. Hierfür wurden, analog zu dem in C.2.1.2 beschriebenen Experiment, BALB/c Mäuse intranasal mit je 30 µg VLPs plus 10 µg Mimotop-präsentierendes CTB (MNCTB<sub>GST</sub>) immunisiert. Zum Vergleich erhielten Mäuse anstelle von MNCTB<sub>GST</sub> entweder selbst produziertes CTB ohne Mimotop (CTB<sub>GST</sub>), kommerzielles CTB oder selbst produziertes GST. Als weitere Kontrollen dienten nicht behandelte Mäuse (mock) sowie Mäuse, denen ausschließlich 30 µg VLPs (i.n.) verabreicht wurden (Abb. C-21). Wie in C.2.1.2 folgten einer Grundimmunisierung zwei homologe *Booster*-Immunisterungen nach 4 und 7 Wochen. Auch die Zeitpunkte von Serengewinnung und Gewebeentnahme entsprachen denjenigen in C.2.1.2. Anzumerken ist, dass in Gruppe 5 (siehe Abb. C-21) zwei Tiere bereits bei der ersten *Booster*-Immunisterung und alle 6 Tiere bei der zweiten *Booster*-Immunisterung zwar VLPs, aber kein beigemischtetes MNCTB<sub>GST</sub> erhielten, da die zur Immunisierung vorbereiteten Proteinchargen während der Lagerung ausfielen.

Wie Abb. C-21 A zeigt, induziert nicht nur das Beimischen von kommerziellem CTB (Gr. 3) eine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort. Der Effekt bleibt, wenn auch geringfügig schwächer, für selbst produziertes CTB ohne (Gr. 4) sowie mit Mimotop (Gr. 5) erhalten und ist nicht auf den GST-*tag* zurückzuführen (Gr. 6). Ähnliches gilt für die humorale Immunantwort (Abb. C-21 B). Der Titer von Gag-spezifischem Gesamtimmunglobulin lässt sich durch jede beigemischte CTB-Variante, nicht aber GST erhöhen. Dabei ist wieder der Effekt von kommerziellem CTB mit über einer zehnfachen Steigerung etwas größer als der von selbst hergestelltem CTB ohne bzw. mit Mimotop (ca. fünf- bzw. zehnfache Steigerung). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass vermutlich ein GST-*tag*, nicht aber die Präsentation eines Mimotops den Adjuvans-Effekt von CTB leicht beeinträchtigen könnte. Die gleiche Schlussfolgerung ergibt sich bei der Analyse der mukosalen Antikörperantwort (Abb. C-21 C). Alle drei eingesetzten CTB-Varianten induzieren die Bildung Gag-spezifischer IgAs. Dabei liegt der mittlere Titer bei kommerziellem CTB etwas über 1000, bei CTB<sub>GST</sub> knapp unter 100 und bei MNCTB<sub>GST</sub> fast wieder bei 1000, obwohl in dieser Gruppe, wie oben erläutert, teilweise *Booster*-Immunisterungen unvollständig waren.

In Ergänzung wurde zusätzlich zur Gag-spezifischen auch wieder die CTB-spezifische humorale Immunantwort bestimmt (Abb. C-21 D und E). Die ermittelten, verminderten CTB-spezifischen Antikörpertiter von selbst produziertem CTB, welches einen GST-*tag* besitzt, verglichen mit kommerziellem CTB, das keinen GST-*tag* trägt, lassen sich zum einen dadurch erklären, dass alle 96-Napf-Platten unabhängig von der immunisierten Probe mit kommerziellem CTB beschichtet wurden (siehe B.4.2.2 und B.4.3.2), zum anderen spiegeln die CTB-spezifischen Titer der Gruppe 5 die eingeschränkten *Booster*-Immunisterungen wieder.



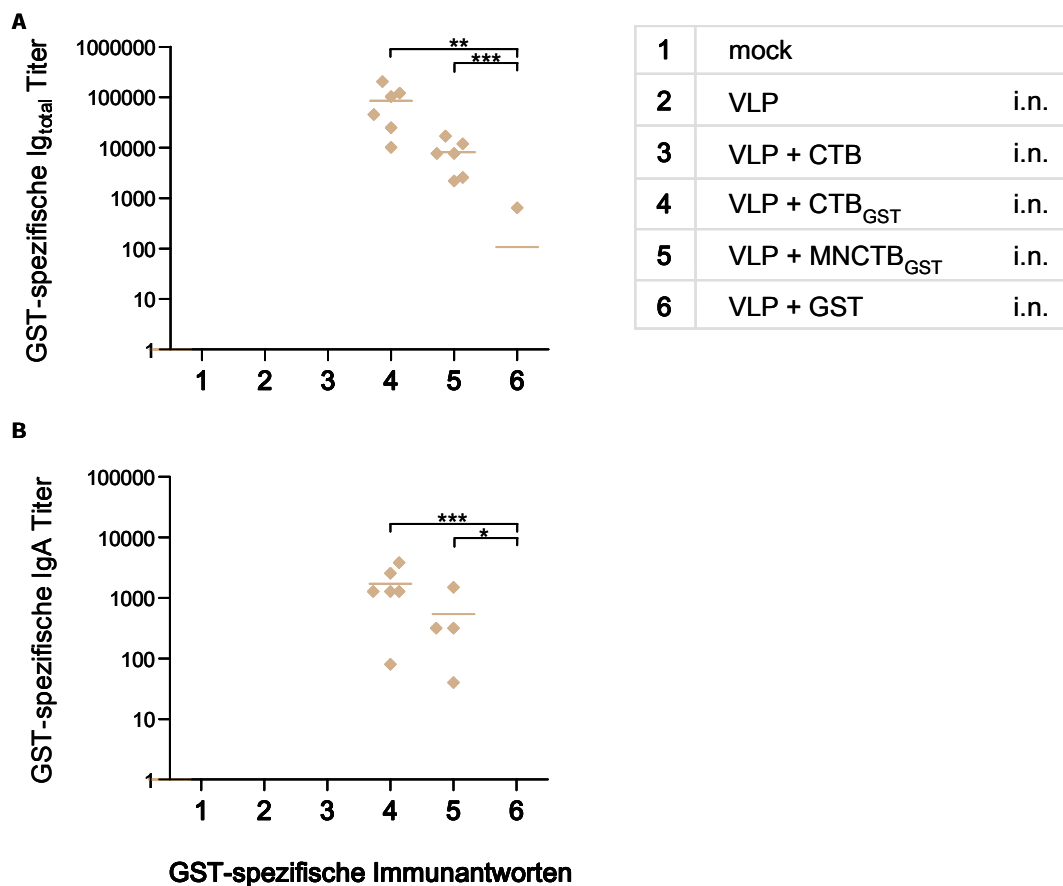
**Abb. C-21: Nachweis eines Adjuvans-Effekts von Mimotop-tragendem CTB auf Gag-spezifische Immunantworten nach intranasaler Immunisierung von BALB/c Mäusen.** 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben dreimal mit je 30  $\mu$ g VLPs immunisiert. In Gruppe 3-6 wurden bei jeder Immunisierung 10  $\mu$ g der angegebenen CTB-Variante bzw. GST beigemischt. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle. (A)  $2 \cdot 10^7$  Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid (stimuliert) oder ohne Peptid (nicht stimuliert) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen pro 30.000 CD8<sup>+</sup> Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. (B-E) Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden Seren (B, D) bzw. BALs (C, E) der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die Gag-spezifischen (B, C) bzw. CTB-spezifischen (D, E) Antikörpertiter der Einzelmäuse ( $\blacklozenge$ ) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Signifikanz (zweiseitiger *Student's t-test*): \* ( $0,05 < P \leq 0,1$ ), \*\* ( $0,01 \leq P \leq 0,05$ ), \*\*\* ( $P < 0,01$ ).

### C.2.1.5 CTB ist im Stande, humorale und mukosale Immunantworten gegen ein fusioniertes Peptid zu induzieren

Abgesehen von der in C.2.1.4 beobachteten leichten Beeinträchtigung des Adjuvans-Effekts von CTB durch GST ergab sich durch den GST-tag auch die Möglichkeit die immunstimulatorische Wirkung von CTB auf die Antikörperantwort gegen ein fusioniertes Peptid zu untersuchen. Dazu wurden Seren und

BALs aus der in C.2.1.4 beschriebenen Immunisierungsstudie auf GST-spezifisches Gesamtimmunglobulin (siehe B.4.2.2) und GST-spezifische IgAs (siehe B.4.3.2) untersucht. Wie Abb. C-22 A zu entnehmen ist, enthält nur das final gewonnene Serum einer von 6 Mäusen GST-spezifische Antikörper, wenn eine Immunisierung mit VLPs plus GST erfolgte (Gr. 6). Die Verabreichung eines mit CTB fusionierten GST (CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub>) dagegen induziert bei jeweils allen 6 Mäusen eine GST-spezifische humorale Immunantwort (Gr. 4 bzw. 5). Vergleichbares wurde für die mukosale Antikörperantwort beobachtet (Abb. C-22 B). Ohne CTB waren in der BAL keiner der 6 immunisierten Mäuse GST-spezifische IgAs nachweisbar. Die Immunisierung von mit CTB fusioniertem GST dagegen induzierte jeweils eine starke mukosale Antikörperantwort. Das jeweils verhältnismäßig schlechtere Abschneiden von MNCTB<sub>GST</sub> erklärt sich durch die in C.2.1.4 erläuterten Einschränkungen bei den beiden *Booster*-Immunisierungen.

Diese Ergebnisse beweisen, dass CTB in den entworfenen, selbst produzierten chimären Proteinen die humorale systemische und mukosale Immunantwort gegen fusionierte Bereiche positiv beeinflusst.



**Abb. C-22: Nachweis eines Adjuvans-Effekts von CTB auf die humorale Immunantwort eines fusionierten Peptids am Beispiel von GST.** 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben dreimal intranasal mit je 30 µg VLPs immunisiert. In Gruppe 3-6 wurden bei jeder Immunisierung 10 µg der angegebenen CTB-Variante bzw. GST beigemischt. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle. Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden Seren (A) bzw. BALs (B) der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die GST-spezifischen Antikörpertiter der Einzelmäuse (♦) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Signifikanz (zweiseitiger *Student's t-test*): \* (0,05 < P ≤ 0,1), \*\* (0,01 ≤ P ≤ 0,05), \*\*\* (P < 0,01).

### **C.2.1.6 Mittels Transmembrandomäne auf VLPs verankertes CTB induziert auch bei Präsentation eines Mimotops Gag-spezifische humorale Immunantworten**

Wie für löslich beigemischt CTB wurde auch für über eine Transmembrandomäne auf der Oberfläche von VLPs präsentiertes CTB der Einfluss eines Mimotops auf den Adjuvans-Effekt untersucht. In Analogie zu der unter C.2.1.2 beschriebenen Studie wurden BALB/c Mäuse intranasal mit je 30 µg VLPs immunisiert, die entweder kein CTB oder CTB ohne (VLP/CTB-CD34TM) bzw. mit Mimotop (VLP/MNCTB-CD34TM) trugen. Nicht behandelte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle (Abb. C-23). Immunisierungsschema und Zeitpunkte von Seren- bzw. Gewebeentnahme entsprachen denjenigen in C.2.1.2.

Aufgrund insgesamt schwächerer Immunantworten im Verhältnis zu anderen Immunisierungsexperimenten (siehe z.B. Gag-spezifische  $Ig_{total}$  Titer in Abb. C-19; siehe auch C.2.1.1) und eines zusätzlich hohen Hintergrundsignals im FACS konnten hier keine zellulären Immunantworten von VLPs nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt, Experiment wird wiederholt). Die insgesamt schwächeren Antworten dieser Studie machten sich auch bei den mukosalen Immunantworten bemerkbar. So konnten lediglich in der BAL einer einzelnen Maus (immunisiert mit VLP/MNCTB-CD34TM) Gag-spezifische IgAs nachgewiesen werden (Abb. C-23 B).

Während die intranasale Applikation von VLPs ohne CTB keine Gag-spezifischen Antikörper hervorrief (Abb. C-23 A, Gr. 2), induzierten neben VLPs, die CTB alleine präsentieren (Gr. 3), auch CTB mit Mimotop tragende VLPs (Gr. 4) die Produktion Gag-spezifische Antikörper ( $Ig_{total}$ ), wobei bei VLP/MNCTB-CD34TM der mittlere Titer etwas niedriger lag und im Gegensatz zu VLP/CTB-CD34TM nur die Hälfte der Mäuse reagierte.

1	mock	
2	VLP	i.n.
3	VLP/CTB-CD34TM	i.n.
4	VLP/MNCTB-CD34TM	i.n.

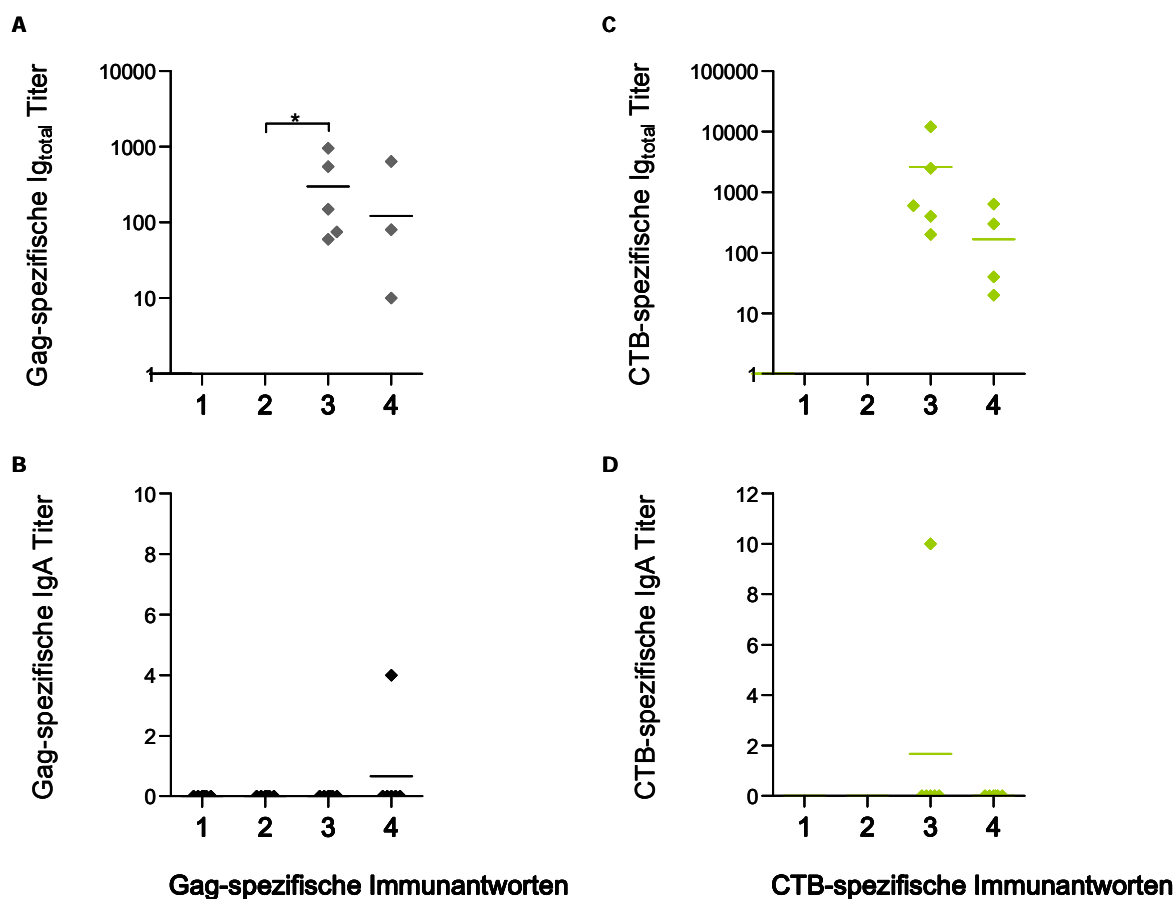


Abb. C-23: Nachweis eines Adjuvans-Effekts von Mimotop-tragendem, über eine Transmembrandomäne präsentiertem CTB auf Gag-spezifische humorale Immunantworten nach intranasaler Immunisierung von BALB/c Mäusen. 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben dreimal mit je 30 µg VLPs immunisiert. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienen als Kontrolle. Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden Seren (A, B) bzw. BALs (C, D) der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die Gag-spezifischen (A, B) bzw. CTB-spezifischen (C, D) Antikörpertiter der Einzelmäuse (♦) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie). Signifikanz (zweiseitiger *Student's t-test*): \* ( $P \leq 0,1$ ).

## C.2.2 Fokussierung der humoralen Immunantwort auf ein Env Epitop

Im zweiten Teil der Immunisierungsstudien wurde die Fokussierung der Immunantworten auf den durch das Mimotop dargestellten Env-Bereich untersucht.

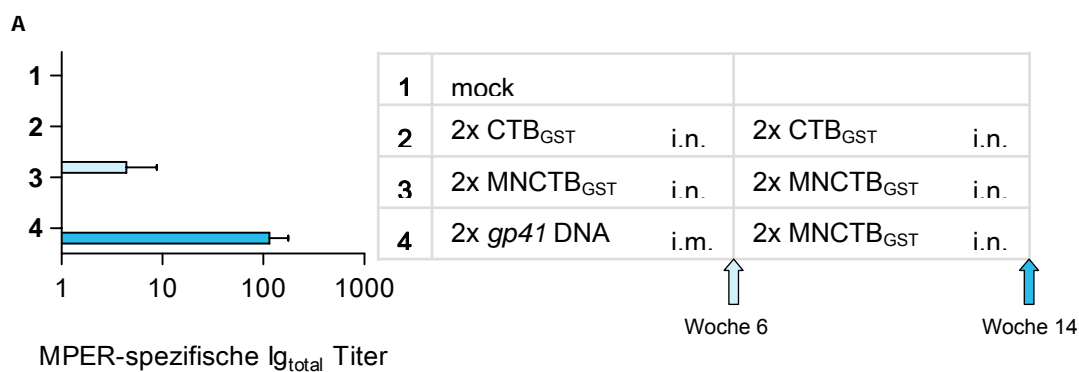
### C.2.2.1 Eine heterologe *Prime-Boost*-Immunisierung mit gp41 kodierender DNA und MNCTB<sub>GST</sub> führt zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper mit moderater *Clade* übergreifender Neutralisationsaktivität

Neben der Untersuchung des Adjuvans-Effekts von CTB ist ein wesentliches Ziel bei der Entwicklung einer effizienten HIV Vakzine die Induktion breit neutralisierender Antikörper (bNAK) gegen Env. Wie unter C.1.1.1 beschrieben entstammt der durch das Mimotop dargestellte Bereich der MPER (*membrane proximal external region*) von Env und enthält die Kernepitope der beiden bekannten bNAKs 2F5 und 4E10. Unter C.1.2.3 konnte gezeigt werden, dass diese Epitope frei zugänglich präsentiert werden. Im Folgenden wurde nun untersucht, ob lösliches, Mimotop-tragendes CTB (MNCTB<sub>GST</sub>) in der Lage ist, die Bildung MPER-spezifischer Antikörper hervorzurufen.

BALB/c Mäuse wurden viermal im Abstand von je vier Wochen intranasal mit je 10 µg MNCTB<sub>GST</sub> immunisiert. Eine weitere Gruppe erhielt anstelle der ersten beiden Immunisierungen mit MNCTB<sub>GST</sub> jeweils 80 µg einer gp41 kodierenden DNA Vakzine (ZM96 mit eingeführtem 2F5 Epitop; zur Verfügung gestellt von T. Benen<sup>17</sup>, siehe E.2) über die intramuskuläre Route. Als Kontrollen dienten nicht behandelte sowie viermal mit je 30 µg CTB<sub>GST</sub> immunisierte Mäuse. Zur Analyse der humoralen Immunantwort wurden Seren vor der ersten sowie jeweils zwei Wochen nach der zweiten und vierten Applikation gewonnen.

Abb. C-24 A ist zu entnehmen, dass durch zweifache Immunisierung mit MNCTB<sub>GST</sub> eine moderate MPER-spezifische Antikörperantwort hervorgerufen wurde, die durch zwei weitere Immunisierungen mit dem Protein aber nicht gesteigert werden konnte (Gr. 3). Nach zweifacher Applikation der gp41 kodierenden DNA Vakzine wurden keine MPER-spezifischen Antikörper gebildet. Erst durch die anschließende Verabreichung von Mimotop-tragendem CTB wurde in 4 von 8 Mäusen die Bildung MPER-spezifischer Antikörper induziert (Gr. 4). Der mittlere Titer bei der heterologen gp41 DNA *Prime* und MNCTB<sub>GST</sub> *Boost*-Immunisierung lag dann jedoch um mehr als eine Potenz über dem Wert, der durch zweifache Immunisierung mit MNCTB<sub>GST</sub> erreicht werden konnte.

Um zu untersuchen, ob die induzierten MPER-spezifischen Antikörper auch neutralisierende Aktivität besitzen, wurden die final gewonnenen Seren der heterolog immunisierten Gruppe einem TZM.bl Test unterzogen (siehe B.4.2.3). Dabei werden TZM.bl Zellen, die neben CD4 beide Corezeptoren für eine HIV-Infektion tragen, zunächst mit den potentiell bNAK enthaltenden Seren und anschließend mit verschiedenen Virus Isolaten inkubiert. Der Messung erfolgter Infektion dient ein, durch den HIV LTR Promotor regulierter Reporter. Wie Abb. C-24 B zeigt wirkten 4 von 8 Seren neutralisierend. Dabei waren die Titer dreier Mäuse zwar eher moderat, jedoch konnten *Clade* übergreifend jeweils 3 der 4 untersuchten Viren neutralisiert werden. Getestet wurde neben dem *Clade B* Virus 89.6, dessen MPER-Region mit derjenigen des zur Immunisierung eingesetzten DNA-Konstrukts und dem Mimotop von MNCTB<sub>GST</sub> übereinstimmt, noch ein weiterer *Clade B* und zwei *Clade C* Viren. Der Neutralisationstiter des vierten Serums war bei Verwendung von 89.6 um den Faktor 10 höher als bei den anderen Seren. Um die Neutralisation der anderen 3 Viren zu testen reichte das Serum dieser Maus jedoch nicht aus.

