
Weiterentwicklung pockenviraler Vakzinekandidaten zur Verbesserung der Induktion HIV-spezifischer T-Zell Antworten

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
IN DEN BIOMEDIZINISCHEN WISSENSCHAFTEN (DR.RER.PHYSIOL.)
AN DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT REGENSBURG



vorgelegt von
Katharina Böckl aus Schwarzenfeld
im Jahr 2011

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Januar 2008 und Dezember 2011 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 16.12.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. Ralf Wagner

Prüfungsausschuss:

Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. Dr. med. André Gessner
Prüfer:	Prof. Dr. Ralf Wagner
	Prof. Dr. Joachim Hauber
	Prof. Dr. Peter Oefner

Ich, Böckl, Katharina geboren am 16.02.1982 in Nabburg erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift
Katharina Böckl

Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit

- Albert Einstein

Meiner Familie

ZUSAMMENFASSUNG	1
A. EINLEITUNG	2
A.1 Pockenviren.....	2
A.1.1 Pockenviren allgemein	2
A.1.2 Vacciniaviren	2
A.1.2.1 Das New York Vacciniavirus (NYVAC).....	6
A.2 Stand der Vakzineentwicklung gegen das Humane Immundefizienzvirus Typ1 (HIV-1)	7
A.3 Vektorsysteme und Vakzinierungsstrategien	10
A.3.1 Allgemein	10
A.3.2 Virale Vektoren	11
A.3.3 DNA-Vakzine	14
A.3.4 heterologe <i>Prime/Boost</i> Immunisierungsstrategien	16
A.4 Zielsetzung	19
B. MATERIAL UND METHODEN.....	21
B.1 Material	21
B.1.1 Zellen.....	21
B.1.1.1 Prokaryotische Zellen	21
B.1.1.2 Eukaryotische Zellen.....	21
B.1.2 Virus	21
B.1.3 DNA	22
B.1.3.1 Oligonukleotide	22
B.1.3.2 Vektoren	23
B.1.4 Antikörper und Peptide	23
B.1.4.1 Primärantikörper	23
B.1.4.2 Sekundärantikörper.....	24
B.1.4.3 Peptide.....	24
B.1.5 Größen- und Molekulargewichtstandards.....	25
B.1.6 Kommerzielle Kits.....	25
B.1.7 Reagenzien	25
B.1.7.1 Anzuchtmedien	25
B.1.7.2 Kulturmedien und Puffer	26
B.1.8 Verbrauchsmaterial	26
B.1.9 Versuchstiere.....	26
B.2 Methoden	26
B.2.1 Molekularbiologische Arbeitstechniken	26

B.2.1.1	Klonierung.....	26
B.2.1.2	DNA-Aufreinigung und Analyse	26
B.2.1.2.1	Plasmid-DNA	26
B.2.1.2.2	Genomische DNA	27
B.2.1.3	PCR-Analyse	27
B.2.1.4	Herstellung rekombinanter NYVACs.....	27
B.2.1.4.1	Herstellung der Transferkonstrukte zur Integration eines Transgens in den pockenviralen Vektor NYVAC	27
B.2.1.4.2	Einbringen des Transgens in den pockenviralen Vektor (1. homologe Rekombination).....	29
B.2.1.4.3	Entfernen des Reportergens LacZ aus dem pockenviralen Vektor (2. homologe Rekombination).....	30
B.2.2	Proteinbiochemische Methoden	30
B.2.2.1	Trichloressigsäure (TCA)-Aceton Fällung.....	30
B.2.2.2	Proteinbestimmung nach Bradford	30
B.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
B.2.2.4	Western-Blot Analyse	31
B.2.3	Zellbiologie	31
B.2.3.1	Allgemeine Zellkulturtechniken	31
B.2.3.2	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	32
B.2.3.3	Ernte von Zellen und Überständen für analytische Zwecke.....	32
B.2.3.4	FACS-Analyse	32
B.2.3.5	Arbeitstechniken mit Viren	33
B.2.3.5.1	Einbringen der Transgene mittels In-vitro Rekombination (IVR)	33
B.2.3.5.2	Aufreinigung der unterschiedlichen NYVAC-Varianten unter Verwendung eines Plaque Assays	33
B.2.3.5.2.1	Durchführung des ersten Aufreinigungsschritts.....	33
B.2.3.5.2.2	Durchführung der weiteren Aufreinigungsschritte	34
B.2.3.5.3	Infektion eukaryotischer Zelle für analytische Zwecke	34
B.2.3.5.4	Herstellung hochtitriger Virusstocks	35
B.2.3.5.5	Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Assay und Kristallviolett-färbung ...	36
B.2.3.5.6	Plaque Assay zum Nachweis der Reinheit der hergestellten rekombinanten Viren.....	36
B.2.4	Immunologische Arbeitstechniken	37
B.2.4.1	Haltung und Immunisierung von Versuchstieren	37
B.2.4.2	Auslesen zellulärer Immunantworten	37
B.2.4.2.1	Generierung von primären Maussplenozyten.....	37
B.2.4.2.2	Intrazelluläre IFN γ Färbung und anschließende FACS-Analyse	37
C	ERGEBNISSE	39
C.1	Beschreibung der verwendeten DNA-Konstrukte	39
C.2	Entwicklung und Verifizierung neuer DNA-Konstrukte.....	41
C.2.1	Herstellung neuer Transgenvarianten durch Einfügen neuer Modifikationen.....	41
C.2.1.1	Allgemein	41
C.2.1.2	Entwicklung eines Gag und Env kodierenden Plasmids unter Verwendung eines 2a-Peptids des Thosa asigna virus (TaV)	41

C.2.1.3	Einbringen der im murinen System immundominanten Epitope aus Gag und Env in das jeweils andere Transgen sowie die Deletion des immundominanten Epitops V11V im Env.....	42
C.2.1.4	Modifikation des Signalpeptids	44
C.2.1.5	Überblick modifizierte Immunogene.....	45
C.2.2	Verifizierung der neuen DNA-Konstrukte	46
C.2.2.1	Überprüfung der Proteinexpression durch die modifizierten Transgene im Western-Blot nach Transfektion von HEK293T Zellen.....	46
C.2.2.2	FACS-Analyse bestätigt Expression der modifizierten Transgene ^M Gag-2a-gp120 und gp120-2a- ^M Gag.....	50
C.3	Entwicklung und Verifizierung rekombinanter Viren	51
C.3.1	Herstellung rekombinanter Viren	51
C.3.1.1	Allgemein	51
C.3.1.2	Aufbau des Transfervektors pLZAW1	52
C.3.1.3	Homologe Rekombination.....	52
C.3.1.3.1	Einbringen des Transgens in den pockenviralen Vektor NYVAC (1. Rekombinationsschritt).....	52
C.3.1.3.2	Entfernen des zur Selektion verwendeten Gens LacZ (2. Rekombinationsschritt).....	54
C.3.2	Verifizierung der rekombinanten Viren am Beispiel des eingebrachten Transgens ^M Gag	55
C.3.2.1	Western-Blot Analyse bestätigt erfolgreiche Expression des im Transfervektor eingebrachten Transgens ^M Gag	55
C.3.2.2	PCR-Analyse bestätigt erfolgreiches Einbringen des Transgens ^M Gag und Entfernen des Reportergens LacZ im pockenviralen Vektor	55
C.3.2.3	Western-Blot Analyse bestätigt Expression des eingebrachten Transgens ^M Gag in den einzelnen Aufreinigungsschritten	57
C.3.2.4	Plaque Assay und anschließende Western-Blot Analyse zeigen die Expression des Transgens in 100 % der rekombinanten NYVAC- ^M Gag	59
C.3.2.5	Mit rekombinanten NYVACs infizierte Zellen zeigen Expression der eingebrachten Transgene	60
C.3.3	Überblick rekombinante Viren	62
C.4	In vivo Applikation der DNA-Konstrukte mit modifizierten Transgenen	63
C.4.1	Unterdrückung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten nach Verabreichung der 2a-Konstrukte sowie einer Mischung aus ^M Gag und gp120.....	63
C.4.2	Deletion des immundominanten Env-spezifischen Epitops V11V im gp120 führt zum Erhalt Gag-spezifischer T-Zell Antworten	65
C.4.3	Verbesserung der Gag-spezifischen T-Zell Antworten durch das Entfernen des artifiziellen Signalpeptids am gp120	67
C.5	In vivo Applikation rekombinanter Viren	69
C.5.1	Steigerung der Gag- und Pol-spezifischen zellulären Immunantworten durch das Wiederherstellen des ribosomalen <i>Frame-Shift</i> Signals.....	69
C.5.2	Durch eine homologe <i>Prime/Boost</i> Applikation konnten die Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten nicht verstärkt werden	71

C.5.3	Co-Verabreichung von gp120 führt nicht zur Unterdrückung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten	73
C.5.4	Eine kombinierte Verabreichung von verbesserten Plasmid-DNA- Konstrukten und rekombinanten NYVACs verstärkt die Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten	75
D.	DISKUSSION	78
D.1	Entwicklung und Bewertung neuer DNA-Konstrukte	78
D.1.1	Die Optimierung der Transgenexpression verbesserte die Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten	78
D.1.2	Der negative Einfluss des HIV-1 Hüllproteins Env auf die Expression und Präsentation co-verabreichter Antigene konnte bestätigt werden	78
D.1.3	Transgenvarianten zur Analyse der Env/Gag-Kompetition zeigten in biochemischen Analysen die erwarteten Proteinexpressionen	80
D.1.4	Die Verabreichung der 2a-Konstrukte zeigte <i>in vitro</i> eine gemeinsame Expression der Proteine in einer Zelle und führte <i>in vivo</i> zur Unterdrückung Gag-spezifischer T-Zell Antworten	81
D.1.5	Die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten nach Gabe einer Mischung aus ^M Gag und gp120ΔV11V deutet auf eine Kompetition um die Präsentation auf MHC-I Molekülen hin	83
D.1.6	Die Deletion des artifiziiellen Signalpeptids von Env verbesserte in gleicher Weise die Gag-spezifischen Immunantworten wie eine Verringerung der verabreichten Menge an Env	84
D.2	Herstellung und Bewertung rekombinanter NYVAC	86
D.2.1	Unter Verwendung der homologen Rekombination wurden neue NYVAC-Varianten hergestellt.....	86
D.2.2	Die Verifizierung der rekombinanten NYVACs bestätigte eine Expression der Transgene und eine hohe Expressionseffizienz in allen rekombinanten Viren ..	86
D.2.3	Verifizierung neuer rekombinanter NYVACs hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion spezifischer zellulärer Immunantworten.....	88
D.2.4	Das Einfügen des ribosomalen <i>Frame-Shift</i> Signals bewirkte nach Applikation des NYVAC- ^{ΔM} G ^{FS} PN bei der Analyse aller NYVAC-Varianten eine Verbesserung Gag-spezifischer T-Zell Antworten	89
D.2.5	Die Fähigkeit zur Bildung Virus-ähnlicher Partikel sowie die Trennung der Transgene auf unterschiedliche NYVACs führte zu keiner weiteren Verbesserung der zellulären Immunantworten	89
D.2.6	Im Kontext des viralen Vektors NYVAC zeigte sich kein Einfluss der Co-Verabreichung von gp120 auf die Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten	91
D.2.7	Eine homologe <i>Prime/Boost</i> -Strategie konnte die Induktion effizienter Antigen-spezifischer T-Zell Antworten nicht zusätzlich verbessern.....	92
D.2.8	Die Verbesserung der DNA-Konstrukte sowie der rekombinanten Viren führte in einer heterologen <i>Prime/Boost</i> -Verabreichung zu einer deutlich gesteigerten Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten	93

D.3	Ausblick	95
D.3.1	Durchführung weiterer heterologer <i>Prime/Boost</i> -Studien	95
D.3.2	Entwicklung eines Transgen-gekoppelten Selektionssystems zur Produktion rekombinanter Vacciniaviren	96
D.3.3	Weiterentwicklung einer schnelleren Herstellung rekombinanter NYVACs durch die Verwendung einer BAC-Technologie	97
E.	ANHANG	98
E.1	Abkürzungsverzeichnis.....	98
E.2	Ergänzende Abbildungen.....	99
E.2.1.	Verifizierung NYVAC_ Δ^M GPN	99
E.2.2.	Verifizierung NYVAC_ Δ^M G ^{FS} PN	100
E.2.3.	Verifizierung NYVAC_ Δ^M G ^{FS} PN.....	101
E.2.4.	Verifizierung NYVAC_ Δ^M Gag	102
E.2.5.	Verifizierung NYVAC_PN	103
E.2.6.	Verifizierung NYVAC_gp120	104
E.3	DNA-Konstrukte	105
E.4	Literaturverzeichnis.....	109
	Danksagung	123

Zusammenfassung

Trotz vielversprechender Fortschritte ist bis jetzt keine HIV-Vakzine verfügbar. Rekombinante virale Vektorsysteme, im Besonderen Vaccinia-virale Vektoren, stellen für die Generierung eines effektiven Impfstoffs einen Erfolg versprechenden Ansatzpunkt dar. Die Kombination eines auf dem *New York Vacciniavirus* basierenden Vektors der die HIV-1 Immunogene GagPolNef (GPN) und gp120 enthält (NYCAC-C) und einer, die gleichen Antigene kodierenden DNA-Vakzine (DNA-C), wurde bereits in präklinischen und klinischen Phase I/II Studien getestet. Die Applikation von DNA-C/NYVAC-C induzierte hohe gp120-spezifische, jedoch nur schwache zelluläre Immunantworten gegen Gag, Pol und Nef. Diese schwachen Gag-, Pol- und Nef-spezifischen T-Zell Antworten beruhen vermutlich auf der niedrigen Expression des artifiziellen Polyproteins GPN. Im Kontext einer DNA-Vakzine führte das Einfügen von Modifikationen in das Antigen GPN zu einer Verbesserung der Proteinexpression, sowie nachgelagert zu einer Steigerung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten. Jedoch konnte dabei ein negativer Einfluss von HIV-1 gp120 auf co-verabreichte Antigene aufgezeigt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb zunächst der Mechanismus, welcher diesem negativen Effekt von Env zu Grunde liegt, mittels neuer Transgenvarianten untersucht. Die Gewährleistung der Co-Expression von Gag und gp120 in einer Zelle konnte zeigen, dass eine mögliche Interferenz zwischen Env und Gag vermutlich nicht auf Ebene der exprimierenden Muskelzellen, sondern in einer Antigen-präsentierenden Zelle stattfindet. Weiterhin führte die Deletion des gp120-spezifischen Epitops bei Co-Verabreichung mit Gag zur Induktion effizienter Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten. Eine MHC-Kompetition der Epitope aus Gag und Env könnte somit eine mögliche Erklärung für die Interferenz zwischen Env und Gag darstellen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden rekombinante NYVACs hergestellt, die unter anderem die hinsichtlich einer gesteigerten Expression von Gag, Pol und Nef verbesserten Transgene enthalten. Im BALB/c Mausmodell zeigte sich nach Verabreichung der rekombinanten NYVACs eine im Vergleich zu NYVAC-C um das Vierfache gesteigerte Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten.

Des Weiteren konnte im letzten Teil dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Kombination der rekombinanten Viren zusammen mit den hinsichtlich der Transgenexpression verbesserten DNA-Konstrukten die stärksten Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten induzierte. Im Vergleich zu einer Applikation von DNA-C/NYVAC-C führte diese Kombination vor allem zu einer deutlichen Steigerung Gag- und Pol-spezifischer T-Zell Antworten. In diesem verbesserten heterologen Prime/Boost-Schema scheint jedoch die Grundimmunsierung mit den optimierten DNA-Konstrukten den entscheidenderen Einfluss auf die Steigerung der Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten zu haben.

A. Einleitung

A.1 Pockenviren

A.1.1 Pockenviren allgemein

Zur Familie der Poxviridae zählt eine große Anzahl verschiedener Viren, darunter die Pockenviren der Wirbeltiere wie Säugetiere oder Vögel (*Chordopoxvirinae*) und die Pockenviren der Insekten (*Entomopoxvirinae*). Pockenviren sind die größten bekannten Viren. Alle pockenviralen Partikel bestehen aus einem linearen, doppelsträngigen DNA-Genom welches von einer inneren Hüllmembran umgeben ist. Die Partikel haben eine ovale Form mit einem Durchmesser von bis zu 300 nm ¹.

Obwohl man über den Erreger oder die Biologie der Infektion keine näheren Kenntnisse besaß, gelangen mit Hilfe des menschlichen Pockenvirus schon früh wichtige Entdeckungen über die Pathogenese von Infektionskrankheiten. Die ältesten bekannten übertragbaren Erkrankungen des Menschen sind hierbei die vom humanpathogenen Pockenvirus *Variola* verursachten Infektionen (*Variola vera* und *Variola minor*). Die Übertragung des Variolavirus erfolgt vor allem durch Tröpfchen- sowie Schmutz- und Schmierinfektion.

Ende des 18. Jahrhunderts erprobte Edward Jenner in England zum ersten Mal eine Impfung mit einem aus der Kuh stammenden Pockenvirus. Er gab diesem Virus den Namen *Vaccinia-Virus*, daraus abgeleitet bezeichnet man heute einen Impfstoff als Vakzine ². Erst in späteren molekularbiologischen Untersuchungen stellt man fest, dass es sich bei diesem Vacciniavirus nicht um das von Jenner vermutlich verwendete Kuhpockenvirus (Jenner 1798 und Downie 1939), sondern um ein inzwischen ausgestorbenes Tierpockenvirus handelt ^{1,3}. Dieses von Jenner verwendete Vacciniavirus wurde bis 1979 in einem globalen Ausrottungsprogramm als Impfstoff gegen die Infektion mit dem Pockenvirus eingesetzt. Seit diesem Zeitpunkt gilt die Pockenerkrankung des Menschen für ausgerottet (WHO 1980). Auch heute kann es in seltenen Fällen zur Übertragung tierpathogener Pockenviren auf den Menschen kommen. Das sogenannte Affenpockenvirus (*Monkey-Pox-Virus*) wird z.B. sporadisch beim Verzehr wild lebender Affen auf die eingeborene Bevölkerung Afrikas übertragen ¹.

A.1.2 Vacciniaviren

Das Vacciniavirus (VACV) zählt zur Unterfamilie der *Chordopoxvirinae* und zum Genus Orthopoxvirus. Das Genom des VACV umfasst ca. 190.000 Basenpaare und kodiert für ungefähr 250 Gene ⁴. Der konkrete Ursprung des Vacciniavirus ist wie bereits erwähnt unbekannt. Es wird jedoch vermutet, dass es sich bei diesem Virus um einen, dem

Kuhpocken artverwandten Virus handelt, welcher durch vielfältige Passagierungen zur Herstellung eines Impfstoffs weiter vermehrt und verändert wurde ⁵.

Ein besonderes Merkmal der Vacciniaviren ist, dass sie, anders als die meisten DNA Viren, ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle replizieren. Dabei ist die virale Genexpression durch einen Kaskadenmechanismus stark reguliert. Der Zusammenbau der Viren findet in einem mehrstufigen Prozess statt, bei welchem mehrere virale Formen entstehen ⁶. Diese verschiedenen Formen der VACV unterscheiden sich in der Anzahl ihrer äußeren Membranen. Jede Form enthält den gleichen DNA-Protein-Komplex, mit einer Vielzahl an Enzymen und Faktoren für die frühe Genexpression, umgeben von einem Kapsid und einer inneren Membranhülle ^{1,7}. Die einfachste und in der größten Anzahl auftretende Form sind die intrazellulären reifen Virionen IMV (*intracellular mature virion*), welche von nur einer doppelten Lipidmembran umgeben sind ^{8,9}. Im Laufe des Replikationszyklus der Vacciniaviren werden die IMV zu frühen Endosomen und zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert und mit einer weiteren Lipid-Doppelschicht umgeben. Diese zweite Form bezeichnet man als intrazelluläre behüllte Virionen IEV (*intracellular enveloped virion*) ¹⁰⁻¹². Die dritte Virusform entsteht durch das Freisetzen der Virionen aus der Zelle durch Fusion der äußeren Lipid-Doppelschicht mit der Zytoplasmamembran. Hierbei bilden sich die extrazellulären behüllten Virionen EEV (*extracellular enveloped virion*), welche im Vergleich zu den IEV mit nur einer äußeren Lipidschicht ausgestattet sind ⁷. Sowohl die IMV als auch die extrazellulären Arten von Viruspartikeln sind infektiös, jedoch ist für die Übertragung der Infektion zwischen einzelnen Individuen die extrazelluläre Form verantwortlich ¹³.

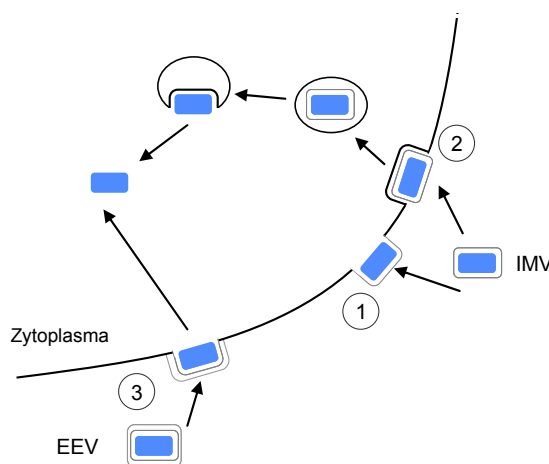


Abb. A-1: Schematische Darstellung der Aufnahme von Vacciniaviren

(modifiziert nach ¹⁴)

Die Aufnahme der IMVs erfolgt zum einen über direkte Fusion der IMV-Membran mit der Plasmamembran (1) zum anderen über Endozytose und/oder Macropinozytose in intrazelluläre Vesikel mit anschließender Fusion der IMV-Membran mit der Vesikelmembran (2).

Die EEVs verlieren ihre äußere Membran an der Außenseite der Zellen und werden durch Fusion der inneren IMV-Membran mit der Plasmamembran aufgenommen (3).

Die Adsorption der Viren an der Zelloberfläche findet vermutlich über Rezeptorbindungen statt ⁷, wobei der genaue Rezeptor noch unbekannt ist. Es konnte die Beteiligung von Glykosaminoglykane (GAGs) an der Interaktion von intrazellulären reifen Virionen (IMV) mit der Zellmembran nachgewiesen werden ¹⁵⁻¹⁷, jedoch konnte auch gezeigt werden, dass GAGs nicht notwendigerweise für eine Infektion benötigt werden ¹⁸. Nach der Bindung der

IMVs oder EEVs erfolgt die Aufnahme in das Zytoplasma der Zielzelle. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen (EM-Aufnahmen) konnte für die intrazellulären Virionen (IMV) zum einen eine direkte Fusion der IMV-Membran mit der Vesikelmembran gezeigt werden¹⁸, zum anderen erfolgt die Aufnahme über Endozytose / Makropinozytose in intrazelluläre Vesikel mit anschließender Fusion der IMV-Membran mit der Vesikelmembran¹⁹ (Abb. A-1, Nr.1 und 2). Durch EM-Aufnahmen konnte man weiterhin belegen, dass die extrazellulären, behüllten Viren bei der Adsorption an die Zielzelle ihre äußere Membran verlieren und durch Fusion der inneren IMV-Membran mit der Plasmamembran aufgenommen werden²⁰ (Abb. A-1, Nr.3).