**B**

TZM.bl Neutralisationstest von Seren der Gruppe 4: ID50 Titer

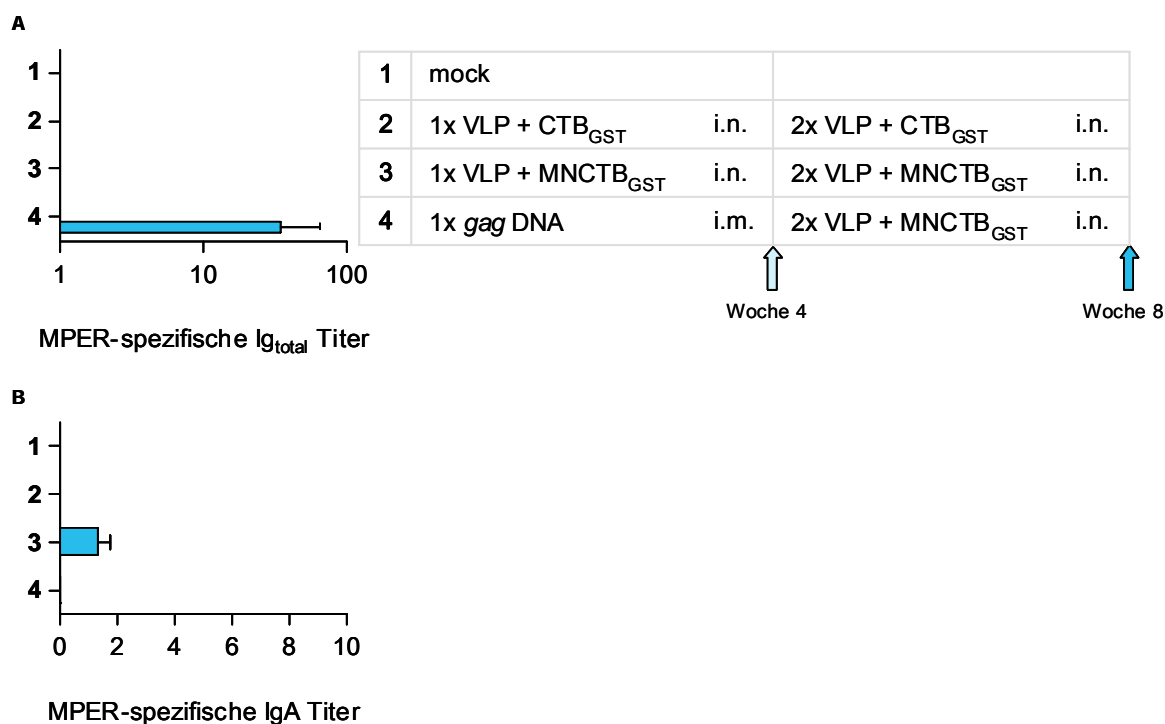
Maus Nr.	Woche	Tier 2 (Clade B)	Tier 1 (Clade B)	Tier 1 (Clade C)	Tier 1 (Clade C)
		SHIV-89.6P	MN	MW965.26	TV1.21
1	0	*	*	*	*
	14	<b>33</b>	*	<b>23</b>	<b>43</b>
5	0	*	*	*	27
	14	<b>36</b>	<b>27</b>	*	<b>40</b>
7	0	*	*	*	25
	14	<b>28</b>	<b>27</b>	*	<b>34</b>
8	0	*	*	*	NT
	14	<b>243</b>	NT	NT	NT

**Abb. C-24: Induktion MPER-spezifischer Antikörper durch aufeinanderfolgende *gp41* DNA und MNCTB<sub>GST</sub> Protein Immunisierungen von BALB/c Mäusen.** 8 Tiere pro Gruppe wurden zunächst zweimal mit je 10 µg der angegebenen CTB-Variante oder 80 µg *gp41* DNA, danach weitere zweimal mit der angegebenen CTB-Variante immunisiert. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienen als Kontrolle. (A) Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) Immunantworten nach der zweiten (hellblau) und vierten (blau) Immunisierung wurden Seren der Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Die beiden analysierten Zeitpunkte sind in der Tabelle durch Pfeile in der entsprechenden Farbe markiert. Dargestellt ist der Mittelwert der MPER-spezifischen Antikörpertiter jeder Gruppe. (B) Präimmunseren (Woche 0) und Seren nach der finalen Immunisierung (Woche 14) von Gruppe 4 wurden einem TZM.bl Neutralisationstest unterzogen. Angegeben ist der Titer, bei dem das jeweils angegebene Virus zu 50 % neutralisiert wurde (\* = <20; NT = *not tested*).

Wie bei der Untersuchung des Adjuvans-Effekts (Abschnitt C.2.1), wurden auch bei den Mäusen dieser Studie bronchoalveolare Lavagen durchgeführt. Allerdings waren in den Proben keine MPER-spezifischen IgAs nachweisbar (nicht gezeigt). Die Induktion mukosaler Antikörper gelang aber, wenn auch sehr moderat, in einer weiteren Immunisierungsstudie, bei der MNCTB<sub>GST</sub> mit VLPs gemischt verabreicht wurde (siehe Abb. C-25 B, Gr. 3). Im genannten Experiment wurden BALB/c Mäuse dreimal intranasal mit je 30 µg VLPs plus 10 µg CTB<sub>GST</sub> bzw. MNCTB<sub>GST</sub> immunisiert. Eine weitere Gruppe erhielt bei der ersten Immunisierung anstelle von VLPs vermischt mit MNCTB<sub>GST</sub> ausschließlich 60 µg *gag* DNA (pcDNA3.1*syngagII*B) intramuskulär. Nicht behandelte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle (Abb. C-25). Die *Booster*-Immunisierungen erfolgten 4 und 7 Wochen nach der Grundimmunisierung. Die Zeitpunkte von Serengewinnung und BALs entsprachen denjenigen in C.2.1.2.

Bemerkenswert ist, dass, wie eine Kombination aus *gp41* DNA und MNCTB<sub>GST</sub> (Abb. C-24 A), auch eine heterologe *gag* DNA *Prime* und MNCTB<sub>GST</sub> plus VLP *Boost*-Immunisierung (Abb. C-25 A, Gr. 4)

die Bildung MPER-spezifischer Antikörper induzieren kann, wenn auch nur bei 2 von 6 Mäusen. Eine dreifach homologe Verabreichung von MNCTB<sub>GST</sub> plus VLPs dagegen rief keine MPER-spezifischen Antikörper im Serum hervor (Gr. 3).



**Abb. C-25: Induktion MPER-spezifischer Antikörper durch aufeinanderfolgende *gag* DNA und VLP + MNCTB<sub>GST</sub> Immunisierungen von BALB/c Mäusen.** 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben zunächst einmal mit je 30 µg VLP und 10 µg CTB-Variante oder 60 µg *gag* DNA, danach weitere zweimal mit der VLPs und der angegebenen CTB-Variante immunisiert. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle. (A) Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) Immunantworten nach der ersten (hellblau) und dritten (blau) Immunisierung wurden Seren der Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Die beiden analysierten Zeitpunkte sind in der Tabelle durch Pfeile in der entsprechenden Farbe markiert. Dargestellt ist der Mittelwert der MPER-spezifischen Antikörpertiter jeder Gruppe. (B) Zur Ermittlung der mukosalen Immunantworten (IgA) wurden BALs mittels Endpunktverdünnung im ELISA untersucht.

### C.2.2.2 Auch die Verabreichung von VLP/MNCTB-CD34<sup>TM</sup> induziert nach einer *gp41* plus *gag* DNA Grundimmunisierung Mimotop-spezifische HIV-1 Env Antikörper

Wie im vorangehenden Abschnitt für lösliches Mimotop-tragendes CTB wurde auch für über eine Transmembrandomäne auf VLPs präsentiertes CTB mit Mimotop (VLP/MNCTB-CD34<sup>TM</sup>) untersucht, ob eine Immunisierung zur Induktion MPER-spezifischer Antikörper führt.

Hierfür wurden BALB/c Mäuse dreimal intranasal mit je 30 µg VLP/MNCTB-CD34<sup>TM</sup> behandelt. Eine Vergleichsgruppe erhielt stattdessen dreimal *gp41* (89.6; siehe E.2) präsentierende VLPs (*gp41* DNA zur Produktion der VLPs zur Verfügung gestellt von T. Benen<sup>17</sup>). Bei weiteren Gruppen wurde die Grundimmunisierung mit VLPs durch einen DNA *Prime* (i.m.) ersetzt. Dabei erhielten zweimal mit VLP/MNCTB-CD34<sup>TM</sup> *geboostete* Mäuse entweder *gag* (pcDNA3.1*syngagIIIB*) und *mnctb-cd34tm* DNA oder *gag* und *gp41* DNA, zweimal mit VLP/*gp41* *geboostete* Mäuse bekamen *gag* und *gp41* DNA. Zur Kontrolle wurden Mäuse nicht behandelt (mock) bzw. ausschließlich einmal intramuskulär mit *gag* plus *mnctb-cd34tm* DNA oder *gag* plus *gp41* DNA immunisiert (siehe Abb. C-26).

Durch die zusätzliche Applikation von *gag* DNA zu *gp41* oder *mnctb-cd34tm* DNA wird bereits bei der Grundimmunisierung die Bildung von VLPs in der Maus ermöglicht. Somit werden bei *Prime* und *Boost* die gleichen Antigene eingesetzt und es wird schon durch die Grundimmunisierung eine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort induziert (nähere Ausführungen dazu siehe A.1.4 und A.1.5). Des Weiteren zeigte sich, dass ein *Prime* mit *gag* DNA (siehe Abb. C-25), ähnlich einem *Prime* mit *gp41* DNA (siehe Abb. C-24), zur Induktion MPER-spezifischer Antikörper beitragen kann.

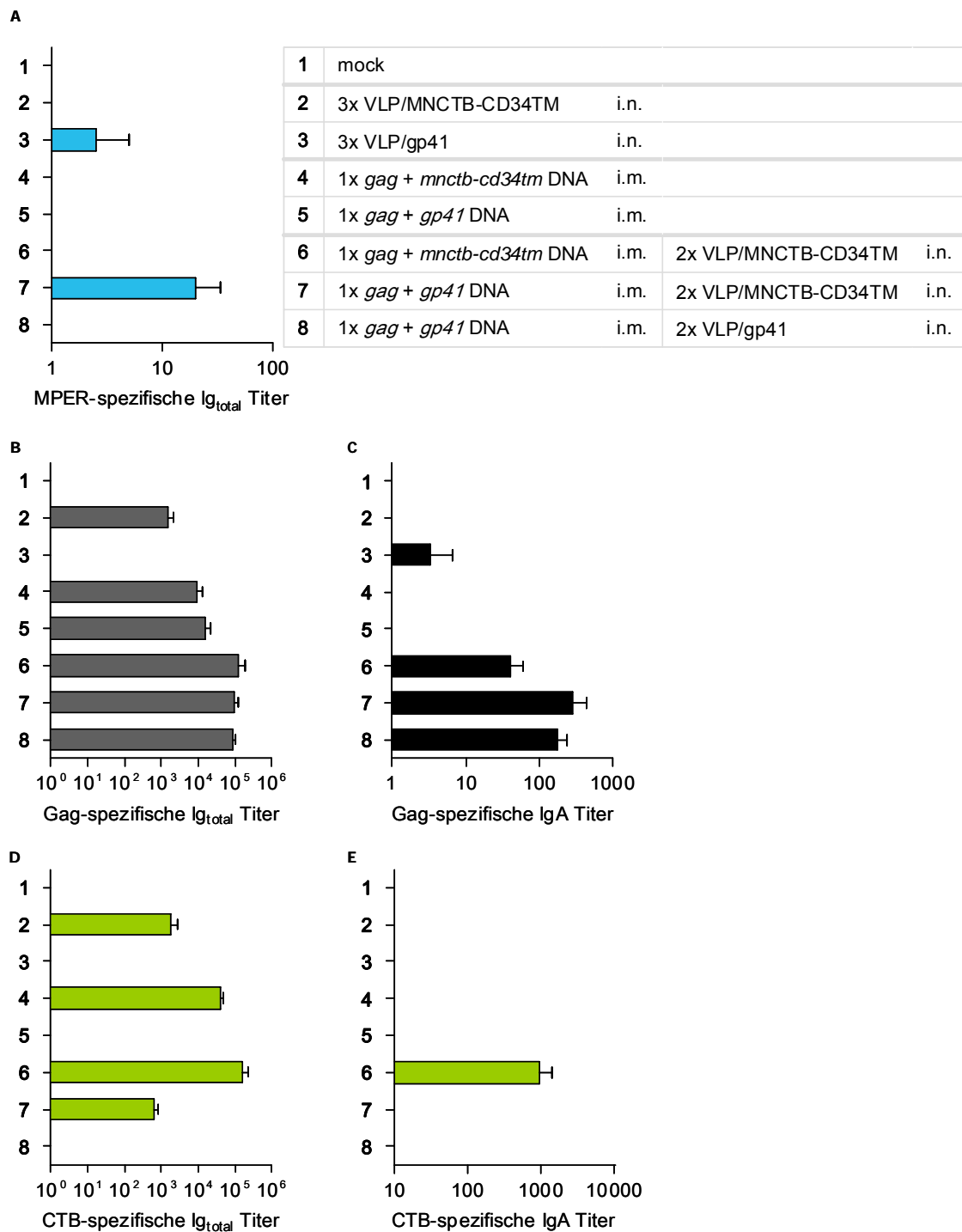
Abb. C-24 A ist zu entnehmen, dass bei dreifach homologer Immunisierung nur *gp41* präsentierende VLPs (bei 1 von 6 Mäusen) eine moderate MPER-spezifische Antikörperantwort hervorrufen (Gr. 3), CTB mit Mimotop präsentierende VLPs aber nicht (Gr. 2). Auch keine der ausschließlichen DNA-Applikationen führte zu diesem Ziel (Gr. 4, 5). Nur eine heterologe Kombination aus *gag* und *gp41* DNA *Prime* und VLP/MNCTB-CD34TM *Boost* konnte eine MPER-spezifische Antikörperantwort induzieren (Gr. 7). Im Gegensatz zu Mimotop präsentierendem CTB in löslicher Form (siehe Abb. C-24; 4 von 8 Mäusen) reagierten allerdings nur 2 von 6 Mäusen. Die Ursache dafür liegt vermutlich in der unterschiedlichen Menge des jeweils in der immunisierten Probe enthaltenen CTB (vergleiche Abschnitt C.1.4).

Da in der Gruppe, in der statt *gp41* DNA bei der Grundimmunisierung *mnctb-cd34tm* DNA eingesetzt wurde, keine MPER-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten (Gr. 6), liegt die Hypothese nahe, dass der Effekt des *gp41* DNA *Prime* stärker wiegt als der des *gag* DNA *Prime*. Anzumerken ist weiterhin, dass die erzielte Fokussierung auf den durch das Mimotop dargestellten Bereich mithilfe einer Präsentation durch CTB erfolgreich war (Gr. 7), wohingegen *Booster*-Immunisierungen mit *gp41* bezüglich der Induktion MPER-spezifischer Antikörper erfolglos waren (Gr. 8).

Eine mukosale MPER-spezifische Immunantwort konnte nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Zu Kontrollzwecken wurden auch Gag-spezifische systemische und mukosale Antikörperantworten ausgelesen (Abb. C-26-B und C). Erstaunlich ist dabei, dass jede Kombination aus einem intramuskulären *gag* DNA *Prime* und einem intranasalen VLP *Boost* zur Induktion Gag-spezifischer IgAs führte (Abb. C-26 C, Gr. 6-8), während DNA oder VLPs alleine jeweils keine Gag-spezifische mukosale Immunantwort hervorriefen (vergleiche D.2.2.2 und Abb. E-2). Ebenfalls bemerkenswert ist der negative Effekt von *gp41* auf die Gag-spezifische Immunantwort (Abb. C-26 B, Gr. 3).

Neben den Gag-spezifischen, sind auch die CTB-spezifischen Antikörperantworten dargestellt (Abb. C-26 D und E). Interessant ist, dass auch hier nur durch eine Kombination von intramuskulärem *mnctb-cd34tm* DNA *Prime* und intranasalem VLP/MNCTB-CD34TM *Boost* mukosale Antikörper induziert werden konnten (Abb. C-26 D, Gr. 6).



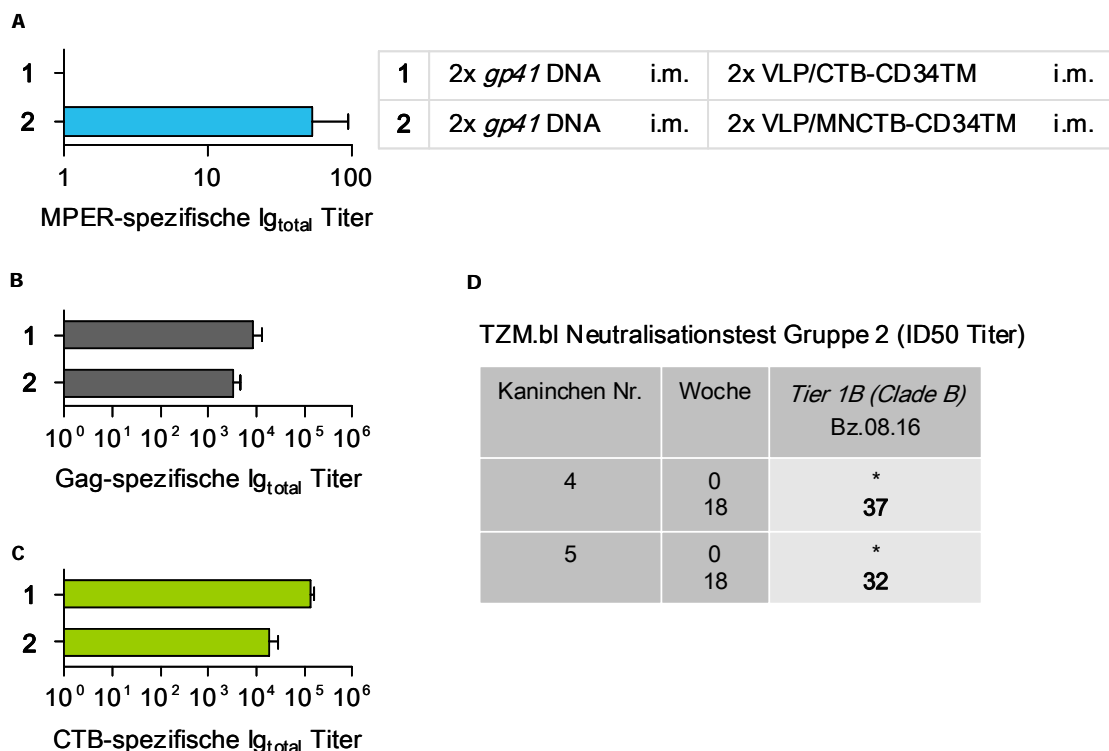
**Abb. C-26: Induktion MPER-spezifischer Antikörper durch aufeinanderfolgende gp41 DNA und VLP/MNCTB-CD34TM Immunisierungen von BALB/c Mäusen.** Je Immunisierung wurden nach angegebenem Schema 6 Tieren pro Gruppe 30  $\mu$ g VLPs bzw. 60  $\mu$ g gag DNA und äquimolare Menge gp41 DNA oder mnctb-cd34tm DNA verabreicht. Nicht immunisierte Mäuse (mock) dienten als Kontrolle. Zur Ermittlung der humoralen ( $Ig_{total}$ ) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden eine Woche nach der finalen Immunisierung gewonnene Seren (A, B, D) bzw. BALs (C, E) im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die MPER- (A), Gag- (B, C) bzw. CTB-spezifischen (D, E) Antikörpertiter als Mittelwert jeder Gruppe.

### C.2.2.3 Die Immunisierung von Kaninchen bestätigt den Vorteil einer heterologen *gp41* DNA *Prime* und VLP/MNCTB-CD34TM *Boost* Kombination

Zusätzlich zu den bisher beschriebenen Experimenten mit BALB/c Mäusen wurde auch eine Studie mit Kaninchen durchgeführt. Die Tiere erhielten 2 Immunisierungen mit je 500 µg *gp41* DNA (89.6; zur Verfügung gestellt von T. Benen<sup>17</sup>, siehe E.2) im Abstand von 4 Wochen. 8 Wochen später folgten wiederum im Abstand von 4 Wochen zwei Immunisierungen mit je 100 µg VLP/CTB-CD34TM bzw. VLP/MNCTB-CD34TM. In Abb. C-27 ist die Analyse der final gewonnenen Seren (zwei Wochen nach der letzten Applikation) dargestellt.

Wie bei BALB/c Mäusen (vergleiche Abb. C-26), führt die Kombination von *gp41* DNA und VLP/MNCTB-CD34TM (bei 2 von 6 Tieren) zur Induktion MPER-spezifischer Antikörper (siehe Abb. C-27 A). Die Gag- und CTB-spezifischen Antikörperantworten sind ergänzend gezeigt (Abb. C-27 B und C).

Um zu untersuchen ob die induzierten MPER-spezifischen Antikörper neutralisierende Aktivität besitzen, wurden die entsprechenden Seren einem TZM.bl Test unterzogen (siehe B.4.2.3). Abb. C-27 D ist zu entnehmen, dass beide Seren moderat neutralisierend gegen ein untersuchtes *Clade B* Virus wirkten.



**Abb. C-27: Induktion MPER-spezifischer Antikörper durch aufeinanderfolgende *gp41* DNA und VLP/MNCTB-CD34TM Immunisierungen von Kaninchen.** Pro Gruppe wurden 6 Tiere wie angegeben zunächst zweimal mit je 500 µg *gp41* DNA, dann zweimal mit jeweils 100 µg CTB-Variante-präsentierenden VLPs immunisiert. (A, B, C)) Zur Ermittlung der humoralen ( $Ig_{total}$ ) Immunantworten nach der vierten Immunisierung wurden Seren der Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die MPER- (A), Gag- (B) bzw. CTB-spezifischen (C) Antikörpertiter als Mittelwert jeder Gruppe. (D) Präimmunsere (Woche 0) und Seren nach der finalen Immunisierung (Woche 22) von Gruppe 2 wurden einem TZM.bl Neutralisationstest unterzogen. Angegeben ist der Titer, bei dem das Virus zu 50 % neutralisiert wurde (\* = <20).

## D Diskussion

Zu den Herausforderungen bei der Entwicklung von Antigenen zur Induktion breit neutralisierender Antikörper gehören neben der hohen Diversität und Variabilität von HIV die extensive Glykosylierung von Env sowie die späte Exposition konservierter, für die Fusion entscheidender Bereiche. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Antigene entworfen, bei denen ein kurzer Env Bereich mit Epitopen bekannter Breitneutralisierer (Mimotop) dem Immunsystem über das mukosale Adjuvans CTB als Träger präsentiert wird. Um die natürliche Virussituation zu imitieren und darüber hinaus auch zelluläre Immunantworten zu induzieren, wurden die chimären Proteine mit Hilfe einer Transmembrandomäne auf der Oberfläche von HIV-1 VLPs verankert. Alternativ wurden lösliche chimäre CTB-Varianten entwickelt, die durch chemische Kopplung kovalent mit VLPs verbunden wurden oder bei Immunisierungsexperimenten in löslicher Form VLPs beigemischt wurden (siehe D.1). In Immunisierungsstudien konnte der Adjuvans-Effekt des Trägermoleküls CTB nachgewiesen werden (siehe D.2.1) und durch eine heterologe *Prime-Boost* Strategie eine Mimotop-spezifische moderat neutralisierende, *Clade*-übergreifende Antikörperantwort induziert werden (siehe D.2.2)

### D.1 Konzeption und biochemische Charakterisierung chimärer CTB-Varianten

#### D.1.1 Das präsentierte Mimotop enthält die hoch konservierten, linearen Epitope von zwei bekannten breit neutralisierenden Antikörpern

Wie unter A.1.3.1 beschrieben, sind alle bisher bekannten breit neutralisierenden Antikörper (bNAKs) gegen vier Bereiche von Env gerichtet. Das in dieser Arbeit über CTB präsentierte Mimotop zur Induktion von bNAKs entstammt der MPER (*membrane proximal external region*) von gp41 und enthält die hoch konservierten Epitope der beiden ersten identifizierten bNAKs, 2F5 und 4E10<sup>231</sup>. Die Aminosäuresequenz des 2F5 Epitopes (ELDKWAS) ist in 72 % anderweitig hoch variabler HIV-1 Isolate konserviert<sup>146</sup>. Der Befund, dass 30 % aller *Elite Controller* MPER-spezifische Antikörper besitzen<sup>193</sup> und der Nachweis, dass Makaken durch passive Immunisierung mit diesen Antikörpern gegen eine Infektion mit mukosal verabreichtem SHIV geschützt werden konnten (siehe A.1.3.2), macht die Epitope von 2F5 und 4E10 zu einem höchst interessanten Ziel bei der Vakzineentwicklung. Die Tatsache, dass beide bNAKs lineare Epitope erkennen, erleichterte des Weiteren deren Darstellung durch Fusion mit einem Trägerprotein.

#### D.1.2 Das mukosale Adjuvans CTB ist ein ideales Trägerprotein zur Präsentation eines Mimotops

Die Darstellung neutralisationskompetenter Epitope durch ein kurzes Mimotop umgeht das Problem der Unzugänglichkeit dieser Bereiche in Volllänge Env und unterbindet die Bildung von Antikörpern gegen immundominante, aber nicht neutralisierende Bereiche von Env. Da Peptide aber nicht

immunogen genug sind, die Stimulation von antikörperproduzierenden B-Zellen auszulösen<sup>143</sup>, wurde hier das MPER Mimotop über das mukosale Adjuvans CTB als Trägerprotein präsentiert.

Die Fusion von Peptid-Antigenen mit Trägerproteinen wie dem Maltosebindeprotein (MalE) von *E. coli* hat sich zur Induktion Peptid-spezifischer Antikörper bereits seit längerem experimentell bewährt<sup>129,192</sup>. Durch Verwendung von MalE als Träger konnten Coëffier und Kollegen das 2F5 Epitop zwar frei zugänglich darstellen, HIV-1 neutralisierende Antikörper konnten jedoch nicht induziert werden<sup>41</sup>. Das hier verwendete CTB bietet MalE gegenüber den großen Vorteil, zusätzlich zur Trägerfunktion als starkes Adjuvans zu fungieren. Die immunstimulatorischen Eigenschaften von CTB, darunter die Induktion Antigen-spezifischer systemischer und mukosaler Antikörperantworten, in CTB-Fusionsproteinen konnten in diversen Immunisierungsstudien bei Mäusen und Menschen nachgewiesen werden<sup>70,95,112,168,180,215</sup>.

In Alternative zu Trägerproteinen mit Adjuvansfunktion steht der Ansatz, die Struktur des präsentierten Epitopes in seiner Antikörper-gebundenen Konformation nachzuahmen. In diesem Zusammenhang wurden aktuell zwei Arbeiten veröffentlicht, bei denen mit Hilfe computergestützter Analysen geeignete Trägerproteine gesucht und so modifiziert wurden, dass sie das 2F5 bzw. das 4E10 Epitop in ihrer Antikörper-gebundenen Konformation darstellen<sup>43,151</sup>. Ofek und Kollegen beschrieben allerdings, dass der 2F5 Epitop-spezifische Antikörpertiter mit der Flexibilität des Epitopes korreliert<sup>151</sup>. Darüber hinaus könnte ein konformationell flexibleres Epitop möglicherweise auch eine breiter neutralisierende Antikörperantwort induzieren. Die in dieser Arbeit beschriebene N-terminale Fusion von Mimotopen an das mukosale Adjuvans CTB sollte die gewünschte Flexibilität gewährleisten. Darüber hinaus wurde bei der Konzeption der chimären CTB-Varianten auch die Möglichkeit offengehalten, das hier verwendete Mimotop durch ein anderes Mimotop oder eine beliebige Mimotop-Bibliothek auszutauschen (siehe Abb. C-1 B), was ohnehin nicht mit einem Struktur-basierten Ansatz zu vereinbaren ist.

### **D.1.3 Durch das *Display* von chimärem CTB auf virusähnlichen Partikeln wird die native Virussituation nachgeahmt und das zelluläre Immunsystem angesprochen**

Wie unter A.1.4 erläutert, muss für eine breite und lang anhaltende Immunität gegen HIV nicht nur die humorale sondern auch die zelluläre Immunantwort angesprochen werden. Daher wurde in dieser Arbeit Mimotop tragendes CTB, das der Induktion breit neutralisierender Antikörper diene, auf der Oberfläche von HIV-1 virusähnlichen Partikeln (*virus like particles*, VLPs) präsentiert.

Auf der Oberfläche von Staphylokokken konnte funktionales CTB bereits über einen Zellwandanker präsentiert werden. Dabei wurden die CTB tragenden Staphylokokken als „Zellvakzine“ diskutiert<sup>121</sup>. Das *Display* von CTB auf der Oberfläche eukaryontischer Zellen mit Hilfe einer Transmembrandomäne ist innovativ und konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden. Die durch Coexpression von chimärem CTB und Gag entstehenden, CTB präsentierenden VLPs eignen sich verglichen mit kompletten bakteriellen Zellen weit besser als Impfstoffkandidat. VLPs gleichen dem Erscheinungsbild eines HI-Virus<sup>69</sup>, sind jedoch replikations-inkompetent und nicht infektiös<sup>207</sup>. Sie sind in der Lage starke zelluläre und humorale Immunantworten ohne Zugabe von Adjuvantien zu

induzieren<sup>52</sup>. VLPs wurden schon mehrfach zur Präsentation von Antigenen eingesetzt und wirkten dabei, verglichen mit den löslichen Antigenen, bereits als Adjuvans (Übersicht in<sup>76</sup>). Kim und Kollegen verwendeten VLPs zur Präsentation eines gp41 Derivats, konnten aber keine neutralisierende Immunantwort induzieren<sup>108</sup>. Ursache hierfür könnte die ineffiziente Oberflächenpräsentation der gp41 Transmembrandomäne (TM) sein. Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt eine Verkürzung des cytoplasmatischen Teils oder der Einsatz einer heterologen TM zu einer verbesserten Präsentation von gp41 auf VLPs<sup>50,52</sup>. Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Transmembrandomänen getestet, um einen möglichst effektiven Einbau der Proteine in VLPs zu erzielen. Nach Analyse zahlreicher Kandidaten bezüglich der unter C.1.1.1 erläuterten Kriterien stellten sich die Transmembrandomänen des zellulären CD34 und des viralen gp64 als geeignete Kandidaten für die Präsentation von chimärem CTB auf der Oberfläche von VLPs heraus<sup>57,197,50,51,213,28,153</sup>.

Neben der Präsentation über eine Transmembrandomäne wurde alternativ in löslicher Form produziertes, Mimotop tragendes CTB unter Verwendung von Kopplungs-Reagenzien kovalent an VLPs gebunden. Die vergleichende relative Quantifizierung der Beladung von VLPs mit CTB bestätigte aber nicht die Annahme, dass durch Kopplung eventuell mehr CTB auf VLPs präsentiert werden könnte als mittels einer Transmembrandomäne. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass in humanen Zellen produzierte VLPs über eine Transmembrandomäne etwa doppelt so viel CTB tragen wie VLPs nach chemischer Kopplung (siehe C.1.4). Überdies vermuteten bereits Kang und Kollegen, die demonstrierten, dass die chemische Kopplung von CTB an im bakuloviralen System produzierte SIV (*simian immunodeficiency virus*) VLPs zur Verstärkung Env- und Gag-spezifischer systemisch und mukosal humoraler sowie zellulärer Immunantworten führt, einen Vorteil von inkorporiertem gegenüber nachträglich gekoppeltem CTB bezüglich des Potentials zur Induktion von bNAKs<sup>103</sup>.

Anstelle des *Displays* von chimärem CTB auf VLPs wäre zur partikulären Präsentation eines Mimotops auch dessen Fusion mit dem Partikel bildenden Trägerprotein E2, einer Untereinheit des Pyruvat Dehydrogenase Komplexes, denkbar<sup>55</sup>. Caivano und Kollegen nutzten kürzlich dieses System zur Präsentation von Gag p17 und induzierten dadurch p17-spezifische humorale und zelluläre Immunantworten<sup>37</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit entworfene Strategie der Präsentation eines Mimotops in Fusion mit dem Trägerprotein CTB über Pr55<sup>Gag</sup> VLPs vereint jedoch die Vorteile des mukosalen Adjuvans CTB und der partikulären Präsentation zur Stimulation des zellulären Immunsystems in einem Ansatz. Darüber hinaus sind Pr55<sup>Gag</sup> VLPs nicht irgendwelche Partikel, sondern sie ahmen spezifisch die native HI-Virus Situation nach.

Des Weiteren ergibt sich durch die Präsentation von chimärem CTB über eine Transmembrandomäne unter Verwendung eines in unserer Arbeitsgruppe etablierten lentiviralen *Display*-Systems (unveröffentlichte Technologie) die Möglichkeit eines Mimotop-*Screenings*, z.B. zur Identifizierung von Mimotopen mit verbesserter Bindung an neue breit neutralisierende Antikörper. Dabei kann die Integration einer Mimotop Bibliothek in CTB leicht und nahtlos über die eingebauten *BsmBI* Schnittstellen erfolgen (siehe Abb. C-1 B).

### **D.1.4 Alle konstruierten chimären CTB-Varianten werden exprimiert und können durch eine Transmembrandomäne effizient auf der Zelloberfläche präsentiert werden**

Eine Voraussetzung für die Inkorporation von chimärem CTB in VLPs wurde durch die effiziente Expression der Fusionsproteine auf der Oberfläche humaner Zellen erfüllt (siehe C.1.1.2 und C.1.1.3). Sicherlich ihren Teil dazu beigetragen hat die Anpassung der Nukleinsäuresequenzen an den humanen Kodon-Gebrauch<sup>109</sup>. Die quantitativ unterschiedliche Detektion der verschiedenen CTB-Varianten in Western-Blot (siehe Abb. C-2) und FACS Analyse (siehe Abb. C-3) lässt zunächst auf eine unterschiedlich starke Expression schließen. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings, dass genannter Effekt zumindest teilweise auf eine unterschiedliche Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers an die Varianten zurückzuführen ist. Während die CTB-Varianten mit internem Mimotop weder im Western-Blot (Abb. C-2) noch im FACS (Abb. C-3) durch den jeweils eingesetzten CTB-spezifischen Antikörper detektiert werden konnten, lieferte die Verwendung von 2F5 und 4E10 ein vergleichbar starkes Signal für alle Mimotop tragenden CTB-Varianten. So ist der FACS Analyse nach Oberflächenmarkierung mit 2F5 oder 4E10 (Abb. C-4) zu entnehmen, dass im Falle der CD34 Transmembrandomäne das Konstrukt mit internem Mimotop genau so effizient auf der Oberfläche präsentiert wird wie beide Konstrukte mit aminoterminalen Mimotop. Lediglich im Falle des Konstrukts mit gp64 TM und internem Mimotop (MiCTB-gp64TM) konnten insgesamt weniger Zellen durch 2F5 und 4E10 markiert werden. Rückschließend lässt dieses Ergebnis vermuten, dass auch der Unterschied zwischen den CTB-Varianten ohne Mimotop und den Konstrukten mit aminoterminalen Mimotop in Abb. C-2 und Abb. C-3 auf die unterschiedlich starke Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers und nicht auf eine verminderte Expression bzw. Präsentation auf der Zelloberfläche zurückzuführen ist. Verantwortlich für die differenzierte Detektion der Varianten durch den CTB-spezifischen Antikörper könnte eher eine Konformationsänderung von CTB sein, die durch die zusätzlichen aminoterminalen bzw. internen 30 AS des Mimotops bedingt ist. Abb. C-5 ist zu entnehmen, dass auch im Western-Blot die Detektion mit 2F5 und 4E10, im Gegensatz zur Detektion mit dem CTB-spezifischen Antikörper, ein vergleichbar starkes Signal für alle CTB-Varianten mit Mimotop, ausgenommen MiCTB-gp64TM (analog zur FACS Analyse), ergibt.

Die Verkürzung des integrierten Mimotops (siehe C.1.1.6) auf 10 Aminosäuren, die das 2F5 Epitop enthalten (2F5iCTB-CD34TM), führte zu einer deutlich verbesserten Erkennung durch CTB-spezifische Antikörper in Western-Blot (Abb. C-10 B) und FACS (Abb. C-10 C). Durch Verkürzung auf 10 AS, die das 4E10 Epitop enthalten (4E10iCTB-CD34TM), wurde zumindest die Bindung des im FACS verwendeten CTB-spezifischen Antikörpers möglich. Eine Verkürzung des integrierten Mimotops von 30 auf 10 Aminosäuren scheint also einen positiven Effekt auf die Konformation von CTB zu haben, wobei neben der Länge auch die Sequenz des integrierten Mimotops eine Rolle spielt. Diese Ergebnis ist in Einklang mit den Beobachtungen von Backström und Kollegen, die verschiedene chimäre CTB-Proteine ohne Transmembrandomäne untersuchten<sup>9,10</sup>.

Einen weiteren Hinweis für die unterschiedlich starke Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers an verschiedene CTB-Varianten liefert der unter C.1.1.5 beschriebene GM1 ELISA. Dort ergab die Detektion mit 2F5, dass die in den ELISA eingesetzten lysierten VLPs unspezifisch an die mit GM1

beschichteten Platten binden, trotzdem war unter Verwendung des CTB-spezifischen Antikörpers zur Detektion das Signal von CTB ohne Mimotop (CTB-CD34TM) 10x stärker als das Signal von CTB mit Mimotop (MNCTB-CD34TM; siehe Abb. C-9).

Auch die Analyse chimärer CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne, deren Expression unter C.1.2.2 (Abb. C-12 und C-13) gezeigt wurde, beweist eine schwächere Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers an CTB mit Mimotop (MNCTB<sub>GST</sub>) gegenüber CTB ohne Mimotop (CTB<sub>GST</sub>). Um dies zu demonstrieren wurden, wie unter B.3.13 beschrieben, 96-Napf Platten mit einem GST-spezifischen Antikörper beschichtet und die in löslicher Form gereinigten chimären CTB-Varianten aufgetragen. Da diese einen GST-tag tragen, wurden über den GST-spezifischen Antikörper identische Mengen der verschiedenen Proteine fixiert. Bei gleich starker Bindung an alle CTB-Varianten hätte eine Detektion mit dem CTB-spezifischen Antikörper identische Signale liefern müssen. Wie Abb. E-1 (Anhang) zu entnehmen ist, ergab sich aber wie erwartet ein schwächeres Signal für MNCTB<sub>GST</sub> verglichen mit CTB<sub>GST</sub>.

Diesen Abschnitt zusammenfassend werden also alle entworfenen chimären CTB-Varianten exprimiert und durch eine Transmembrandomäne effizient auf der Zelloberfläche präsentiert. Besonders anzumerken ist, dass die Oberflächenmarkierung mit 2F5 bzw. 4E10 mit anschließender FACS Analyse für Zellen, die Mimotop tragendes CTB präsentieren, ein deutlich stärkeres Signal liefert als für Zellen, die gp41 tragen (siehe Abb. C-4). Dies ist mitunter darauf zurückzuführen, dass die gp41 Transmembrandomäne, wie bereits erwähnt, eine ineffiziente Oberflächenpräsentation vermittelt<sup>50</sup>. Die in den chimären CTB-Varianten verwendete CD34 bzw. gp64 Transmembrandomäne ist wohl, wie angestrebt, für eine verbesserte Präsentation der Fusionsproteine auf der Zelloberfläche verantwortlich.

### **D.1.5 Die Präsentation eines Mimotops mittels CTB erzielt eine verbesserte Zugänglichkeit der Epitope von 2F5 und 4E10**

Zusätzlich zu der im vorangegangenen Abschnitt erläuterten, verglichen mit gp41 gesteigerten Oberflächenpräsentation der chimären CTB-Varianten trägt sicherlich auch die verbesserte Zugänglichkeit der Epitope von 2F5 und 4E10 in Mimotop tragendem CTB zu dem deutlich stärkeren Signal bei der Oberflächenmarkierung mit den bNAKs und anschließender FACS Analyse bei (Abb. C-4). Da die Präsentation essentieller Epitope eine Grundvoraussetzung für die Induktion breit neutralisierender Antikörper ist, wurde mit der erreichten verbesserten Zugänglichkeit eines der Hauptziele bei der Konstruktion der chimären CTB-Varianten erfüllt. Wie die Varianten mit Transmembrandomäne, präsentiert auch das in löslicher Form produzierte MNCTB<sub>GST</sub> sein Mimotop frei zugänglich, was durch die Bindung von 2F5 im ELISA gezeigt werden konnte (siehe Abb. C-14).

### **D.1.6 Chimäre CTB-Varianten mit CD34 Transmembrandomäne werden effizient in VLPs eingebaut und in Form von Pentameren auf deren Oberfläche präsentiert**

Ein weiteres Ziel bei der Entwicklung der chimären CTB-Varianten wurde durch deren Integration in VLPs erreicht (siehe C.1.1.4). Durch die vergleichende Analyse von Zelllysaten und angereicherten

VLPs im Western-Blot ergab sich, dass die Mimotop tragenden CTB-Varianten mit CD34 Transmembrandomäne wesentlich effektiver in VLPs eingebaut werden als diejenigen mit gp64 TM (siehe Abb. C-5 B, C). Die Konformation von CTB wird, wie in Abschnitt D.1.4 erläutert, durch ein aminoterminales Mimotop vermutlich weniger beeinflusst als durch ein internes Mimotop (siehe u. a. Abb. C-3). Da eine korrekte Faltung für die Adjuvansfunktion von CTB von Bedeutung ist, wurde die CTB-Variante mit aminoterminalen Mimotop und CD34 Transmembrandomäne (MNCTB-CD34TM) für die Immunisierungsexperimente und damit die weitere Charakterisierung ausgewählt. Die erfolgreiche Integration von MNCTB-CD34TM in VLPs wurde durch Aufbereitung der VLPs mittels Zonalzentrifugation im Saccharosegradient und den Nachweis von Mimotop tragendem CTB sowie Pr55<sup>Gag</sup> in denselben Fraktionen des Gradienten bestätigt (siehe Abb. C-6). Elektronenmikroskopische Aufnahmen nach Immunogoldmarkierung demonstrierten überdies die Zugänglichkeit des Mimotops für den breit neutralisierenden Antikörper 2F5 auf der Oberfläche von VLPs (siehe Abb. C-7). Einen zusätzlichen Beweis der Präsentation von CTB auf der VLP-Oberfläche lieferte die chemische Quervernetzung des chimären Proteins mittels BS<sup>3</sup> (siehe C.1.1.5). Dieses Reagens kann Membranen nicht passieren und vernetzt daher nur auf der Zell- bzw. VLP-Oberfläche befindliche, benachbarte freie Aminogruppen miteinander<sup>138</sup>. Der Nachweis von Banden auf der berechneten Höhe von CTB-Oligomeren inklusive Pentameren nach Behandlung von VLPs mit BS<sup>3</sup> belegt die Präsentation von chimärem CTB in Form von Pentameren auf der Oberfläche von VLPs (siehe Abb. C-8). Dies gilt in jedem Falle für CTB ohne Mimotop (CTB-CD34TM). Im Falle von MNCTB-CD34TM konnten zwar keine Banden für CTB-Oligomere detektiert werden, jedoch war die in der unbehandelten Probe detektierte Bande für CTB-Monomere nach Anwendung von BS<sup>3</sup> nicht mehr nachweisbar. Zudem muss beachtet werden, dass bei Analyse identischer Mengen VLPs (siehe Zweit-Inkubation mit anti-Pr55<sup>Gag</sup>) bereits in den unbehandelten Proben das CTB-spezifische Signal (Monomer) bei CTB-CD34TM (Abb. C-8 A) etwa 10x intensiver ist als bei MNCTB-CD34TM (Abb. C-8 B). Eine Aufteilung von CTB auf mehrere oligomere Formen hat daher vermutlich den Verlust des CTB-spezifischen Signals zur Folge.

Das Vorliegen von CTB in Form von Pentameren ist Voraussetzung für die Bindung des Proteins an den Gangliosid-Rezeptor GM1<sup>99</sup>, welche wiederum ein wichtiger Aspekt des Adjuvans-Effekts von CTB ist<sup>58</sup> (siehe A.2). Im Falle der CTB-Varianten mit Transmembrandomäne konnte allerdings anhand des durchgeführten GM1 ELISAs (siehe B.3.12) aufgrund unspezifischer Bindung der Proben keine Aussage über die Bindung an GM1 getroffen werden. Das unspezifische Signal, welches vermutlich auf die Bindung von Membranfragmenten an GM1 zurückzuführen ist, konnte auch durch diverse Optimierungsversuche, wie die Variation von Blockierung und Waschbedingungen, nicht eliminiert werden (siehe C.1.1.5). Wenn auch die Bindung der CTB-Varianten mit Transmembrandomäne an GM1 nicht direkt nachgewiesen werden konnte, so ist doch deren Pentamerisierung ein Indiz für die Funktionalität der chimären Proteine.

### **D.1.7 In löslicher Form produzierte chimäre CTB-Varianten weisen eine spezifische Bindung an GM1 auf**

Für die in löslicher Form produzierten CTB-Varianten konnte die Bindung an GM1 mit Hilfe des GM1 ELISAs nachgewiesen werden (siehe Abb. C-14). Durch die Detektion von an GM1 gebundenem

(GST tragendem) Protein mit einem GST-spezifischen Antikörper wurde die Verwendung des CTB-spezifischen Antikörpers, welcher unterschiedlich effizient an verschiedene CTB-Varianten bindet (siehe D.1.4), umgangen. Ein unspezifisches Signal blieb hier aus, was die Vermutung bestätigt, dass bei den Varianten mit Transmembrandomäne Membranfragmente für eine unspezifische Bindung verantwortlich sind. In Ergänzung konnte die Pentamerisierung der in löslicher Form produzierten CTB-Varianten wie bei MNCTB-CD34<sup>TM</sup> im Western-Blot indirekt über das Ausbleiben eines Signals für monomeres CTB nach Anwendung des quervernetzenden Reagens BS<sup>3</sup> gezeigt werden (siehe C.1.2.3).

Neben dem durch das Fehlen der Transmembrandomäne ermöglichten Nachweis der Bindung an GM1, war ein weiterer Grund chimäres CTB in löslicher Form zusätzlich zu den Varianten mit Transmembrandomäne zu konstruieren und zu produzieren, dass das Vorliegen in löslicher Form im Vergleich zu der Präsentation auf VLPs die Verabreichung höherer Konzentrationen an Mimotop-tragendem CTB bei Immunisierungsexperimenten ermöglicht. Ein weiterer Beweggrund für den Entwurf der zusätzlichen Varianten war, dass die Pentamerisierung und Bindung an GM1 vermutlich ohne eine angefügte Transmembrandomäne weniger behindert werden würden. Um zusätzlich zu Mimotop-spezifischen Antikörperantworten auch das zelluläre Immunsystem zu stimulieren, wurden den in löslicher Form produzierten CTB-Varianten bei Immunisierungsexperimenten VLPs beigemischt. Alternativ erfolgte eine chemische Kopplung an VLPs mit dem Ziel, auch mit in löslicher Form produziertem CTB eine natürliche Virussituation zu imitieren (siehe D.1.8).

Die Expression der CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne erfolgte in *E. coli* Bakterien, welche verglichen mit eukaryontischen Zellen ein schnelleres Wachstum aufweisen und einfacher zu kultivieren sind, was bei der für Immunisierungsexperimente erforderlichen Produktion im größeren Maßstab einen höheren Durchsatz ermöglicht. Allerdings konnte selbst durch Variation von Kultur- und Expressionsbedingungen (Bakterienstamm, Bakteriendichte, Expressionsdauer, Temperatur, Luftzufuhr) eine maximale Ausbeute von lediglich ca. 1,5 mg (CTB<sub>GST</sub>) bzw. 1 mg (MNCTB<sub>GST</sub>) rekombinantem Protein pro Liter Bakterienkultur erzielt werden. Mutmaßlich verantwortlich für die moderate Produktion in löslicher Form ist eine Überproduktion der CTB-Varianten, verursacht durch die Anpassung der Nukleinsäuresequenzen an den Kodon-Gebrauch von *E. coli*, was ein Verpacken des für *E. coli* fremden Proteins in sogenannte *Inclusion Bodies* und damit die unlösliche Fraktion des Lysats zur Folge hatte (siehe Abb. C-12 A und B, jeweils Spur 3). Für höhere Ausbeuten in löslicher Form wäre wohl ein ledigliches Vermeiden von in *E. coli* selten gebrauchten Kodons zielführender gewesen. Dennoch konnten ausreichende Mengen beider CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne für die Immunisierungsexperimente gereinigt werden (siehe C.1.2.4).