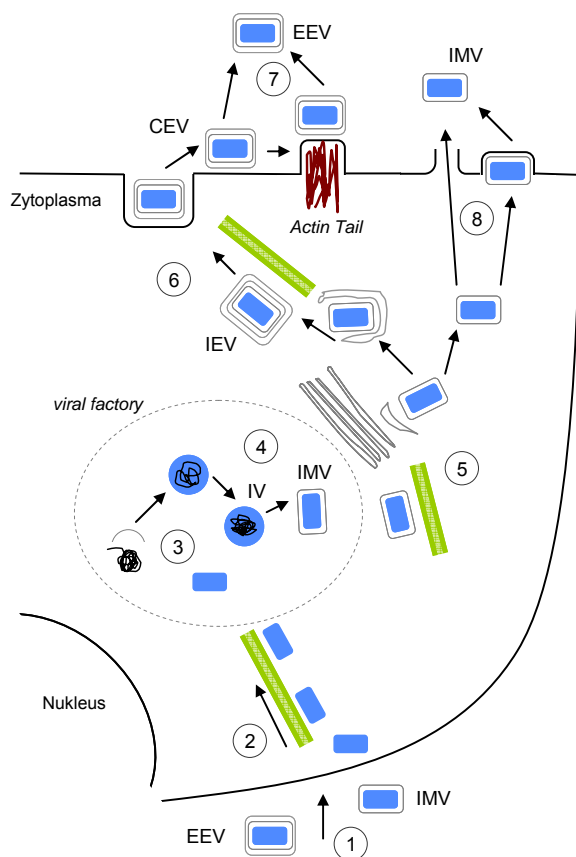


Abb. A-2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Vacciniaviren

(modifiziert nach^{14,21})

1. Das Virus bindet an die Zelle, wird aufgenommen und entlässt das virale „Core“ in das Zytoplasma der Zelle.
2. Das virale „Core“ wird in der Zelle entlang von Mikrotubuli transportiert.
3. Die Transkription der frühen mRNAs, die Freisetzung der viralen DNA und die anschließende DNA Replikation findet in „viral factory“ statt.
4. In der „viral factory“ werden immature Virionen (IV) hergestellt und zu IMVs prozessiert.
5. Die IMVs werden zu frühen Endosomen und zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert und mit einer Membran umgeben.
6. Die mit einer zweiten Membran versehenen IEVs werden über Mikrotubuli zur Zellmembran transportiert.
7. Die äußere IEV-Membran fusioniert mit der Vesikelmembran um CEV freizusetzen. CEV können entweder über *Actin Tails* zu einer Nachbarzelle transportiert oder als EEV freigesetzt werden.
8. Mehrzahl der IMVs wird durch Zelllyse oder durch *Budding* freigesetzt (der Mechanismus ist noch unklar).

Nach der Adsorption und der Aufnahme der unterschiedlichen viralen Formen, kommt es zur Freisetzung des DNA-Protein-Komplexes, welcher zusammen mit viralen Enzymen und regulatorisch aktiven Proteinen von einem Capsid umgeben ist und im Folgenden als „Core“ bezeichnet wird. Dieser virale Core wird im Weiteren entlang der Mikrotubuli transportiert (Abb. A-2, Nr.2). Mit Hilfe der viralen DNA-abhängigen RNA Polymerase kommt es, nach der Freisetzung des viralen Genoms in sogenannten „viral factories“, zur Transkription früher mRNAs (Abb. A-2, Nr.3) und zur Expression viraler Proteine, die an der Zellinteraktion oder

an der viralen DNA-Synthese beteiligt sind²². Nachfolgend werden dann intermediäre und späte Gene exprimiert, die für Strukturproteine, Enzyme und frühe Transkriptionsfaktoren kodieren. Die ersten sichtbaren Strukturen in diesen Replikationszentren sind halbmondartig geformt, beinhalten Lipid und Protein, und reifen zu ovalen Strukturen heran, in welche die viralen Core-Komponenten eingeschlossen werden¹⁴. Aus diesen immaturen Virionen (IV) reifen die intrazellulären muren Virionen (IMV), welche von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind und die ersten infektiösen Partikel des viralen Replikationszyklus darstellen (Abb A-2, Nr.4)¹³. Einige dieser IMVs werden anschließend über Mikrotubuli²³ zu frühen Endosomen oder zum trans-Golgi-Netzwerk (TGN) transportiert, und dort mit einer zweiten endosomalen oder aus dem TGN abgeleiteten Membran umschlossen¹⁰⁻¹² (Abb. A-2, Nr.5). Diese doppelt behüllten, als IEVs bezeichneten Virionen, werden dann zur Zellmembran transportiert wo sie mit dieser fusionieren, dabei ihre äußerste Membran verlieren und freigesetzt werden (Abb. A-2, Nr.6 und 7).

Die freien Virionen werden, wenn sie zellgebunden bleiben, als CEV (*cell-associated enveloped virion*), oder wenn sie freigesetzt werden, als EEV bezeichnet^{7,21}. CEVs sind wichtig für die Zell-zu-Zell Ausbreitung^{24,25} und induzieren das Entstehen von *Actin Tails*, welche unterhalb der Plasmamembran gebildet werden, und die Weitergabe der CEV an umliegende Zellen antreiben^{26,27}. EEVs vermitteln hingegen eine weite Ausbreitung des Virus *in vitro* und *in vivo*^{28,29}. Die Mehrzahl der IMVs wird jedoch nicht mit einer zweiten Membran versehen, sondern während dem Absterben der Zelle mittels Zelllyse oder durch *Budding* an der Plasma Membran freigesetzt²¹ (Abb. A-2, Nr.8). Der Mechanismus, der der Freisetzung der IMVs durch *Budding* zu Grunde liegt, ist Virus- und Zelltyp-spezifisch, und konnte bislang noch nicht aufgeklärt werden²¹.

Kurz nach der Einstellung der flächendeckenden Impfung gegen die Pocken, wurde die Verwendung des Vacciniavirus als Vakzine gegen verschiedene Erkrankungen diskutiert^{30,31}. Die Idee bestand darin in das Genom des Vacciniavirus, welches eine ausreichende Kapazität dafür bereit stellt, Gene verschiedener Erreger stabil zu integrieren, um eine vielfältige Vakzine zu generieren^{32,33}. Obwohl Vacciniaviren bei der Ausrottung der Pocken erfolgreich eingesetzt wurden, ist die Wiederaufnahme von VACV als Vektor jedoch für weitere Impfungen umstritten, da durch die Gabe von VACV bei Kindern und immunsupprimierten Personen starke Nebenwirkungen auftraten^{34,35}. Ein Erfolg zeigte sich zwar bei der Verabreichung eines rekombinanten Vacciniavirus zur Kontrolle der Tollwut bei Tieren³⁶, jedoch reicht die bestehende Attenuierung für eine erneute Applikation im Menschen nicht aus. Aus diesem Grund wurden neue hochattenuierte Stämme entwickelt, wie z.B. NYVAC (*New York Vacciniavirus*) oder MVA (*Modified Vaccinia Ankara*).

A.1.2.1 Das New York Vacciniavirus (NYVAC)

Das *New York Vacciniavirus* (NYVAC) stellt einen hochattenuierten Virusstamm dar, welcher auf dem Kopenhagen Vakzine Stamm basiert, der sich neben einigen anderen Vaccinia Stämmen (Lister, MVA) hinsichtlich seiner immunogenen Eigenschaften als besonders interessant erwiesen hat.

Auf Basis der Sequenz dieses Kopenhagen Stamms⁴ wurden zur Generierung von NYVAC achtzehn offene Leserahmen (ORF = *open reading frame*) im Vaccinia Genom zielgerichtet deletiert, darunter vor allem virale Gene die mit der Virulenz des Virus in Zusammenhang stehen³⁷. Zu diesen viralen Funktionen zählen bestimmte enzymatische Aktivitäten, welche zum Beispiel mit der Thymidinkinase³⁸ oder der Ribonukleotidreduktase³⁹, mit dem viralen Hämagglutinin⁴⁰, mit Proteinen des Komplements^{41,42}, oder mit anderen viral kodierten Proteinen⁴³⁻⁴⁶ verbunden sind. Es wird postuliert, dass diese Funktionen zur verbesserten Replikation des Virus in ruhenden Zellen, zur Unterdrückung der Komplement-vermittelten Lyse infizierter Zelle beitragen, oder auf eine andere Weise die Abwehrmechanismen gegen virale Infektionen in der Zelle untergraben³⁷.

In Abbildung A-3 ist das Genom des *New York Vacciniavirus* mit allen deletierten ORFs, welche im Folgenden beispielhaft erläutert werden, schematisch dargestellt.

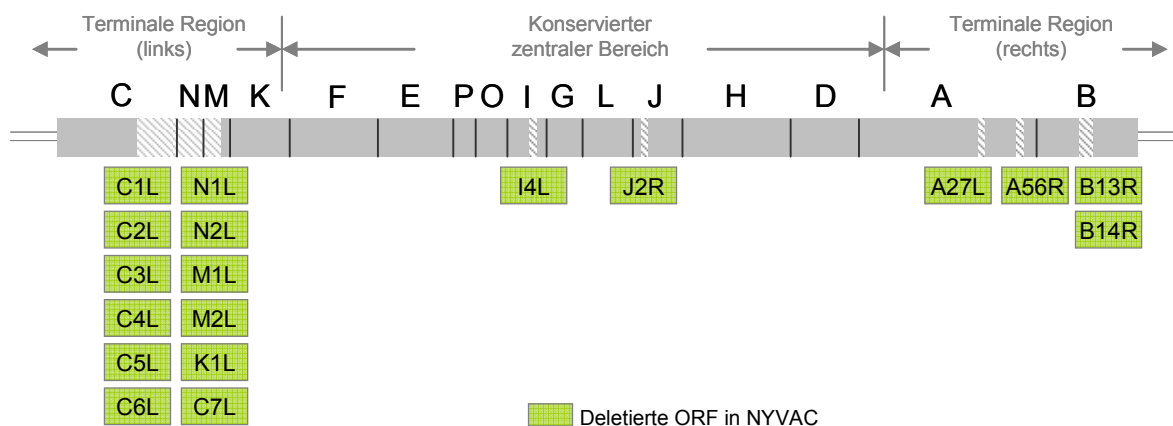


Abb. A-3: Schematische Darstellung des NYVAC Genoms mit allen deletierten ORFs

(modifiziert nach⁴⁷)

Schematisch dargestellt ist das Genom des *New York Vacciniavirus*. Die deletierten ORFs sind an ihrer jeweiligen Position im Genom eingezeichnet.

Die Attenuierung des Virus durch Deletion des Thymidinkinasegens (J2R) beruht unter anderem auf der Beobachtung dass Thymidinkinase-negative Vacciniaviren in Mäusen deutlich weniger pathogen als das Wildtypvirus waren³⁸ und bei nasaler Applikation eine signifikant geringere Ausbreitung in andere Gewebe aufwiesen⁴⁸.

Das immundominante Hämagglutinin des Vacciniavirus (HA) ist ein Glykoprotein, welches auf der Plasma Membran infizierter Zellen und in der Virus Membran extrazellulärer Virionen vorkommt⁴⁹. Es konnte gezeigt werden, dass Hämagglutinin die Bindung des Virus an seine Zielzelle begünstigt und gleichzeitig die Fusion infizierter Zellen verhindert⁵⁰. Eine Arbeit von Shida und Kollegen zeigte, dass die Inaktivierung des HA Gens zu einer geringeren Neurovirulenz und geringeren Läsionen bei einer intradermalen Immunisierung von Kaninchen führt⁴⁰. Des Weiteren konnten in verschiedenen Arbeiten regulatorische virale Gene identifiziert werden, die die Wirtsspezifität (*host range*) regulieren und somit die Replikation der Viren in definierten Zielzellen ermöglichen. Die Deletion von zwei ‚*host range* Genen‘ K1L und C7L vermindert die Fähigkeit des Vacciniavirus sich auf den meisten humanen Zellen zu vermehren⁵¹.

Die Attenuierung des gezielt hergestellten NYVAC Stammes wurde in verschiedenen Studien überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass (i) keine Verhärtungen oder Geschwürbildungen an der Hautstelle nach intradermaler Verabreichung in Kaninchen auftraten, (ii) eine schnelle Beseitigung des Virus an der intradermalen Immunisierungsstelle in der Kaninchenhaut stattfand, (iii) im Vergleich zum VACV nach intrakranieller Gabe eine stark reduzierte Virulenz in drei Wochen alten und in neugeborenen Mäusen auftrat, (iv) ein außerordentlich guter Rückgang der Pathogenität und eine fehlende Ausbreitung in immundefizienten Mäusen zu beobachten war, und (v) die Fähigkeit zur Replikation in den meisten humanen Zellen sehr stark reduziert werden konnte^{51,52,37}.

Durch die Deletion der beschriebenen und weiterer viraler Gene, die mit der Virulenz, der Pathogenese oder der Wirtsspezifität der Vacciniaviren in Verbindung stehen, wurde der hochattenuierte Vacciniavirus Vektor NYVAC generiert, welcher aufgrund seiner Attenuierung als viraler Vektor für Immunisierungen eingesetzt werden kann.

A.2 Stand der Vakzineentwicklung gegen das Humane Immundefizienzvirus Typ1 (HIV-1)

Aktuelle Zahlen der WHO (*world health organisation*) zeigen, dass derzeit weltweit ca. 34 Mio Menschen mit HIV infiziert sind. An den Folgen der erworbenen Immunschwächekrankheit (AIDS) erlagen im Jahr 2010 1,8 Mio Menschen. Gleichzeitig waren im selben Jahr 2,7 Mio HIV-Neuinfektionen zu verzeichnen (UNAIDS 2011).

Erstmals wurde die Immunschwächekrankheit im Jahre 1981 (*Center of Disease Control*, 1981) beschrieben, und die darauffolgende Identifizierung des Erregers HIV-1 gelang Luc Montagier und Françoise Barré-Sinoussi 1983^{53,54}. Zur Behandlung von HIV stehen momentan ausschließlich antiretrovirale Medikamente zur Verfügung, die trotz einer

deutlichen Verbesserung in den letzten Jahren eine Ausbreitung der HIV-Pandemie nicht verhindern können. Obwohl in den vergangenen 30 Jahren intensiv an der Entwicklung einer effektiven HIV-Vakzine gearbeitet wurde, steht bislang kein wirksamer Impfstoff gegen das Virus zur Verfügung.

In ersten Ansätzen wurde versucht neutralisierende Antikörper gegen das Hüllprotein Env (gp160) des HI-Virus zu generieren. Die große Variabilität des HI-Virus stellte hierbei jedoch ein Hindernis dar. Basierend auf dem Hüllprotein Env wurde HIV-1 in die drei Klassen M (*main*), O (*outlier*) und N (*non-main* oder *non-outlier*) unterteilt. Die am häufigsten auftretende Klasse M lässt sich weiterhin in neun Untereinheiten, die sogenannten *Clades*, einteilen (A, B, C, D, F, G, H, J und K). Diese *Clades* weisen zum einen untereinander eine hohe Variabilität z.B. in der Untereinheit gp120 des Hüllproteins gp160 auf⁵⁵, zum anderen kommt es, bei Patienten, die gleichzeitig mit mehreren unterschiedlichen Subtypen infiziert sind, im Laufe der Zeit zum Austausch genetischer Informationen zwischen den einzelnen *Clades*⁵⁶ und somit zum Auftreten chimärer Viren. Begünstigt durch die genetische Variabilität der Viren kommt es beim Auftreten eines Selektionsdrucks, z.B. ausgelöst durch die antivirale Immunreaktion des Wirts oder durch antiretrovirale Medikamente, im Verlauf einer HIV Infektion zur Bildung neuer HIV-Varianten (Quasispezies)⁵⁷⁻⁵⁹. Die genetische Vielfalt der HI-Viren resultiert dabei zum einen aus der hohen Fehlerrate der Reversen Transkriptase (RT)⁶⁰⁻⁶², und zum anderen aus der schnellen Vermehrung des Virus in einer sehr kurzen Zeit⁶³⁻⁶⁵.

Neben den genetischen Variationen im Virusgenom, welche eine nachhaltig wirksame Antikörperantwort erschweren, wird auch die Zugänglichkeit konservierter Epitope in den Untereinheiten gp120 und gp41 des Hüllproteins Env, durch eine N-terminale Glycosylierung^{66,67}, sowie eine durch Trimerisierung⁶⁸ oder CD4 Rezeptorbindung⁶⁹ ausgelöste Konformationsänderung, beeinträchtigt. Trotz vielversprechender Fortschritte stellt die hohe genetische und morphologische Variabilität des HI-Virus für die Entwicklung einer HIV-Vakzine, welche vor allem auf der Induktion breit-neutralisierender Antikörper beruht, immer noch eine große Hürde dar^{70,71}.

Für die Suche nach einer geeigneten und wirksamen HIV-Vakzine ist es wichtig zu verstehen, welche Bereiche des Immunsystems durch die eingesetzte Vakzine angesprochen werden, und welche immunologischen und genetischen Parameter dabei zu einem protektiven Effekt führen. Das Zusammenspiel beider Faktoren stellt die Korrelate einer schützenden Immunantwort dar⁷²⁻⁷⁴. Dabei induzieren verschiedene Vakzine-Kandidaten unterschiedliche Immunantworten. Lebend-attenuierte Viren und aufgereinigte synthetische Proteine vermitteln, ähnlich einer natürlichen Infektion, die Induktion neutralisierender Antikörper, jedoch sind synthetische Proteine im Gegensatz zu attenuierten Viren nicht in der Lage, zytotoxische CD8+ T-Lymphozyten (CTL) zu induzieren. Die

Verabreichung replikationsdefizienter viraler Vektoren alleine oder in Kombination mit einem DNA-Vektor führt hingegen in erster Linie zur Induktion von CTLs und CD4+ T-Zell Antworten, sind aber wenig effizient im Hervorrufen einer schützenden Antikörperantwort⁷². Diese Beispiele zeigen, dass nicht jede Vakzine in der Lage ist, sowohl gute humorale als auch effektive zelluläre Immunantworten zu generieren.

Aus Studien an Patienten, die den chronischen Verlauf einer HIV Infektion jahrelang ohne die Hilfe antiretroviraler Medikamente so gut kontrollieren können, dass ihre Viruslast im Blut dauerhaft unter der Nachweisgrenze von 50 Kopien HIV-RNA/ml Plasma liegt (*Elite Controller*)^{75,76}, oder an Personengruppe die durch eine ständige Exposition mit dem Virus einen Immunschutz entwickelten (z.B. Kohorten afrikanischer Prostituierten)^{77,78}, konnten jedoch einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden. So traten in den Kohorten afrikanischer Prostituierten sowohl HIV-spezifische zelluläre Immunantworten beruhend auf reaktiven CD8+ T-Zellen⁷⁹, als auch HIV-spezifische IgA-Antikörpertiter auf^{80,81}, welche somit durch den wiederholten Kontakt mit dem HI-Virus einen wirksamen humoralen und zellulären Immunschutz aufbauen. Auch bei einigen wenigen *Elite Controllern* konnten breit-neutralisierende Antikörper (bNAb) gefunden werden, die in der Lage sind eine Virämie effizient zu unterdrücken⁸²⁻⁸⁴. Eine Kombination dieser 'Breitneutralisierer' rief, durch eine passive Immunisierung im Makakenmodell, einen protektiven Schutz gegen die Infektion mit einem chimären SIV/HIV-Stamm (SHIV) hervor⁸⁵.

Obwohl breit-neutralisierenden Antikörpern bei der Verhinderung viraler Erkrankungen im Allgemeinen eine große Bedeutung beigemessen wird⁸⁶⁻⁸⁹, waren erste Ansätze, z.B. der Einsatz inaktivierter HIV-1 Partikel^{90,91} nur wenig erfolgreich. Diese inaktivierten HI-viralen Partikel konnten nur geringe Antikörpertiter erzielen, welche für einen protektiven Schutz gegen eine Virusinfektion im Affenmodell nicht ausreichend waren⁹². Auch die Applikation von rekombinanten Proteinen (gp120 oder gp160) schlug aufgrund einer fehlenden Protektivität, nach einer Infektion mit chimären Viren, in nicht-humanen Primaten fehl^{93,94}. Auch in einer klinischen Phase I Studie wurden HIV-1 negative Probanden mit einer Vakzine, basierend auf rekombinant hergestellten HIV-1 Hüllproteinen, immunisiert. Die verwendeten Impfstoffkandidaten wiesen *in vitro* bereits einen Schutz gegen HIV-1 Laborstämme homolog zum eingesetzten Immunogen auf, waren aber *in vivo* nicht in der Lage primäre HIV-1 Isolate zu neutralisieren⁹⁵. Der Fokus aktueller Studien zur Generierung breit-neutralisierender Antikörper liegt auf den konservierten Bereichen des HIV-1 Hüllproteins, wie z.B. der CD4 Bindestelle von gp120 oder auf schwer zugängliche Regionen von gp41. Hierbei stellen die Antikörper IgGb12 und 2G12 sowie 4E10 und 2F5 einen sehr guten Ansatz für die Weiterentwicklung bNAbs dar^{83,96-100}.

Ein weiterer Gesichtspunkt bei der Generierung einer effektiven HIV-Vakzine ist das Hervorrufen einer schützenden CTL (*cytotoxic T-Lymphocytes*) Immunantwort. CD8+ CTL,

meist gegen HIV-1 Epitope aus Gag und Pol gerichtet, sind in der Lage die Virusreplikation zu kontrollieren^{101,102}, jedoch wird die Effektivität der CTL Antwort durch den HLA-Genotyp des jeweiligen Patienten stark beeinflusst¹⁰³. Analysen der HLA-Typen bei *Elite Controllern* zeigten z.B. eine verbesserte Kontrolle der Viruslast wenn bestimmte HLA-B Allele bevorzugt wurden¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Eine protektive CTL Antwort kann somit nicht vor der Persistenz einer HIV Infektion schützen, ist aber in der Lage, die Infektion effizient zu kontrollieren. Untersuchungen an HIV-Infizierten zeigten dabei, dass bei dieser Art von protektiver Immunantwort die Qualität der induzierten T-Zell Antworten eine entscheidende Rolle spielt. So bestehen HIV-spezifische T-Zell Immunantworten in Personen mit einem nicht-progressiven Verlauf hauptsächlich aus langlebigen IFN γ und IL-2 produzierenden polyfunktionalen CD4+ T-Zellen und kurzlebigeren CD8+ T-Zellen^{72,107,108}.

Eine nicht-progressiv verlaufende HIV-1 Infektion ist somit unter anderem verbunden mit einer polyfunktionalen (IL-2 und IFN γ Produktion) CD4+ und CD8+ spezifischen zellulären Immunantwort^{108,109}. Somit sollte eine effektive Vakzine gegen HIV, welche sowohl die Viruslast unterdrückt als auch das Ausbreiten des Virus verhindert, in der Lage sein, eine schnelle, qualitativ gute und lang anhaltende HIV-spezifische B- und T-Zell Antwort hervorzurufen, welche sowohl systemisch als auch im mukosalen Gewebe auftritt^{110,111}.

Da trotz intensiver Forschung noch kein Impfstoff zur Verfügung steht, welcher effizient in der Lage ist breit-neutralisierende Antikörper zu induzieren, ist die Weiterentwicklung einer verbesserten T-Zell Vakzine, welche eine akute Infektion effizient kontrollieren kann, sehr wichtig.

A.3 Vektorsysteme und Vakzinierungsstrategien

A.3.1 Allgemein

Für die Entwicklung einer guten Vakzine gegen das Immunschwächevirus ist es nicht nur notwendig zu verstehen welche Art der Immunität durch die Applikation eines Antigens hervorgerufen wird, auch der Wahl eines geeigneten Vektorsystems kommt eine große Bedeutung zu. Je nach Vektorsystem kommt es zur Aktivierung unterschiedlicher Bereiche des Immunsystems.

Eine endogene Expression und proteasomale Prozessierung eines Antigens in der Zelle führt zur Präsentation relevanter Epitope auf MHC-Klasse-I Molekülen und somit zum Auslösen einer zellulären Immunantwort¹¹². Humorale Immunantworten werden dagegen in erster Linie durch die Präsentation eines exogen aufgenommenen und prozessierten Antigens auf MHC-Klasse-II Molekülen hervorgerufen^{113,114}.