## **D.1.8 Chemische Kopplung ermöglicht die Präsentation von löslichen**

### **CTB-Varianten auf in verschiedenen Systemen produzierten VLPs**

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die CTB-Varianten mit Transmembrandomäne evtl. in ihrer Bindung an GM1 beeinträchtigt sein könnten (siehe C.1.1.5), wurde die unter C.1.3 beschriebene chemische Kopplung von löslichem CTB an VLPs etabliert. Diese ermöglicht die Präsentation von CTB-Varianten, deren GM1 Bindung zuvor bestätigt wurde (siehe C.1.2.3), auf VLPs. Hierdurch wird wie bei den Varianten mit Transmembrandomäne die native Virussituation imitiert. Die Vermutung,

dass durch Kopplung möglicherweise mehr CTB auf VLPs präsentiert werden könnte als über eine Transmembrandomäne, bestätigte sich jedoch nicht, wie die Ergebnisse der relativen Quantifizierung der Beladung von VLPs mit CTB zeigten (siehe C.1.4, Tab. C-1). Demnach tragen in humanen Zellen produzierte VLPs (293-F VLPs) über eine Transmembrandomäne etwa doppelt so viel CTB als VLPs nach chemischer Kopplung.

Ein anderer Beweggrund für die Etablierung der chemischen Kopplung von CTB an VLPs war die Möglichkeit der Präsentation von chimären CTB-Varianten auf im bakuloviralen System produzierten VLPs (Bak VLPs), ohne CTB-Mimotop-kodierende rekombinante Bakuloviren generieren zu müssen. Das Ergebnis, dass Bak VLPs verglichen mit 293-F VLPs nach Kopplung nur etwa ein Fünftel so viel CTB präsentieren (siehe C.1.4, Tab. C-1), lässt sich wahrscheinlich durch eine Kopplungsprozess-unabhängige Bindung von CTB an die im humanen System produzierten VLPs erklären. Da die Plasmamembran der meisten Säugerzellen, so auch die von 293-F Zellen, GM1 enthält<sup>48</sup>, liegt die Vermutung nahe, dass CTB an in der VLP-Membran enthaltenes GM1 bindet. Diese Hypothese wurde durch ein Experiment bestätigt, bei dem eine „Kopplung“ von CTB an VLPs ohne Zugabe von Kopplungsreagenzien erzielt wurde (Daten nicht gezeigt).

## D.2 Immunogenität chimärer CTB-Varianten

Der Adjuvans-Effekt von Mimotop tragendem CTB und dessen Potential zur Fokussierung der humoralen Immunantwort auf ein Env-Epitop wurde im Rahmen dieser Arbeit in mehreren Immunisierungsexperimenten untersucht.

Wie die biochemische Charakterisierung der chimären CTB-Varianten ergab, werden Konstrukte mit CD34 Transmembrandomäne wesentlich effizienter in VLPs integriert als solche mit gp64 Transmembrandomäne (siehe Abb. C-5). Die Konformation von CTB wird anscheinend durch ein 30 Aminosäuren enthaltendes, aminoterminales Mimotop weniger beeinflusst als durch ein internes Mimotop gleicher Sequenz (siehe D.1.4). Die Verkürzung des internen Mimotops auf 10 Aminosäuren verbessert zwar die Konformation von CTB bei 2F5iCTB-CD34TM deutlich (siehe Abb. C-10 C), jedoch verschlechtert sich dadurch gleichzeitig die Zugänglichkeit des Mimotops (siehe Abb. C-10 D). Da die Konformation von CTB für dessen Adjuvans-Effekt von Bedeutung ist und die Induktion Mimotop-spezifischer Antikörper die Zugänglichkeit des Mimotops erfordert, ist MNCTB-CD34TM diejenige CTB-Variante mit Transmembrandomäne, die alle Vorteile für Immunisierungsexperimente am besten vereint. Aus diesem Grund wurden MNCTB-CD34TM und die dazu analoge Variante ohne Transmembrandomäne (MNCTB<sub>GST</sub>) zur Untersuchung der Immunogenität von Mimotop tragendem CTB eingesetzt.

Als Applikationsroute für die entworfenen Immunogene wurde schwerpunktmäßig die intranasale (i.n.) Verabreichung untersucht, zumal die mukosale Immunantwort eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung einer präventiven HIV Vakzine spielt, denn mukosale Oberflächen dienen als Haupteintrittspforte für das HI-Virus<sup>97</sup> (siehe A.1.7). Die Induktion einer mukosalen Immunantwort erfordert anscheinend die Darreichung eines Antigens über mukosale Routen<sup>66,86,100,187,224</sup>. Die intranasale Applikation von CTB kann überdies eine mukosale Immunantwort nicht nur in der nasalen, sondern auch in der vaginalen Schleimhaut und der Mundschleimhaut hervorrufen<sup>18</sup>. Bei Mäusen kann durch die intranasale

Applikation sogar eine bessere mukosale Immunantwort in der vaginalen Schleimhaut erzielt werden als durch die vaginale Verabreichung eines Antigens<sup>59</sup>.

## D.2.1 Adjuvans-Effekt von CTB

Die Mimotop-spezifische Immunantwort ist als Messgröße für den Adjuvans-Effekt von CTB schlecht einsetzbar, da die als Kontrolle notwendige Immunisierung mit einem 30 Aminosäuren langen Peptid ohne Adjuvans nicht erfolversprechend ist<sup>143</sup>. Vielversprechender ist die Analyse der durch VLPs induzierten, Gag-spezifischen Immunantworten als Indikator für den Adjuvans-Effekt des Trägerproteins CTB, insbesondere da das Auslesen Gag-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten in der Arbeitsgruppe bereits gut etabliert ist<sup>93</sup>. Daher erfolgte die Analyse des Adjuvans-Effekts von CTB vornehmlich durch Untersuchung des Einflusses chimärer CTB-Varianten auf Gag-spezifische Immunantworten. Ergänzend ermöglichte der GST-tag (25 kDa) der in löslicher Form produzierten CTB-Varianten das Auslesen der GST-spezifischen Immunantwort als Messgröße für den Adjuvans-Effekt gegenüber einem fusionierten Peptid.

### D.2.1.1 Durch chemische Kopplung auf VLPs präsentiertes CTB erzielt nicht denselben Adjuvans-Effekt wie mittels Transmembrandomäne auf VLPs präsentiertes CTB

Die Untersuchung des Adjuvans-Effekts von CTB, zunächst ohne Mimotop, auf die Gag-spezifische Immunantwort demonstrierte, dass die Präsentation von (kommerziellem) CTB nach chemischer Kopplung lediglich in Bezug auf die mukosale Immunantwort einen schwachen Effekt hatte, während der Einfluss von über eine Transmembrandomäne präsentiertem CTB stärker und auch bei den zellulären und systemisch humoralen Immunantworten nachzuweisen war (siehe C.2.1.2, Abb. C-19). Aus diesem Grund wurden die mit den in löslicher Form produzierten chimären CTB-Varianten MNCTB<sub>GST</sub> bzw. CTB<sub>GST</sub> gekoppelten VLPs nicht in Immunisierungsexperimenten eingesetzt. Verantwortlich für den schwachen Effekt der gekoppelten VLPs könnte die durch den Kopplungsprozess bedingte zufällige Orientierung von CTB auf der VLP-Oberfläche sein. Dadurch könnten zahlreiche GM1-Bindestellen unzugänglich sein wenngleich die Bindung an GM1 ein wichtiger Aspekt des Adjuvans-Effekts von CTB ist<sup>58</sup> (siehe A.2). Abgesehen davon konnte durch chemische Kopplung ohnehin nur etwa halb so viel CTB auf der Oberfläche von VLPs präsentiert werden wie über eine Transmembrandomäne (siehe C.1.4, Tab. C-1). Die höheren CTB-spezifischen Antikörpertiter von gekoppelten VLPs verglichen mit den über eine Transmembrandomäne CTB präsentierenden VLPs (Abb. C-19 D, E) lassen sich wohl dadurch erklären, dass zur Bestimmung der Titer für alle Proben dasjenige CTB eingesetzt wurde, welches auch zur Kopplung verwendet worden war.

Nicht auszuschließen ist auch, dass der Kopplungsprozess die VLPs in irgendeiner Form schädigt, denn die zelluläre Immunantwort gegen die hochgradig immunogenen Bak VLPs wurde durch Kopplung mit CTB sogar verringert (siehe C.2.1.3, Abb. C-20 A), wenn auch elektronenmikroskopische Aufnahmen gekoppelter VLPs nicht offensichtlich auf eine Schädigung hindeuten (siehe Abb. C-17).

### **D.2.1.2 Im bakuloviralen System produzierte VLPs eignen sich nicht wie in humanen Zellen produzierte VLPs zur Messung des Adjuvans-Effekts von chimärem CTB**

Wie bereits unter A.1.5 erwähnt, ist die gängigste, da sehr ertragreiche Methode zur Gewinnung von HIV-1 VLPs die Infektion von Insektenzellen mit rekombinantem Bakulovirus<sup>128,207</sup>. Mit diesem System produzierte VLPs sind bekannterweise hoch immunogen<sup>33,190</sup>. Sie wirken sogar derart stimulatorisch auf das Immunsystem, dass die Präsenz von CTB weder in gekoppelter noch in löslich beigemischter Form eine zusätzliche Steigerung der Immunantworten auf intranasal applizierte VLPs bewirken konnte (siehe C.2.1.3, Abb. C-20). Überdies konnte außer bei der CTB-spezifischen Antwort der gekoppelten VLPs keine Zunahme der Antikörpertiter (Gag- und CTB-spezifisch) in den final gewonnenen Seren gegenüber denjenigen nach der ersten *Booster*-Immunisierungen festgestellt werden (Abb. C-20 B, D). Als Ursache für den stark immunstimulatorischen Effekt der Bak VLPs wird zunehmend deren Verunreinigung mit Bakuloviren (siehe Abb. C-17 B, schwarzer Pfeil) diskutiert<sup>85,128</sup>. Untersuchungen in der Arbeitsgruppe liefern Hinweise, dass CpG Bereiche bakuloviraler DNA für den Adjuvans-Effekt verantwortlich sein könnten (unveröffentlichte Daten). Versuche, die Bakuloviren aus der VLP-Präparation abzutrennen, erwiesen sich als erfolglos<sup>28</sup>, weshalb die Verwendung von Bak VLPs zur Messung des Adjuvans-Effekts von CTB nicht geeignet ist. Zusätzlich stellt die „Kontamination“ mit Viren ein potentiell Sicherheitsrisiko bei Impfstoffkandidaten dar. Diese Verunreinigung enthalten in Säugerzellen produzierte VLPs, wie die hier eingesetzten 293-F VLPs, nicht.

Die systemische Antikörperantwort auf 293-F VLPs lässt sich im Gegensatz zu derjenigen, die durch Bak VLPs induziert wurde, Dosis-abhängig sowie durch mehrfach aufeinander folgende Applikationen steigern. Ohne Adjuvans induzieren die im humanen System produzierten VLPs keine Gag-spezifische mukosale Immunantwort, weder bei intranasaler noch bei intramuskulärer Applikation (siehe C.2.1.1). Nach einer intranasalen Verabreichung wird zudem keine zelluläre Immunantwort hervorgerufen. Durch die Präsentation von CTB auf 293-F VLPs mittels Transmembrandomäne sowie das Beimischen von CTB in löslicher Form konnte jedoch eine zelluläre und mukosal humorale Immunantwort *de novo* induziert werden und der Gag-spezifische systemische Antikörpertiter überdies weiter erhöht werden (siehe C.2.1.2, Abb. C-19). Dies beweist den Adjuvans-Effekt von über eine Transmembrandomäne präsentem sowie von löslich beigemischem CTB (zunächst ohne Mimotop).

### **D.2.1.3 Der anhand Gag-spezifischer Immunantworten gezeigte Adjuvans-Effekt von mittels Transmembrandomäne auf VLPs verankertem sowie löslich beigemischem CTB bleibt bei Präsentation eines Mimotops erhalten**

Wie im vorangegangenen Abschnitt bereits angesprochen, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass chimäres CTB, welches über eine Transmembrandomäne auf der Oberfläche von VLPs präsentiert wird, nach intranasaler Applikation eine Gag-spezifische zelluläre Immunantwort induziert (siehe C.2.1.1, Abb. C-19 A). Zudem konnte die Produktion Gag-spezifischer IgAs hervorgerufen

werden (Abb. C-19 C) und der Titer Gag-spezifischen Gesamtimmunglobulins je nach Immunisierungsexperiment entweder um ca. eine halbe Potenz gesteigert oder ebenfalls *de novo* induziert werden (wie unter 2.1.1. erwähnt variiert die Stärke der Antworten insgesamt von Experiment zu Experiment). Dieser Effekt konnte ebenfalls, wenn auch geringfügig schwächer, für Mimotop tragendes CTB mit Transmembrandomäne gezeigt werden (siehe C.2.6, Abb. C-23 A). Bezüglich des Erhalts des Adjuvans-Effekts auf die zelluläre und mukosale Immunantwort konnte im Rahmen derselben Immunisierungsstudie keine Aussage getroffen werden, da aufgrund insgesamt schwächerer Immunantworten im Verhältnis zu anderen Experimenten und eines zusätzlich hohen Hintergrundsignals im FACS keinerlei zelluläre Immunantworten von VLPs sowie lediglich in der BAL einer einzelnen Maus Gag-spezifische IgAs nachgewiesen werden konnten. Schwankungen in der Stärke der Immunantworten von Experiment zu Experiment wurden, wie bereits erwähnt, mehrfach beobachtet, in diesem speziellen Fall könnte die Haltung der Mäuse in einem anderen Tierlabor als bei den übrigen Immunisierungsstudien (bedingt durch die Tierhaltungskapazität) zu der verstärkten Abweichung beigetragen haben (Experiment wird wiederholt).

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass der Adjuvans-Effekt von CTB hauptsächlich auf dessen Bindung an den Gangliosid-Rezeptor GM1 zurückzuführen ist<sup>58,70,149</sup>, wodurch das fusionierte Antigen verstärkt über die mukosale Barriere aufgenommen wird und effizienter durch dendritische Zellen, Makrophagen und naive B-Zellen präsentiert wird<sup>94</sup>. In der Mehrzahl der Veröffentlichungen, in denen der Adjuvans-Effekt von CTB untersucht wurde, konnte dementsprechend kein Effekt von dem spezifischen Antigen löslich beigemischt CTB gezeigt werden, es sei denn, den Proben wurden zusätzlich Spuren an Cholera Toxin A (CTA) beigemischt<sup>73,95,170,198</sup>. Dem widersprechend demonstrierten Prabakaran sowie Kang und Kollegen einen Adjuvans-Effekt von CTB, welches jeweils in löslicher Form zu einem spezifischen Antigen beigemischt wurde<sup>103,167</sup>. Boberg und Kollegen wiederum, die CTB mit 9 AS einer Variante der HIV-1 Reversen Transkriptase (RT) fusionierten, detektierten RT-spezifische CTL lediglich nach Immunisierung von Mäusen mit dem Fusionsprotein, aber nicht in den Milzen derjenigen Tiere, die CTB zu dem 9 AS Peptid beigemischt erhielten<sup>23</sup>. Boberg mutmaßt, dass das CTB derjenigen Gruppen, die einen Effekt durch das Beimischen von CTB zeigen konnten, CTA Verunreinigungen enthält. Die in dieser Arbeit entworfenen löslichen CTB-Varianten CTB<sub>GST</sub> und MNCTB<sub>GST</sub> wurden nach Transformation synthetischer DNA in *E. coli* exprimiert und enthalten daher sicherlich keine Spuren an CTA. Dennoch waren beide Varianten in der Lage, Gag-spezifische zelluläre sowie humoral mukosale Immunantworten nach intranasaler Applikation in Kombination mit VLPs zu induzieren und die Titer an Gag-spezifischem Gesamtimmunglobulin um etwa den Faktor 10 zu erhöhen (siehe C.2.1.4, Abb. C-21). Demzufolge verbessert auch das Beimischen von CTB zu einem Antigen dessen Immunogenität, ohne dass Spuren an CTA enthalten sind.

In Ergänzung zur Verbesserung der Immunogenität von VLPs waren sowohl CTB<sub>GST</sub> als auch MNCTB<sub>GST</sub> in der Lage, GST-spezifische IgAs zu induzieren und den GST-spezifischen Gesamtimmunglobulin Titer, bezogen auf GST alleine, maßgeblich zu erhöhen (siehe C.2.1.5, Abb. C-22), d.h. humorale und mukosale Immunantworten gegen ein fusioniertes Peptid zu stimulieren.

Im direkten Vergleich hatte das Beimischen von CTB einen stärkeren Effekt auf die Gag-spezifische Antikörperantwort als die Präsentation von CTB über eine Transmembrandomäne (siehe Abb. C-19 B, C). Zur weiteren Steigerung der Funktionalität von letzterem wäre der Austausch bzw. die Verlängerung der *Linker*-Region zwischen CTB und der Transmembrandomäne denkbar (siehe Abb. C-1), beim Entwurf der CTB-Varianten wurden hierfür bereits Schnittstellen vorgesehen.

Bezüglich des Adjuvans-Effekts von löslich beigemischem CTB lassen die Ergebnisse der unter C.2.1.4 beschriebenen Immunisierungsstudie darauf schließen, dass vermutlich ein GST-*tag*, nicht aber die Präsentation eines Mimotops den Adjuvans-Effekt von CTB leicht beeinträchtigen könnte. Eine Möglichkeit zur Steigerung des Adjuvans-Effekts von in löslicher Form produziertem chimärem CTB wäre daher die Abspaltung des GST-*tags*. Auch daran wurde bereits bei der Konstruktion der Varianten gedacht, sie enthalten eine spezifische Proteaseschnittstelle (HRV 3C) zwischen CTB und *Linker* (siehe Abb. C-11).

## D.2.2 Fokussierung der humoralen Immunantwort auf ein Env Epitop

Da, wie bereits unter A.1.6 beschrieben, diverse Studien darauf hinweisen, dass die Kombination einer *env* DNA Grundimmunisierung (*Prime*) gefolgt von Immunisierungen mit Env Protein (*Boost*) höhere und länger anhaltende Titer Env-spezifischer Antikörper induziert als jede Komponente für sich, wurden auch in den hier konzeptionierten Immunisierungsexperimenten zur Fokussierung der humoralen Immunantwort auf das Mimotop heterologe *Prime – Boost* Strategien untersucht. Dabei zeigte sich durchweg ein Erfolg der Grundimmunisierung mit DNA.

### D.2.2.1 Eine heterologe *Prime-Boost*-Immunisierung mit *gp41* DNA und MNCTB<sub>GST</sub> führt zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper mit moderater *Clade* übergreifender Neutralisationsaktivität

Während die Immunisierung von Mäusen ausschließlich mit *gp41* DNA nicht zur Induktion MPER-spezifischer Antikörper führte und die zweifache Immunisierung mit löslichem Mimotop tragendem CTB (MNCTB<sub>GST</sub>) eine moderate MPER-spezifische Antikörperantwort hervorrief, die jedoch durch zwei weitere Immunisierungen mit dem Protein nicht gesteigert werden konnte, erzielte die Kombination aus einer *gp41* DNA Grundimmunisierung und zwei *Boosts* mit MNCTB<sub>GST</sub> einen 10fach höheren mittleren MPER-spezifischen Antikörpertiter (siehe C.2.2.1, Abb. C-24 A). Die induzierten Immunglobuline vermittelten sogar einen zwar moderaten, jedoch *Clade* übergreifenden Schutz gegen *Clade B* und *Clade C* Virusisolate (siehe Abb. C-24 B).

Matoba und Kollegen dagegen erreichten selbst nach 6facher homologer intranasaler Immunisierung mit einem CTB-MPER Fusionsprotein (C-terminales Fusionsprotein) keine MPER spezifischen Antikörper. Dabei applizierten sie mit 14 µg je Immunisierung sogar jeweils 1,4 Mal so viel chimäres Protein wie in dieser Arbeit pro Anwendung verabreicht wurde<sup>137</sup>. Erst durch einen folgenden intraperitonealen *Boost* mit dem Fusionsprotein konnten Transcytose blockierende Antikörper induziert werden. Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, reduziert eine Grundimmunisierung mit *gp41* DNA also merklich die zur Induktion MPER-spezifischer Antikörper notwendige Anzahl an Immunisierungen mit chimärem CTB. Dabei ist DNA sogar weitaus einfacher und schneller zu gewinnen als rekombinantes Protein. In einer Folgestudie zu der oben genannten Veröffentlichung

beschrieben Matoba und Kollegen bei sonstiger Beibehaltung ihres Immunisierungsschemas eine Erhöhung auf die 3fache Menge Fusionsprotein unter zusätzlicher Beimischung von jeweils 1 µg Cholera Toxin (CT) und erzielten damit einen MPER-spezifischen IgG Titer von ca.  $10^4$  sowie einen IgA Titer von ca.  $50^{136}$ . Die Verwendung des Holotoxins als Adjuvans ist jedoch bei Menschen nicht denkbar, da bereits 5 µg CT schwere Durchfälle verursachen <sup>7</sup>.

Um eine Eingrenzung der Immunantwort auf den MPER-Bereich verdeutlichen zu können, wäre in Ergänzung zu den MPER-spezifischen Antikörperantworten auch die humorale Immunantwort gegen Volllänge gp41 interessant gewesen. Diese sollte analog zu den MPER-spezifischen Antikörperantworten mittels Endpunktdilutions-ELISA bestimmt werden. Allerdings ergaben erste Versuche ein starkes Hintergrundsignal. Da für notwendige Etablierungsmaßnahmen das zur Beschichtung der Platten erforderliche lösliche gp41 <sup>90</sup> nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand, konnte die gp41-spezifische Immunantwort nicht weiter untersucht werden.