Die proteasomale Prozessierung von Proteinen im Zytoplasma der Zelle spielt zum einen eine wichtige Rolle (i) beim Abbau falsch-gefalteter Proteine ¹¹⁵⁻¹¹⁷, (ii) bei der Kontrolle des Zellzyklus sowie (iii) beim Abbau extrazellulärer Proteine. Zum Anderen werden intrazelluläre Antigene im Proteasom degradiert und über die Proteine TAP1 und TAP2 (*Transporter associated with Antigen Processing*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und dort in einem mehrstufigen Prozess auf MHC-I Moleküle beladen, was als *direct-presentation* bezeichnet wird ^{118,119}. Durch das Auftreten zweier Mechanismen, der Cross-Präsentation (*cross-presentation*) und der Autophagie, kommt es in professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie den Dendritischen Zellen (DC) in manchen Fällen auch zur Präsentation exogen aufgenommener Antigene auf MHC-I und endogener Antigene auf MHC-II Molekülen ^{120,121}. Der auf der Zelloberfläche präsentierte MHC-Peptid-Komplex wird dann zusammen mit kostimulatorischen Signalen (CD80/CD86) im Falle von MHC-I vom T-Zell-Rezeptor einer zytotoxischen T-Zelle (CTL) erkannt, woraufhin diese aktiviert wird.

Die Verabreichung inaktiverter Erreger, rekombinanter Proteine oder Peptide, bei welchen das Antigen über Phagozytose in Antigen-präsentierende Zellen (APC) aufgenommen wird, führt somit in erster Linie zur Induktion einer humoralen Immunantwort. Zelluläre Immunantworten, die bei einer erfolgreichen HIV-Vakzine ebenfalls entscheidend sind, werden unter anderem durch die Gabe attenuierter HI-Viren induziert. Obwohl diese Viren auch in der Lage sind effektive mukosale und humorale Immunantworten zu generieren, werden sie aufgrund von Sicherheitsrisiken, wie mögliche Pathogenität oder Reversion zu virulenten Stämmen, als Vakzine-Kandidaten nicht verwendet.

Eine geeignete Alternative stellen rekombinante virale Vektorsysteme dar. Eine Vektor-Vakzine ist in der Lage die intrazelluläre Expression heterologer Antigene zu induzieren und so die Präsentation auf MHC-I Molekülen zur Generierung zytotoxischer T-Zell Antworten zu vermitteln ¹²². Des Weiteren rufen virale Vektoren auch Antikörper Antworten gegen die eingebrachten Fremdantigene hervor, die ebenfalls für eine effektive HIV-Vakzine wichtig sind ¹²³. Einige virale Vektorsysteme werden bereits, zum Teil in Kombination mit DNA-Vektoren, in präklinischen und klinischen Studien zur Austestung von HIV-Vakzineandidaten eingesetzt ¹²⁴⁻¹³¹.

A.3.2 Virale Vektoren

Viren sind evolutionär dazu in der Lage genetisches Material in eukaryotische Zellen zu transportieren. Ein viraler Vektor stellt deshalb einen geeigneten Überträger dar, um bestimmte Immunogene in die Wirtszelle einzuschleusen und deren Expression zu initiieren. Rekombinante Viren sind im Rahmen einer Vakzineentwicklung, aufgrund ihrer sehr effizienten und gerichtet ablaufenden Transduktionsprozesse, ideale Kandidaten für den heterologen Gentransfer ¹³². Bereits in den 70er Jahren verwendete Paul Berg, zur *in vitro*

Infektion von Affennierenzellen, ein modifiziertes SV40-Virus (*Simian-Virus*), welches die DNA des Bacteriophagen Lambda enthielt ¹³³.

Virale Vektoren weisen im Vergleich zu traditionellen Vakzinen einige interessante Vorteile auf. Zusätzlich zur Induktion von wirksamen Antikörper Antworten rufen sie wie bereits erwähnt CTL Antworten hervor, welche für die Kontrolle intrazellulärer Pathogene oder Tumoren äußerst wichtig sind, und durch den Einsatz von proteinbasierten Vakzinen nicht induziert werden können ¹²². Virale Vektoren, die für eine HIV-Vakzine eingesetzt werden, sollten dabei vor allem in der Lage sein Immunantworten gegen konservierte Epitope aus unterschiedlichen Virusstämmen zu generieren. Frühe genetische Studien an HIV Stämmen konnten bereits zeigen, dass Gag und Pol Proteine stärker konserviert sind als Env, und dass das Hüllprotein (Env) viele variable Bereiche enthält, in welchen sich aufgrund eines steigenden Selektionsdrucks verstärkt Mutationen bilden. Die Herstellung einer *Multi-Clade*-Vakzine, welche stark konservierte Bereiche der HIV-1 Konsensussequenz enthält, und im Makakenmodell als hoch immunogen getestet werden konnte, ist eine Möglichkeit um eine möglichst breite Immunantwort zu generieren ^{134,135}. Ein anderer Ansatz stellt das sogenannte Mosaik-Antigen-Design dar. Hierbei werden mit Hilfe eines *in silico* Algorithmus synthetische Immunogene hergestellt, die die genetischen Unterschiede diverser zirkulierender Virusisolate verbinden, und verglichen mit der Konsensussequenz zu einer Verbesserung der Breite und Qualität von CD8+ T-Zell Antworten führen ^{136,137}.

Zur Generierung rekombinanter Vektoren für den Einsatz als Vakzine wurden bereits einige Viren in Betracht gezogen, darunter Alphaviren (z.B. *Semliki forest virus*), Adeno-assoziierte Viren, das vesikuläre Stomatitis Virus, Masernviren, Polioviren oder das Hepatitis-B Virus ¹³². Die am häufigsten eingesetzten Vektoren sind derzeit jedoch der replikationsdefiziente adenovirale Vektor Ad5, die attenuierten Säuger-Pockenviren MVA (*Modified Vaccinia Ankara*) und NYVAC, sowie der attenuierte aviäre Pockenvirus ALVAC (*Canarypox-Virus*). Diese wurden bereits in mehreren präklinischen und klinischen Studien getestet ^{125,129-131,138}. Dabei sind verschiedene immunologische Faktoren ausschlaggebend dafür welcher Vektor für welche Fragestellung am besten geeignet ist. Da die Quantität der Antigene die Immunantwort beeinflussen könnte, erscheint die Effizienz mit welcher heterologe Antigene exprimiert werden wichtig. Darüber hinaus könnte die Art der infizierten und somit Antigen-produzierenden Zelle einen Einfluss auf die Beschaffenheit und die Stärke der Immunantwort haben. Für die Induktion einer lang anhaltenden Immunantwort könnte auch der Einsatz eines persistierenden Vektors (wie z.B. Herpesviren ¹³⁹) von Vorteil sein ¹²³. Auch wenn viele unterschiedliche Faktoren, welche im Augenblick keinesfalls vollständig verstanden sind, die Induktion einer optimalen Immunantwort beeinflussen, könnte die Austestung unterschiedlicher Vektor-Kombinationen in präklinischen Studien weiterhelfen.

Sowohl adenovirale als auch pockenviralen Vektoren besitzen zahlreiche Eigenschaften, die sie für eine Austestung als Vakzine besonders interessant machen.

So hat das Adenovirus Typ5 (Ad5) wie alle Adenoviren die Fähigkeit, sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu infizieren. Auch kann man Ad5 *in vitro* hochtitrig vermehren und eingebrachte Transgene werden *in vivo* in hohen Mengen in transduzierten Zellen exprimiert. Darüber hinaus erfüllen sie hohe Sicherheitsansprüche, da sie weder in das Wirtsgenom integrieren noch in nicht-komplementierenden Zellen replizieren können¹⁴⁰. Mit Ad5 infizierte Dendritische Zellen exprimieren vermehrt ko-stimulatorische Signale und rufen starke Zytokin- und Chemokin-Antworten hervor. Ad5 ist in der Lage DCs, welche als professionelle Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle in der Induktion spezifischer Immunantworten spielen zu infizieren und zu aktivieren. Somit kommt es zur Induktion einer guten Immunantwort gegen die über Ad eingebrachte Vakzine¹⁴¹. Ein Nachteil für die Verwendung Ad5-basierter Vektoren besteht jedoch in der hohen Prävalenz in der Bevölkerung¹⁴². Die Verwendung anderer Serotypen, welche im Menschen weniger häufig auftreten (wie Ad11, Ad26, Ad35 oder Ad49)¹⁴³⁻¹⁴⁶, nicht-humaner Adenovirusisolate z.B. aus Schimpansen (AdC)^{147,148} oder das Einfügen von Modifikationen in das Capsid von Ad5^{144,145} könnten ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Vektoren sein.

Pockenviren zeichnen sich so durch eine hohe Verpackungskapazität von bis zu 10 kb aus^{149,150}. In humanen Zellen ist die Replikation attenuierter Pockenviren (NYVAC oder MVA) stark eingeschränkt; in embryonalen Hühnerfibroblasten lassen sie sich jedoch, sehr einfach und kostengünstig, hochtitrig vermehren^{149,151}. Trotz der verminderten Virusreplikation in humanen und auch in vielen anderen Säugerzellen, vermitteln attenuierte pockenvirale Vektoren eine sehr starke Expression der eingebrachten Transgene und induzieren gute Immunantworten in Tier und Mensch¹⁵²⁻¹⁵⁵. Die Lokalisation und vollständige Replikation aller Pockenviren im Zytoplasma der infizierten Zelle vermindert weiterhin das Risiko der Integration der viralen DNA ins Genom der Wirtszelle¹⁵⁶. Pockenviren breiten sich im Wirt durch direkten Zell-zu-Zell Kontakt über *Actin Tails*, als freie infektiöse Virionen oder durch eine virusinduzierte Zellbeweglichkeit aus. Die attenuierten Formen MVA und NYVAC hingegen sind in den meisten Säugerzellen nicht mehr in der Lage infektiöse Nachkommenviren zu produzieren, wie eine Studie mit MVA und NYVAC, die ein rekombinantes Luciferase-Gen exprimieren, zeigt¹⁵⁷. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass rekombinante aviäre Pockenviren ebenso sicher sind, jedoch induzieren sie im Vergleich zu attenuierten Säugerpocken nur mäßige Antigen-spezifische zelluläre Immunantworten. Wie der Vergleich von Ad und MVA in einer Studie von Reyes-Sandoval und Kollegen zeigt¹⁵⁸, führt der Gebrauch unterschiedlicher Vektoren zur Ausprägung von Immunantworten, die sich in Stärke und Qualität stark unterscheiden.

Ein generelles Problem viraler Vektoren ist die Induktion einer Immunantwort gegen die viralen Proteine des Vektors (Vektorimmunität). Dies kann bereits bei der ersten Applikation des rekombinanten Virus zu einer Unterdrückung der Vakzine-spezifischen Immunantworten führen, da Immunogen-spezifische Epitope mit Vektor-spezifischen Epitopen um die Präsentation auf MHC-Molekülen konkurrieren¹⁵⁹. Bei einer weiteren Verabreichung der Vakzine in einem homologen *Prime/Boost*-Verfahren könnte dies zur Beeinträchtigung einer erneuten Antigenpräsentation, zur Unterdrückung zellulärer Immunantworten und zum Rückgang weiterer Vektor-induzierter, adjuvierender Entzündungsreaktionen führen¹⁶⁰. Generell versteht man unter einem homologen *Prime/Boost*-Verfahren die Applikation eines Impfstoffs als Grundimmunisierung (*Prime*) mit einer nachfolgenden Applikation des gleichen Impfstoffs als Auffrischimmunisierung (*Boost*), in einem festgelegten Zeitraum.

Die Nachteile der Vektorimmunität lassen sich durch die Verwendung eines heterologen *Prime/Boost*-Verfahrens beheben. Bei einer heterologen Immunisierung wird das gleiche Antigen ebenfalls in einem festgelegten Zeitraum mehrfach verabreicht, jedoch unter Verwendung unterschiedlicher Vektorsysteme oder verschiedener Verabreichungsformen¹⁶¹. Die Verwendung von DNA-Vektoren als Impfstoff für die Grundimmunisierung in einem heterologen *Prime/Boost* wurde bereits in einigen *in vivo* Studien getestet¹⁶².

A.3.3 DNA-Vakzine

Bei einer DNA-Vakzine handelt es sich um ein eukaryotisches Expressionsplasmid, welches für ein oder mehrere spezifische Antigene kodiert. Je nach Applikation solcher „nackten“ Plasmid-DNA *in vivo* wird diese von Muskel- oder Epithelzellen aufgenommen, und die Plasmid-kodierte Gensequenz wird exprimiert¹⁶³⁻¹⁶⁵. Da die Plasmide keinen in eukaryotischen Zellen funktionierenden Replikationsursprung (*origin of replication*) enthalten, kommt es trotz langanhaltender Persistenz und Expression der eingebrachten DNA nicht zur Replikation und in der Regel nicht zur Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Wirtszelle^{166,167}.

Obwohl die DNA von Muskelzellen aufgenommen und dort die Proteine exprimiert und prozessiert werden, bewirkt die Gabe einer DNA-Vakzine, welche das Influenza A Nukleoprotein kodiert, im Mausmodell die Induktion Nukleoprotein-spezifischer CTL Immunantworten, die bei *Challenge* mit einem heterologen Virus schützen¹⁶⁸. Der immunologische Mechanismus wurde erst verstanden, als man zeigen konnte, dass ein sogenanntes *cross-priming* stattfindet bei dem das in nicht-Antigen-präsentierenden Zellen produzierte Antigen auf professionelle APCs übertragen wird¹⁶⁹, und dass eine geringe Anzahl an APCs bei einer intramuskulären Immunisierung auch direkt infiziert werden können¹⁷⁰.

Ein anderer Mechanismus für die Induktion einer Immunantwort gegen Proteine die durch eine DNA-Vakzine induziert werden, ist die angeborene Immunantwort gegen das Plasmid selbst. Studien konnten zeigen, dass das Zumischen nicht-kodierender Plasmide zu Plasmiden, welche für ein Antigen kodieren, zu einer Verbesserung der Antigen-spezifischen Immunantworten führt ¹²³. Ein Grund hierfür könnte das Vorhandensein von CpG Motiven in der Plasmid-DNA sein. Diese stimulieren über den *Toll-like* Rezeptor 9 (TLR 9) das Immunsystem, was wiederum in einer Zunahme der Immunantwort gegen das auf dem Plasmid kodierten Antigens resultiert ^{171,172}.

Im Gegensatz zum viralen Vektorsystem kommt es bei einer DNA-Vakzine nicht zur Induktion von Vektorimmunität, da in den transfizierten Zellen nur das Vakzine-Protein exprimiert, und somit nur eine Immunantwort gegen die Vakzine generiert wird. In unterschiedlichen Kleintiermodellen wurde durch den Einsatz einer DNA-Vakzine eine protektive Immunantwort gegen eine Vielzahl viraler und auch bakterieller Pathogene erzielt ¹⁷³⁻¹⁷⁵. Des Weiteren konnte im Mausmodell eine effektive humorale und zelluläre Immunantwort gegen das HIV-1 Hüllprotein gp160 ¹⁷⁶ und gp120 ¹⁷⁷ induziert werden. Auch im Affenmodell konnte mit Hilfe einer DNA Immunisierung ein leichter Schutz gegen ein *Challenge* mit einem homologen HIV-Isolat des gleichen *Clades* erzielt werden ¹⁷⁸. Jedoch stehen die hohen Immunisierungs Dosen, welche im Affenmodell benötigt werden (im mg-Bereich), in keinem Verhältnis zu der lediglich moderaten Induktion zellulärer und humoraler Immunantworten, verglichen mit den Ergebnissen in der Maus ^{149,179,180}. Ein Grund für die marginalen Immunantworten könnte die schlechte Aufnahme der intramuskulär verabreichten DNA-Vakzine oder ein zu langsamer Transport der DNA in professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) sein. Auch die hohen DNA Mengen könnten bei einer Verabreichung im Menschen Probleme aufwerfen.

Aus diesem Grund wurden neue Methoden zur Applikation eines DNA-Vektors untersucht. Die Methode der *in vivo* Elektroporation erhöht die Aufnahme der DNA in die Zellen erheblich und führt dadurch zu einer erhöhten Proteinproduktion und einer gesteigerten Immunogenität ¹⁸¹. Die *in vivo* Elektroporation ist bereits mit guten Ergebnissen im Affenmodell getestet ¹⁸² und wird derzeit auf Sicherheit und Effizienz im humanen System untersucht ¹⁸³. Ein anderer Ansatz ist die Verpackung der DNA in oder auf Mikropartikel von 1-10 µm Größe, da diese effizienter in APCs aufgenommen werden können und gleichzeitig ein Schutz der DNA vor Degradation gewährleistet wird ¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Auch die Beladung der DNA auf Goldpartikel und die damit verbundene Verabreichung mittels „Gene-Gun“ führt zur besseren Aufnahme der DNA in verschiedene Antigen-präsentierende Zellen und in klinischen Studien zur Induktion guter Antikörper Antworten ¹⁸⁷.

A.3.4 heterologe *Prime/Boost* Immunisierungsstrategien

Für viele bereits bestehende Impfstoffe ist eine mehrfache Immunisierung nötig. So wird z.B. für einen ausreichenden Impfschutz gegen Diphtherie, Tetanus oder Pertussis eine viermalige Verabreichung der Vakzine innerhalb eines Zeitraums von einem Jahr benötigt. Diese homologen *Prime/Boost*-Verabreichungen werden unter anderem bei inaktivierten Vakzinen (z.B. Hepatitis A), rekombinanten Proteinen (Hepatitis B) oder bei Polysaccharid-Impfstoffen (*Haemophilus influenzae* Typ B) angewandt¹⁸⁸. Einige Studien zur Entwicklung neuer Impfstoffe zeigen jedoch, dass heterologe *Prime/Boost*-Verabreichungen deutlich effektiver sind. Eine heterologe *Prime/Boost*-Strategie beinhaltet das Induzieren einer ersten Immunantwort (*Prime*) gegen ein Antigen welches mittels eines Vektors eingebracht wurde, und das Verstärken dieser Antwort durch eine zweite Immunisierung (*Boost*) des gleichen Antigens mit Hilfe eines anderen Vektors¹⁶¹.

Ein Vorteil dieser Immunisierungsstrategie ist nicht nur die Steigerung der Antigen-spezifischen Immunantworten, auch die adjuvierenden und zum Teil synergistischen Eigenschaften der für den *Prime* und *Boost* verwendeten Vektorsysteme können zur Verbesserung der Immunantworten beitragen¹⁶⁰. In Zusammenhang mit der Entwicklung einer HIV-Vakzine zeigte sich bereits 1992 in nicht-humanen Primaten, welche mit einem rekombinanten Vacciniavirus (exprimiert SIVgp160) grundimmunisiert, und anschließend mit einem gp160 Protein ein zweites Mal immunisiert wurden, ein Schutz gegen das äquivalente SIV *Challenge* Virus¹⁸⁹. Bereits einige Jahre zuvor fand an der Pierre und Marie Curie Universität in Paris zur Austestung einer HIV-Vakzine ein Selbstversuch statt. Daniel Zagury immunisierte sich selbst mit einem rekombinanten Vacciniavirus, welches das HIV-1 Env enthielt und verabreichte sich danach eine zweite Immunisierung mit einem rekombinanten HIV Env Protein¹⁹⁰. Dabei zeigte sich bis zu einem Jahr nach Immunisierung eine nachweisbare Anzahl neutralisierender Antikörper gegen divergierende HIV-Stämme.

In den 90er Jahren kam dann ein neuer Ansatz hinzu. Im Kleintiermodell fand die DNA-Vakzine ein erfolgreiches Anwendungsgebiet. In humanen Studien zeigte sich jedoch, dass eine DNA-Vakzine alleine nicht ausreicht. Eine Kombination aus einer Grundimmunisierung mit einem DNA-Vektor und einer zweiten *Boost*-Immunisierung mit einem rekombinanten Protein oder einem viralen Vektor war hingegen ein vielversprechender Ansatz¹⁹¹. In Anlehnung an die Studien in welchen eine Kombination aus viralem Vektor und rekombinantem Protein verwendet wurden, konnten nun auch durch einen DNA-*Prime* und einen Protein-*Boost* gute Immunantworten im Kleintiermodell erzielt werden^{192,193}. Die Kombination aus einer DNA-Vakzine, die ein HIV-1 Env exprimiert, und einem rekombinanten Env Protein erzielte in Kaninchenseren positive neutralisierende Antikörpertiter gegen das schwer zu neutralisierende HIV-1 Isolat JR-FL^{194,195}. Durch die Verwendung multivalenter Env Antigene konnten mit einer DNA-*Prime*/Protein-*Boost*

Immunisierung außerdem cross-reaktive neutralisierende Antikörper gegen ein breites Spektrum an primären HIV-1 Isolaten generiert werden¹⁹⁶. Auch in nicht-humanen Primaten¹⁹⁷ und in humanen Studien¹⁹⁸ konnte die Gabe von DNA und anschließendem rekombinanten Protein erfolgreich getestet werden. Neben der Induktion bNAbs, zur Verhinderung der Ausbreitung und der Persistenz des Virus, ist die Generierung einer effektiven T-Zell Antwort, welche als erste Barriere bei einer akuten Infektion wirkt, ebenso wichtig.

Die Kombination aus einer DNA-Vakzine und einem viralen Vektor stellt derzeit, bei einer heterologen *Prime/Boost*-Verabreichung, die beste Strategie zur Induktion einer guten T-Zell vermittelten Immunantwort dar. In Studien an nicht-humanen Primaten konnte dies durch die Verabreichung unterschiedlicher viraler Vektoren wie z.B. Fowlpox-Vektoren¹⁹⁹ oder adenoviraler Vektoren^{200,201} bestätigt werden. Auch die Gabe einer heterologen *Prime/Boost* Vakzine bestehend aus einer DNA-Vakzine und einem rekombinanten viralen MVA-Vektor, welche beide für die gleichen SHIV Immunogene kodieren, konnte in Rhesus-Makaken einen protektiven Schutz gegen ein *Challenge* mit einem SHIV-Stamm erzielen²⁰².

Präklinische Studien zur Analyse der attenuierten pockenviralen Vektoren MVA und NYVAC, welche die HIV-Antigene *env*, *gag*, *pol* und *nef* (*Clade B* und *Clade C*) exprimieren, zeigen, dass beide viralen Vektoren im Mausmodell Antigen-spezifische humorale und zelluläre Immunantworten hervorrufen. Des Weiteren konnte in diesen und anderen Studien gezeigt werden, dass eine heterologe *Prime/Boost*-Strategie aus DNA-Vektor und MVA bzw. NYVAC die HIV-spezifischen Immunantworten zusätzlich verstärkt und hauptsächlich zur Induktion einer Th-1 Immunantwort führt^{125,126,131}. Die Verabreichung einer Kombination aus einem DNA-Vektor und einem viralen Vektor (MVA oder NYVAC), welche sowohl das Transgen *env* von HIV-1, als auch die Immunogene *gag*, *pol* und *nef* des SIV_{mac239}-Stamms kodieren, führt in Studien an nicht-humanen Primaten ebenfalls zur Induktion guter zellulärer Immunantworten. Die durch DNA in Kombination mit NYVAC hervorgerufenen Antworten waren hierbei hauptsächlich CD4+ T-Zellen wohingegen eine Verabreichung von DNA und MVA zur Induktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen führte. Jedoch waren Tiere aus beiden Gruppen (DNA/NYVAC vs. DNA/MVA) in der Lage nach einem *Challenge* mit einem SHIV-Virus die Infektion zu kontrollieren²⁰³. Außerdem konnten im Makakenmodell persistierende Antigen-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen mit einem *central-memory*- und einem *effector-memory*-Phänotyp, welche zusätzlich die immunstimulatorischen Zytokine IFN γ , IL-2 und TNF- α sezernieren, induziert werden. Dabei zeigte sich weiterhin, dass eine Kombination aus DNA und NYVAC sehr gute langanhaltende Antigen-spezifische Antworten induziert, dass diese jedoch deutlich häufiger gegen Env und weniger gegen Gag, Pol und Nef gerichtet sind¹³⁰.