#### **D.2.2.2 Selbst eine heterologe *Prime-Boost*-Immunisierung mit *gag* DNA kann durch *Boost* mit einer Kombination aus VLPs und MNCTB<sub>GST</sub> zur Induktion Mimotop-spezifischer HIV-1 Env Antikörper führen**

Im Rahmen einer Immunisierungsstudie, die ursprünglich zum Auslesen des Adjuvans-Effekts von CTB durchgeführt wurde, zeigte sich, dass nicht nur ein *Prime* mit *gp41* DNA sondern auch eine Grundimmunisierung mit *gag* DNA zur Produktion MPER-spezifischer Antikörper führen kann, wenn ein zweifacher *Boost* mit VLPs und löslich beigemischttem MNCTB<sub>GST</sub> erfolgt (siehe C.2.2.1, Abb. C-25 A). Mit Hilfe dieses Immunisierungsschemas wurde sogar, wenn auch sehr moderat, eine mukosale MPER-spezifische Antikörperantwort induziert (Abb. C-25 B). Ein TZM.bl Test zur Analyse der neutralisierenden Aktivität der MPER-spezifischen Antikörper konnte nicht durchgeführt werden, da die Studie, wie erwähnt, zum Auslesen des Adjuvans-Effekts von CTB auf die Gag-spezifische Immunantwort und nicht zur Untersuchung der Fokussierung der Immunantwort auf das Mimotop konzeptioniert worden war und daher weniger Blut entnommen wurde. Es zeigte sich, dass eine Grundimmunisierung mit *gag* DNA derart immunstimulatorisch ist, dass ein Beimischen von CTB zu VLPs beim *Boost* nicht zu einer messbaren Erhöhung der Gag-spezifischen Immunantworten führen konnte (Daten nicht gezeigt). Daher eignete sich die Studie nicht zur Untersuchung des Adjuvans-Effekts von CTB. Bemerkenswert ist jedoch, dass die intramuskuläre Verabreichung von *gag* DNA (*Prime*) in Kombination mit der intranasalen Verabreichung von VLPs (*Boost*) zur Induktion Gag-spezifischer mukosaler Antikörper mit einem mittleren Titer größer 1.000 führte, während beide Komponenten alleine keine Gag-spezifischen IgAs hervorriefen (siehe Abb. E-2 C). Das heißt, ein nicht mukosal applizierter DNA *Prime* ist in der Lage in Kombination mit einem mukosal verabreichten Protein *Boost* hohe Titer mukosaler Antikörper zu induzieren. Durch die heterologe *Prime – Boost* Kombination aus *gag* DNA i.m. und VLPs i.n. erhöhte sich zudem der Gag-spezifische Gesamtimmunglobulin Titer, bezogen auf die beiden Komponenten jeweils alleine, um ca. den Faktor 100 (Abb. E-2 B) und die Gag-spezifische zelluläre Immunantwort verdoppelte sich ungefähr, verglichen mit *gag* DNA alleine (Abb. E-2 A).

### D.2.2.3 Die Verabreichung von VLP/MNCTB-CD34TM induziert nach einer DNA Grundimmunisierung Mimotop-spezifische HIV-1 Env Antikörper bei Mäusen und Kaninchen

Ausgehend von dem in der Literatur beschriebenen und in den vorangehenden Immunisierungsstudien selbst beobachteten Erfolg der heterologen DNA *Prime* – Protein *Boost* Immunisierung, wurde auch bei der Fokussierung der Immunantwort auf das Mimotop von MNCTB-CD34TM, welches auf der Oberfläche von VLPs präsentiert wird, von einer Grundimmunisierung mit DNA Gebrauch gemacht. Zusätzlich zu *gp41* bzw. *mnctb-cd34tm* DNA wurde dabei auch *gag* DNA verabreicht, um dadurch die Produktion von *gp41* bzw. MNCTB-CD34TM präsentierenden VLPs im lebenden Organismus zu induzieren (siehe A.1.5) und somit eine Analogie zum jeweiligen *Boost* herbeizuführen und bereits durch den *Prime* zelluläre und humorale Immunantworten zu stimulieren<sup>16</sup>, welche sich bei der Virusbekämpfung ergänzen und vermutlich nur gemeinsam in der Lage sind, einen lang anhaltenden Schutz gegen HIV zu gewähren (siehe A.1.4). Überdies zeigte sich, wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, dass ein *Prime* mit *gag* DNA bei geeignetem *Boost* die Produktion MPER-spezifischer Antikörper stimulieren kann.

Wie bereits unter D.2.2.1 diskutiert wäre auch an dieser Stelle die Antikörperantwort gegen Volllänge *gp41* im Vergleich zur analysierten MPER-spezifischen Antwort interessant gewesen. Dennoch konnte hier eindeutig eine Fokussierung der Immunantwort auf die durch CTB präsentierten Env Epitope gezeigt werden. Während nach *gag* plus *gp41* DNA *Prime* und *Boost* mit *gp41* präsentierenden VLPs keine MPER-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden konnten, induzierte ein *Boost* mit VLPs, die MNCTB-CD34TM präsentieren, die Produktion einer MPER-spezifischen humoralen Immunantwort (siehe C.2.2.2, Abb. C-26 A). Bei Austausch der *gp41* DNA durch *mnctb-cd34tm* DNA dagegen, konnte wiederum keine MPER-spezifischen Antikörper nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass der Effekt des *gp41* DNA *Prime* stärker wiegt als derjenige des *gag* DNA *Prime*. MPER-spezifische mukosale Immunantworten konnten zwar nicht erzielt werden, jedoch führte jede Kombination aus *gag* DNA *Prime* und VLP *Boost* erneut zur Induktion Gag-spezifischer IgAs (siehe Abb. C-26 C, vergleiche Abb. E-2), welche bei der Bekämpfung von HIV in der unmittelbaren Eintrittspforte des Virus ebenfalls von großer Bedeutung sind. Dass eine systemisch applizierte Komponente, die allein nicht in der Lage ist, die Bildung spezifischer IgAs zu induzieren, dennoch als *Priming* für eine mukosale Immunantwort dienen kann, zeigte sich in der Arbeitsgruppe bereits bei der Untersuchung von EHV-1 (*Equines Herpes Virus Typ 1*) als virales Vektorsystem<sup>93</sup>.

Den durchgehenden Erfolg eines *gp41* DNA *Prime* konnte überdies auch die Immunisierung von Kaninchen bestätigen, in deren Seren nach einem *Boost* mit VLP/MNCTB-CD34TM ebenfalls MPER-spezifische Antikörper mit moderat neutralisierender Aktivität nachgewiesen wurden (siehe C.2.2.3, Abb. C-27).

### D.3 Ausblick

Verschiedene bisherige gp41 Peptid-basierte Ansätze waren nicht erfolgreich bei der Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern. So erzielten z. B. zur Nachahmung eines Fusionsintermediats entwickelte NHR- und CHR-Peptide zwar Antikörper gegen den Übergangszustand jedoch keine Neutralisation<sup>47</sup>. Auch ein um die minimale Trimerisierungseinheit erweitertes NHR-Peptid, welches zusätzlich durch Disulfidbrücken stabilisiert wurde, rief keine neutralisierende Antwort hervor<sup>124</sup>.

Das hier etablierte Prinzip der Präsentation eines gp41 Peptids (Mimotop) durch chimäres CTB auf der Oberfläche von VLPs oder auch in löslicher Form ist ein vielversprechendes System zur Induktion breit neutralisierender Antikörper gegen HIV-1. Es konnte gezeigt werden, dass chimäres CTB ein Mimotop frei zugänglich präsentieren kann und gleichzeitig als Adjuvans funktional ist. Da zu Beginn der Arbeit nur wenige bNAKs bekannt und verfügbar waren, wurden die Epitope der potentesten darunter (2F5 und 4E10) zur Präsentation über CTB eingesetzt. Durch Kombination mit einem *gp41* DNA *Prime* gelang die Induktion Mimotop-spezifischer Antikörper mit moderater *Clade* übergreifender Neutralisationsaktivität. Aktuell wird verstärkt diskutiert, dass zur Neutralisation durch 2F5 und 4E10 neben der Bindung an das lineare Epitop in der MPER von gp41 auch die Bindung an die virale Membran erforderlich ist<sup>2,3,64</sup>. Eine Kreuzreaktion von 2F5 und 4E10 mit zellulären Lipidmembranen könnte zudem aufgrund möglicher Autoimmunreaktionen die Induktion derartiger Antikörper erschweren<sup>82,83,203</sup>. Eine Übertragung des hier entwickelten Konzepts auf die Epitope kürzlich identifizierter bNAKs (siehe A.1.3.1), wie z.B. das des gegen die CD4-Bindestelle gerichteten VRC01<sup>222</sup>, welcher aktuell der am breitesten und gleichzeitig der am stärksten neutralisierende bNAK ist, könnte allerdings großes Potential zur Induktion von breit neutralisierenden Antikörpern haben. Die Verabreichung einer Kombination aus mehreren verschiedenen, jeweils über CTB präsentierten Epitopen könnte das im Rahmen dieser Arbeit etablierte System zusätzlich verbessern. Durch den Einbau einer ganzen Peptid-Bibliothek ergibt sich aufgrund der Präsentation von chimärem CTB über eine Transmembrandomäne unter Verwendung eines in unserer Arbeitsgruppe etablierten, lentiviralen *Display*-Systems (unveröffentlichte Technologie) des Weiteren die Möglichkeit eines *Mimotop-Screenings*, z.B. zur Identifizierung von Mimotopen mit verbesserter Bindung an neue breit neutralisierende Antikörper.

## E Anhang

### E.1 Abkürzungsverzeichnis

Soweit nicht anders angegeben entsprechen die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen dem *Gold Book* der IUPAC <sup>142</sup>, dem *White Book* der JCBN <sup>120</sup> bzw. den Empfehlungen des Duden <sup>56</sup>.

AIDS	<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>	Ig	Immunglobulin
Amp	Ampicillin	IgA	Immunglobulin A
AP	<i>Akaline Phosphatase</i>	i.m	intramuskulär
APC	Allophycocyanin	i.n	intranasal
AS	Aminosäuren	Iono	Ionomycin
BAL	Bronchoalveolare Lavage	IPTG	Isopropylthiogalactosid
BFA	Brefeldin A	IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
bNAK	breit neutralisierender Antikörper	JCBN	<i>Joint Commission on Biochemical Nomenclature</i>
BS <sup>3</sup>	Bis[sulfosuccinimidyl] Suberate	Kan	Kanamycin
BSA	Bovines Serumalbumin	LB	Luria-Bertani
CAVD	<i>Collaboration for AIDS Vaccine Discovery</i>	LPS	Lipopolysaccharid
CD40L	CD40 Ligand	MaIE	Maltosebindeprotein
CRFs	<i>circulating recombinant forms</i>	MPER	<i>membrane proximal external region</i>
CT	Cholera Toxin	MPL	Monophosphoryl-Lipid-A
CTA	Cholera Toxin A	OD	<i>outer domain</i> , äußere Domäne
CTB	Cholera Toxin B	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
CTL	<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	PE	Phycoerythrin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
EHV-1	<i>Equines Herpes Virus Typ 1</i>	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>	Pr55 <sup>Gag</sup>	Gruppen-spezifisches Antigen, Capsidprotein
Env	<i>Envelope</i> , Hüllprotein	RT	Reverse Transkriptase
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	SDF	<i>stromal cell derived factor</i>
Fc	<i>constant fragment</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
FCS	<i>fetal calf serum</i>	SHIV	<i>simian-human immunodeficiency virus</i>
FITC	Fluorescein-isothiocyanat	Strep	Streptomycin
Gag	Gruppen-spezifisches Antigen, Capsidprotein	TBS	<i>Tris buffered saline</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>	Tet	Tetracyclin
GST	Glutathion-S-Transferase	TLR	<i>toll-like receptor</i>
HA	Hämagglutinin	TM	Transmembrandomäne
HBV	Hepatitis B Virus	TMB	Tetramethyl-Benzidin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	tpa	<i>tissue plasminogen activator</i>
HPV	Humanes Papillomavirus	ün	über Nacht
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>	VLP	<i>virus like particle</i> , virusähnlicher Partikel
IFN <sub>γ</sub>	Interferon $\gamma$	ZEM	Zentralen Labor für Elektronenmikroskopie

## E.2 DNA-Konstrukte

### E.2.1 Vektoren

Bezeichnung	Bezugsquelle	Anmerkung
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt	Eukaryontisches Expressionsplasmid
pET-49b(+)	Novagen, Darmstadt	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid
pGEX-KG	GE Healthcare, München	<i>E. coli</i> Expressionsplasmid

Tab. E-1: Übersicht der verwendeten Vektoren

### E.2.2 Chimäre CTB-Varianten mit Transmembrandomäne

Die Herstellung der CTB-Varianten mit Transmembrandomäne erfolgte wie unter C.1.1.1 bzw. C.1.1.6 beschrieben. Die Sequenzen der in pcDNA3.1 eingebrachten Konstrukte sind im Folgenden aufgelistet.

#### CTB-CD34TM

```
GGCCGGCCGCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTCTGTGA
GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCCGTTTCAGAAGGGGGCGCCAGGGGTAGTGCGACACCCCAGAACATCACCGACCTGTG
CGCCGAGTACCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGG
AGATGGCCATCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCCCGGCAGCCAGCACATCGACAGCCAGAA
GAAAGCCATCGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGG
AACAAACAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGA
AGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAGCCTGATCGCCCTGGTGACCTCCGGAGCCCTGCTGGCCGTGCTGGGCATCACCGGC
TACTTTCTGATGAACCGGCGGAGTGGTCCCCACCGGCGAGAGACTGGAACCTGGAACCCCTGA
```

#### CTB-gp64TM

```
GGCCGGCCGCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTCTGTGA
GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCCGTTTCAGAAGGGGGCGCCAGGGGTAGTGCGACACCCCAGAACATCACCGACCTGTG
CGCCGAGTACCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGG
AGATGGCCATCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCCCGGCAGCCAGCACATCGACAGCCAGAA
GAAAGCCATCGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGG
AACAAACAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGA
AGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAGCACAAGCTTTCATGTTCCGGCCACGTGGTGAACCTTCGTGATCATCTGATCGTATCCT
GTTCTGTACTGCATGATCCGCAACCGGTGA
```

#### MNCTB-CD34TM

```
GGCCGGCCGCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTCTGTGA
GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCCGTTTCAGAAGGGGGCGCCAGGGGTAGTGAGACGAAAAAGAGCTGCTGGAACCTGGA
CAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACCTGTTTCGACATCACCAACTGGCTGTGGTACATCGTCTCGGCGACACCCCAGAACATCA
CCGACCTGTGCGCCGAGTACCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCC
GGCAAGCGGGAGATGGCCATCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCCCGGCAGCCAGCACATCG
ACAGCCAGAAGAAAGCCATCGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCT
GTGCGTGTGGAACAACAAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGG
CGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAGCCTGATCGCCCTGGTGACCTCCGGAGCCCTGCTGGCCGTGCTGG
GCATCACCGGCTACTTTTCTGATGAACCGGCGGAGTGGTCCCCACCGGCGAGAGACTGGAACCTGGAACCCCTGA
```

#### MNCTB-gp64TM

```
GGCCGGCCGCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTCTGTGA
GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCCGTTTCAGAAGGGGGCGCCAGGGGTAGTGAGACGAAAAAGAGCTGCTGGAACCTGGA
CAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACCTGTTTCGACATCACCAACTGGCTGTGGTACATCGTCTCGGCGACACCCCAGAACATCA
CCGACCTGTGCGCCGAGTACCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCC
GGCAAGCGGGAGATGGCCATCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCCCGGCAGCCAGCACATCG
ACAGCCAGAAGAAAGCCATCGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCT
GTGCGTGTGGAACAACAAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGG
CGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAGCACAAGCTTTCATGTTCCGGCCACGTGGTGAACCTTCGTGATCATCTG
ATCGTATCCTGTTCTGTACTGCATGATCCGCAACCGGTGA
```

**MiCTB-CD34TM**

GGCCGGCCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCGCCGTGTTTCGTGA  
 GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTTCCAGAAAGGGGGCGCCAGGACCCCCAGAACATCACCGACCTGTGCGCCGAGTA  
 CCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGGGAGATGGCCA  
 TCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCGGTAGTGAGACGAAAAAGAGCTGCTGGAAGTGGAC  
 AAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCCGACATCACCAACTGGCTGTGGTACATCGTCTCGGCCGATTGAGCGGATGAAGGA  
 CACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGGAACAACAAGACCCCCACGCGATC  
 GCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAG  
 CCTGATCGCCCTGGTGAACCTCCGGAGCCCTGCTGGCCGTGCTGGGCATCACCGGCTACTTTCTGATGAACCGGGGAGC  
 TGGTCCCCACCGGCGAGAGACTGGAAGTGAACCTGA

**MiCTB-gp64TM**

GGCCGGCCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGCTGCTGTTGCGCCGTGTTTCGTGA  
 GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTTCCAGAAAGGGGGCGCCAGGACCCCCAGAACATCACCGACCTGTGCGCCGAGTA  
 CCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGGGAGATGGCCA  
 TCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCGGTAGTGAGACGAAAAAGAGCTGCTGGAAGTGGAC  
 AAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCCGACATCACCAACTGGCTGTGGTACATCGTCTCGGCCGATTGAGCGGATGAAGGA  
 CACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGGAACAACAAGACCCCCACGCGATC  
 GCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCGGAGGGGGCGGAAGCGGCAG  
 CACAAGCTTCATGTTCCGGCCACGTGGTGAACCTCGTGATCATCTGATCGTGATCCTGTTCCCTGACTGCATGATCCGCAAC  
 CGGTGA

**2F5iCTB-CD34TM**

GGCCGGCCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGCTGTTGCGCCGTGTTTCGTGA  
 GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTTCCAGAAAGGGGGCGCCAGGACCCCCAGAACATCACCGACCTGTGCGCCGAGTA  
 CCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGGGAGATGGCCA  
 TCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCGGTAGTGAGACTGGACAAGTGGGCCAGCCTG  
 GCGATTGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGGAACA  
 ACAAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGCGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCG  
 GAGGGGGCGGAAGCGGCAGCCTGATCGCCCTGGTGAACCTCCGGAGCCCTGCTGGCCGTGCTGGGCATCACCGGCTACT  
 TTCTGATGAACCGGCGGAGCTGGTCCCCACCGGCGAGAGACTGGAAGTGAACCTGA

**4E10iCTB-CD34TM**

GGCCGGCCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCGCTGTGCTGCGTGCTGCTGCTGTTGCGCCGTGTTTCGTGA  
 GCCCCAGCCAGGAAATCCACGCCCGGTTTCCAGAAAGGGGGCGCCAGGACCCCCAGAACATCACCGACCTGTGCGCCGAGTA  
 CCACAACACCCAGATCCACACCCTGAACGACAAGATCTTCAGCTACACCGAGAGCCTGGCCGGCAAGCGGGGAGATGGCCA  
 TCATCACCTTCAAGAACGGCGCCACCTTCCAGGTGGAGGTGCCGGTAGTGAGACTGGTTCCGACATCACCAACTGG  
 GCGATTGAGCGGATGAAGGACACCCTGCGGATCGCCTACCTGACCGAGGCCAAGGTGGAGAAGCTGTGCGTGTGGAACA  
 ACAAGACCCCCACGCGATCGCCGCCATCAGCATGGCCAACGGCAGCGGGCGGAGGGGGATCTGGCGGCGGAGGAAGCG  
 GAGGGGGCGGAAGCGGCAGCCTGATCGCCCTGGTGAACCTCCGGAGCCCTGCTGGCCGTGCTGGGCATCACCGGCTACT  
 TTCTGATGAACCGGCGGAGCTGGTCCCCACCGGCGAGAGACTGGAAGTGAACCTGA

**E.2.3 Chimäre CTB-Varianten zur Produktion in löslicher Form**

Die Klonierung der CTB-Varianten ohne Transmembrandomäne erfolgte wie unter C.1.2.1 erläutert.

Die Sequenzen der in pET-49b(+) eingebrachten Konstrukte sind im Folgenden aufgelistet.

**CTB<sub>GST</sub>**

GGTAGTGCGACACCGCAGAACATTACCGATCTGTGCGCGGAATATCATAACACCCAGATCCATACCCTGAACGATAAAATC  
 TTCAGCTATACCGAAAGCCTGGCCGGCAACGTGAAATGGCGATCATCACCTTTAAAAACGGCGCGACCTTTCAGGTGGAA  
 GTGCCGGGCGAGCCAGCATATTGATAGCCAGAAAAAGCGATCGAACCGCATGAAAGATACCCTGCGTATTGCGTATCTGACC  
 GAAGCGAAAGTGA AAAAAGTGTGCGTGTGGAACAACA AAAAAGCGGATGCGATCGCCGCGATTAGCATGCGGAACCTGGA  
 AGTGTGTTTTAGGGTCCGGGCGAGCGGTGGTGGTGTAGCGGGCGGTGGCGGCGAGCGGTGGCGGCGGTAGCGGTAGCAT  
 GAGCCCATTCTGGGCTATTGAAAATTAAGGCCTGGTGCAGCCGACCCGTCTGCTGCTGGAATATCTGGAAGAGAAAAA  
 TGAAGAACACCTGTACGAACGTGATGAAGGCGATAAATGGCGCAACAAAAATTTGAACTGGGCCTGGAATTTCCGAACCT  
 GCCGTATTATATTGATGGTGTGTAAGTGAACCTGACCCAGAGCATGGCGATTATTCGTTATATCGCGGATAAACATAACATGCTG  
 GGCGGCTGCCGAAAGAACGTGCGGAAATTAGCATGCTGGAAGGCGCGGTGCTGGATATTTCGTTATGGCGTGAGCCGCA  
 TTGCGTATAGCAAAGATTTCCGAACCCCTGAAAGTGGATTTTCTGAGCAAACCTGCCGAAATGCTGAAAATGTTTGAAGATCG  
 CCTGTGCCATAAAACCTATCTGAACGGCGATCATGTGACCCATCCGGATTTTATGCTGTATGACGCGCTGGATGTGGTGTGCT  
 GTATATGGATCCGATGTGCCGTGGATGCGTTTTCCGAAACTGGTGTGCTTTAAAAACGCATTGAAGCGATTCCGCAGATCGA  
 TAAATATCTGAAAAGCAGCAAATATATTGCGTGGCCGCTGCAGGGTTGGCAGGCGACCTTTGGTGGTGGTGACCATCCGC  
 CGAAATAA





GATCAGGATGATCTGGACGAAGGCATCAGGGGCTCGCCGACGCCAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCG  
 ACGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGTTGCCGAATATCATGGTGGAAAAAGCCGCTTTTCTGGATTCA  
 TCGACTGTGGCCGGTGTGGCGGACCGCTATCGGACATAGCGTTGGCTACCCGTTGATATTGCTAGCAAGGACTTGGC  
 GGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT  
 GACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGAGATTTGAT  
 TCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGA  
 TCTCATGCTGGAGTCTTCGCCACCCCAACTGTTTATTGCACTTATAATGGTTACAAAATAAGCAATAGCATCAAAATT  
 TCACAAAATAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGT  
 CGACCTTAGTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAA  
 CATAACGAGCCGGAAGCAATAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACT  
 GCCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTGCCAGTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTGCGTA  
 TTGGGCGCTTCTCCGCTTCTCGTCACTGACTCGTGCCTCGTTCGGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGTCACTCA  
 AAGGCGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG  
 GAACCGTAAAAAGGCCGCGTGTGGCGTTTTTCCATAGCTCCGCCCTTACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAA  
 GTCAGAGGTGGCAAAACCGACAGGACTATAAAGATACCGGCTTTCCCTTGGAAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTT  
 CCGACCTCGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCCGAAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCAGCTGTAG  
 GTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTCCGCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCT  
 TATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAACAGGATTA  
 GCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTG  
 GTATCTGCGCTTCTGACAGCCGTTACCTTCGGAATAAGATGTTGATGCTTCCCGCAAAACAAACCCAGCTGGTA  
 GCGGTTTTTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGT  
 TGACGCTCAGTGGAAACGAAAACCTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCCACTAGATCCTTTTA  
 AATAAAAAAGTAAAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAACTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCA  
 CCTATCTCAGCGATCTTATTTCCATCCATGTTGCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTGACATACGGGAGGGCT  
 TACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAG  
 CCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA  
 GTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTA  
 GGTCTTACTCAGTCCGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAGTTACATGACTCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTGCTT  
 TCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAAGTAAAGTTGGCCGAGTTTATCACTCATGGTTATGGCAGACTGCATAATTCTCTTAC  
 TGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTACTCAACCAAGTCTTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG  
 AGTTGCTTTCGCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAAGTGTCTATCATTGAAAAAGCTT  
 CTTCCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCT  
 CAGCATCTTTTACCGAGCTTCTGGTGAGCAAAAAAGGAAAGCGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAAATAAGGGCGCA  
 CACGGAATGTTGAATACTACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACA  
 TATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