Gute Immunisierungsergebnisse für heterologe *Prime/Boost*-Verabreichungen ergaben sich auch in humanen Studien. In Zusammenarbeit mit unserer Arbeitsgruppe führte Giuseppe Pantaleo in einer aktuellen Studie (EV02) Immunisierungen an vierzig HIV-negativen Probanden durch, um die Sicherheit sowie die Immunogenität von HIV-1 Vakzinekandidaten zu untersuchen²⁰⁴. Das für diese Studie verwendete HIV-1 Polyprotein (GagPolNef) sowie das Hüllprotein gp120 wurde von unserer Arbeitsgruppe entwickelt, synthetisch hergestellt und hinsichtlich maximaler Epitop-Präsentation optimiert. Unter anderem beeinflusst Nef in mit HIV-1 infizierten Zellen die Beladung und Präsentation von MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Zellen und führt somit zu einer verminderten Stimulation spezifischer T-Zellen^{205,206}. Um dies zu unterbinden wurde bei der Generierung des Polyproteins GagPolNef der N- und C-terminale Bereich im Nef-Leserahmen vertauscht, so dass eine Prozessierung der benötigten Epitope gewährleistet ist, aber kein funktionelles Nef hergestellt werden kann. Als Vektoren für die Vakzine wurden DNA-Plasmide, die ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe synthetisiert worden waren, bzw. entsprechende rekombinante NYVAC-Vektoren eingesetzt. Die Studie ergab, dass 90 % aller Probanden, die mit einem heterologen *Prime/Boost* aus DNA und NYVAC behandelt worden waren, Antigen-spezifische T-Zell Immunantworten entwickelten. Dagegen waren es in der Gruppe die einen homologen *Prime/Boost* mit NYVAC erhalten hatten lediglich 30 %. Genauere Untersuchungen ergaben, dass die induzierten T-Zell Antworten gegen eine breite Anzahl an HIV-Epitopen gerichtet und noch 72 Wochen nach der letzten Immunisierung nachweisbar waren. Der Nachweis der Produktion verschiedener Zytokine, wie z.B. IFN γ und IL-2, bestätigte weiterhin die Polyfunktionalität der induzierten CD4+ und CD8+ T-Zellen¹²⁹.

In einer anderen klinischen Phase III Studie (RV-144), dem sogenannten Thai-Trial, konnte durch die primäre Gabe des pockenviralen Vektors ALVAC (enthält die HIV-1 Immunogene gp120, *gag* und Protease) sowie einer zweiten Immunisierung mit einem rekombinanten gp120-Protein (AIDSVAX B/E) in ca. 31 % aller geimpften Probanden ein Schutz gegen eine HIV Infektion erzielt werden¹³⁸. Obwohl kein Einfluss der Vakzine auf die Viruslast oder die Verbesserung der CD4+ Zellzahl in HIV infizierten Probanden nachgewiesen wurde, konnte diese klinische Studie zum ersten Mal zeigen, dass eine HIV-Vakzine in der Lage ist, vor einer Infektion mit dem HI-Virus zu schützen.

Ein Problem bei der Verwendung einiger viraler Vektoren stellen in der Bevölkerung vorkommende präexistierende Immunantworten gegen die verwendeten Vektoren dar. Individuen die zu einem früheren Zeitpunkt mit dem Virus in Kontakt gekommen sind, könnten so unter Umständen schlechtere Immunantworten gegen die eingebrachte Vakzine induzieren. Im September 2007 wurde aus diesem Grund die klinische Studie STEP wegen Unwirksamkeit der verwendeten Vakzine gestoppt²⁰⁷. Zur Austestung der Wirksamkeit einer adenoviralen-Vakzine wurden Probanden mit einem replikations-defizienten Ad5, welcher die

HI-viralen Proteine Gag, Pol und Nef exprimiert, durch eine dreifache Verabreichung immunisiert. Im Verlauf der Studie zeigte sich weder ein Schutz der Vakzine vor einer HIV Infektion noch konnte der chronische Verlauf der Erkrankung beeinflusst werden. Da sich in der Vakzine-Gruppe mehr männliche Probanden mit HIV infizierten als in der entsprechenden Placebo-Gruppe, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Verabreichung der Vakzine in männlichen Probanden mit einer präexistierenden Immunität gegen Ad5 eine HIV Infektion sogar begünstigt wurde²⁰⁸. Die Frage ob sich präexistierende Immunantworten auf eine erhöhte HIV-Suszeptibilität nach Vakzinierung auswirken, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt^{209,210}. Fest steht jedoch, dass sowohl der Thai-Trial als auch die EV02 Studie wichtige Erkenntnisse bei der Entwicklung einer erfolgreichen HIV-Vakzine erzielen konnten.

A.4 Zielsetzung

Ein auf dem *New York Vacciniavirus* (NYVAC) basierender Vektor, der die HIV-Immunogene GagPolNef (GPN) und gp120 enthält (NYVAC-C), wurde im Rahmen einer klinischen Phase I/II Studie bereits als Vakzine-Kandidat getestet. Dabei induzierte die Applikation von NYVAC-C hohe gp120-spezifische, jedoch nur schwache T-Zell Antworten gegen Gag, Pol und Nef. Die Verabreichung einer die gleichen Antigene kodierenden DNA-Vakzine (DNA-C) in Kombination mit NYVAC-C in einem heterologen *Prime/Boost*-Schema induzierte deutlich stärkere zelluläre Immunantworten, wobei wiederum die gp120-spezifischen T-Zellen dominierten. Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten wurden vermutlich aufgrund der niedrigen Expression des artifiziellen GagPolNef Polyproteins nur sehr schwach induziert. Durch das Einfügen von Modifikationen in das Transgen GPN konnte bereits in einer vorangegangenen Arbeit eine Verbesserung der Proteinexpression erreicht werden. Es konnte weiterhin eine Steigerung der Induktion Gag- und Pol-spezifischer CTL-Antworten durch die Applikation dieser verbesserten Transgene mittels einer DNA-Vakzine gezeigt werden. Die Co-Verabreichung von Env führte dabei jedoch zur Unterdrückung dieser verbesserten Gag-spezifischen zellulären Immunantworten.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte der Mechanismus, welcher dem negativen Effekt von Env zu Grunde liegt, untersucht werden. Hierzu sollten neue Transgenvarianten hergestellt und hinsichtlich der Transgenexpression *in vitro* sowie der Induktion Transgen-spezifischer T-Zell Antworten *in vivo* untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit war weiterhin die Weiterentwicklung pockenviraler Vakzinekandidaten zur weiteren Verbesserung der Induktion Gag- und Pol-spezifischer T-Zell Antworten. Dazu sollten rekombinante Viren generiert werden, die unter anderem die hinsichtlich einer gesteigerten Expression von Gag, Pol und Nef verbesserten Transgene enthalten. Neben

der Untersuchung der Transgenexpression in infizierten Zellen sollte das Potential zur Induktion Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten im BALB/c Mausmodell untersucht werden.

Abschließend lag ein Schwerpunkt der Arbeit auf der Austestung unterschiedlicher Kombinationen der modifizierten DNA und NYVAC Vakzinekomponenten im heterologen *Prime/Boost*. Es sollte dabei jeweils der Einfluss des optimierten DNA-*Prime* und NYVAC-*Boost* auf die Verbesserung der Induktion Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten getestet und die vielversprechendste Kombination aus DNA und NYVAC untersucht werden.

B. Material und Methoden

B.1 Material

B.1.1 Zellen

B.1.1.1 Prokaryotische Zellen

Zur Klonierung rekombinanter DNA und zur Amplifikation von Plasmiden wurden die Bakterienstämme DH5 α , DH10B oder Omnimax verwendet.

Tab. B-1: Übersicht der verwendeten prokaryotischen Zellen

Bezeichnung	Genotyp
DH5 α	F ⁻ <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR1</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> ²¹¹
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara,leu</i>)7649 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rspl</i> <i>nupG</i> (Gibco BRL)
Omnimax	F' { <i>proAB+</i> <i>lacIq</i> <i>lacZ</i> Δ M15 Tn10(TetR) Δ (<i>ccdAB</i>)} <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80(<i>lacZ</i>) Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>supE44</i> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i> <i>tonA</i> <i>panD</i> (Invitrogen)

B.1.1.2 Eukaryotische Zellen

Tab. B-2: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zellen

Bezeichnung	Kurzbeschreibung
BHK-21	Hamster-Nieren-Zelllinie (ATCC: CCL-10) ²¹²
DF1	Hühner-Fibroblasten-Zelllinie (ATCC: CCL-1120) ²¹³
HEK293T	Humane AD5/SV40 (T)-transformierte Nierenepithelzellen (ATCC: CRL-11268)

B.1.2 Virus

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren basieren auf NYVAC (*New York Vacciniavirus*), einem hoch-attenuierten Vacciniavirus, welches vom Vaccinia Stamm Kopenhagen durch die gezielte Deletion von 18 offenen Leserahmen (*open reading frames*; ORFs) im viralen Genom abgeleitet wurde³⁷.

Durch das Einbringen von HIV-1 Clade C gp120 und einem artifiziellen Polyprotein GagPolNef von HIV-1 in den Locus des nicht-essentiellen Gens der Thymidinkinase (TK),

wurde unter der Leitung der Firma Aventis Pasteur NYVAC-HIV-C (2010) generiert welches bereits in klinischen Studien getestet wurde^{128,129} und im weitem als NYVAC-C bezeichnet wird.

B.1.3 DNA

B.1.3.1 Oligonukleotide

Tab. B-3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
Primer zur Überprüfung der Insertion der Transgene		
VV_Copenhagen_pcr	CGTCTGATTTGGTAACTCGAG	NYVAC spezifisch; PCR Primer für alle Transgene
VV_Gag_pcr	AGTGTTTCTTGCCGCCAGGC	Gag spezifisch; PCR Primer für Gag und GPN
VV_PN_pcr	CTGCTCGCTGCTGAACTCC	Pol spezifisch; PCR Primer für PolNef
VV-Env_pcr	TAGTACACGGTCACCCACAG	Env spezifisch; PCR Primer für gp120
Primer zum Überprüfung der Deletion von GFP und LacZ		
VV_Copenhagen_pcr	CGTCTGATTTGGTAACTCGAG	NYVAC spezifisch; PCR Primer Überprüfung Deletion GFP
GFP_rev	GATCTTGAAGTTCACCTTGATG	GFP spezifisch; PCR Primer Überprüfung Deletion GFP
LacZ_fwd	GGATGACAACTCAAACATCTGC	NYVAC spezifisch (Ende LacZ); PCR Primer Überprüfung Deletion LacZ
LacZ_rev	GAATTCCGGCCGCCTAATT	NYVAC spezifisch (Start LacZ); PCR Primer Überprüfung Deletion LacZ

B.1.3.2 Vektoren**Tab. B-4: Übersicht der verwendeten Plasmide**

Bezeichnung	Quelle
pcDNA3.1(+)	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen)
pLZAW1	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Sanofi Pasteur)

B.1.4 Antikörper und Peptide**B.1.4.1 Primärantikörper****Tab. B-5: Übersicht der verwendeten Primärantikörper**

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Beschreibung
Anti-HIV-1 p24-PE (KC57-RD1)	Beckman Coulter	1:1.000 (FACS)	Maus, monoklonal, Erkennung von HIV-1 Kapsidprotein (p24/55 C/B)
HGN194-Alexa 488		1:1.000 (FACS)	Human, monoklonal, Erkennung der V3 Region im HIV-1 Hüllprotein (gp120)
CB-4/1	Charite Berlin / Prof. Dr. W. Höhne	1:1.000 (1 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Maus, monoklonal, Erkennung HIV-1 C Clade Kapsidprotein (p24)
MH23	NIBSC, Mark Hassall	1:1.000 (1 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Maus, monoklonal, Erkennung von HIV-CN54/96ZM651 Hüllprotein (gp140)
5B2B2	NIBSC, Mark Hassall	1:400 (1 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Maus, monoklonal, Erkennung HIV-1 RT
Anti-Vaccinia (521)	Uni-Klinikum Regensburg / Dr. J. Köstler	1:4.000 (1 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Kaninchen, polyklonales Serum, Erkennung Vacciniavirus
Anti-Maus CD16/32	BD Pharmingen	1:100 (FACS)	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus Fc-Rezeptoren (CD16/CD32)

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Maus CD8a- APC (Ly-2)	BD Pharmingen	1:200 (FACS)	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus CD8 Oberflächenrezeptoren
Anti-Maus CD4- FITC	BD Pharmingen	1:200 (FACS)	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus CD4 Oberflächenrezeptoren
Anti-Maus IFN γ - PE	BD Pharmingen	1:200 (FACS)	Ratte, monoklonal, Erkennung von Maus IFN γ
Anti- β -Aktin (AC-15)	Sigma	1:2000 (WB)	Maus, monoklonal, Erkennung von β -Aktin

B.1.4.2 Sekundärantikörper

Tab. B-6: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Verdünnung	Beschreibung
Anti-Maus-IgG (H+L)-HRP	Dianova	1:10.000 (3 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Ziege, polyklonal, Erkennung von Maus IgG
Anti-Kaninchen- IgG (H+L)-HRP	Thermo Scientific	1:5.000 (1 % Magermilchpulver) (Western-Blot)	Ziege, polyklonal, Erkennung von Kaninchen IgG

B.1.4.3 Peptide

Die HIV-1 spezifischen, murinen MHC-Klasse-I restringierten Peptide (vgl. Tabelle B-7) wurden für das Auslesen der zellulären Immunantworten in BALB/c Mausstudien verwendet. Die lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-grade DMSO gelöst (10 mM) und bei -20 °C gelagert.

Tab. B-7: Übersicht der verwendeten Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Beschreibung	Hersteller
A9I	AMQILKDTI	CN54-Gag (p24) spezifisches 9-mer Peptid ²¹⁴	Biosyntan
V11V	VPADPNPQEMV	CN54-gp12 spezifisches 11-mer Peptid ¹³¹	Biosyntan
L9I	LVGPTPVNI	CN54-Pol spezifisches 9-mer Peptid ¹³¹	Biosyntan

B.1.5 Größen- und Molekulargewichtstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen mittels Gelelektrophorese wurde der 100 bp DNA Marker (NEB) oder der 1 kb DNA Marker (NEB) verwendet.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde der *Precision Prestained Protein Standard* (BioRad) verwendet.

B.1.6 Kommerzielle Kits

Tab. B-8: Übersicht der verwendeten kommerziellen Kits

Produkt	Firma
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
<i>QIAGEN Plasmid Maxi / Midi Kit</i>	Qiagen
<i>EndoFree Plasmid Mega Kit</i>	Qiagen
Limulus Amebocyte Lysate QCL-1000	Cambrex

B.1.7 Reagenzien

B.1.7.1 Anzuchtmedien

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Anzucht von Bakterien in *Luria Bertani* (LB-) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten.

B.1.7.2 *Kulturmedien und Puffer*

Die verwendeten Kulturmedien und Puffer sind unter den jeweils beschriebenen Methoden vermerkt.

B.1.8 *Verbrauchsmaterial*

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Plastikmaterialien von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen. Für Restriktionsendonukleasen und übrige Enzyme wurden Produkte der Firma New England Biolabs verwendet.

B.1.9 *Versuchstiere*

Die Versuchstiere (weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrI (H-2^d)) wurden von der Firma Janvier aus Frankreich bezogen.

B.2 *Methoden*

B.2.1 *Molekularbiologische Arbeitstechniken*

B.2.1.1 Klonierung

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für alle Klonierungen in *Escherichia coli* (*E. coli*) Standardmethoden angewendet²¹⁵. Alle Klonierungen wurden mittels DNA-Sequenzierung, durchgeführt bei der Firma Geneart (Life Technologies, Regensburg), nach der Methode von Sanger²¹⁶ überprüft.

B.2.1.2 DNA-Aufreinigung und Analyse

B.2.1.2.1 Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus einem Kulturvolumen bis 5 ml wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Schnelllyse präpariert²¹⁵. Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen erfolgte über Anionenaustauschersäulen *Qiagen-tip* 100 oder *Qiagen-tip* 500 (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers.

Zur Vermeidung von Kontaminationen durch immunmodulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), wurde die Präparation von Plasmid-DNA zur Applikation in Mäusen in einem größeren Maßstab unter Verwendung des *EndoFree Plasmid Mega DNA preparations-Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Plasmid-DNA für *in vivo* Anwendungen wurde in sterilem PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA erfolgte mit einem NanoDrop®-ND-1000 Spektrophotometer (PeqLab). Die DNA Konzentration wird hierbei durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Zur weiteren Analyse wurde je 1 µg DNA mit Hilfe von 10 U geeigneter Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers spezifisch geschnitten, mit 6x DNA-Auftragspuffer (0,001 % (w/v) Bromphenolblau; 0,001 % (w/v) Xylencyanol; 60 mM EDTA; 36 % (v/v) Glycerin) versetzt und mittels Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen TBE-Agarosegel analysiert (TBE-Puffer: 8,5 mM Tris; 89 mM Borsäure; 0,47 mM EDTA; mit 0,5-1 % Agarose und 50 ng/mL Ethidiumbromid).

Um Kontaminationen durch Lipopolysaccharide auszuschließen, wurde die aufgereinigte DNA mittels des *Limulus Amebocyte Lysate* Tests nach Angaben des Herstellers auf ihren Endotoxingehalt hin untersucht.

B.2.1.2.2 Genomische DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus infizierten Zellen wurde mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde ebenfalls mit Hilfe des NanoDrop®-ND-1000 Spektrophotometers (PeqLab) bestimmt. Für anschließende PCR-Applikationen (B.2.1.3) wurden 100 ng DNA eingesetzt.

B.2.1.3 PCR-Analyse

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Polymerase-Kettenreaktion²¹⁷. Soweit nicht anders angegeben, erfolgte die PCR-Analyse unter Standardbedingungen (primäre Denaturierung 98 °C, 5 min; [Denaturierung 98 °C, 10 s; Annealing 65 °C, 30 s; Extension 72 °C, 30 s/1 kb] 30 Zyklen; finale Elongation 72 °C 5 min) unter Verwendung der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Finland). Die Sequenzen der als Primer verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle B-3 aufgelistet.

B.2.1.4 Herstellung rekombinanter NYVACs

B.2.1.4.1 Herstellung der Transferkonstrukte zur Integration eines Transgens in den pockenviralen Vektor NYVAC

Zum Einbringen von Transgensequenzen in das NYVAC Genom wurde der gewünschte Leserahmen über Restriktionsschnittstellen in den Transfervektor pLZAW1 (zur Verfügung gestellt von Aventis Pasteur) kloniert (B. 2.1.1; Übersicht pLZAW1-Konstrukte: Tabelle B-9). Der pLZAW1 Vektor enthält, flankiert von homologen Sequenzen, das zur Selektion benötigte LacZ-Gen, ein Gen für die β -Galactosidase, welches nach Zugabe des Substrats *Blue Gal* zur Blau-Weiß-Selektion von Kolonien dient. Aufgrund der vollständigen Replikation des NYVAC Virus im Zytoplasma der Zelle, enthält der pLZAW1 Vektor, zur korrekten

Transkription des Transgens und des Reportergens LacZ, Vacciniavirus-spezifische Promotoren.

Zur Überprüfung des Transferkonstrukts wurden 1 µg DNA mit Hilfe von 10 U geeigneter Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers spezifisch geschnitten, mit 6x DNA-Auftragspuffer (0,001 % (w/v) Bromphenolblau; 0,001 % (w/v) Xylencyanol; 60 mM EDTA; 36 % (v/v) Glycerin) versetzt und mittels Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen TBE-Agarosegel analysiert (TBE-Puffer: 8,5 mM Tris; 89 mM Borsäure; 0,47 mM EDTA; mit 0,5-1 % Agarose und 50 ng/mL Ethidiumbromid).

Das Transferkonstrukt enthält neben der Expressionskassette für das gewünschte Transgen (E/L Promotor; Transgen-Leserahmen) auch Bereiche, die zur NYVAC-Sequenz homolog sind und der gerichteten Integration des Transferkonstrukts während der ersten homologen Rekombination dienen. Eine Ampicillinresistenz-Kassette (Amp.) dient der Selektion positiver Klone, und interne homologe Bereiche (linker Arm) ermöglichen die rückstandsfreie Ausrekombination des Reportergens LacZ während der zweiten homologen Rekombination (Schemadarstellung pLZAW1-Konstrukt: Abb. B-1).

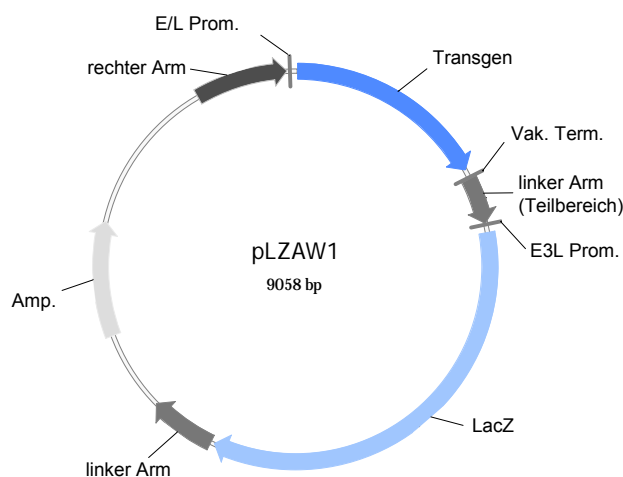


Abb. B-1: Schematische Darstellung des Transferkonstrukts pLZAW1

Rechter Arm, linker Arm = homologe Bereiche zur Integration des Transgens in das NYVAC Genom

Linker Arm (Teilbereich) = homologer Bereich zur Entfernung des Reportergens LacZ

LacZ = LacZ-Gen (codiert für das Enzym β -Galactosidase)

E/L Prom. = early/late Promotor Vaccinia

E3L Prom. = E3L Promotor Vaccinia

Vak. Term. = Vaccinia Terminationssequenz

Amp. = Ampicillinresistenz-Kassette

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. B-9) sind alle hergestellten pLZAW1-Transferkonstrukte mit der Bezeichnung des Konstrukts, den zur Klonierung verwendeten Restriktionschnittstellen und einer kurzen, zusammenfassenden Beschreibung des eingebrachten Transgens aufgelistet.

Tab. B-9: Übersicht hergestellte pLZAW1-Transferkonstrukte

Transferkonstrukt	Schnittstellen	Beschreibung Transgen
pLZAW-1_GFP	XhoI und PacI	GFP (grün fluoreszierendes Protein)
pLZAW-1 ^M Gag	XhoI und PacI	Gag (Gruppenspezifisches Antigen; HIV-1 Clade C, 97CN001), <i>budding</i> kompetent
pLZAW-1 ^{ΔM} Gag	XhoI und PacI	Gag (Gruppenspezifisches Antigen; HIV-1 Clade C, 97CN001), nicht <i>budding</i> kompetent
pLZAW-1 ^{ΔM} GPN	XhoI und PacI	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), nicht <i>budding</i> kompetent, kein viraler <i>Frame Shift</i>
pLZAW-1 ^{ΔM} G ^{FS} PN	XhoI und PacI	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), nicht <i>budding</i> kompetent, viraler <i>Frame Shift</i> (95 % Gag / 5 % GPN)
pLZAW-1 ^M G ^{FS} PN	XhoI und PacI	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), <i>budding</i> kompetent, viraler <i>Frame Shift</i> (95 % Gag / 5 % GPN)
pLZAW-1_PN	XhoI und PacI	PolNef (Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, CN54)
pLZAW-1_gp120	XhoI und PacI	gp120 (Teil des Hüllproteins Env; sezerniert; HIV-1 Clade C, CN54)

^M = Myristoylierungsstelle

^{ΔM} = deletierte Myristoylierungsstelle

^{FS} = ribosomaler *Frame Shift* (HIV-1)

B.2.1.4.2 Einbringen des Transgens in den pockenviralen Vektor (1. homologe Rekombination)

Unter Verwendung des Transferkonstrukts pLZAW1-GFP (Tab. B-9) wurde im ersten Schritt ein NYVAC-GFP generiert, welches durch das Einfügen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) eine visuelle Kontrolle für weitere Rekombinationsschritte bietet, und im Folgenden als Wildtypvirus verwendet wird. Zur Integration des Transgens in das NYVAC Genom wurden BHK-21 Zellen mit NYVAC-GFP infiziert und im Anschluss daran mit dem gewünschten Transferkonstrukt transfiziert (B.2.3.5.1). Über die im pLZAW1 Vektor integrierten homologen Bereiche kommt es zu einer gerichteten, beliebig häufig stattfindenden Integration der

Transgene. Die korrekte Integration wurde mittels PCR (B.2.1.3) und Western-Blot Analyse (B.2.2.3 und B.2.2.4) überprüft.