### pcDNA3.1/*tpa-gp41*(ZM96) 2F5<sup>17</sup>

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTGCAGTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATC  
 TGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTGCGTGAGTAGTGCAGCAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACA  
 ATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACCGTTGACATTGAT  
 TATTGACTAGTTAATAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACG  
 GTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA  
 ATAGGGACTTTCCATGACGTCAATGGTGGACTATTTACGGTAACTGCCACTGGCAGTACATGATGATGATGATGATG  
 CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC  
 CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA  
 GCGGTTTTGACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGA  
 CTTTTCAAAATGTCTAAACAATCCGCCCATTTGACGCAATGAGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGTCTATATAAGCAG  
 AGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTGG  
 CTAGCGCCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCTGTGCTGCGTGTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTCTGTGAGCCC  
 CAGCCAGGAAATCCACCGCGGTTTACAGCGGGGAGCCGGATGCAGTGGGACCGGGAGATCAGCAACTACCAACACACC  
 ATCTACGGCTGCTGAAGATAGCCAGAGCCAGAGCAAGAGAGCAAGAGGACTGCTGGAGTGTGACAAGTGGCCCA  
 GCCTGTGGAAGTGGTTCGACATCACCAAGTGGCTGTGGTACATCAAGATCTTCTCATGATGATCGTGGCGGCGCTGATCGGC  
 CTGCGGATCATCTTCCCGTGTGCTCCATCGTGAACAGAGTGCAGGAGGCTACAGCCCCCTGAGCTTCCAGACCCTGAT  
 CCCCACCCCTGATGAGGTACCGCGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGGAAATTCTGCAGATCCAGCACAGTGGCC  
 GCGCTCGAGCTAGAGGCGGCTTTAAACCGCTGATCAGCTGACTGCTGCTTCTAGTTGCCAACTGTTGTTGTTG  
 CCCCTCCCGCTGCTTCTTACCCCTTCCCTTCCGCAACGTTCCGCGGTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGATCCC  
 TTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATC  
 GCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAATGGAACAACA  
 CTCAACCCATCTCGTCTATTCTTTGATTTAAGGGATTTGGGATTTGGCCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTA  
 AAAAAATTAACGCGAATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGTTGGAAAGTCCCCAGCTCCCAGGCTCCGAGGCGAG  
 AAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA  
 AAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCCAGTCCCGC  
 CCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTTATGAGAGGCGGAGGCCGCTCTGCCCTGTAGCTATTCCAGAAG  
 TAGTGAGGAGGCTTTTTTGAAGGCTAGGCTTTTGAAGGCTCCCGGAGCTTGTATATCCCTTCCGATGATCAAG  
 AGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTA  
 TTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTGTGATGCCGCGTGTTCGGCTGTACGCGAGGGCGCCCGG  
 TTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGTAATGAAGTGCAGGAGGAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCAG  
 ACGGGCTCTTTCGCGAGCTGTGCTGACGTTGTACTGAAGCGGAAAGGACTGGCTGTCTATTGGGCGAAGTGCACCG  
 GGCAGGATCCTGTCTACTCACCTTGTCTGCTGCGGAGAAAGATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACCG  
 TTGATCCGGCTACCTGCCATTGACACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAAGTGGATGGAAGCCGGTCTT  
 GTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCAACTGTTCCGCAAGGCTCAAGGCGCGCATGC

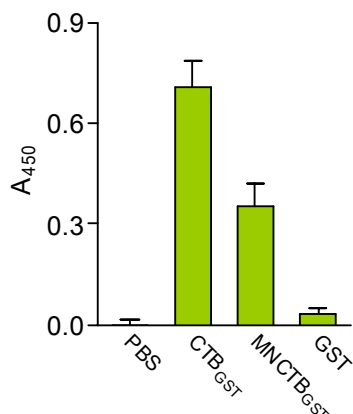
CCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGA  
 TTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCT  
 TGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCC  
 TTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTT  
 CGATTCCACCGCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCG  
 GGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCCACTTGTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAC  
 AAATTTACAAATAAAGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATA  
 CCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCAC  
 ACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCT  
 CACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGCGGGGAGAGGCGGTTT  
 CGTATTGGGCGCTTTCGCCCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGTCA  
 CTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAG  
 CCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGC  
 TCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTC  
 TGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCACGCTG  
 TAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCGACCCGCTGCG  
 CCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA  
 TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTAT  
 TTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTG  
 GTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC  
 GGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTACCTAGATC  
 CTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT  
 GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG  
 AGGGTTACCATCTGGCCCGAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC  
 AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAA  
 GCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTAAAGTGGTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTGC  
 TTTGGTATGGTTCATTACAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTA  
 GTCCTTCCGTCCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCATGCATAATTC  
 TCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGG  
 CGACCGAGTTGCTCTTCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTAAAAAGTGTCTCATCATTGGA  
 AAACGTTCTTCCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC  
 TGATCTTCAGCATCTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAA  
 GGGCGACCGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGC  
 GGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTGCCACCTGACGTC

### E.3 Peptide

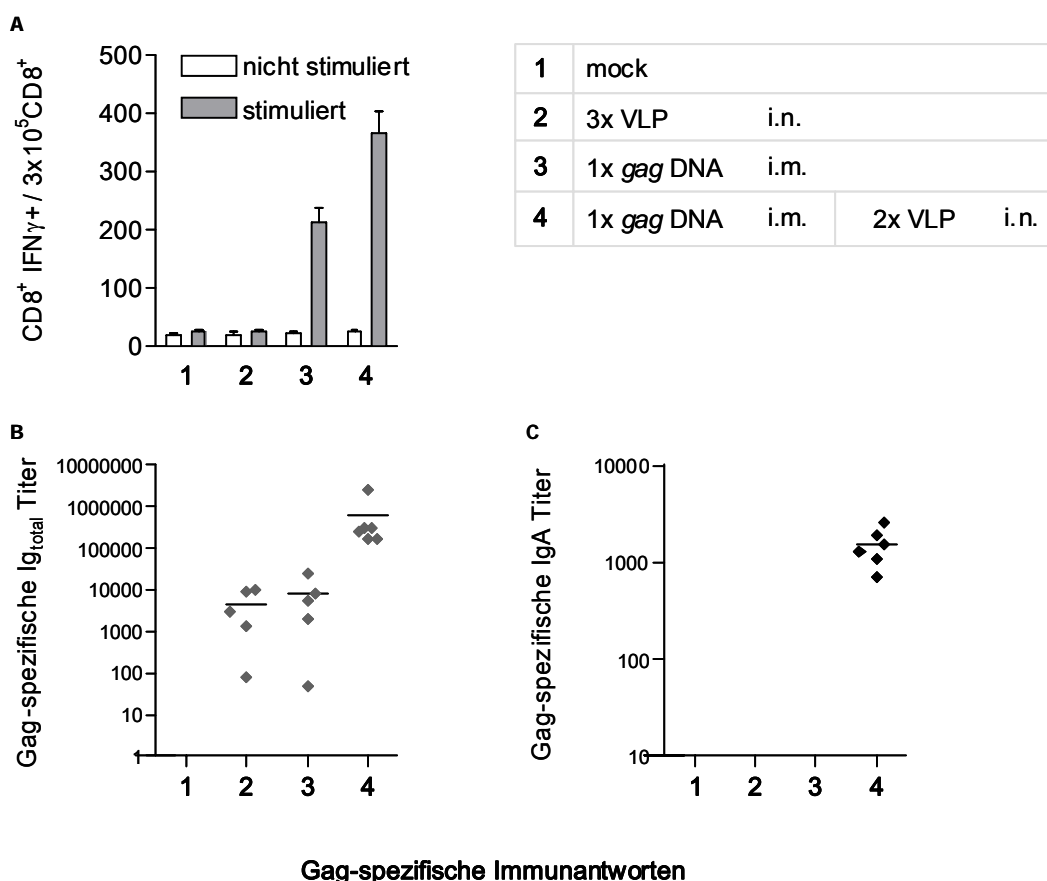
Bezeichnung	Bezugsquelle	Sequenz
MPER Peptid	Pepscan, Lelystad, NE	EKNEQELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK
A9I Peptid	Biosyntan, Berlin	AMQMLKETI

Tab. E-2: Übersicht der verwendeten Peptide

## E.4 Ergänzende Abbildungen



**Abb. E-1: Analyse der Bindung des CTB-spezifischen Antikörpers C 3062 an verschiedene CTB-Varianten mittels ELISA.** CTB<sub>GST</sub> bzw. MNCTB<sub>GST</sub> wurden in *E. coli* Origami 2(DE3) produziert, mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt und im ELISA analysiert. Dabei wurden Platten mit einem GST-spezifischen Antikörper beschichtet, die Detektion erfolgte mit dem CTB-spezifischen Antikörper C 3062. Als Negativkontrolle diente ebenfalls über Affinitätschromatographie gereinigtes GST. Gezeigt ist der Mittelwert von drei Experimenten mit Standardabweichung.



**Abb. E-2: Induktion einer Gag-spezifischen mukosalen Immunantwort durch Kombination einer intramuskulären gag DNA Prime Immunisierung mit intranasalen VLP Booster Immunisierungen.** 6 Tiere pro Gruppe wurden wie angegeben entweder dreimal i.n. mit je 30 µg VLPs oder einmal i.m. mit 60 µg DNA und zweimal i.n. mit je 30 µg VLPs immunisiert. Nicht immunisierte (mock) sowie einmal i.m. mit 60 µg gag DNA immunisierte Mäuse (Gruppe 3) dienen als Kontrolle. (A)  $2 \cdot 10^7$  Splenozyten wurden für 6 h mit einem Gag-spezifischen A9I Peptid (stimuliert) oder ohne Peptid (nicht stimuliert) behandelt. Im Anschluss wurde die Anzahl CD8<sup>+</sup>/IFNγ<sup>+</sup> Zellen pro 30.000 CD8<sup>+</sup> Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. (B, C) Zur Ermittlung der humoralen (Ig<sub>total</sub>) bzw. mukosalen (IgA) Immunantworten wurden Seren (B) bzw. BALs (C) der immunisierten Mäuse im ELISA mittels Endpunktverdünnung untersucht. Dargestellt sind die Gag-spezifischen Antikörpertiter der Einzelmäuse (♦) und der jeweilige Mittelwert der Gruppe (Linie).

## E.5 Literaturverzeichnis

1. **Abrahams, M. R., J. A. Anderson, E. E. Giorgi, C. Seoighe, K. Mlisana, L. H. Ping, G. S. Athreya, F. K. Treurnicht, B. F. Keele, N. Wood, J. F. Salazar-Gonzalez, T. Bhattacharya, H. Chu, I. Hoffman, S. Galvin, C. Mapanje, P. Kazembe, R. Thebus, S. Fiscus, W. Hide, M. S. Cohen, S. A. Karim, B. F. Haynes, G. M. Shaw, B. H. Hahn, B. T. Korber, R. Swanstrom, and C. Williamson.** 2009. Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J. Virol.* **83**:3556-3567.
2. **Alam, S. M., M. McAdams, D. Boren, M. Rak, R. M. Scearce, F. Gao, Z. T. Camacho, D. Gewirth, G. Kelsoe, P. Chen, and B. F. Haynes.** 2007. The role of antibody polyspecificity and lipid reactivity in binding of broadly neutralizing anti-HIV-1 envelope human monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 to glycoprotein 41 membrane proximal envelope epitopes. *J. Immunol.* **178**:4424-4435.
3. **Alam, S. M., M. Morelli, S. M. Dennison, H. X. Liao, R. Zhang, S. M. Xia, S. Rits-Volloch, L. Sun, S. C. Harrison, B. F. Haynes, and B. Chen.** 2009. Role of HIV membrane in neutralization by two broadly neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:20234-20239.
4. **Alimonti, J. B., J. Kimani, L. Matu, C. Wachih, R. Kaul, F. A. Plummer, and K. R. Fowke.** 2006. Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol. Cell Biol.* **84**:482-485.
5. **Alkhatib, G. and E. A. Berger.** 2007. HIV coreceptors: from discovery and designation to new paradigms and promise. *Eur. J. Med. Res.* **12**:375-384.
6. **Astronomo, R. D., H. K. Lee, C. N. Scanlan, R. Pantophlet, C. Y. Huang, I. A. Wilson, O. Blixt, R. A. Dwek, C. H. Wong, and D. R. Burton.** 2008. A glycoconjugate antigen based on the recognition motif of a broadly neutralizing human immunodeficiency virus antibody, 2G12, is immunogenic but elicits antibodies unable to bind to the self glycans of gp120. *J. Virol.* **82**:6359-6368.
7. **Azizi, A., H. Ghunaim, F. Diaz-Mitoma, and J. Mestecky.** 2010. Mucosal HIV vaccines: a holy grail or a dud? *Vaccine* **28**:4015-4026.
8. **Baba, T. W., V. Liska, R. Hofmann-Lehmann, J. Vlasak, W. Xu, S. Ayehunie, L. A. Cavacini, M. R. Posner, H. Katinger, G. Stiegler, B. J. Bernacky, T. A. Rizvi, R. Schmidt, L. R. Hill, M. E. Keeling, Y. Lu, J. E. Wright, T. C. Chou, and R. M. Ruprecht.** 2000. Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nat. Med.* **6**:200-206.
9. **Backström, M., J. Holmgren, F. Schodel, and M. Lebens.** 1995. Characterization of an internal permissive site in the cholera toxin B-subunit and insertion of epitopes from human immunodeficiency virus-1, hepatitis B virus and enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Gene* **165**:163-171.
10. **Backström, M., M. Lebens, F. Schodel, and J. Holmgren.** 1994. Insertion of a HIV-1-neutralizing epitope in a surface-exposed internal region of the cholera toxin B-subunit. *Gene* **149**:211-217.
11. **Barnett, S. W., I. K. Srivastava, E. Kan, F. Zhou, A. Goodsell, A. D. Cristillo, M. G. Ferrai, D. E. Weiss, N. L. Letvin, D. Montefiori, R. Pal, and M. Vajdy.** 2008. Protection of macaques against vaginal SHIV challenge by systemic or mucosal and systemic vaccinations with HIV-envelope. *AIDS* **22**:339-348.
12. **Barouch, D. H., J. Kunstman, M. J. Kuroda, J. E. Schmitz, S. Santra, F. W. Peyerl, G. R. Krivulka, K. Beaudry, M. A. Lifton, D. A. Gorgone, D. C. Montefiori, M. G. Lewis, S. M. Wolinsky, and N. L. Letvin.** 2002. Eventual AIDS vaccine failure in a rhesus monkey by viral escape from cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **415**:335-339.
13. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
14. **Bayer, M. E., B. S. Blumberg, and B. Werner.** 1968. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature* **218**:1057-1059.
15. **Beddows, S., N. Schulke, M. Kirschner, K. Barnes, M. Franti, E. Michael, T. Ketas, R. W. Sanders, P. J. Maddon, W. C. Olson, and J. P. Moore.** 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.
16. **Bellier, B., C. Dalba, B. Clerc, D. Desjardins, R. Drury, F. L. Cosset, M. Collins, and D. Klatzmann.** 2006. DNA vaccines encoding retrovirus-based virus-like particles induce efficient immune responses without adjuvant. *Vaccine* **24**:2643-2655.
17. **Benen, T. D.** 2011. Novel HIV-1 gp41 immunogens and display systems for their affinity maturation. Dissertation.
18. **Bergquist, C., E. L. Johansson, T. Lagergard, J. Holmgren, and A. Rudin.** 1997. Intranasal vaccination of humans with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina. *Infect. Immun.* **65**:2676-2684.
19. **Binley, J. M., E. A. Lybarger, E. T. Crooks, M. S. Seaman, E. Gray, K. L. Davis, J. M. Decker,**

- D. Wycuff, L. Harris, N. Hawkins, B. Wood, C. Nathe, D. Richman, G. D. Tomaras, F. Bibollet-Ruche, J. E. Robinson, L. Morris, G. M. Shaw, D. C. Montefiori, and J. R. Mascola.** 2008. Profiling the specificity of neutralizing antibodies in a large panel of plasmas from patients chronically infected with human immunodeficiency virus type 1 subtypes B and C. *J. Virol.* **82**:11651-11668.
20. **Binley, J. M., T. Wrin, B. Korber, M. B. Zwick, M. Wang, C. Chappey, G. Stiegler, R. Kunert, S. Zolla-Pazner, H. Katinger, C. J. Petropoulos, and D. R. Burton.** 2004. Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J. Virol.* **78**:13232-13252.
21. **Birnboim, H. C. and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
22. **Blumberg, B. S., I. Millman, and W. T. London.** 1985. Ted Slavin's blood and the development of HBV vaccine. *N. Engl. J. Med.* **312**:189.
23. **Boberg, A., S. Gaunitz, A. Brave, B. Wahren, and N. Carlin.** 2008. Enhancement of epitope-specific cellular immune responses by immunization with HIV-1 peptides genetically conjugated to the B-subunit of recombinant cholera toxin. *Vaccine* **26**:5079-5082.
24. **Bogers, W. M., D. Davis, I. Baak, E. Kan, S. Hofman, Y. Sun, D. Mortier, Y. Lian, H. Oostermeijer, Z. Fagrouch, R. Dubbes, M. M. van der, P. Mooij, G. Koopman, E. Verschoor, J. P. Langedijk, J. Zhao, E. Brocca-Cofano, M. Robert-Guroff, I. Srivastava, S. Barnett, and J. L. Heeney.** 2008. Systemic neutralizing antibodies induced by long interval mucosally primed systemically boosted immunization correlate with protection from mucosal SHIV challenge. *Virology* **382**:217-225.
25. **Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Pfeffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. H. Hahn, M. B. Oldstone, and G. M. Shaw.** 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**:205-211.
26. **Boutwell, C. L., M. M. Rolland, J. T. Herbeck, J. I. Mullins, and T. M. Allen.** 2010. Viral evolution and escape during acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **202 Suppl 2**:S309-S314.
27. **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.
28. **Bredl, S.** 2005. Mitogene Eigenschaften von HIV-1 Pr55gag virusähnlichen Partikeln zur Stimulation des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Diplomarbeit.
29. **Briggs, J. A., M. N. Simon, I. Gross, H. G. Krausslich, S. D. Fuller, V. M. Vogt, and M. C. Johnson.** 2004. The stoichiometry of Gag protein in HIV-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:672-675.
30. **Brito, L. A. and M. Singh.** 2011. Acceptable levels of endotoxin in vaccine formulations during preclinical research. *J. Pharm. Sci.* **100**:34-37.
31. **Broliden, K., J. Hinkula, C. Devito, P. Kiama, J. Kimani, D. Trabattoni, J. J. Bwayo, M. Clerici, F. Plummer, and R. Kaul.** 2001. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol. Lett.* **79**:29-36.
32. **Buchacher, A., R. Predl, K. Strutzenberger, W. Steinfellner, A. Trkola, M. Purtscher, G. Gruber, C. Tauer, F. Steindl, A. Jungbauer, and .** 1994. Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; electrofusion and Epstein-Barr virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:359-369.
33. **Buonaguro, L., M. L. Visciano, M. L. Tornesello, M. Tagliamonte, B. Biryahwaho, and F. M. Buonaguro.** 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.
34. **Burton, D. R., R. C. Desrosiers, R. W. Doms, W. C. Koff, P. D. Kwong, J. P. Moore, G. J. Nabel, J. Sodroski, I. A. Wilson, and R. T. Wyatt.** 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat. Immunol.* **5**:233-236.
35. **Burton, D. R., J. Pyati, R. Koduri, S. J. Sharp, G. B. Thornton, P. W. Parren, L. S. Sawyer, R. M. Hendry, N. Dunlop, P. L. Nara, and .** 1994. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science* **266**:1024-1027.
36. **Burton, D. R. and R. A. Weiss.** 2010. AIDS/HIV. A boost for HIV vaccine design. *Science* **329**:770-773.
37. **Caivano, A., N. A. Doria-Rose, B. Buelow, R. Sartorius, M. Trovato, L. D'Apice, G. J. Domingo, W. F. Sutton, N. L. Haigwood, and P. De Berardinis.** 2010. HIV-1 Gag p17 presented as virus-like particles on the E2 scaffold from *Geobacillus stearothermophilus* induces sustained humoral and cellular immune responses in the absence of IFN $\gamma$  production by CD4 $^{+}$  T cells. *Virology* **407**:296-305.
38. **Calarese, D. A., C. N. Scanlan, M. B. Zwick, S. Deechongkit, Y. Mimura, R. Kunert, P. Zhu, M. R. Wormald, R. L. Stanfield, K. H. Roux, J. W. Kelly, P. M. Rudd, R. A. Dwek, H. Katinger, D. R. Burton, and I. A. Wilson.** 2003. Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science* **300**:2065-2071.
39. **Cardoso, R. M., M. B. Zwick, R. L. Stanfield, R. Kunert, J. M. Binley, H. Katinger, D. R.**

- Burton, and I. A. Wilson.** 2005. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity*. **22**:163-173.
40. **Carter, C. A. and L. S. Ehrlich.** 2008. Cell biology of HIV-1 infection of macrophages. *Annu. Rev. Microbiol.* **62**:425-443.
41. **Coeffier, E., J. M. Clement, V. Cussac, N. Khodaei-Boorane, M. Jehanno, M. Rojas, A. Dridi, M. Latour, R. El Habib, F. Barre-Sinoussi, M. Hofnung, and C. Leclerc.** 2000. Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19**:684-693.
42. **Coffin, J., A. Haase, J. A. Levy, L. Montagnier, S. Oroszlan, N. Teich, H. Temin, K. Toyoshima, H. Varmus, P. Vogt, and .** 1986. What to call the AIDS virus? *Nature* **321**:10.
43. **Correia, B. E., Y. E. Ban, D. J. Friend, K. Ellingson, H. Xu, E. Boni, T. Bradley-Hewitt, J. F. Bruhn-Johannsen, L. Stamatos, R. K. Strong, and W. R. Schief.** 2011. Computational protein design using flexible backbone remodeling and resurfacing: case studies in structure-based antigen design. *J. Mol. Biol.* **405**:284-297.
44. **Corti, D., J. P. Langedijk, A. Hinz, M. S. Seaman, F. Vanzetta, B. M. Fernandez-Rodriguez, C. Silacci, D. Pinna, D. Jarrossay, S. Balla-Jhagjhoorsingh, B. Willems, M. J. Zekveld, H. Dreja, E. O'Sullivan, C. Pade, C. Orkin, S. A. Jeffs, D. C. Montefiori, D. Davis, W. Weissenhorn, A. McKnight, J. L. Heeney, F. Sallusto, Q. J. Sattentau, R. A. Weiss, and A. Lanzavecchia.** 2010. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS. One.* **5**:e8805.
45. **Dalglish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
46. **de Jong, M. A. and T. B. Geijtenbeek.** 2009. Human immunodeficiency virus-1 acquisition in genital mucosa: Langerhans cells as key-players. *J. Intern. Med.* **265**:18-28.
47. **de Rosny, E., R. Vassell, P. T. Wingfield, C. T. Wild, and C. D. Weiss.** 2001. Peptides corresponding to the heptad repeat motifs in the transmembrane protein (gp41) of human immunodeficiency virus type 1 elicit antibodies to receptor-activated conformations of the envelope glycoprotein. *J. Virol.* **75**:8859-8863.
48. **Del Real, G., S. Jimenez-Baranda, R. A. Lacalle, E. Mira, P. Lucas, C. Gomez-Mouton, A. C. Carrera, A. Martinez, and S. Manes.** 2002. Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J. Exp. Med.* **196**:293-301.
49. **Deml, L., A. Bojak, S. Steck, M. Graf, J. Wild, R. Schirmbeck, H. Wolf, and R. Wagner.** 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.
50. **Deml, L., G. Kratochwil, N. Osterrieder, R. Knuchel, H. Wolf, and R. Wagner.** 1997. 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.
51. **Deml, L., R. Schirmbeck, J. Reimann, H. Wolf, and R. Wagner.** 1997. Recombinant human immunodeficiency Pr55gag virus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic T-cells and neutralizing antibodies. *Virology* **235**:26-39.
52. **Deml, L., C. Speth, M. P. Dierich, H. Wolf, and R. Wagner.** 2005. Recombinant HIV-1 Pr55gag virus-like particles: potent stimulators of innate and acquired immune responses. *Mol. Immunol.* **42**:259-277.
53. **Dertzbaugh, M. T. and C. O. Elson.** 1993. Comparative effectiveness of the cholera toxin B subunit and alkaline phosphatase as carriers for oral vaccines. *Infect. Immun.* **61**:48-55.
54. **Dertzbaugh, M. T. and C. O. Elson.** 1993. Reduction in oral immunogenicity of cholera toxin B subunit by N-terminal peptide addition. *Infect. Immun.* **61**:384-390.
55. **Domingo, G. J., A. Caivano, R. Sartorius, P. Barba, M. Backstrom, D. Piatier-Tonneau, J. Guardiola, P. De Berardinis, and R. N. Perham.** 2003. Induction of specific T-helper and cytolytic responses to epitopes displayed on a virus-like protein scaffold derived from the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Vaccine* **21**:1502-1509.
56. **Dudenredaktion.** 2009. Duden 01. Die deutsche Rechtschreibung: Das umfassende Standardwerk auf der Grundlage der neuen amtlichen Regeln: Band 1. 25. Aufl. Bibliographisches Institut & F. A. Brockhaus.
57. **Egelhofer, M., G. Brandenburg, H. Martinus, P. Schult-Dietrich, G. Melikyan, R. Kunert, C. Baum, I. Choi, A. Alexandrov, and D. von Laer.** 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* **78**:568-575.
58. **Eriksson, K., M. Fredriksson, I. Nordstrom, and J. Holmgren.** 2003. Cholera toxin and its B subunit promote dendritic cell vaccination with different influences on Th1 and Th2 development. *Infect. Immun.* **71**:1740-1747.
59. **Eriksson, K. and J. Holmgren.** 2002. Recent advances in mucosal vaccines and adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* **14**:666-672.
60. **Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger.** 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**:872-877.