B.2.1.4.3 *Entfernen des Reportergens LacZ aus dem pockenviralen Vektor (2. homologe Rekombination)*

Zur Entfernung des Reportergens LacZ erfolgte die Aufreinigung rekombinanter Viren unter Verwendung eines *Plaque Assay* (B.2.3.5.2). Diese Aufreinigungsrunden wurden so lange wiederholt bis über die integrierten homologen Bereiche eine Ausrekombination des Reportergens stattfand. Alle Aufreinigungsschritte wurde mittels PCR (B.2.1.3) und Western-Blot Analyse (B.2.2.3 und B.2.2.4) überprüft.

B.2.2 Proteinbiochemische Methoden

B.2.2.1 *Trichloressigsäure (TCA)-Aceton Fällung*

Die Kulturüberstände von transfizierten bzw. infizierten Zellen wurden wie unter B.2.3.3 beschrieben abgenommen und verarbeitet. Zu fällende Proben wurden mit einem hundertstel Volumen 2 % (w/v) Na-Desoxycholat versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von einem zehntel Volumen 100 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA). Die Zellen wurden daraufhin für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 20.000 xg und 4 °C 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen (20.000 xg; 4 °C; 10 min) und ca. 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Für die anschließende Analyse im Western-Blot wurden die gefällten Proteine in einem geeigneten Volumen aufgenommen und mit der entsprechenden Menge eines fünffach konzentrierten SDS Probenpuffers (B.2.2.3) versetzt. Im Falle einer Gelbfärbung des Puffers (zu niedriger pH) wurde der pH durch Zugabe von 1 M NaOH neutralisiert.

B.2.2.2 *Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den aufbereiteten Proteinproben erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) und wurde unter Verwendung des *BioRad Protein Assay* Reagenz (BioRad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard diente stets eine BSA-Verdünnungsreihe.

B.2.2.3 *SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)*

Für die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht mittels SDS-PAGE²¹⁸ wurden definierte Mengen (50-100 µg Gesamtprotein) bzw. geeignete Mengen des gefällten Kulturüberstands der zu untersuchenden Proben mit fünffach konzentriertem SDS Probenpuffer (62,5 mM Tris; 1 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,5 mM EDTA;

5 % (v/v) Glycerin; 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Als Standard diente der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Je nach Auftrennungsbereich wurden unterschiedlich konzentrierte Acrylamidgele verwendet, die nach der Elektrophorese einer Western-Blot Analyse (B.2.2.4) unterzogen wurden.

B.2.2.4 Western-Blot Analyse

Über SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden im *Semi-Dry-Verfahren*^{215,219} unter Verwendung einer *BlueFlash Blotting-Apparatur* (Serva) nach Herstellerangaben aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Membran (Porengröße 0,45 µm) (Schleicher und Schuell) transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in TTBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% Tween-20) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver geschüttelt. Nach 1 h Inkubation bei Raumtemperatur mit einem spezifischen Primärantikörper (verdünnt in TTBS) (Tab. B-5) wurde dreimal mit TTBS (10 min; Raumtemperatur) gewaschen. Mit dem entsprechenden *Horseradish Peroxidase* (HRP)-gekoppelten (Tab. B-6) Sekundärantikörper, wurde anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen mit TTBS wurden die Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran mit Hilfe des *SuperSignal West Femto* Substrates (Thermo Fisher Scientific) im Geldokumentationssystem *Chemilux Imager* (Intas) detektiert.

B.2.3 Zellbiologie

B.2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kompletmedium kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zelllinien im Verhältnis 1:10 subkultiviert.

Tab. B-10: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien

Kompletmedium	Zellen
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM, Invitrogen), 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum ¹ (FKS, Invitrogen), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (PAN Biotech)	HEK293T, DF1, BHK-21
UC Medium (Lonza), 100 µg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (PAN Biotech), 20 mM HEPES, 50 µM β-Mercaptoethanol, 1 % Glutamin (PAN Biotech)	primäre Maussplenozyten

¹Die Inaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte für 30 min bei 56 °C

B.2.3.2 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mit Hilfe von jetPEI™ (Polyethylenimin, PEI) (PeqLab). Hierfür wurde ca. 16 h vor der Transfektion eine geeignete Menge an Zellen in 6-Napf-Platten (Ø 3 cm) ausgesät. Die zu ca. 80 % konfluenten Zellen wurden anschließend mit 3 µg DNA nach Herstellerangaben transfiziert, Zellen und Zellüberstände nach 24 h bzw. 48 h geerntet und, wie unter B.2.3.3 beschrieben, weiter behandelt. Für kleinere und größere Ansätze wurde die Menge an Zellen, DNA und jetPEI proportional zur Fläche des verwendeten Kulturgefäßes angepasst.

B.2.3.3 Ernte von Zellen und Überständen für analytische Zwecke

Für Analysen im Western-Blot wurden Zellen und Kulturüberstände 48 h nach Transfektion (B.2.3.2) bzw. Infektion (B.2.3.5.3) abgenommen und bei 300 xg für 5 min und 4 °C pelletiert. Die dabei gewonnen Überstände wurden bis zur weiteren Verwendung (B.2.2.1) bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden einmal mit kaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) gewaschen (300 xg; 5 min; 4 °C) und 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-40; 0,5 % (w/v) Na-Deoxycholat + 1 Tablette Proteaseinhibitor/ 15 mL (Complete™; Roche)) aufgenommen. Nach 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen einmal für 30 s sonifiziert, 5 min bei 16.500 xg zentrifugiert, die Überstände in frische Reaktionsgefäße überführt und ebenfalls bis zur weiteren Verwendung (B.2.2.3) bei -20 °C gelagert. Für die Analyse im Durchflusszytometer (FACS) wurden HEK293T Zellen 24 h nach Transfektion mit dem im Kulturgefäß befindlichen Medium abgespült, 5 min bei 300 xg pelletiert und in 1 ml FACS-Puffer (PBS; 1 % FKS; 1 g/l NaN₃) aufgenommen. Nach erneutem Waschen mit FACS-Puffer folgte die unter B.2.3.4 beschriebene Färbung mit spezifischen Antikörpern.

B.2.3.4 FACS-Analyse

Der intrazelluläre Nachweis von Proteinen erfolgte mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS). Hierfür wurden, wie unter B.2.3.3 beschrieben, zweimal mit FACS-Puffer gewaschene Zellen zunächst für 20 min bei 4 °C mit *Cytofix/Cytoperm* (4 % (w/v) PFA in PBS; 1 % (w/v) Saponin) behandelt. Nach zweimaligem Waschen mit dem Puffer *Perm/Wash* (PBS; 0,1 % (w/v) Saponin) wurden die Zellen mit einem in 100 µl *Perm/Wash* verdünnten Antikörper (Tabelle B-5) für 25 min gefärbt, erneut zweimal gewaschen und in einem geeigneten Volumen FACS-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte an einem FACSCanto II (BD Biosciences), wobei innerhalb der ausgewählten Population 10.000 Zellen gemessen wurden. Die resultierenden Daten wurden mit Hilfe des Programms FACSDiva ausgewertet.

B.2.3.5 Arbeitstechniken mit Viren

B.2.3.5.1 Einbringen der Transgene mittels In-vitro Rekombination (IVR)

Zur Herstellung infektiöser rekombinanter NYVACs wurden ca. 16 h vor Infektion 1×10^6 BHK-21 Zellen in Kulturgefäßen (Ø 3,5 cm) ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit NYVAC-GFP mit verschiedenen MOI (*Multiplicity of infection*) (0,0075 pfu; 0,0125 pfu; 0,075 pfu; 0,125 pfu und 0,5 pfu) in einem Volumen von 2 ml Medium (ohne FKS und Antibiotika; DMEM_{ohne}) infiziert und dabei alle 15 min geschwenkt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37 °C wurden die infizierten Zellen mit 6 µg des Transferkonstrukts (pLZAW1) und einer entsprechenden Menge jetPEI™ (B.2.3.2) transfiziert und erneut für 1 h inkubiert. Im Anschluss daran erfolgten ein Mediumswechsel und eine Inkubation für 48 h – 72 h bei 37 °C. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturüberstand geerntet und nach einem dreimaligen Gefrier-Auftau-Schritt (*freez/thaw*; flüssiger Stickstoff und 37 °C Wasserbad) in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

B.2.3.5.2 Aufreinigung der unterschiedlichen NYVAC-Varianten unter Verwendung eines Plaque Assays

B.2.3.5.2.1 Durchführung des ersten Aufreinigungsschritts

Die Aufreinigung der hergestellten rekombinanten Viren (B.2.3.5.1) erfolgte mit Hilfe eines *Plaque Assays*. Hierzu wurden 3×10^6 BHK-21 Zellen in Kulturgefäßen (Ø 10 cm) ausgesät und mit der Viruskultur (B.2.3.5.1) in einem Volumen von 4 ml DMEM_{ohne} mit unterschiedlichen Verdünnungen je MOI (MOI 0,0075 und 0,0125: 1:20, 1:50, 1:100 und 1:500; MOI 0,075 und 0,125: 1:100, 1:500, 1:1.000 und 1:5.000; MOI 0,5: 1:500, 1:1.000, 1:5.000 und 1:10.000) infiziert. Diese wurde zuvor zweimal für 1 min sonifiziert (*Branson Sonicator*, Branson Ultrasonics). Die Zellen wurden anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert und dabei alle 30 min geschwenkt. Nach vorsichtigem Absaugen des Mediums erfolgte die erste Überschichtung der Zellen mit 12 ml Agarose-Medium (6 ml 2,4 % (w/v) LMP-Agarose und 6 ml zweifach konzentriertes Medium; 8 % FKS; 200 µg/ml Penicillin, 200 U/ml Streptomycin) und ein Inkubationsschritt für 3 d bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml eines zweiten Agarose-Mediums (2,5 ml 2,4 % (w/v) LMP-Agarose und 2,5 ml zweifach konzentriertes Medium; 8 % FKS; 200 µg/ml Penicillin; 200 U/ml Streptomycin; 200 mg/ml *Blue Gal*; 3,33 g/l Neutral Rot), welches zusätzlich ein chromogenes Substrat (*Blue Gal*) für das Enzym β-Galactosidase enthält, überschichtet. Es erfolgte im Anschluss eine Inkubation für 4-6 h bei 37 °C. Mit Hilfe einer sterilen Glaspasteurpipette konnten dann in den für ca. 1 h bei Raumtemperatur abgekühlten Kulturgefäßen blaue Plaques (Vorhandensein von β-Galactosidase) gepickt werden.

Diese wurden in einem Volumen von 500 µl in sterilen Reaktionsgefäßen bei -80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

B.2.3.5.2.2 Durchführung der weiteren Aufreinigungsschritte

Zur Selektion der hergestellten rekombinanten NYVACs wurden weitere Aufreinigungsschritte mittels *Plaque Assay* durchgeführt. Hierfür wurden die unter B.2.3.5.2.1 hergestellten Plaques einem dreimaligen *freez/thaw*-Schritt unterzogen und zweimal für 1 min sonifiziert. Anschließend wurden 80-90 % konfluente BHK-21 Zellen (B.2.3.5.2.1) in einem Volumen von 4 ml DMEM_{ohne} mit unterschiedlichen Verdünnungen (1:100; 1:500; 1:1.000 und 1:5.000) der Plaquesuspension infiziert. Die Zellen wurden für 2 h inkubiert und ebenfalls mit den Agarose-haltigen Medien überschichtet (B.2.3.5.2.1). Zu Anfang wurden mittels einer Glaspasteurpipette weiterhin blaue Plaques (β-Galactosidase positiv) gepickt, wohingegen in den späteren Runden auf weiße Plaques (β-Galactosidase negativ) selektioniert wurde. Diese wurden wiederum in einem Volumen von 500 µl in sterilen Reaktionsgefäßen bei -80 °C zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

B.2.3.5.3 Infektion eukaryotischer Zelle für analytische Zwecke

Zur Detektion rekombianter Viren mittels PCR-Analyse wurden 1×10^5 BHK-21 Zellen ca. 16 h vorher in 24-Napf-Platten (Ø 1,5 cm) ausgesät. Die Zellen wurden mit 100 µl Plaquesuspension, welche zuvor dreimal mittels *freez/thaw* behandelt und zweimal für je 1 min sonifiziert worden war, in einem Gesamtvolumen von 300 µl DMEM_{ohne} infiziert. Während einer Inkubation von 2 h bei 37 °C wurden die Schalen regelmäßig geschwenkt. Im Anschluss daran wurden 500 µl Komplettmedium (Tab. B-9) zugegeben, und es erfolgte eine weitere Inkubation von 48-72 h. Die Zellen wurden geerntet (B.2.3.3) und die genomische DNA wurde mittels *QIAamp DNA Blood Mini Kit* isoliert (B.2.1.2.2).

Für die Analysen der Proteinexpression im Western-Blot wurden 6×10^5 BHK-21 Zellen ca. 16 h vorher in 6-Napf-Platten (Ø 3 cm) ausgesät. Die zuvor gepickten weißen Plaques (B.2.3.5.2.2 und B.2.3.5.6) wurden einem dreimaligen *freez/thaw*-Schritt unterzogen und zweimal für je 1 min sonifiziert. In einem Volumen von 1 ml DMEM_{ohne} wurden die Zellen mit 100-200 µl Einzelplaquesuspension infiziert. Im Anschluss an eine Inkubation von 2 h bei 37 °C erfolgte die Zugabe von 1 ml Komplettmedium. Die Zellen wurden weitere 48 h inkubiert und wie unter B.2.3.3 beschrieben geerntet.

Zur Überprüfung der korrekten Proteinexpression im aufbereiteten Virusstock (B.2.3.5.4), wurden ebenfalls 6×10^5 BHK-21 Zellen in 6-Napf-Platten (Ø 3 cm) ausgesät, in einem Volumen von 1 ml DMEM_{ohne} mit einer MOI 0,5 mit den aufgereinigten NYVAC-Stocks infiziert und, wie für die Einzelplaques beschrieben, inkubiert und geerntet.

Die Überprüfung der Expression der Proteine in den pLZAW1-Konstrukten erfolgte durch Infektion mit anschließender Transfektion von 6×10^5 BHK-21 Zellen in 6-Napf-Platten (\varnothing 3 cm). Dazu wurde zuerst mit einer MOI 0,5 mit NYVAC-wt infiziert und 2 h danach mit den pLZAW1-Konstrukten transfiziert (B.2.3.5.1). Die Zellen wurden 48 h inkubiert und, wie unter B.2.3.3 beschrieben, geerntet.

B.2.3.5.4 Herstellung hochtitriger Virusstocks

Zur Herstellung hochtitriger Virusstocks wurden die rekombinanten NYVACs in den getesteten Plaquesuspensionen durch schrittweise Erhöhung der Infektionsvolumina vermehrt. Dazu wurden zuerst 6×10^5 BHK-21 Zellen mit 100 μ l Plaquesuspension, welche zuvor dreimal mittels *freez/thaw* behandelt und zweimal für je 1 min sonifiziert worden war, in einem Volumen von 1 ml DMEM_{ohne} in 6-Napf-Platten infiziert. Die Zellen wurden für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Komplettmedium (Tab. B-9), und nach einer weiteren Inkubation für 48 h wurden die Zellen zusammen mit dem Kulturüberstand geerntet. Es folgten ein dreimaliger *freez/thaw*-Schritt und die Infektion von 5×10^6 BHK-21 Zellen mit 100 μ l der zuvor geernteten Virussuspension in einem Volumen von 5 ml DMEM_{ohne} in T75-Kulturflaschen (Fläche 75 cm²). Nach einer Inkubation von 2 h wurden 15 ml Komplettmedium zugegeben, und die Zellen wurden erneut für 48 h inkubiert.

Im letzten Schritt wurden 1×10^7 BHK-21 Zellen in Kulturschalen (\varnothing 15 cm) ausgesät. Diese wurden mit 100 μ l der Virussuspension aus den T75-Kulturflaschen, welche ebenfalls dreimal mittels *freez/thaw* behandelt worden waren, in einem Volumen von 10 ml DMEM_{ohne} infiziert und für 2 h inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Komplettmedium zugegeben, und es erfolgte eine weitere Inkubation für 72 h. Die Zellen wurden zusammen mit dem Kulturüberstand abgenommen und bei 1.500 xg und 4 °C für 15 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet einmal mit 10 ml PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) gewaschen (1.500 xg; 15 min; 4 °C), in 10 ml PBS aufgenommen und zu je 2,5 ml aliquotiert. Durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C wurden die Zellen aufgeschlossen und die Viren freigesetzt. Die Virussuspensionen wurde anschließend zweimal für je 1 min sonifiziert, pelletiert (1.500 xg; 15 min; 4 °C), und die Überstände wurden vereinigt. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert, erneut sonifiziert und abzentrifugiert. Die gewonnen Überstände wurden mit den ersten vereinigt, und die Viren wurden mittels zweimaliger Ultrazentrifugation (SW32 Rotor; 1 h; 20.000 rpm; 4 °C) über ein 45 %iges Saccharosekissen angereichert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Viruspellet in 10 mM Tris-HCl (zur Lagerung im Archiv) bzw. PBS (zur Applikation *in vivo*) aufgenommen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Danach wurde die Virussuspension aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Virustiter wurden jeweils im Doppelansatz bestimmt (B.2.3.5.5).

B.2.3.5.5 *Bestimmung von Virustitern mittels Plaque Assay und Kristallviolettffärbung*

Die Bestimmung von Virustitern wurde mit DF-1 Zellen in 6-Napf-Platten durchgeführt. Hierzu wurden 8×10^5 Zellen ausgesät und mit unterschiedlichen Verdünnungen an aufgereinigtem Virus in einem Volumen von 1 ml DMEM_{ohne} infiziert. Anschließend wurde 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml Komplettmedium (Tab. B-9) ersetzt. Nach Auftreten deutlicher Plaques im Zellrasen (ca. 72 h nach Infektion), wurde das Medium abgenommen, der Zellrasen einmal mit PBS (10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl) gewaschen, und die Zellen wurden im Anschluss mit Kristallviolettfixierer (PBS mit 5 % (v/v) Formalin) 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Die nachfolgende Färbung des Zellrasens wurde mit Kristallviolettffärbelösung (1,5 g/l Kristallviolett; 8,5 % (v/v) Ethanol; 25 % (v/v) Formalin) durchgeführt. Nach einer Einwirkzeit von 10 min wurde die Färbelösung entfernt, der Zellrasen mit H₂O_{bidest} gewaschen, getrocknet, und Plaques wurden ausgezählt.

Der Virustiter wurde gemäß der Formel: Virustiter (pfu/ml) = Anzahl ausgezählter Plaques pro Napf x Verdünnungsfaktor / 1 ml berechnet.

B.2.3.5.6 *Plaque Assay zum Nachweis der Reinheit der hergestellten rekombinanten Viren*

Zum Nachweis der Reinheit der hergestellten Viren wurde ein *Plaque Assay* durchgeführt. Hierzu wurden 3×10^6 BHK-21 Zellen in Kulturgefäßen (Ø 10 cm) ausgesät und mit dem aufgereinigten Virus (B.2.3.5.4) in einem Volumen von 4 ml DMEM_{ohne} mit unterschiedlichen Verdünnungen infiziert. Es wurde eine Verdünnungsreihe von 1:1.000 bis $1:1 \times 10^6$ gewählt, da hier die Gewinnung von einzelnen Plaques gewährleistet wird. Die Zellen wurden anschließend für 2 h bei 37 °C inkubiert und dabei alle 30 min geschwenkt. Nach vorsichtigem Absaugen des Medium erfolgte die Überschichtung der Zellen mit den jeweiligen Agarose-Medien und das Picken der Plaques mittels Glaspasteurpipette (B.2.3.5.2.1). Die erhaltenen weißen Plaques wurden in einem Volumen von 500 µl in sterilen Reaktionsgefäßen bei -80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung der Transgen Expression in den Einzelplaques erfolgte nach einer Infektion eukaryotischer Zellen (B.2.3.5.3) mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse (B.2.2.3 und B.2.2.4).

B.2.4 Immunologische Arbeitstechniken

B.2.4.1 Haltung und Immunisierung von Versuchstieren

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsstudien wurden weibliche Mäuse der Inzuchtrasse BALB/cAnNCrI (H-2^d) im Alter von 40-42 Tagen verwendet. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage D3 des Universitätsklinikums Regensburg gehalten. Falls nicht anders vermerkt, wurden die Tiere im Alter von 8 Wochen intramuskulär (i.m.) immunisiert. Für die i.m. Immunisierung wurden die Tiere zunächst mittels des Inhalationsnarkotikums Isoflurane (Baxter) betäubt, und die Region um die Einstichstelle wurde rasiert. Danach wurde die gewünschte Menge eines entsprechenden Antigens in einem Volumen von je 50 µl langsam in beide Schienbeinmuskel (*tibialis anterior*) injiziert.

B.2.4.2 Auslesen zellulärer Immunantworten

B.2.4.2.1 Generierung von primären Maussplenozyten

Zur Generierung primärer Maussplenozyten wurde die Milz jeder Maus unter Verwendung eines sterilen Präparationsbestecks entnommen und in 10 ml Waschpuffer (PBS; 1 % UC-Medium) aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden unter sterilen, für die Zellkultivierung gängigen Bedingungen durchgeführt. Die Milzen wurden inklusive des Waschpuffers 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 xg; Raumtemperatur; 5 min), zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) in 10 ml Lysepuffer (150 mM NH₄Cl; 1 mM KHCO₃; 0,1 mM Na₂EDTA; pH 7,2) resuspendiert und sofort erneut pelletiert (300 xg; Raumtemperatur; 5 min). Die zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschenen (300 xg; Raumtemperatur; 5 min) Zellen wurden in Kompletmedium (Tab. B-9) aufgenommen und unmittelbar zur Bestimmung IFN γ produzierender Zellen mittels intrazellulärer IFN γ Färbung und anschließender FACS Analyse (B.2.4.2.2) eingesetzt.

B.2.4.2.2 Intrazelluläre IFN γ Färbung und anschließende FACS-Analyse

Die Anzahl IFN γ produzierender, CD8⁺ Zellen nach Restimulation der Splenozyten mit einem geeigneten Peptid ist ein Maß für die Stärke der durch die Immunisierung induzierten zellulären Immunantwort. Die Bestimmung IFN γ produzierender, CD8⁺ Zellen erfolgte mittels intrazellulärer IFN γ Färbung und anschließender FACS Analyse. Hierfür wurden die zu untersuchenden primären Maussplenozyten auf eine Konzentration von 2x10⁷ Zellen/ml eingestellt und in eine 96-Napf-Zellkulturplatte mit Rundboden (100 µl pro Napf) überführt. Zur Restimulation der spezifischen zellulären Immunantworten wurden 100 µl Stimulationslösung (Kompletmedium (Tab. B-9); 0,02 mM spezifisches Peptid (Tab. B-7);

0,01 µg/µl Brefeldin A (BFA)) zugegeben. Dabei verhindert das zugesetzte BFA die IFN γ Sezernierung und ermöglicht die intrazelluläre Anreicherung und somit eine bessere Anfärbung des Proteins in den stimulierten Zellen. Als Negativkontrolle wurden Splenozyten mit 100 µl Kompletmedium (inklusive BFA) ohne Zugabe eines Peptids behandelt. Zur unspezifischen Stimulation (Positivkontrolle) wurden 100 µl einer PMA/Iono-Lösung (Kompletmedium; 0,1 µg/ml Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA); 1 µg/ml Ionomycin (Iono)) zugegeben.