61. **Ferrantelli, F. and R. M. Ruprecht.** 2002. Neutralizing antibodies against HIV -- back in the major leagues? *Curr. Opin. Immunol.* **14**:495-502.
62. **Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano.** 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* **5**:512-517.
63. **Flynn, N. M., D. N. Forthal, C. D. Harro, F. N. Judson, K. H. Mayer, and M. F. Para.** 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**:654-665.
64. **Franquelim, H. G., S. Chiantia, A. S. Veiga, N. C. Santos, P. Schwille, and M. A. Castanho.** 2011. Anti-HIV-1 antibodies 2F5 and 4E10 interact differently with lipids to bind their epitopes. *AIDS.*
65. **Frey, G., J. Chen, S. Rits-Volloch, M. M. Freeman, S. Zolla-Pazner, and B. Chen.** 2010. Distinct conformational states of HIV-1 gp41 are recognized by neutralizing and non-neutralizing antibodies. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
66. **Gai, W., W. Zou, L. Lei, J. Luo, H. Tu, Y. Zhang, K. Wang, P. Tien, and H. Yan.** 2008. Effects of different immunization protocols and adjuvant on antibody responses to inactivated SARS-CoV vaccine. *Viral Immunol.* **21**:27-37.
67. **Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic.** 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:865-867.
68. **Garland, S. M., M. Hernandez-Avila, C. M. Wheeler, G. Perez, D. M. Harper, S. Leodolter, G. W. Tang, D. G. Ferris, M. Steben, J. Bryan, F. J. Taddeo, R. Railkar, M. T. Esser, H. L. Sings, M. Nelson, J. Boslego, C. Sattler, E. Barr, and L. A. Koutsky.** 2007. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N. Engl. J. Med.* **356**:1928-1943.
69. **Gelderblom, H. R., M. Ozel, and G. Pauli.** 1989. Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations. *Arch. Virol.* **106**:1-13.
70. **George-Chandy, A., K. Eriksson, M. Lebens, I. Nordstrom, E. Schon, and J. Holmgren.** 2001. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* **69**:5716-5725.
71. **Gheysen, D., E. Jacobs, F. de Foresta, C. Thiriart, M. Francotte, D. Thines, and M. De Wilde.** 1989. Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**:103-112.
72. **Gilbert, P. B., M. L. Peterson, D. Follmann, M. G. Hudgens, D. P. Francis, M. Gurwith, W. L. Heyward, D. V. Jobes, V. Popovic, S. G. Self, F. Sinangil, D. Burke, and P. W. Berman.** 2005. Correlation between immunologic responses to a recombinant glycoprotein 120 vaccine and incidence of HIV-1 infection in a phase 3 HIV-1 preventive vaccine trial. *J. Infect. Dis.* **191**:666-677.
73. **Gockel, C. M. and M. W. Russell.** 2005. Induction and recall of immune memory by mucosal immunization with a non-toxic recombinant enterotoxin-based chimeric protein. *Immunology* **116**:477-486.
74. **Gomez, C. E., J. L. Najera, V. Jimenez, K. Bieler, J. Wild, L. Kostic, S. Heidari, M. Chen, M. J. Frachette, G. Pantaleo, H. Wolf, P. Liljestrom, R. Wagner, and M. Esteban.** 2007. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine* **25**:1969-1992.
75. **Goonetilleke, N., M. K. Liu, J. F. Salazar-Gonzalez, G. Ferrari, E. Giorgi, V. V. Ganusov, B. F. Keele, G. H. Learn, E. L. Turnbull, M. G. Salazar, K. J. Weinhold, S. Moore, N. Letvin, B. F. Haynes, M. S. Cohen, P. Hraber, T. Bhattacharya, P. Borrow, A. S. Perelson, B. H. Hahn, G. M. Shaw, B. T. Korber, and A. J. McMichael.** 2009. The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**:1253-1272.
76. **Grgacic, E. V. and D. A. Anderson.** 2006. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* **40**:60-65.
77. **Grundner, C., Y. Li, M. Louder, J. Mascola, X. Yang, J. Sodroski, and R. Wyatt.** 2005. Analysis of the neutralizing antibody response elicited in rabbits by repeated inoculation with trimeric HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology* **331**:33-46.
78. **Grundner, C., T. Mirzabekov, J. Sodroski, and R. Wyatt.** 2002. Solid-phase proteoliposomes containing human immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *J. Virol.* **76**:3511-3521.
79. **Guo, L., X. Lu, S. M. Kang, C. Chen, R. W. Compans, and Q. Yao.** 2003. Enhancement of mucosal immune responses by chimeric influenza HA/SHIV virus-like particles. *Virology* **313**:502-513.
80. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
81. **Harrer, T., E. Harrer, S. A. Kalams, T. Elbeik, S. I. Staprans, M. B. Feinberg, Y. Cao, D. D. Ho, T. Yilma, A. M. Caliendo, R. P. Johnson, S. P. Buchbinder, and B. D. Walker.** 1996. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**:585-592.

82. **Haynes, B. F., J. Fleming, E. W. St Clair, H. Katinger, G. Stiegler, R. Kunert, J. Robinson, R. M. Scearce, K. Plonk, H. F. Staats, T. L. Ortel, H. X. Liao, and S. M. Alam.** 2005. Cardioliipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**:1906-1908.
83. **Haynes, B. F., M. A. Moody, L. Verkoczy, G. Kelsoe, and S. M. Alam.** 2005. Antibody polyspecificity and neutralization of HIV-1: a hypothesis. *Hum. Antibodies* **14**:59-67.
84. **Herr, W., U. Protzer, A. W. Lohse, G. Gerken, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and T. Wolfel.** 1998. Quantification of CD8+ T lymphocytes responsive to human immunodeficiency virus (HIV) peptide antigens in HIV-infected patients and seronegative persons at high risk for recent HIV exposure. *J. Infect. Dis.* **178**:260-265.
85. **Hervas-Stubbs, S., P. Rueda, L. Lopez, and C. Leclerc.** 2007. Insect baculoviruses strongly potentiate adaptive immune responses by inducing type I IFN. *J. Immunol.* **178**:2361-2369.
86. **Hervouet, C., C. Luci, N. Cuburu, M. Cremel, S. Bekri, L. Vimeux, C. Maranon, C. Czerkinsky, A. Hosmalin, and F. Anjuere.** 2010. Sublingual immunization with an HIV subunit vaccine induces antibodies and cytotoxic T cells in the mouse female genital tract. *Vaccine* **28**:5582-5590.
87. **Hessell, A. J., P. Poignard, M. Hunter, L. Hangartner, D. M. Tehrani, W. K. Bleeker, P. W. Parren, P. A. Marx, and D. R. Burton.** 2009. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. Med.* **15**:951-954.
88. **Hessell, A. J., E. G. Rakasz, P. Poignard, L. Hangartner, G. Landucci, D. N. Forthal, W. C. Koff, D. I. Watkins, and D. R. Burton.** 2009. Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS. Pathog.* **5**:e1000433.
89. **Hessell, A. J., E. G. Rakasz, D. M. Tehrani, M. Huber, K. L. Weisgrau, G. Landucci, D. N. Forthal, W. C. Koff, P. Poignard, D. I. Watkins, and D. R. Burton.** 2010. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J. Virol.* **84**:1302-1313.
90. **Hinz, A., G. Schoehn, H. Quendler, D. L. Hulsik, G. Stiegler, H. Katinger, M. S. Seaman, D. Montefiori, and W. Weissenhorn.** 2009. Characterization of a trimeric MPER containing HIV-1 gp41 antigen. *Virology* **390**:221-227.
91. **Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz.** 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**:123-126.
92. **Hofmann-Lehmann, R., J. Vlasak, R. A. Rasmussen, B. A. Smith, T. W. Baba, V. Liska, F. Ferrantelli, D. C. Montefiori, H. M. McClure, D. C. Anderson, B. J. Bernacky, T. A. Rizvi, R. Schmidt, L. R. Hill, M. E. Keeling, H. Katinger, G. Stiegler, L. A. Cavacini, M. R. Posner, T. C. Chou, J. Andersen, and R. M. Ruprecht.** 2001. Postnatal passive immunization of neonatal macaques with a triple combination of human monoclonal antibodies against oral simian-human immunodeficiency virus challenge. *J. Virol.* **75**:7470-7480.
93. **Hofmann-Sieber, H., J. Wild, N. Fiedler, K. Tischer, J. von Einem, N. Osterrieder, H. Hofmann, J. Kostler, and R. Wagner.** 2010. Impact of ETIF deletion on safety and immunogenicity of equine herpesvirus type 1-vectored vaccines. *J. Virol.* **84**:11602-11613.
94. **Holmgren, J., J. Adamsson, F. Anjuere, J. Clemens, C. Czerkinsky, K. Eriksson, C. F. Flach, A. George-Chandy, A. M. Harandi, M. Lebens, T. Lehner, M. Lindblad, E. Nygren, S. Raghavan, J. Sanchez, M. Stanford, J. B. Sun, A. M. Svennerholm, and S. Tengvall.** 2005. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunol. Lett.* **97**:181-188.
95. **Holmgren, J., N. Lycke, and C. Czerkinsky.** 1993. Cholera toxin and cholera B subunit as oral-mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine* **11**:1179-1184.
96. **Hu, S. L., K. Abrams, G. N. Barber, P. Moran, J. M. Zaring, A. J. Langlois, L. Kuller, W. R. Morton, and R. E. Benveniste.** 1992. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science* **255**:456-459.
97. **Humbert, M. and U. Dietrich.** 2006. The role of neutralizing antibodies in HIV infection. *AIDS Rev.* **8**:51-59.
98. **Ingallinella, P., E. Bianchi, N. A. Ladwa, Y. J. Wang, R. Hrin, M. Veneziano, F. Bonelli, T. J. Ketas, J. P. Moore, M. D. Miller, and A. Pessi.** 2009. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**:5801-5806.
99. **Jobling, M. G. and R. K. Holmes.** 2002. Mutational analysis of ganglioside GM(1)-binding ability, pentamer formation, and epitopes of cholera toxin B (CTB) subunits and CTB/heat-labile enterotoxin B subunit chimeras. *Infect. Immun.* **70**:1260-1271.
100. **Johansson, E. L., L. Wassen, J. Holmgren, M. Jertborn, and A. Rudin.** 2001. Nasal and vaginal vaccinations have differential effects on antibody responses in vaginal and cervical secretions in humans. *Infect. Immun.* **69**:7481-7486.
101. **Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS).** 2010. REPORT ON THE GLOBAL AIDS EPIDEMIC | 2010. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

102. **Joyce, J. G., I. J. Krauss, H. C. Song, D. W. Opalka, K. M. Grimm, D. D. Nahas, M. T. Esser, R. Hrin, M. Feng, V. Y. Dudkin, M. Chastain, J. W. Shiver, and S. J. Danishefsky.** 2008. An oligosaccharide-based HIV-1 2G12 mimotope vaccine induces carbohydrate-specific antibodies that fail to neutralize HIV-1 virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:15684-15689.
103. **Kang, S. M., Q. Yao, L. Guo, and R. W. Compans.** 2003. Mucosal immunization with virus-like particles of simian immunodeficiency virus conjugated with cholera toxin subunit B. *J. Virol.* **77**:9823-9830.
104. **Kang, Y. K., S. Andjelic, J. M. Binley, E. T. Crooks, M. Franti, S. P. Iyer, G. P. Donovan, A. K. Dey, P. Zhu, K. H. Roux, R. J. Durso, T. F. Parsons, P. J. Maddon, J. P. Moore, and W. C. Olson.** 2009. Structural and immunogenicity studies of a cleaved, stabilized envelope trimer derived from subtype A HIV-1. *Vaccine* **27**:5120-5132.
105. **Kaul, R., D. Trabattoni, J. J. Bwayo, D. Arienti, A. Zagliani, F. M. Mwangi, C. Kariuki, E. N. Ngugi, K. S. MacDonald, T. B. Ball, M. Clerici, and F. A. Plummer.** 1999. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS* **13**:23-29.
106. **Keele, B. F., E. E. Giorgi, J. F. Salazar-Gonzalez, J. M. Decker, K. T. Pham, M. G. Salazar, C. Sun, T. Grayson, S. Wang, H. Li, X. Wei, C. Jiang, J. L. Kirchherr, F. Gao, J. A. Anderson, L. H. Ping, R. Swanstrom, G. D. Tomaras, W. A. Blattner, P. A. Goepfert, J. M. Kilby, M. S. Saag, E. L. Delwart, M. P. Busch, M. S. Cohen, D. C. Montefiori, B. F. Haynes, B. Gaschen, G. S. Athreya, H. Y. Lee, N. Wood, C. Seoighe, A. S. Perelson, T. Bhattacharya, B. T. Korber, B. H. Hahn, and G. M. Shaw.** 2008. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:7552-7557.
107. **Kiepiela, P., K. Ngumbela, C. Thobakgale, D. Ramduth, I. Honeyborne, E. Moodley, S. Reddy, C. de Pierres, Z. Mncube, N. Mkhwanazi, K. Bishop, S. M. van der, K. Nair, N. Khan, H. Crawford, R. Payne, A. Leslie, J. Prado, A. Prendergast, J. Frater, N. McCarthy, C. Brander, G. H. Learn, D. Nickle, C. Rousseau, H. Coovadia, J. I. Mullins, D. Heckerman, B. D. Walker, and P. Goulder.** 2007. CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load. *Nat. Med.* **13**:46-53.
108. **Kim, M., Z. Qiao, J. Yu, D. Montefiori, and E. L. Reinherz.** 2007. Immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus type 1-like particles expressing gp41 derivatives in a pre-fusion state. *Vaccine* **25**:5102-5114.
109. **Kofman, A., M. Graf, A. Bojak, L. Deml, K. Bieler, A. Kharazova, H. Wolf, and R. Wagner.** 2003. HIV-1 gag expression is quantitatively dependent on the ratio of native and optimized codons. *Tsitologiya* **45**:86-93.
110. **Kothe, D. L., J. M. Decker, Y. Li, Z. Weng, F. Bibollet-Ruche, K. P. Zammit, M. G. Salazar, Y. Chen, J. F. Salazar-Gonzalez, Z. Moldoveanu, J. Mestecky, F. Gao, B. F. Haynes, G. M. Shaw, M. Muldoon, B. T. Korber, and B. H. Hahn.** 2007. Antigenicity and immunogenicity of HIV-1 consensus subtype B envelope glycoproteins. *Virology* **360**:218-234.
111. **Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho.** 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**:4650-4655.
112. **Kozlowski, P. A., S. Cu-Uvin, M. R. Neutra, and T. P. Flanigan.** 1997. Comparison of the oral, rectal, and vaginal immunization routes for induction of antibodies in rectal and genital tract secretions of women. *Infect. Immun.* **65**:1387-1394.
113. **Kuroda, M. J., J. E. Schmitz, W. A. Charini, C. E. Nickerson, M. A. Lifton, C. I. Lord, M. A. Forman, and N. L. Letvin.** 1999. Emergence of CTL coincides with clearance of virus during primary simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *J. Immunol.* **162**:5127-5133.
114. **Kwong, P. D., M. L. Doyle, D. J. Casper, C. Cicala, S. A. Leavitt, S. Majeed, T. D. Steenbeke, M. Venturi, I. Chaikin, M. Fung, H. Katinger, P. W. Parren, J. Robinson, D. Van Ryk, L. Wang, D. R. Burton, E. Freire, R. Wyatt, J. Sodroski, W. A. Hendrickson, and J. Arthos.** 2002. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature* **420**:678-682.
115. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
116. **Lambert, P. H., M. Liu, and C. A. Siegrist.** 2005. Can successful vaccines teach us how to induce efficient protective immune responses? *Nat. Med.* **11**:S54-S62.
117. **Learmont, J. C., A. F. Geczy, J. Mills, L. J. Ashton, C. H. Raynes-Greenow, R. J. Garsia, W. B. Dyer, L. McIntyre, R. B. Oelrichs, D. I. Rhodes, N. J. Deacon, and J. S. Sullivan.** 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N. Engl. J. Med.* **340**:1715-1722.
118. **Lencer, W. I., T. R. Hirst, and R. K. Holmes.** 1999. Membrane traffic and the cellular uptake of cholera toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1450**:177-190.
119. **Li, M., F. Gao, J. R. Mascola, L. Stamatatos, V. R. Polonis, M. Koutsoukos, G. Voss, P. Goepfert, P. Gilbert, K. M. Greene, M. Bilska, D. L. Kothe, J. F. Salazar-Gonzalez, X. Wei, J. M. Decker, B. H. Hahn, and D. C. Montefiori.** 2005. Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J. Virol.* **79**:10108-10125.

120. **Liebecq, C.** 1992. *Biochemical Nomenclature: And Related Documents : A Compendium*. 2. Aufl. Portland Press.
121. **Liljeqvist, S., P. Samuelson, M. Hansson, T. N. Nguyen, H. Binz, and S. Stahl.** 1997. Surface display of the cholera toxin B subunit on *Staphylococcus xylosum* and *Staphylococcus carnosus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2481-2488.
122. **Liljeqvist, S., S. Stahl, C. Andreoni, H. Binz, M. Uhlen, and M. Murby.** 1997. Fusions to the cholera toxin B subunit: influence on pentamerization and GM1 binding. *J. Immunol. Methods* **210**:125-135.
123. **Liu, J., A. Bartesaghi, M. J. Borgia, G. Sapiro, and S. Subramaniam.** 2008. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* **455**:109-113.
124. **Louis, J. M., I. Nesheiwat, L. Chang, G. M. Clore, and C. A. Bewley.** 2003. Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion. *J. Biol. Chem.* **278**:20278-20285.
125. **Luallen, R. J., J. Lin, H. Fu, K. K. Cai, C. Agrawal, I. Mboudjeka, F. H. Lee, D. Montefiori, D. F. Smith, R. W. Doms, and Y. Geng.** 2008. An engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain binds the broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody 2G12 and elicits mannose-specific gp120-binding antibodies. *J. Virol.* **82**:6447-6457.
126. **Luci, C., C. Hervouet, D. Rousseau, J. Holmgren, C. Czerkinsky, and F. Anjuere.** 2006. Dendritic cell-mediated induction of mucosal cytotoxic responses following intravaginal immunization with the nontoxic B subunit of cholera toxin. *J. Immunol.* **176**:2749-2757.
127. **Ludwig, C., A. Leiberer, and R. Wagner.** 2008. Importance of protease cleavage sites within and flanking human immunodeficiency virus type 1 transframe protein p6\* for spatiotemporal regulation of protease activation. *J. Virol.* **82**:4573-4584.
128. **Ludwig, C. and R. Wagner.** 2007. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **18**:537-545.
129. **Martineau, P., J. G. Guillet, C. Leclerc, and M. Hofnung.** 1992. Expression of heterologous peptides at two permissive sites of the MalE protein: antigenicity and immunogenicity of foreign B-cell and T-cell epitopes. *Gene* **118**:151.
130. **Mascola, J. R., M. G. Lewis, G. Stiegler, D. Harris, T. C. VanCott, D. Hayes, M. K. Louder, C. R. Brown, C. V. Sapan, S. S. Frankel, Y. Lu, M. L. Robb, H. Katinger, and D. L. Birx.** 1999. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**:4009-4018.
131. **Mascola, J. R. and D. C. Montefiori.** 2010. The role of antibodies in HIV vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* **28**:413-444.
132. **Mascola, J. R., A. Sambor, K. Beaudry, S. Santra, B. Welcher, M. K. Louder, T. C. VanCott, Y. Huang, B. K. Chakrabarti, W. P. Kong, Z. Y. Yang, L. Xu, D. C. Montefiori, G. J. Nabel, and N. L. Letvin.** 2005. Neutralizing antibodies elicited by immunization of monkeys with DNA plasmids and recombinant adenoviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 proteins. *J. Virol.* **79**:771-779.
133. **Mascola, J. R., S. W. Snyder, O. S. Weislow, S. M. Belay, R. B. Belshe, D. H. Schwartz, M. L. Clements, R. Dolin, B. S. Graham, G. J. Gorse, M. C. Keefer, M. J. McElrath, M. C. Walker, K. F. Wagner, J. G. McNeil, F. E. McCutchan, and D. S. Burke.** 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.
134. **Mascola, J. R., G. Stiegler, T. C. VanCott, H. Katinger, C. B. Carpenter, C. E. Hanson, H. Beary, D. Hayes, S. S. Frankel, D. L. Birx, and M. G. Lewis.** 2000. Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **6**:207-210.
135. **Matano, T., R. Shibata, C. Siemon, M. Connors, H. C. Lane, and M. A. Martin.** 1998. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J. Virol.* **72**:164-169.
136. **Matoba, N., H. Kajiura, I. Cherni, J. D. Doran, M. Bomsel, K. Fujiyama, and T. S. Mor.** 2009. Biochemical and immunological characterization of the plant-derived candidate human immunodeficiency virus type 1 mucosal vaccine CTB-MPR. *Plant Biotechnol. J.* **7**:129-145.
137. **Matoba, N., A. Magerus, B. C. Geyer, Y. Zhang, M. Muralidharan, A. Alfson, C. J. Arntzen, M. Bomsel, and T. S. Mor.** 2004. A mucosally targeted subunit vaccine candidate eliciting HIV-1 transcytosis-blocking Abs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101**:13584-13589.
138. **Mattson, G., E. Conklin, S. Desai, G. Nielander, M. D. Savage, and S. Morgensen.** 1993. A practical approach to crosslinking. *Mol. Biol. Rep.* **17**:167-183.
139. **Mc Cann, C. M., R. J. Song, and R. M. Ruprecht.** 2005. Antibodies: can they protect against HIV infection? *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **5**:95-111.
140. **McBurney, S. P., K. R. Young, and T. M. Ross.** 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.