Nach 6 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer (PBS; 1 % FKS; 1 g/l NaN₃) gewaschen (300 xg; 5 min; Raumtemperatur). Im Folgenden wurden mit Hilfe Fluoreszenz-gekoppelter, spezifischer Antikörper (Tab. B-5) eine Oberflächenfärbung der CD4- und CD8-Rezeptoren sowie eine intrazelluläre Färbung von IFN γ durchgeführt. Um zunächst die Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur 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 Raumtemperatur im Dunkeln wurden die angefärbten Splenozyten zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen (300 xg; 5 min; Raumtemperatur), anschließend in 200 µl *Cytofix/Cytoperm* (4 % (w/v) PFA in PBS; 1 % (w/v) Saponin) aufgenommen und weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Anfärbung von intrazellulärem IFN γ wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen (500 xg; 5 min; Raumtemperatur) mit je 200 µl *Perm/Wash*-Puffer (PBS; 0,1 % (w/v) Saponin) mit 100 µl anti-IFN γ -PE (1:200 verdünnt in *Perm/Wash*-Puffer) behandelt und für 25 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 200 µl *Perm/Wash*-Puffer (500 xg; 5 min; Raumtemperatur) wurden die Splenozyten in einer geeigneten Menge FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACSCanto II, BD Biosciences) analysiert.

C Ergebnisse

C.1 Beschreibung der verwendeten DNA-Konstrukte

Die RNA- und Codon-optimierten *gag*, *pol*, *nef* und *env* Transgene wurden von der Firma Geneart (Life Technologies, Regensburg) synthetisiert und anschließend unter die Kontrolle eines CMV Promotors in den pcDNA3.1 Vektor kloniert¹³¹. Die Sequenz des *Clade C/B* GagPolNef (GPN) Referenzkonstrukts sowie die Sequenz des Env (gp120) Konstrukts wurden basierend auf der Sequenzinformation des 97CN54 Provirus Isolates synthetisiert²²⁰. Das optimierte CN54 Env Konstrukt enthält die N-terminal mit einem artifiziellen Signalpeptid (MDRAKLLLLLLLLLPQAQA) verbundene²²¹ kodierende Sequenz des gp120 CN54 (Abb. C-1, Abschnitt B).

Das 97CN54 GPN Referenzkonstrukt, welches im Folgenden als Δ^M GPN bezeichnet wird, wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten beschrieben^{222,204,130}. Δ^M GPN kodiert ein nicht-glykosyliertes ca. 160 kD großes artifizielles Polyprotein bestehend aus (i) einem nicht-myristoylierten Gag verbunden mit (ii) dem 5' Bereich von Pol, einschließlich der inaktivierten viralen Protease, gefolgt von (iii) dem 5' Bereich der Reversen Transkriptase, verbunden mit (iv) einer *scrambled* Nef-Variante (N- und C-terminaler Bereich vertauscht), welche den aktiven Bereich der Reversen Transkriptase ersetzt, (v) dem 3' Bereich des Pol Leserahmens ohne das Gen der Integrase, erweitert (vi) durch das 3' Ende der Reversen Transkriptase, gefolgt von (vii) einer Sequenz kodierend für den aktiven Bereich der Reversen Transkriptase.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden, zur Herstellung neuer Transgenvarianten, verschiedene Modifikationen in das vorher beschriebene Referenzkonstrukt Δ^M GPN eingefügt (Dissertation Dr. Simon Bredl, durchgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Regensburg sowie²¹⁴). Um die Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln (*virus like particles*, VLP) und somit die Fähigkeit zur Abschnürung von VLP (*budding*) zu gewährleisten, wurden (i) das Myristoylierungssignal (A2G) wieder eingefügt und (ii) sieben Aminosäuren (P66S, L85P, K98R, D309G, R439G, G447R und G461E), welche für die korrekte Zusammenlagerung der Gag-Moleküle wichtig sind, im Gag ausgetauscht. Des Weiteren wurde die natürliche HI-virale ribosomale *Frame Shift* Sequenz zwischen dem Gag und dem Pol Leserahmen wiederhergestellt, wodurch ein Verhältnis von 10:1 bis 20:1 in der Expression von Gag zu GagPolNef auftreten sollte²²³.

Durch Einfügen der soeben beschriebenen Modifikation wurden alle neuen GPN Konstrukte, (i) das Δ^M GPN, welches das 160 kD Durchlesekonstrukt inklusive des Myristoylierungssignals und der ausgetauschten Aminosäuren im Gag kodiert, (ii) das $\Delta^M G^{FS}$ PN mit integriertem HI-viralem *Frame Shift* und (iii) das $\Delta^M G^{FS}$ PN, welches beide Modifikationen enthält, als pcDNA-Konstrukte hergestellt (Abb. C-1, Abschnitt A).

Das ^MGag Konstrukt, welches sowohl das Myristoylierungssignal als auch die ausgetauschten Aminosäuren enthält, wurde, ebenso wie das 97CN54 PolNef, aus dem ^MGPN gewonnen. Beide Transgene wurden über definierte Restriktionsschnittstellen jeweils in einen separaten pcDNA3.1(+) Vektor kloniert (Abb. C-1, Abschnitt B).

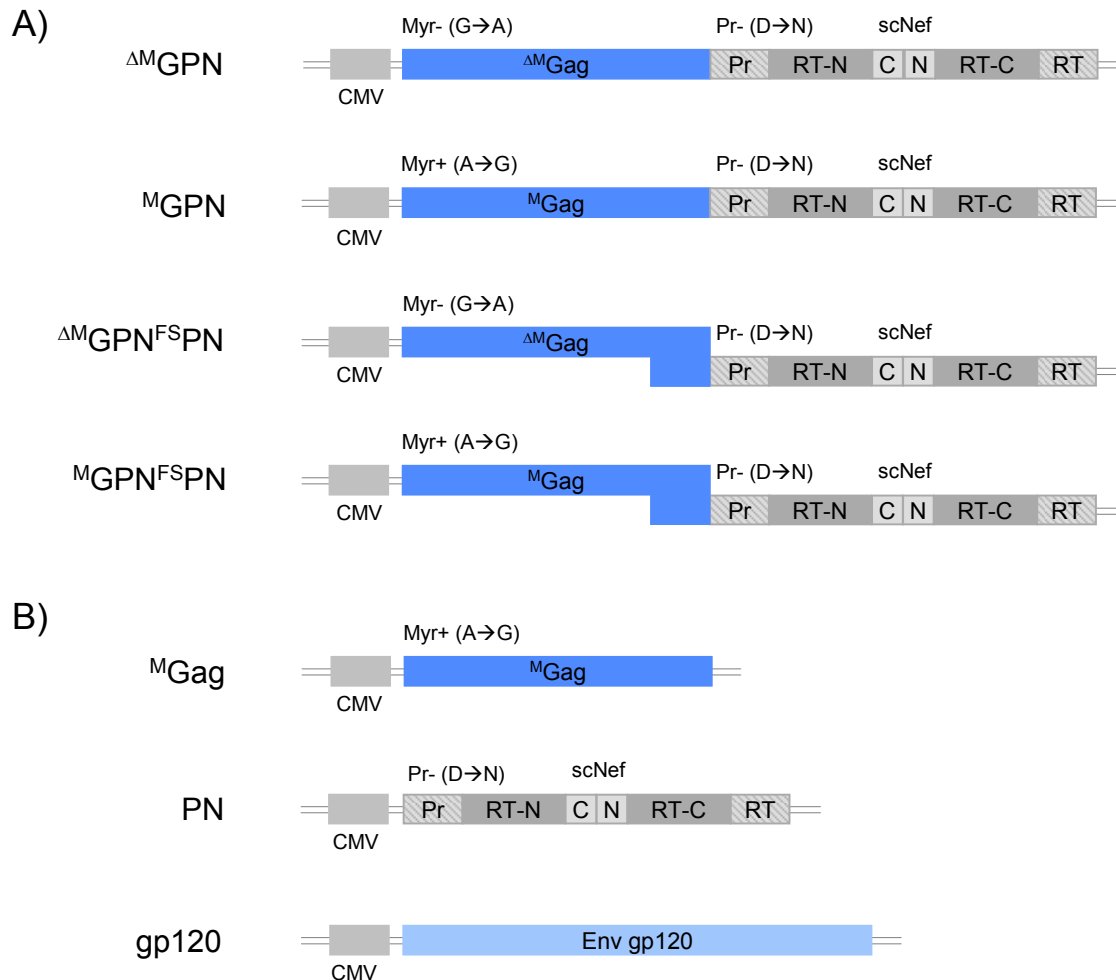


Abb. C-1: Schematische Darstellung verwendeter Expressionskassetten (pcDNA-Plasmide)

A) Die Sequenz des 160 kDa Polyprotein ^{ΔM}GPN setzt sich aus Gag (p17 (Matrix), p24 (Kapsid), p1, p7, p2 und p6*); Pol (inaktivierte Protease (Pr), N- und C-terminaler Bereich Reverse Transkriptase (RT-N, RT-C) sowie der aktiven Domäne (RT) und einem *scrambled* Nef (scNef)) zusammen.

Dieses Polyprotein wurde aus dem HIV-1 Isolat CN54 gewonnen und ist durch das Fehlen einer N-Myristoylierungsstelle nicht *budding* kompetent. Im Transgen ^MGPN wurde durch den Austausch der Aminosäure Alanin (A) zu Glycin (G) das N-Myristoylierungssignal wieder hergestellt. Zusätzlich wurden die Sequenzen für weitere sieben Aminosäuren im Gag ausgetauscht. Zur Herstellung des Transgens ^{ΔM}G^{FS}PN wurde die natürliche *Frame Shift* Sequenz aus dem CN54 Virus Isolat in das ^MGPN Konstrukt eingesetzt und der Austausch der Aminosäuren Alanin zu Glycin vorgenommen. ^MG^{FS}PN enthält beides, sowohl die *Frame Shift* Sequenz als auch das N-Myristoylierungssignal.

B) Das ^MGag Konstrukt enthält eine Expressionskassette der Gag Sequenz mit einem N-Myristoylierungssignal und den sieben ausgetauschten Aminosäuren. PN kodiert für Pol und Nef mit allen im Polyprotein ^{ΔM}GPN beschriebenen Modifikationen. Das gp120 Konstrukt enthält die Codon optimierte CN54 Env gp120 Sequenz mit einem artifiziellen Signalpeptid (SP), welches N-terminal das natürliche SP von HIV Env ersetzt. Alle Konstrukte enthalten einen CMV-Promotor (CMV).

C.2 Entwicklung und Verifizierung neuer DNA-Konstrukte

C.2.1 Herstellung neuer Transgenvarianten durch Einfügen neuer Modifikationen

C.2.1.1 Allgemein

Die Verbesserung der Proteinexpression der Transgene *gag/pol/nef* durch das Einbringen posttranslationaler Modifikationen (z.B. N-terminale Myristoylierung) oder durch die Trennung des offenen Leserahmens von *gag* und *pol/nef* (Einfügen des ribosomalen HI-viralen *Frame Shift Signals*) konnte eine Verbesserung der Induktion Gag-spezifischer Immunantworten im Kontext einer DNA-Vakzine erzielen. Im Vergleich zu vorangegangenen präklinischen²²² und klinischen Phase I Studien^{128,129}, in welchen der HIV-1 Vakzine-Kandidat DNA-C in Kombination mit NYVAC-C getestet wurde, konnte durch die Verwendung neuer Transgene im Rahmen der Applikation der DNA-Konstrukte eine Steigerung der Gag- und Pol-spezifischen T-Zell Antworten um den Faktor zwei bis zehn erzielt werden²¹⁴. Eine Co-Immunisierung mit Env führte jedoch zu einer Unterdrückung dieser verbesserten Immunantworten. Durch eine räumlich oder zeitlich getrennte Verabreichung von GagPolNef und Env, sowie eine Veränderung des Mengenverhältnisses zwischen Gag und Env zugunsten von Gag, lässt sich diese Unterdrückung der spezifischen Immunantworten aufheben²¹⁴.

Die Wahl einer geeigneten Verabreichungsart führte somit zum Aufheben des negativen Effekts von Env auf Gag. Der Mechanismus, welcher diesem Effekt zu Grunde liegt, ist unklar. Die Herstellung neuer Transgenvarianten, welche die Lokalisierung von Env und Gag in einer Zelle gewährleisten, die Prozessierung von Env und Gag in einer Zelle beeinflussen oder die gezielte Deletion immundominanter Epitope, könnte erste Hinweise auf den Mechanismus liefern. Hierzu wurde zum einen ein Plasmid-DNA Konstrukt hergestellt, welches sowohl für ^MGag als auch für gp120 kodiert und eine Expression beider Transgene in der gleichen Zelle gewährleistet. Des Weiteren erfolgte die zusätzliche Integration der im murinen System immundominanten Epitope aus Gag und Env in das jeweils andere Transgen sowie die Modifikation des artifiziellen Signalpeptids am Env.

C.2.1.2 Entwicklung eines Gag und Env kodierenden Plasmids unter Verwendung eines 2a-Peptids des *Thosea asigna* virus (TaV)

Um eine gemeinsame Lokalisierung von Gag und Env in einer transfizierten Zelle zu gewährleisten, wurde ein Plasmid-DNA Konstrukt hergestellt welches sowohl das virale Transgen *gag* als auch *env* kodiert.

Hierzu wurde die kodierende Sequenz des humanen EGFP (Clontech) zusammen mit einem 18 Aminosäuren langen TaV2a-Peptid (EGRGSLTTCGDVEENPGP)²²⁴ und dem *ccdB* (synthetisiert von Geneart) aus dem pQL11 Plasmid (zur Verfügung gestellt von Tim-Henrik

Bruun, Regensburg) amplifiziert und in einen pcDNA3.1(+) Vektor (Invitrogen) kloniert. EGFP und ccdB wurden durch das aus dem ^MGPN gewonnene Transgen ^MGag bzw. durch CN54 Env (gp120) sowohl *upstream* als auch *downstream* des TaV2a-Peptids ersetzt (Abb. C-2). Der dem TaV2a vorgelagerte ORF (*open reading frame*) enthält kein Stopp-Codon. Dieses befindet sich zur vollständigen und gleichmäßigen Translation beider Proteine am 3' Ende des zweiten ORFs. Die neu hergestellten Konstrukte wurden sequenziert, und die Verifizierung der korrekten Transgenexpression erfolgte mittels Western-Blot Analyse (C.2.2.1). In der weiteren Nomenklatur wird das TaV2a-Peptid als 2a bezeichnet.

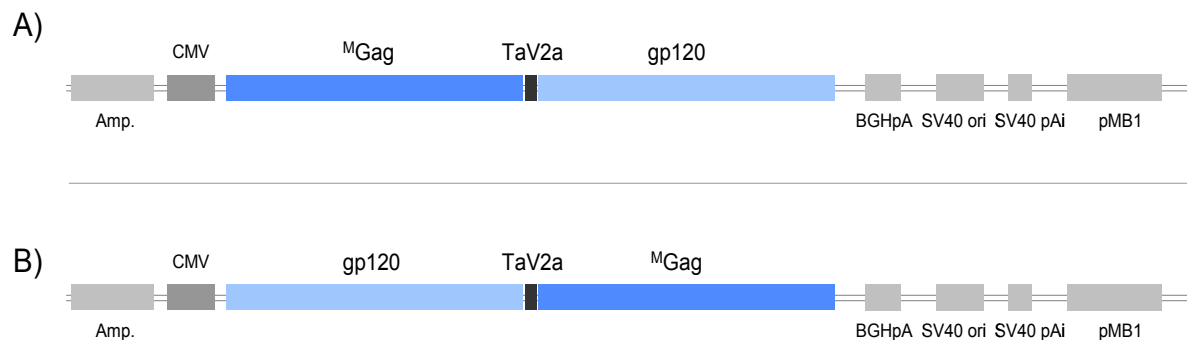


Abb. C-2: Schematische Darstellung der TaV2a Plasmide (pcDNA)

A) Das ^MGag-2a-gp120 Plasmid enthält N-terminal des 2a-Peptids den Leserahmen für ^MGag. C-terminal des 2a-Peptids ist der Leserahmen für das Hüllprotein gp120 integriert.

B) Das gp120-2a-^MGag Plasmid enthält im Gegensatz N-terminal des 2a-Peptids den Leserahmen für das Hüllprotein gp120. C-terminal des 2a-Peptids ist der Leserahmen für ^MGag integriert.

TaV2a = 2a-Peptid aus dem *Thosea asignia virus* (TaV) mit einer Länge von 18 Aminosäuren (EGRGSLTTCGDVEENPGP)

CMV = CMV Promotor; Amp. = Ampicillinresistenz-Kassette; pMB1 = *origin of replication*; SV40pA = SV40 PolyA-Site; SV40 ori = *origin of replication*; BGHpA = BGH PolyA-Site

C.2.1.3 **Einbringen der im murinen System immundominanten Epitope aus Gag und Env in das jeweils andere Transgen sowie die Deletion des immundominanten Epitops V11V im Env**

Bei einer Co-Expression von Env und Gag in einer Zelle könnten unterschiedliche Mechanismen zur Inhibition von Gag führen. Es besteht z.B. die Möglichkeit der Konkurrenz der immundominanten Epitope von Gag und Env um die Präsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen zugunsten des gp120.

Eine gp120 Transgenvariante, welche eine Deletion des BALB/c gp120-spezifischen Epitops aufweist, oder aber die zusätzliche Integration des Gag- bzw. gp120-spezifischen Epitops in das jeweils andere Transgen gp120 und ^MGag sollten hierfür zur Überprüfung beitragen.

Hierzu wurde zum einen das ^MGag C-terminal um das BALB/c gp120-spezifische Epitop V11V (VPADPNPQEMV) verlängert, zum anderen wurde an das gp120, ebenfalls C-terminal, das BALB/c Gag-spezifische Epitop A9I (AMQILKDTI) angefügt. Beide

Konstrukte wurden von der Firma Geneart (Life Technologies, Regensburg) synthetisiert. Die anschließende Klonierung in den pcDNA3.1(+) Vektor (Invitrogen) resultierte in den Konstrukten pc^MGag-V11V und pcgp120-A9I (Abb. C-3, Abschnitt A und B).

Des Weiteren wurde das Env-spezifische Epitop V11V im gp120 deletiert, und das hergestellte Konstrukt als pcgp120ΔV11V bezeichnet (Abb. C-3, Abschnitt C).

Die einzelnen Varianten wurden sequenziert, und die korrekte Expression der modifizierten Transgene wurde mit Hilfe von Western-Blot Analysen überprüft (B.2.2.1).

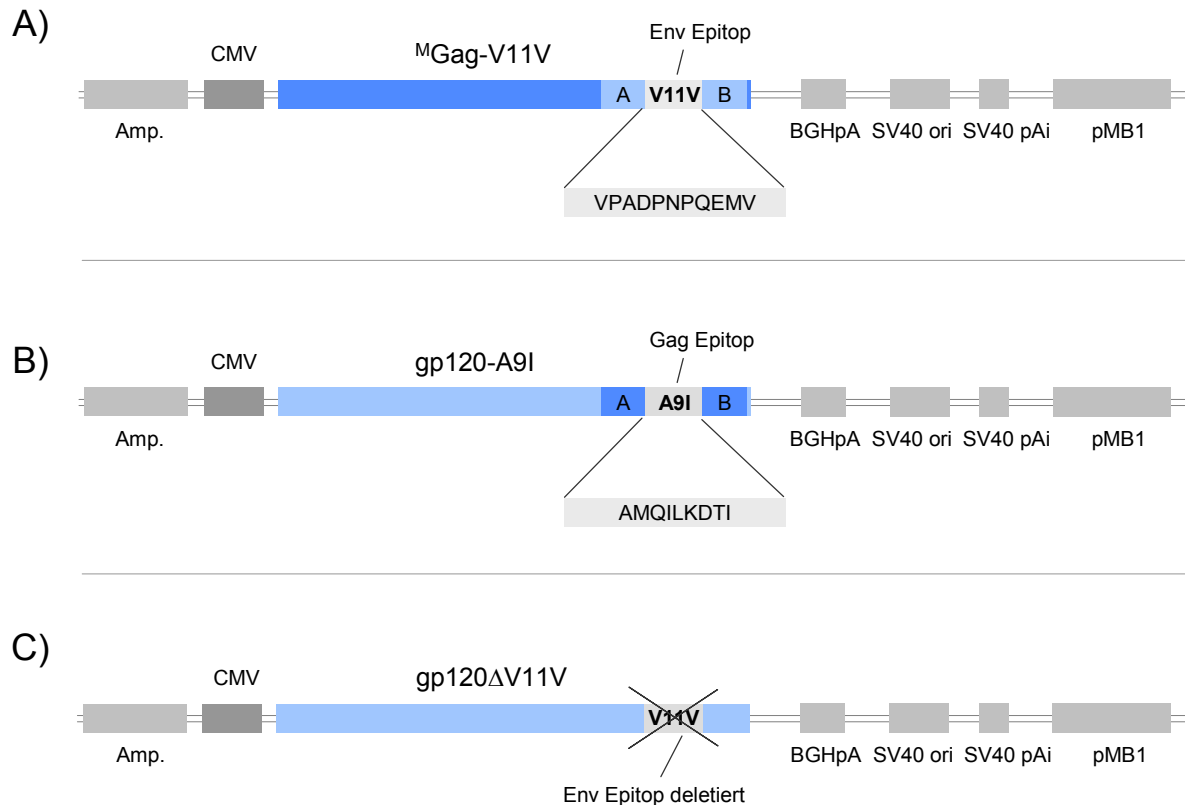


Abb. C-3: Schematische Darstellung der pcDNA-Konstrukte mit den ausgetauschten immundominanten Epitopen

A) Das ^MGag-V11V Plasmid enthält eine Expressionskassette für ^MGag, welches ein N-Myristoylierungssignal enthält. C-terminal vor dem Stopp-Codon wurde das ^MGag um das BALB/c Env-spezifische Epitop V11V verlängert. Flankierende Bereiche (A und B) aus dem Env wurden zur besseren Prozessierung und Präsentation des Peptids N- und C-terminal angehängt.

B) Das gp120-A9I Plasmid enthält eine Expressionskassette für Env gp120. C-terminal vor dem Stopp-Codon wurde das gp120 um das BALB/c Gag-spezifische Epitop A9I verlängert. Flankierende Bereiche (A und B) aus dem Gag wurden zur besseren Prozessierung und Präsentation des Peptids N- und C-terminal angehängt.

C) Dargestellt ist das Env gp120 Plasmid mit deletiertem Env-spezifischen Epitop V11V (gp120ΔV11V).

CMV = CMV Promotor; Amp. = Ampicillinresistenz-Kassette; pMB1 = *origin of replication*; SV40pA = SV40 PolyA-Site; SV40 ori = *origin of replication*; BGHpA = BGH PolyA-Site

C.2.1.4 Modifikation des Signalpeptids

Eine Verschiebung des Mengenverhältnisses von Env und Gag zugunsten von Gag führte, wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt, zur Aufhebung der Unterdrückung der Gag-spezifischen Immunantworten²¹⁴. Die Veränderung der Prozessierung von Env und Gag in einer Zelle und die damit verbundene Veränderung der Lokalisierung translatierter Proteine in der Zelle könnten zur weiteren Analyse des inhibitorischen Effekts von Env auf Gag dienen.

Die Deletion des artifiziellen Signalpeptids am Env oder aber auch das Anfügen dieses Signalpeptids an Gag führt zu einer veränderten Prozessierung von Gag und Env und damit evtl. zur verbesserten Präsentation des Gag Peptids auf MHC-Molekülen.

Um dies zu überprüfen wurde die Gensequenz des artifiziellen Signalpeptids (MDRAKLLLLLLLLLLPQAQA) N-terminal an das Transgen^MGag angefügt bzw. N-terminal am gp120 deletiert (Abb. C-4, Abschnitt A und B).

Die Varianten wurden sequenziert, und die korrekte Expression der Transgene wurde mit Hilfe von Western-Blot Analysen überprüft (C.2.2.1).

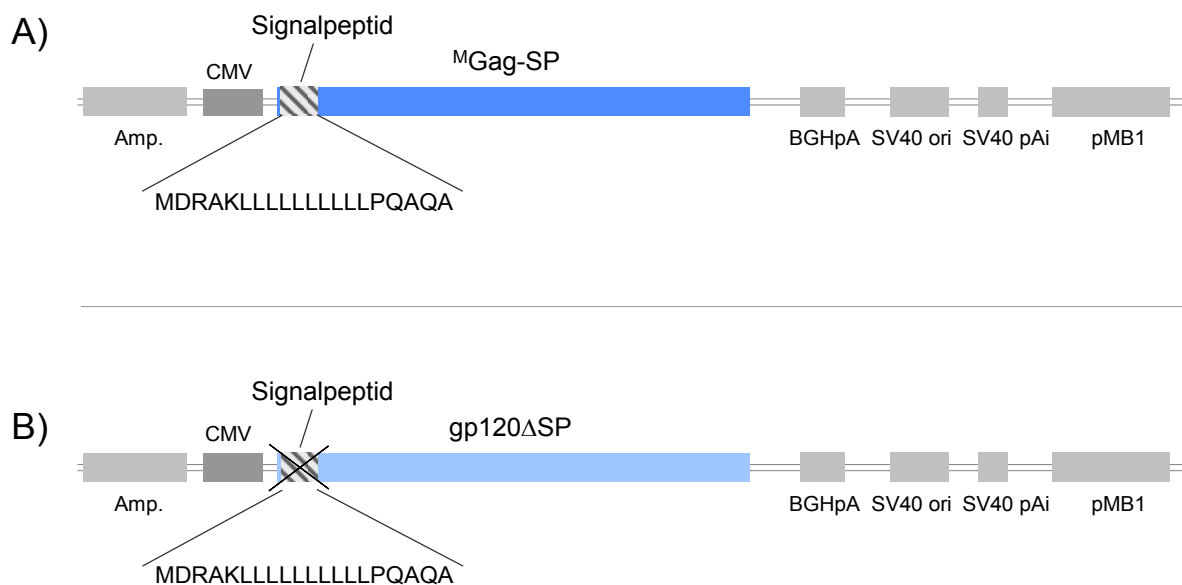


Abb. C-4: Schematische Darstellung der pcDNA-Konstrukte mit den Modifikationen im Signalpeptid

A) Dargestellt ist das M^{Gag}-SP Plasmid. In die Expressionskassette des M^{Gag} wurde N-terminal die Gensequenz des artifiziellen Signalpeptids (MDRAKLLLLLLLLLLPQAQA) integriert.

B) Dargestellt ist das gp120ΔSP Plasmid. In der Expressionskassette des gp120 wurde N-terminal die Gensequenz des artifiziellen Signalpeptids (MDRAKLLLLLLLLLLPQAQA) deletiert.

CMV = CMV Promotor; Amp. = Ampicillinresistenz-Kassette; pMB1 = origin of replication; SV40pA = SV40 PolyA-Site; SV40 ori = origin of replication; BGHpA = BGH PolyA-Site

C.2.1.5 Überblick modifizierte Immunogene

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. C-1) sind alle neu hergestellten pcDNA-Konstrukte mit der Bezeichnung des Plasmids und einer kurzen, zusammenfassenden Beschreibung des eingebrachten Immunogens aufgelistet.

Tab. C-1: Übersicht modifizierte Immunogene

Alle Immunogene befinden sich im Vektor pcDNA3.1

Plasmid	Beschreibung Immunogene
pc ^M Gag-2a-gp120	N-terminal ^M Gag (HIV-1 Clade C 97CN001; <i>budding</i> kompetent) und C-terminal gp120 (HIV-1 Clade C, CN54) verbunden mit dem 2a-Peptid (EGRGSLLTCGDVEENPGP) aus dem <i>Thosea asignia</i> virus (TaV)
pcgp120-2a- ^M Gag	N-terminal gp120 (HIV-1 Clade C CN54) und C-terminal ^M Gag (HIV-1 Clade C, 97CN001; <i>budding</i> kompetent) verbunden mit dem 2a-Peptid (EGRGSLLTCGDVEENPGP) aus dem <i>Thosea asignia</i> virus (TaV)
pc ^M Gag-V11V	^M Gag (HIV-1 Clade C, 97CN001; <i>budding</i> kompetent) mit C-terminal integriertem V11V Env Peptid (VPADPNPQEMV)
pcgp120-A9I	gp120 (HIV-1 Clade C, CN54) mit C-terminal integriertem A9I Gag Peptid (AMQILKDTI)
pcgp120ΔV11V	gp120 (HIV-1 Clade C, CN54) mit deletiertem V11V Env Peptid (VPADPNPQEMV)
pc ^M Gag-SP	^M Gag (HIV-1 Clade C, 97CN001; <i>budding</i> kompetent) mit N-terminal integriertem Signalpeptid (MDRAKLLLLLLLLLLLPQAQA)
pcgp120ΔSP	gp120 (HIV-1 Clade C, CN54) mit N-terminal deletiertem Signalpeptid (MDRAKLLLLLLLLLLLPQAQA)

^M = Myristoylierungsstelle

SP = Signalpeptid

Δ = deletiert

C.2.2 Verifizierung der neuen DNA-Konstrukte

C.2.2.1 Überprüfung der Proteinexpression durch die modifizierten Transgene im Western-Blot nach Transfektion von HEK293T Zellen

Um die Expression der modifizierten Transgen-Varianten zu überprüfen, wurden HEK293T Zellen transient transfiziert. 48 h später wurden sowohl die Zelllysate als auch die Überstände im Western-Blot mit Transgen-spezifischen Antikörpern (Tab. B-5) untersucht. Als Negativkontrolle wurden in allen Versuchen mit pcDNA3.1 (Leervektor) transfizierte Zellen verwendet (mock). Der Nachweis von β -Aktin in den Western-Blots erfolgte, um zu zeigen, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden.

Um eine gemeinsame Expression von Gag und Env in transfizierten Zellen gewährleisten zu können, wurden unter Verwendung eines 2a-Peptids des *Thosea asigna virus* (TaV) Transgenvarianten hergestellt, welche sowohl Gag als auch Env auf einem einzigen pcDNA-Plasmid kodieren (Abb. C-2). Im Western-Blot wurde die Proteinexpression dieser 2a-Konstrukte mit Hilfe Gag- und Env-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) überprüft.

Wie in Abbildung C-5 dargestellt, zeigte die biochemische Charakterisierung der Zelllysate beider pcDNA-Konstrukte ^MGag-2a-gp120 und gp120-2a-^MGag sowohl eine Gag-spezifische Proteinbande bei 55 kD (Abb. C-5, Abschnitt A) als auch die für das Transgen Env spezifische Bande bei 120 kD (Abb. C-5, Abschnitt C). Dabei ist die Laufhöhe des dem TaV2a vorangehenden Transgens jeweils etwas erhöht, da dieses durch das Anfügen des 2a-Peptids um 16 Aminosäuren verlängert wurde. Die Expressionsstärke ist in beiden Fällen mit derjenigen vergleichbar, die nach Transfektion von Plasmiden erhalten wird, die nur ein Antigen kodieren (^MGag oder gp120), bzw. einer äquimolaren Mischung beider Plasmid-DNAs. Bei der Analyse der aufbereiteten Zellüberstände (B.2.2.1) lassen sich, mit Ausnahme der Transfektion des gp120-2a-^MGag Konstrukts, die gleichen Beobachtungen treffen. Bei letzterem zeigte sich bei der Analyse der Zelllysate eine deutliche Bande für ^MGag bei 55 kD, jedoch konnte im Überstand nur ein schwacher Nachweis von Gag erbracht werden (Abb. C-5, Abschnitt B). Ein Grund hierfür könnte ein fehlerhaft prozessiertes Myristoylierungssignals am ^MGag sein, welches somit nicht korrekt zur Plasmamembran transportiert und in Partikel verpackt werden würde.

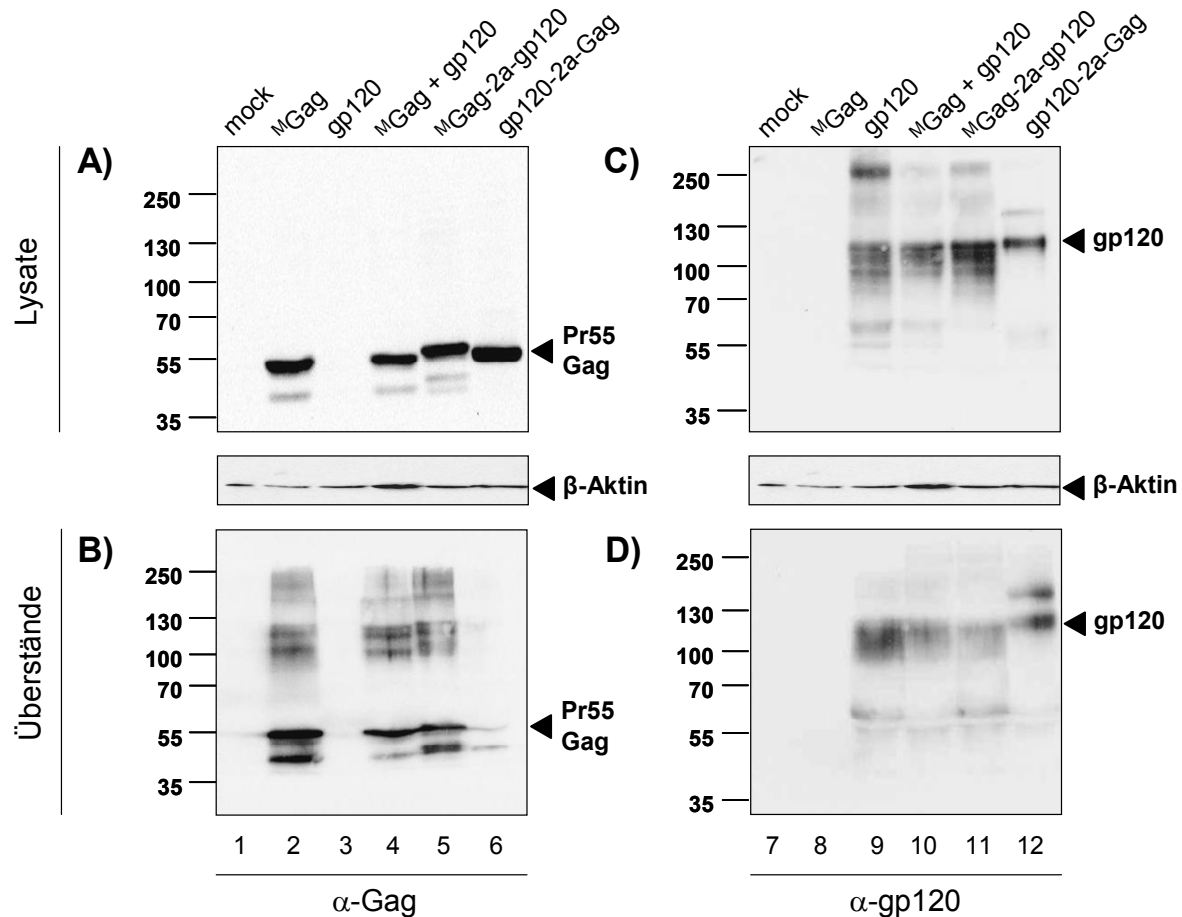


Abb. C-5: Nachweis von Transgenexpression durch die 2a-Konstrukte mittels Western-Blot Analyse

HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen Plasmid-DNA-Konstrukten transient transfiziert. Die Zellen wurden zusammen mit den Überständen 48 h nach Transfektion geerntet. Ein Zehntel des abgenommenen Überstands wurde mittels TCA/Aceton Fällung aufgearbeitet und, ebenso wie die Zelllysate (50 μ g Gesamtprotein), mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt. Unter Verwendung Transgen-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) erfolgte der Nachweis der Proteinexpression im Western-Blot (mock: mit Leervektor transfizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Der Nachweis von β -Aktin (42 kD) diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge. Die für das jeweilige Transgen spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der verwendete Protein Marker ist jeweils mit den Größen 35 - 250 kD am linken Rand der Gele eingezeichnet.

In einer weiteren Western-Blot Analyse wurden die Konstrukte untersucht, welche einen weiteren Aufschluss über einen möglichen Inhibitionseffekt von Env auf Gag geben könnten. Einen Mechanismus der Inhibition könnte z.B. eine mögliche Konkurrenz der immundominanten Epitope von Gag und Env um die Präsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen darstellen.

Zur genaueren Überprüfung wurde eine Transgenvariante hergestellt, welche eine Deletion des gp120-spezifischen Epitops V11V aufweist. Des Weiteren erfolgte die Integration des Gag- bzw. gp120-spezifischen Epitops in das jeweils andere Transgen ^MGag und gp120 (Abb. C-3). Die daraus resultierenden Konstrukte ^MGag-V11V, gp120-A9I und gp120 Δ V11V

wurden anschließend zur Verifizierung unter Verwendung Gag- und Env-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) in einem Western-Blot analysiert.

Hierbei zeigte sich bei allen Konstrukten sowohl in den Lysaten als auch in den Überständen eine effiziente Proteinexpression mit der jeweils für das Transgen spezifischen Expressionsgröße 55 kD (Gag) und 120 kD (Env) (Abb. C-6). Zur Kontrolle wurden Lysate und Überstände aus mit ^MGag und gp120 transfizierten Zellen aufgetragen, die zum Vergleich einer ausreichenden bis guten Expressionsstärke der modifizierten Transgene dienten.

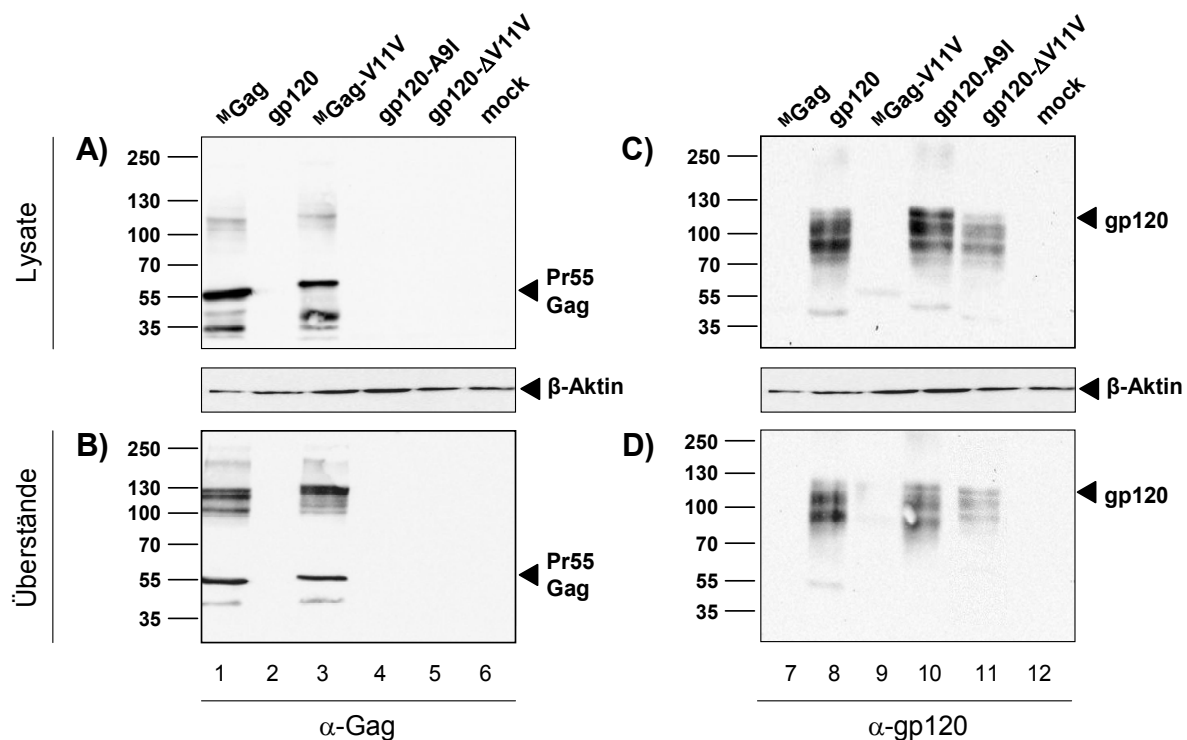


Abb. C-6: Nachweis der Proteinexpression nach Integration des immundominanten Epitops in das jeweils andere Transgen mittels Western-Blot Analyse

HEK293T Zellen wurden mit den angegebenen DNA-Konstrukten mittels jetPEI transient transfiziert und 48 h später geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot unter Verwendung Transgen-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) hinsichtlich der Expression des Transgens untersucht. Ein Zehntel des jeweils geernteten Überstands wurde mit Hilfe einer TCA/Aceton Fällung aufgearbeitet, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls im Western-Blot analysiert (mock: mit Leervektor transfizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Der Nachweis von β-Aktin (42 kD) diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge. Die für das jeweilige Transgen spezifischen Banden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der verwendete Protein Marker ist jeweils mit den Größen 35 - 250 kD am linken Rand der Gele eingezeichnet.

Die Verifizierung der Konstrukte mit einer Veränderung im artifiziiellen Signalpeptid der Transgene war Bestandteil einer dritten Western-Blot Analyse.

Eine weitere Möglichkeit der Aufklärung des Mechanismus bestand darin, die Lokalisierung und damit die Prozessierung von Gag durch das Anfügen eines Signalpeptids zu

Konstrukts zeigte hingegen, verglichen mit der Analyse gp120 transfizierter Zellen, keine nachweisbare Expression des modifizierten Transgens (Abb. C-7, Abschnitt C). Der Nachweis einer Proteinbande bei 70 kD deutet vermutlich eine fehlerhafte Glykosylierung des Immunogens gp120 Δ SP an.

Wie in Abschnitt B und D zu sehen, konnte keines der beiden Konstrukte im Überstand transfizierter Zellen nachgewiesen werden. Einen Grund hierfür könnte eine durch das Anfügen bzw. Entfernen des Signalpeptids entstandene fehlerhafte Prozessierung der neuen Transgene darstellen (D.1.3).

C.2.2.2 **FACS-Analyse bestätigt Expression der modifizierten Transgene ^MGag-2a-gp120 und gp120-2a-^MGag**

Eine Möglichkeit zur Überprüfung der Expression der modifizierten Transgene ^MGag-2a-gp120 und gp120-2a-^MGag auf Einzelzellbasis stellt die FACS-Analyse dar. Hierzu wurden HEK293T Zellen mit den zu untersuchenden Plasmiden transfiziert und 24 h später analysiert. Der intrazelluläre Nachweis der Proteine erfolgte unter Verwendung Gag- und Env-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) mittels FACS-Analyse.

Wie in Abbildung C-8 dargestellt, führte die Transfektion mit einer Mischung aus ^MGag und gp120 kodierender DNA zu 27,1 % Gag-positiver und 10,1 % Env-positiver Zellen. In nur 8,3 % aller Zellen lässt sich die Expression beider Antigene nachweisen.

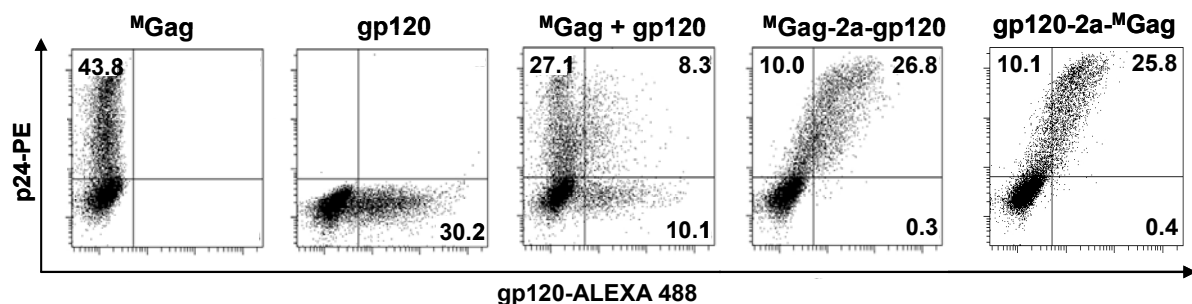


Abb. C-8: Verifizierung der Expression von Gag und Env in co-transfizierten 293T Zellen verglichen mit der Transfektion der TaV2a-Konstrukte mittels FACS-Analyse

Mit den angegebenen DNA-Konstrukten transient transfizierte HEK293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion geerntet, die Zellen wurden mit Transgen-spezifischen Antikörpern (Tab. B-5) gefärbt und in einer FACS-Analyse hinsichtlich ihrer Transgen Expression untersucht. Aufgetragen sind auf der X-Achse die gp120 exprimierenden und auf der Y-Achse alle Gag exprimierenden Zellen. Die Anzahl der einzel- und doppelt-positiven Zellen ist mit den jeweiligen Prozentzahlen angegeben. Die Beschreibung ^MGag+gp120 bezeichnet die Transfektion mit einer äquimolaren Mischung aus ^MGag und gp120.

Im Gegensatz dazu exprimieren im Falle von ^MGag-2a-gp120 26,8 % und nach Transfektion mit gp120-2a-^MGag 25,8 % aller Zellen beide Proteine (Abb. C-8). Nur 10 % bzw. 10,1 % exprimieren ausschließlich Gag, und 0,3 % bzw. 0,4 % weisen ausschließlich eine

Expression von Env auf. Die hergestellten pcDNA Konstrukte mit den Transgenvarianten ^MGag-2a-gp120 und gp120-2a-^MGag gewährleisten somit die gemeinsame Expression von ^MGag und gp120 in einer Zielzelle.

C.3 Entwicklung und Verifizierung rekombinanter Viren

C.3.1 Herstellung rekombinanter Viren

C.3.1.1 Allgemein

Die Herstellung der rekombinanten NYVAC beruht auf dem Prinzip der homologen Rekombination, welche in einem zweistufigen Prozess abläuft und unter C.3.1.3.1 und C.3.1.3.2 genauer erläutert wird. In einem ersten Schritt wird, unter Verwendung eines Transfervektors, eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen zusammen mit einem geeigneten Reportergen in das Genom des *New York Vacciniavirus* (NYVAC) eingebracht (1. homologe Rekombination). Die Integration des Transgens erfolgt dabei in den im NYVAC Genom deletierten Leserahmen des für das Virus nicht-essentiellen Thymidinkinasegens (J2R) (Abb. C-9).

Nach den ersten Selektionsrunden findet eine spontane Ausrekombination des Reportergens statt, so dass ein rekombinantes NYVAC entsteht, welches spezifisch nur noch die gewünschte Transgenkassette enthält (2. homologe Rekombination). Durch Infektion permissiver eukaryotischer Zellen und der anschließenden Durchführung eines *Plaque* Assays erfolgten die Aufreinigung der NYVAC Varianten sowie die Herstellung funktioneller Viren.