141. **McGaughey, G. B., M. Citron, R. C. Danzeisen, R. M. Freidinger, V. M. Garsky, W. M. Hurni, J. G. Joyce, X. Liang, M. Miller, J. Shiver, and M. J. Bogusky.** 2003. HIV-1 vaccine development: constrained peptide immunogens show improved binding to the anti-HIV-1 gp41 MAb. *Biochemistry* **42**:3214-3223.
142. **McNaught, A. and A. Wilkinson.** 1997. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
143. **Modrow, S., D. Falke, U. Truyen, and H. Schätzl.** 2010. *Molekulare Virologie, 3. Auflage.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
144. **Moore, J. P., Y. Cao, L. Qing, Q. J. Sattentau, J. Pyati, R. Koduri, J. Robinson, C. F. Barbas, III, D. R. Burton, and D. D. Ho.** 1995. Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J. Virol.* **69**:101-109.
145. **Muratori, C., R. Bona, and M. Federico.** 2010. Lentivirus-based virus-like particles as a new protein delivery tool. *Methods Mol. Biol.* **614**:111-124.
146. **Muster, T., F. Steindl, M. Purtscher, A. Trkola, A. Klima, G. Himmler, F. Ruker, and H. Katinger.** 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**:6642-6647.
147. **Myszka, D. G., R. W. Sweet, P. Hensley, M. Brigham-Burke, P. D. Kwong, W. A. Hendrickson, R. Wyatt, J. Sodroski, and M. L. Doyle.** 2000. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**:9026-9031.
148. **Nashar, T. O. and T. R. Hirst.** 1995. Immunoregulatory role of H-2 and intra-H-2 alleles on antibody responses to recombinant preparations of B-subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin (rEtxB) and cholera toxin (rCtXB). *Vaccine* **13**:803-810.
149. **Nashar, T. O., H. M. Webb, S. Eaglestone, N. A. Williams, and T. R. Hirst.** 1996. Potent immunogenicity of the B subunits of Escherichia coli heat-labile enterotoxin: receptor binding is essential and induces differential modulation of lymphocyte subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**:226-230.
150. **Ni, J., H. Song, Y. Wang, N. M. Stamatos, and L. X. Wang.** 2006. Toward a carbohydrate-based HIV-1 vaccine: synthesis and immunological studies of oligomannose-containing glycoconjugates. *Bioconjug. Chem.* **17**:493-500.
151. **Ofek, G., F. J. Guenaga, W. R. Schief, J. Skinner, D. Baker, R. Wyatt, and P. D. Kwong.** 2010. Elicitation of structure-specific antibodies by epitope scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**:17880-17887.
152. **Ofek, G., M. Tang, A. Sambor, H. Katinger, J. R. Mascola, R. Wyatt, and P. D. Kwong.** 2004. Structure and mechanistic analysis of the anti-human immunodeficiency virus type 1 antibody 2F5 in complex with its gp41 epitope. *J. Virol.* **78**:10724-10737.
153. **Oomens, A. G. and G. W. Wertz.** 2004. The baculovirus GP64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *J. Virol.* **78**:124-135.
154. **Osmanov, S., C. Pattou, N. Walker, B. Schwardlander, and J. Esparza.** 2002. Estimated global distribution and regional spread of HIV-1 genetic subtypes in the year 2000. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **29**:184-190.
155. **Pal, R., V. S. Kalyanaraman, B. C. Nair, S. Whitney, T. Keen, L. Hocker, L. Hudacik, N. Rose, I. Mboudjeka, S. Shen, T. H. Wu-Chou, D. Montefiori, J. Mascola, P. Markham, and S. Lu.** 2006. Immunization of rhesus macaques with a polyvalent DNA prime/protein boost human immunodeficiency virus type 1 vaccine elicits protective antibody response against simian human immunodeficiency virus of R5 phenotype. *Virology* **348**:341-353.
156. **Paliard, X., Y. Liu, R. Wagner, H. Wolf, J. Baenziger, and C. M. Walker.** 2000. Priming of strong, broad, and long-lived HIV type 1 p55gag-specific CD8+ cytotoxic T cells after administration of a virus-like particle vaccine in rhesus macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**:273-282.
157. **Pan, C., S. Liu, and S. Jiang.** 2010. HIV-1 gp41 fusion intermediate: a target for HIV therapeutics. *J. Formos. Med. Assoc.* **109**:94-105.
158. **Pantaleo, G. and R. A. Koup.** 2004. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* **10**:806-810.
159. **Pantophlet, R., S. E. Ollmann, P. Pognard, P. W. Parren, I. A. Wilson, and D. R. Burton.** 2003. Fine mapping of the interaction of neutralizing and nonneutralizing monoclonal antibodies with the CD4 binding site of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* **77**:642-658.
160. **Pantophlet, R., I. A. Wilson, and D. R. Burton.** 2003. Hyperglycosylated mutants of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 monomeric gp120 as novel antigens for HIV vaccine design. *J. Virol.* **77**:5889-5901.
161. **Pantophlet, R., I. A. Wilson, and D. R. Burton.** 2004. Improved design of an antigen with enhanced specificity for the broadly HIV-neutralizing antibody b12. *Protein Eng Des Sel* **17**:749-758.
162. **Parren, P. W., P. A. Marx, A. J. Hessel, A. Luckay, J. Harouse, C. Cheng-Mayer, J. P. Moore, and D. R. Burton.** 2001. Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving

- complete neutralization in vitro. *J. Virol.* **75**:8340-8347.
163. **Peyerl, F. W., D. H. Barouch, and N. L. Letvin.** 2004. Structural constraints on viral escape from HIV- and SIV-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Viral Immunol.* **17**:144-151.
  164. **Phogat, S., K. Svehla, M. Tang, A. Spadaccini, J. Muller, J. Mascola, I. Berkower, and R. Wyatt.** 2008. Analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane proximal external region arrayed on hepatitis B surface antigen particles. *Virology* **373**:72-84.
  165. **Phogat, S. and R. Wyatt.** 2007. Rational modifications of HIV-1 envelope glycoproteins for immunogen design. *Curr. Pharm. Des* **13**:213-227.
  166. **Pitisuttithum, P., P. Gilbert, M. Gurwith, W. Heyward, M. Martin, F. van Griensven, D. Hu, J. W. Tappero, and K. Choopanya.** 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.
  167. **Prabakaran, M., S. Velumani, F. He, A. K. Karuppannan, G. Y. Geng, L. K. Yin, and J. Kwang.** 2008. Protective immunity against influenza H5N1 virus challenge in mice by intranasal co-administration of baculovirus surface-displayed HA and recombinant CTB as an adjuvant. *Virology* **380**:412-420.
  168. **Price, G. A., M. W. Russell, and C. N. Cornelissen.** 2005. Intranasal administration of recombinant *Neisseria gonorrhoeae* transferrin binding proteins A and B conjugated to the cholera toxin B subunit induces systemic and vaginal antibodies in mice. *Infect. Immun.* **73**:3945-3953.
  169. **Purtscher, M., A. Trkola, G. Gruber, A. Buchacher, R. Predl, F. Steindl, C. Tauer, R. Berger, N. Barrett, and A. Jungbauer.** 1994. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**:1651-1658.
  170. **Rask, C., M. Fredriksson, M. Lindblad, C. Czerkinsky, and J. Holmgren.** 2000. Mucosal and systemic antibody responses after peroral or intranasal immunization: effects of conjugation to enterotoxin B subunits and/or of co-administration with free toxin as adjuvant. *APMIS* **108**:178-186.
  171. **Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler, and M. Friede.** 2009. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* **30**:23-32.
  172. **Rerks-Ngarm, S., P. Pitisuttithum, S. Nitayaphan, J. Kaewkungwal, J. Chiu, R. Paris, N. Prem Sri, C. Namwat, M. de Souza, E. Adams, M. Benenson, S. Gurunathan, J. Tartaglia, J. G. McNeil, D. P. Francis, D. Stablein, D. L. Birx, S. Chunsuttiwat, C. Khamboonruang, P. Thongcharoen, M. L. Robb, N. L. Michael, P. Kunasol, and J. H. Kim.** 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* **361**:2209-2220.
  173. **Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli.** 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* **2**:361-367.
  174. **Reynolds, M. R., A. M. Weiler, K. L. Weisgrau, S. M. Piaskowski, J. R. Furlott, J. T. Weinfurter, M. Kaizu, T. Soma, E. J. Leon, C. MacNair, D. P. Leaman, M. B. Zwick, E. Gostick, S. K. Musani, D. A. Price, T. C. Friedrich, E. G. Rakasz, N. A. Wilson, A. B. McDermott, R. Boyle, D. B. Allison, D. R. Burton, W. C. Koff, and D. I. Watkins.** 2008. Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *J. Exp. Med.* **205**:2537-2550.
  175. **Roquebert, B., F. Damond, F. Brun-Vezinet, and D. Descamps.** 2009. [HIV genetic diversity and its consequences]. *Pathol. Biol. (Paris)* **57**:142-148.
  176. **Rowland-Jones, S., T. Dong, P. Krausa, J. Sutton, H. Newell, K. Ariyoshi, F. Gotch, S. Sabally, T. Corrah, J. Kimani, K. MacDonald, F. Plummer, J. Ndinya-Achola, H. Whittle, and A. McMichael.** 1998. The role of cytotoxic T-cells in HIV infection. *Dev. Biol. Stand.* **92**:209-214.
  177. **Ruprecht, R. M., F. Ferrantelli, M. Kitabwalla, W. Xu, and H. M. McClure.** 2003. Antibody protection: passive immunization of neonates against oral AIDS virus challenge. *Vaccine* **21**:3370-3373.
  178. **Ryan, E. T., S. B. Calderwood, and F. Qadri.** 2006. Live attenuated oral cholera vaccines. *Expert. Rev. Vaccines.* **5**:483-494.
  179. **Sambrook, J. and D. W. Russell.** 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Volume 3.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cold Spring Harbor, New York.
  180. **Sanchez, J., S. Johansson, B. Lowenadler, A. M. Svennerholm, and J. Holmgren.** 1990. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. *Res. Microbiol.* **141**:971-979.
  181. **Sanders, R. W., M. Venturi, L. Schiffner, R. Kalyanaraman, H. Katinger, K. O. Lloyd, P. D. Kwong, and J. P. Moore.** 2002. The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J. Virol.* **76**:7293-7305.
  182. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**:5463-5467.
  183. **Sather, D. N., J. Armann, L. K. Ching, A. Mavrantoni, G. Sellhorn, Z. Caldwell, X. Yu, B. Wood, S. Self, S. Kalams, and L. Stamatatos.**

2009. Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **83**:757-769.
184. **Schief, W. R., Y. E. Ban, and L. Stamatatos.** 2009. Challenges for structure-based HIV vaccine design. *Curr. Opin. HIV. AIDS* **4**:431-440.
185. **Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann.** 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-860.
186. **Selvarajah, S., B. Puffer, R. Pantophlet, M. Law, R. W. Doms, and D. R. Burton.** 2005. Comparing antigenicity and immunogenicity of engineered gp120. *J. Virol.* **79**:12148-12163.
187. **Shacklett, B. L., J. W. Critchfield, A. L. Ferre, and T. L. Hayes.** 2009. Mucosal T-cell responses to HIV: responding at the front lines. *J. Intern. Med.* **265**:58-66.
188. **Shreedhar, V. K., B. L. Kelsall, and M. R. Neutra.** 2003. Cholera toxin induces migration of dendritic cells from the subepithelial dome region to T- and B-cell areas of Peyer's patches. *Infect. Immun.* **71**:504-509.
189. **Skountzou, I., F. S. Quan, S. Gangadhara, L. Ye, A. Vzorov, P. Selvaraj, J. Jacob, R. W. Compans, and S. M. Kang.** 2007. Incorporation of glycosylphosphatidylinositol-anchored granulocyte- macrophage colony-stimulating factor or CD40 ligand enhances immunogenicity of chimeric simian immunodeficiency virus-like particles. *J. Virol.* **81**:1083-1094.
190. **Speth, C., S. Bredl, M. Hagleitner, J. Wild, M. Dierich, H. Wolf, J. Schroeder, R. Wagner, and L. Deml.** 2008. Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Pr55gag virus-like particles are potent activators of human monocytes. *Virology* **382**:46-58.
191. **Srivastava, I. K., J. B. Ulmer, and S. W. Barnett.** 2005. Role of neutralizing antibodies in protective immunity against HIV. *Hum. Vaccin.* **1**:45-60.
192. **Stahl, S., A. Sjolander, P. A. Nygren, K. Berzins, P. Perlmann, and M. Uhlen.** 1989. A dual expression system for the generation, analysis and purification of antibodies to a repeated sequence of the Plasmodium falciparum antigen Pf155/RESA. *J. Immunol. Methods* **124**:43-52.
193. **Stamatatos, L., L. Morris, D. R. Burton, and J. R. Mascola.** 2009. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* **15**:866-870.
194. **Stiegler, G., R. Kunert, M. Purtscher, S. Wolbank, R. Voglauer, F. Steindl, and H. Katinger.** 2001. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **17**:1757-1765.
195. **Stott, E. J.** 1994. Towards a vaccine against AIDS: lessons from simian immunodeficiency virus vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **188**:221-237.
196. **Sur, D., A. L. Lopez, S. Kanungo, A. Paisley, B. Manna, M. Ali, S. K. Niyogi, J. K. Park, B. Sarkar, M. K. Puri, D. R. Kim, J. L. Deen, J. Holmgren, R. Carbis, R. Rao, T. V. Nguyen, A. Donner, N. K. Ganguly, G. B. Nair, S. K. Bhattacharya, and J. D. Clemens.** 2009. Efficacy and safety of a modified killed-whole-cell oral cholera vaccine in India: an interim analysis of a cluster-randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **374**:1694-1702.
197. **Sutherland, D. R. and A. Keating.** 1992. The CD34 antigen: structure, biology, and potential clinical applications. *J. Hematother.* **1**:115-129.
198. **Tamura, S., A. Yamanaka, M. Shimohara, T. Tomita, K. Komase, Y. Tsuda, Y. Suzuki, T. Nagamine, K. Kawahara, H. Danbara, and .** 1994. Synergistic action of cholera toxin B subunit (and Escherichia coli heat-labile toxin B subunit) and a trace amount of cholera whole toxin as an adjuvant for nasal influenza vaccine. *Vaccine* **12**:419-426.
199. **Tebit, D. M., I. Nankya, E. J. Arts, and Y. Gao.** 2007. HIV diversity, recombination and disease progression: how does fitness "fit" into the puzzle? *AIDS Rev.* **9**:75-87.
200. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **76**:4350-4354.
201. **Trkola, A., H. Kuster, P. Rusert, B. Joos, M. Fischer, C. Leemann, A. Manrique, M. Huber, M. Rehr, A. Oxenius, R. Weber, G. Stiegler, B. Vcelar, H. Katinger, L. Aceto, and H. F. Gunthard.** 2005. Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **11**:615-622.
202. **Trkola, A., M. Purtscher, T. Muster, C. Ballaun, A. Buchacher, N. Sullivan, K. Srinivasan, J. Sodroski, J. P. Moore, and H. Katinger.** 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.
203. **Verkoczy, L., M. Diaz, T. M. Holl, Y. B. Ouyang, H. Bouton-Verville, S. M. Alam, H. X. Liao, G. Kelsoe, and B. F. Haynes.** 2010. Autoreactivity in an HIV-1 broadly reactive neutralizing antibody variable region heavy chain induces immunologic tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **107**:181-186.
204. **Virgin, H. W. and B. D. Walker.** 2010. Immunology and the elusive AIDS vaccine. *Nature* **464**:224-231.

205. **Wagner, R., L. Deml, H. Fliessbach, G. Wanner, and H. Wolf.** 1994. Assembly and extracellular release of chimeric HIV-1 Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology* **200**:162-175.
206. **Wagner, R., L. Deml, R. Schirmbeck, M. Niedrig, J. Reimann, and H. Wolf.** 1996. Construction, expression, and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology* **220**:128-140.
207. **Wagner, R., H. Fliessbach, G. Wanner, M. Motz, M. Niedrig, G. Deby, A. von Brunn, and H. Wolf.** 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.
208. **Walker, L. M. and D. R. Burton.** 2010. Rational antibody-based HIV-1 vaccine design: current approaches and future directions. *Curr. Opin. Immunol.* **22**:358-366.
209. **Walker, L. M., S. K. Phogat, P. Y. Chan-Hui, D. Wagner, P. Phung, J. L. Goss, T. Wrin, M. D. Simek, S. Fling, J. L. Mitcham, J. K. Lehrman, F. H. Priddy, O. A. Olsen, S. M. Frey, P. W. Hammond, S. Kaminsky, T. Zamb, M. Moyle, W. C. Koff, P. Poignard, and D. R. Burton.** 2009. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science* **326**:285-289.
210. **Wang, L. X.** 2006. Toward oligosaccharide- and glycopeptide-based HIV vaccines. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **9**:194-206.
211. **Wang, S., J. S. Kennedy, K. West, D. C. Montefiori, S. Coley, J. Lawrence, S. Shen, S. Green, A. L. Rothman, F. A. Ennis, J. Arthos, R. Pal, P. Markham, and S. Lu.** 2008. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine* **26**:3947-3957.
212. **Wang, S. K., P. H. Liang, R. D. Astronomo, T. L. Hsu, S. L. Hsieh, D. R. Burton, and C. H. Wong.** 2008. Targeting the carbohydrates on HIV-1: Interaction of oligomannose dendrons with human monoclonal antibody 2G12 and DC-SIGN. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**:3690-3695.
213. **Wanninger, V.** 2007. Strategien zur Modulation der Immunogenität des HIV-1 Hüllproteins als Vakzinekomponente. Dissertation.
214. **Wassen, L. and M. Jertborn.** 2006. Influence of exogenous reproductive hormones on specific antibody production in genital secretions after vaginal vaccination with recombinant cholera toxin B subunit in humans. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**:202-207.
215. **Wassen, L., K. Schon, J. Holmgren, M. Jertborn, and N. Lycke.** 1996. Local intravaginal vaccination of the female genital tract. *Scand. J. Immunol.* **44**:408-414.
216. **Watson, D. S. and F. C. Szoka, Jr.** 2009. Role of lipid structure in the humoral immune response in mice to covalent lipid-peptides from the membrane proximal region of HIV-1 gp41. *Vaccine* **27**:4672-4683.
217. **Wei, X., J. M. Decker, S. Wang, H. Hui, J. C. Kappes, X. Wu, J. F. Salazar-Gonzalez, M. G. Salazar, J. M. Kilby, M. S. Saag, N. L. Komarova, M. A. Nowak, B. H. Hahn, P. D. Kwong, and G. M. Shaw.** 2003. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**:307-312.
218. **Whitney, J. B. and R. M. Ruprecht.** 2004. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**:17-26.
219. **Wolf, H., S. Modrow, M. Soutschek, M. Motz, R. Grunow, H. Döbl, and R. von Baehr.** 1990. Production, mapping and biological characterization of monoclonal antibodies against core protein (p24) of the human immunodeficiency virus. *AIDS-Forsch.* **1**:16-18.
220. **Wrin, T. and J. H. Nunberg.** 1994. HIV-1MN recombinant gp120 vaccine serum, which fails to neutralize primary isolates of HIV-1, does not antagonize neutralization by antibodies from infected individuals. *AIDS* **8**:1622-1623.
221. **Wu, L., T. Zhou, Z. Y. Yang, K. Svehla, S. O'Dell, M. K. Louder, L. Xu, J. R. Mascola, D. R. Burton, J. A. Hoxie, R. W. Doms, P. D. Kwong, and G. J. Nabel.** 2009. Enhanced exposure of the CD4-binding site to neutralizing antibodies by structural design of a membrane-anchored human immunodeficiency virus type 1 gp120 domain. *J. Virol.* **83**:5077-5086.
222. **Wu, X., Z. Y. Yang, Y. Li, C. M. Hogerkorp, W. R. Schief, M. S. Seaman, T. Zhou, S. D. Schmidt, L. Wu, L. Xu, N. S. Longo, K. McKee, S. O'Dell, M. K. Louder, D. L. Wycuff, Y. Feng, M. Nason, N. Doria-Rose, M. Connors, P. D. Kwong, M. Roederer, R. T. Wyatt, G. J. Nabel, and J. R. Mascola.** 2010. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science* **329**:856-861.
223. **Yang, X., V. Tomov, S. Kurteva, L. Wang, X. Ren, M. K. Gorny, S. Zolla-Pazner, and J. Sodroski.** 2004. Characterization of the outer domain of the gp120 glycoprotein from human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **78**:12975-12986.
224. **Yuki, Y., T. Nochi, and H. Kiyono.** 2007. Progress towards an AIDS mucosal vaccine: an overview. *Tuberculosis. (Edinb.)* **87 Suppl 1**:S35-S44.
225. **Zeifelder, U., O. Frank, S. Sparacio, U. Schon, V. Bosch, W. Seifarth, and C. Leib-Mosch.** 2007. The potential of retroviral vectors to cotransfer human endogenous retroviruses (HERVs) from human packaging cell lines. *Gene* **390**:175-179.
226. **Zhang, R. G., D. L. Scott, M. L. Westbrook, S. Nance, B. D. Spangler, G. G. Shipley, and E. M. Westbrook.** 1995. The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. *J. Mol. Biol.* **251**:563-573.



## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Des Weiteren möchte ich mich für seine fachlich kompetente Betreuung und die anregenden Gespräche bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Gernot Längst für die Vertretung der Promotionsarbeit an der NWF III und die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf gilt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Bei Dr. Alexander Kliche möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für seine fachliche Betreuung sowie seine stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Ebenso herzlich danke ich Dr. Jens Wild für seine Unterstützung bei den Mausexperimenten und das Korrekturlesen dieser Arbeit. Vielen Dank auch an alle weiteren helfenden fleißigen Hände bei den Immunisierungsversuchen.

Meinen lieben 65ern möchte ich für die schöne Zeit danken, die wir gemeinsam verbracht haben. Danke auch für all eure aufmunternden Worte und wissenschaftlichen Ratschläge. Ich vermisse euch.

Ich danke allen Kollegen der AG Wagner für ihre Hilfsbereitschaft sowie die überaus angenehme, freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Freunde und meine Familie, insbesondere an meine Eltern, meine Oma und meinen lieben Thomas (vielen lieben Dank für die Gestaltung des Umschlages). Danke, dass ihr immer fest an mich geglaubt habt und mir Halt und Kraft gegeben habt.