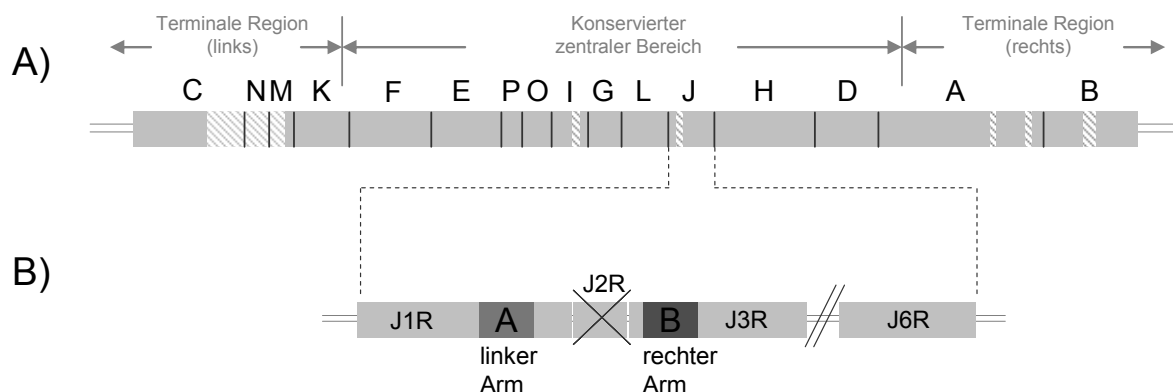


Abb. C-9: Schematischer Überblick der Integrationsstelle im NYVAC Genom

A) Dargestellt ist das Genom des *New York Vacciniavirus* (NYVAC) mit allen offenen Leserahmen (ORFs). Die Deletion aller 18 ORFs ist im NYVAC Genom markiert.

B) Den im NYVAC deletierten ORF J2R (Gen der Thymidinkinase) flankieren zwei homologe Bereiche die für die Integration der Transgene benötigt werden (linker Arm und rechter Arm).

C.3.1.2 Aufbau des Transfervektors pLZAW1

Bei dem Transfervektor pLZAW1 handelt es sich um ein DNA-Plasmid, welches sowohl eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen als auch das Reportergen LacZ enthält. Die am 5' bzw. 3' Ende befindlichen Bereiche 'linker Arm' (499 bp) und 'rechter Arm' (692 bp) sind homolog zur NYVAC Sequenz und vermitteln die gerichtete Insertion des Transgens ins NYVAC Genom mittels homologer Rekombination. Ein Teil des Bereichs des 'linken Arms' (348 bp) befindet sich weiterhin zwischen dem Reportergen und dem Transgen und dient zur Ausrekombination des Reportergens LacZ bei der Anreicherung der rekombinanten Viren. Vacciniaviren replizieren vollständig im Zytoplasma der Zelle, so dass die Synthese der RNA auch dort und nicht im Zellkern stattfindet. Die somit zur korrekten Transkription von Transgen und Reportergen im Zytoplasma benötigten Vacciniavirus-spezifischen Promotoren E3L und E/L (*early/late* Promotor) sind ebenfalls im Transfervektor enthalten (Abb. C-10).



Abb. C-10: Schematische Darstellung des Transfervektors pLZAW1 mit dem Transgen ^MGag und dem Reportergen LacZ für die Integration in das NYVAC Genom

Das Transferkonstrukt enthält eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen (hier z.B. ^MGag) und eine zweite für das Reportergen LacZ. Rechter und linker Arm sind Bezeichnungen für die zur NYVAC Sequenz homologen Bereiche und vermitteln die gerichtete Integration des Transgens bzw. die Ausrekombination des Reportergens LacZ. E/L und E3L bezeichnen die zur korrekten Transkription von Transgen und Reportergen benötigten Vacciniavirus-spezifischen Promotoren.

C.3.1.3 Homologe Rekombination

C.3.1.3.1 Einbringen des Transgens in den pockenviralen Vektor NYVAC (1. Rekombinationsschritt)

Im dargestellten Beispiel wurde eine Expressionskassette für das Transgen ^MGag zusammen mit dem Reportergen LacZ über homologe Rekombination in das NYVAC Genom eingebracht.

Dazu wurden im ersten Schritt eukaryotische Zellen mit NYVAC-GFP infiziert und anschließend mit dem Transfervektor pLZAW1-^MGag (Beschreibung: Tab. B-9) transfiziert. Über die im Transfervektor integrierten homologen Bereiche, 'linker Arm' und 'rechter Arm', findet, wie in Abbildung C-11 (Abschnitt A-C) dargestellt, die Integration von Transgen und Reportergen in den Lokus der Thymidinkinase des NYVAC Genoms statt.

Das grün-fluoreszierende Protein (GFP) wurde somit durch das Transgen ^MGag zusammen mit dem Reportergen ersetzt, und eine erste optische Selektion ist unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskops möglich.

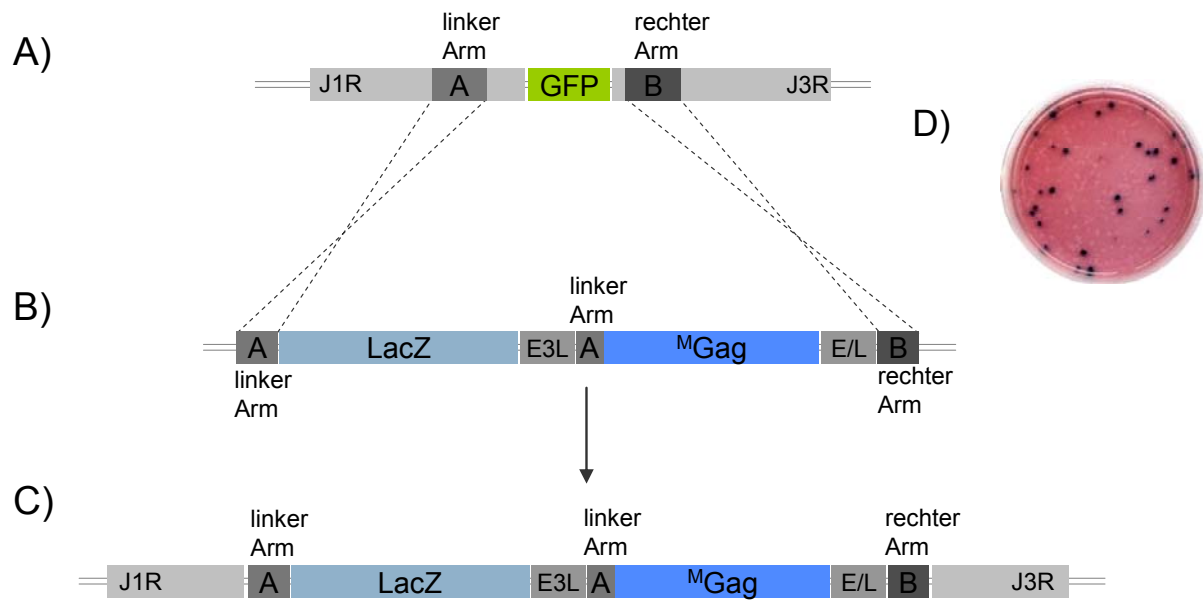


Abb. C-11: Schematische Darstellung des 1. Rekombinationsschritts zum Einbringen des Transgens

A) Dargestellt ist ein Ausschnitt aus dem NYVAC-GFP Genom mit den beiden homologen Bereichen (linker und rechter Arm) welche zur Integration des Transferkonstrukts benötigt werden.

B) Schematische Darstellung des Transferkonstrukts, welches eine Expressionskassette für das Transgen (^MGag) und für das Reportergen LacZ enthält, und des ersten Rekombinationsschritts über die zum NYVAC Genom homologen Bereiche (linker und rechter Arm).

C) Integration des Transgens und des Reportergens in den im NYVAC Genom deletierten Leserahmen des nicht-essentiellen Thymidinkinasgens.

D) Darstellung einer Kulturschale mit blauen Plaques zur Selektion der ersten homologen Rekombination.

Des Weiteren lässt sich mittels spezifischer Primer die korrekte Integration der Transgen-Reportergen-Kassette mit Hilfe einer PCR Analyse überprüfen (C.3.2.2). Die erste Anreicherung des hergestellten rekombinanten NYVAC erfolgte mittels Selektion auf das integrierte LacZ-Gen unter Verwendung eines *Plaque Assays*.

Durch Zugabe von Blue-Gal (5-Bromo-3-Indolyl-beta-D-galactosid), ein Substrat für das Enzym β -Galactosidase, für welches das eingebrachte Reportergen LacZ kodiert, konnte mittels *Blau-Weiß-Screening* auf die Integration von Transgen zusammen mit dem Reportergen (blaue Plaques) selektioniert werden (Abb. C-11, Abschnitt D).

C.3.1.3.2 Entfernen des zur Selektion verwendeten Gens LacZ (2. Rekombinationsschritt)

Zur Ausrekombination des zur Selektion benötigten Gens LacZ wurden weitere Aufreinigungsschritte durchgeführt. Über die homologen Bereiche (linker Arm) 5' und 3' des Reportergens LacZ findet im Verlauf der Aufreinigung eine interne homologe Rekombination statt, welche zur rückstandsfreien Entfernung des Reportergens führt (Abb. C-12, Abschnitt A und B).

Dieser interne Rekombinationsschritt findet im Verlauf der Anreicherung spontan statt. Aus diesem Grund ist die weitere Selektion auf blaue Plaques (LacZ positiv) zu Beginn der einzelnen Aufreinigungsschritte nötig.

Ab dem Auftreten einer Mischung aus weißen und blauen Plaques konnte im Folgenden auf beide selektioniert werden. Zum Ende der Aufreinigung wurden ausschließlich weiße Plaques, welche bereits LacZ negativ sein müssten, analysiert (Abb. C-12, Abschnitt C).

Die so nach ca. neun Aufreinigungsrunden entstandenen NYVAC enthalten ausschließlich das gewünschte Transgen ^MGag unter Kontrolle des Vaccinia-spezifischen Promotors E/L.

Im Anschluss an jede durchgeführte Aufreinigung wurden die gewonnenen Plaques mittels PCR und Western-Blot Analyse verifiziert.

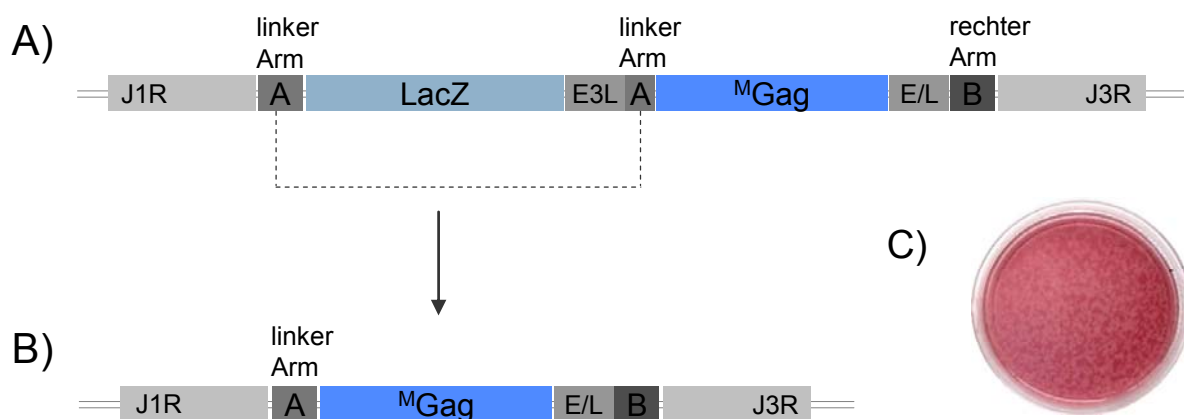


Abb. C-12: Schematische Darstellung des 2. Rekombinationsschritts zum Entfernen des Reportergens LacZ

A) Dargestellt sind das im NYVAC Genom integrierte Transgen in Kombination mit dem Reportergen LacZ sowie der zweite Schritt der homologen Rekombination über die flankierenden homologen Bereiche des LacZ Gens (linker Arm).

B) Schematische Darstellung des ins NYVAC Genom integrierten Transgens ^MGag und des ausrekombinierten Reportergens LacZ.

C) Darstellung einer Kulturschale mit weißen Plaques zur Selektion der zweiten homologen Rekombination.

C.3.2 Verifizierung der rekombinanten Viren am Beispiel des eingebrachten Transgens ^MGag

C.3.2.1 *Western-Blot Analyse bestätigt erfolgreiche Expression des im Transfektor eingebrachten Transgens ^MGag*

Zur Bestimmung der erfolgreichen Expression der im Transfektor eingebrachten Transgene wurden Zellen mit NYVAC-wt infiziert und anschließend mit den pLZAW1-Vektoren transfiziert. Unter Verwendung eines Transgen-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) erfolgte die biochemische Charakterisierung der Zelllysate und deren Überstände (exemplarisch für das Transgen ^MGag).

Sowohl die Analyse der Lysate als auch der Überstände infizierter/transfizierter Zellen zeigte eine Gag-spezifische Bande bei 55 kD und stellte somit eine effiziente Expression des eingebrachten Transgens ^MGag dar. Mit NYVAC-wt infizierte Zellen (mock) dienten als Negativkontrolle und zeigten keine spezifischen Banden im Western-Blot.

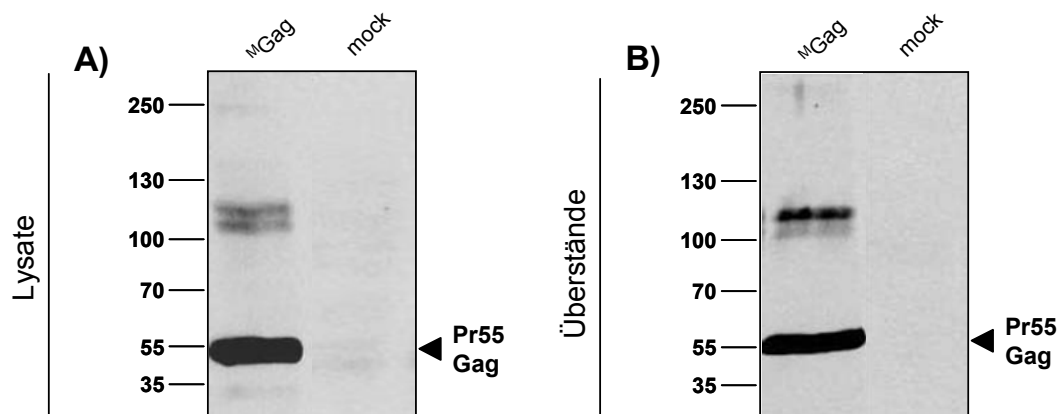


Abb. C-13: Nachweis der Expression des Transgens ^MGag im Transfektor pLZAW1

BHK-21 Zellen wurden mit NYVAC-GFP infiziert und anschließend mit dem ^MGag-pLZAW1 Transfektor transient transfiziert. 48 h nach Infektion/Transfektion wurden die Zellen geerntet und 50 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) erfolgte der Nachweis der Proteinexpression im Western-Blot. Ein Zehntel des geernteten Überstands wurde mit Hilfe einer TCA/Aceton Fällung aufgearbeitet, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls im Western-Blot analysiert (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der verwendete Protein Marker ist jeweils mit den Größen 35 - 250 kD am linken Rand der Gele eingezeichnet.

C.3.2.2 *PCR-Analyse bestätigt erfolgreiches Einbringen des Transgens ^MGag und Entfernen des Reportergens LacZ im pockenviralen Vektor*

Im dargestellten Beispiel wurde die Expressionskassette für das Transgen ^MGag unter Kontrolle eines Vaccinia-spezifischen Promotors in das NYVAC Genom eingebracht. Nach erfolgreicher Integration des Transgens ergibt sich in einer PCR-Analyse unter Verwendung spezifischer Primer ein PCR-Produkt mit einer Größe von 0,9 kb. Gewählt wurde ein

Primerpaar bestehend aus einem Gag-spezifischen und einem spezifisch im NYVAC Genom bindenden Primer (Tab. B-3). In jeder Aufreinigungsrunde (Nr.1-9) wurden mehrere Einzelplaques untersucht.

Jeweils drei Plaques, welche in der PCR-Analyse ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe aufweisen konnten, wurden in die nächste Aufreinigungsrunde eingesetzt (Abb. C-14). Die Identität der Banden wurde dabei zuvor durch Sequenzierung bestätigt.

Als Positivkontrolle diente der Nachweis eines spezifischen PCR-Produkts des NYVAC-GFP, als Negativkontrolle wurde NYVAC-wt verwendet.

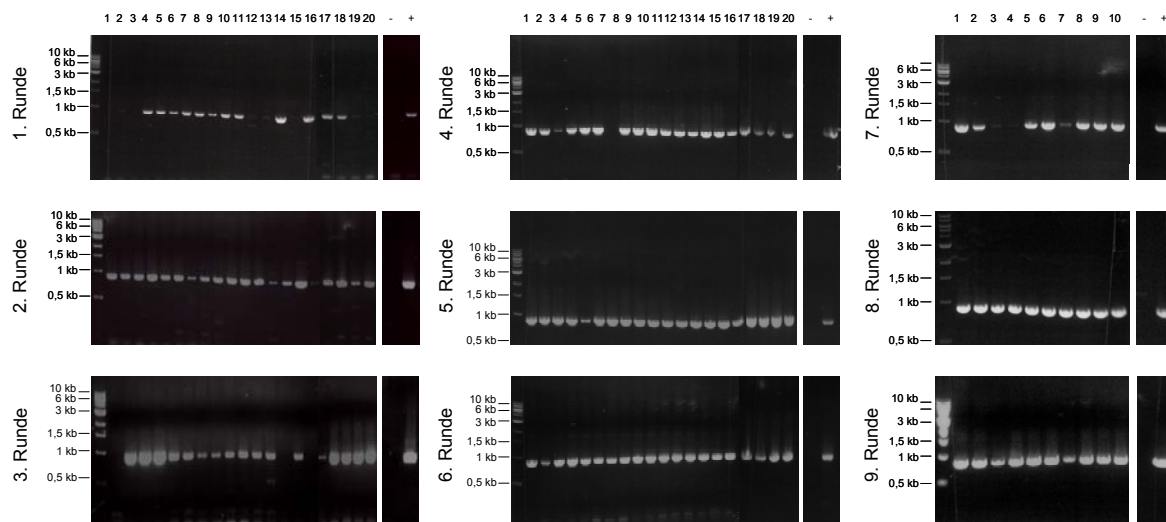


Abb. C-14: Untersuchung auf Integration des Transfervektors (1. homologe Rekombination) ins NYVAC Genom mittels PCR-Analyse

Untersucht wurden je Aufreinigungsrunde (Bezeichnung 1. - 9.) mehrere Einzelplaques hinsichtlich der Integration des Transfervektors. Für den Nachweis der erfolgreichen Integration wurden spezifische Primer im Transgen und im NYVAC Genom gewählt (Tab. B-3).

Als Positivkontrolle diente der Nachweis eines spezifischen PCR-Produkts des NYVAC-GFP, als Negativkontrolle wurde NYVAC-wt verwendet.

Ein 1 kb DNA Marker wurde als Standard verwendet.

Eine zweite homologe Rekombination führt zum rückstandsfreien Ausrekombinieren des Reportergens LacZ, was wiederum mit Hilfe spezifischer Primer (Tab. B-3) in einer PCR-Analyse überprüft wurde. Bedingt durch die Ausrekombination des Reportergens LacZ reduziert sich die Größe des spezifischen PCR-Produkts (Primer im LacZ-Gen sowie im NYVAC-Genom) auf 0,5 kb. Eine weiterhin bestehende Integration des LacZ-Gens lässt sich dagegen durch ein PCR-Produkt bei einer Größe von 4 kb nachweisen.

Es wurden in den beiden Runden mehrere Einzelplaques überprüft, darunter diejenigen die jeweils zur weiteren Aufreinigung verwendet wurden. Es zeigte sich hierbei in allen getesteten Proben eine erfolgreiche Ausrekombination des Reportergens (Abb. C-15, Abschnitt A und B). Als Vergleichskontrolle für den Nachweis von LacZ diente die

PCR-Analyse von mit NYVAC-wt infizierten und mit pLZAW1-^MGag transfizierten Zellen (Abb. C-15, Abschnitt A).

Zusätzlich wurde unter Verwendung eines GFP-spezifischen Primers der Austausch des zuvor im NYVAC integrierten grün-fluoreszierenden Proteins überprüft.

Ein rückstandsloser Austausch des GFP führt unter Verwendung spezifischer Primer zu keinem nachweisbaren PCR-Produkt. Hingegen lässt sich ein weiterhin vorhandenes GFP durch ein PCR-Produkt bei einer Größe von 4 kb nachweisen (Abb. C-15, Abschnitt A und B). Wie in Abbildung C-15 dargestellt wiesen alle analysierten Plaques keine nachweisbare Bande für GFP auf.

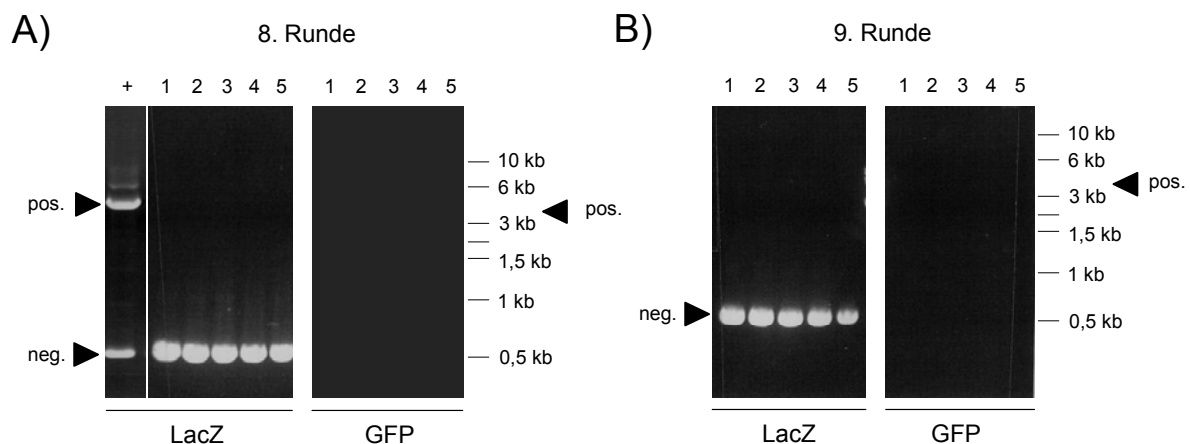


Abb. C-15: Untersuchung auf Ausrekombination des Reportergens LacZ (2. homologe Rekombination) aus dem NYVAC Genom mittels PCR-Analyse

Untersucht wurden auf positive Integration des Transgens getestete Einzelplaques aus den Runden acht und neun. Für den Nachweis der erfolgreichen Ausrekombination wurden spezifische Primer im LacZ-Gen und im NYVAC Genom gewählt (Tab. B-3).

Als Vergleichskontrolle (mit einem + gekennzeichnet) für den Nachweis von LacZ diente die Analyse von mit NYVAC-wt infizierten und mit pLZAW1-^MGag transfizierten Zellen.

Ein 1 kb DNA Marker wurde als Standard verwendet.

Die in der neunten Aufreinigungsrunde getesteten Einzelplaques (1-5) wiesen somit eine erfolgreiche Integration des Transgens ^MGag auf (Abb. C-14), und auch die Ausrekombination des Reportergens LacZ und der Austausch von GFP konnten mittels PCR-Analyse bestätigt werden (Abb. C-15).

Als zusätzliche Kontrolle wurden die in den letzten Aufreinigungsrunden erhaltenen Plaques hinsichtlich ihrer Transgenexpression biochemisch charakterisiert (C.3.2.3).

C.3.2.3 Western-Blot Analyse bestätigt Expression des eingebrachten Transgens ^MGag in den einzelnen Aufreinigungsschritten

Zur weiteren Verifizierung wurde in den letzten vier Aufreinigungsschritten die Proteinexpression der eingebrachten Transgene überprüft.

Für den Nachweis der Expression wurden BHK-21 Zellen mit jeweils zehn Einzelplaquesuspensionen, welche in der PCR-Analyse (C.3.2.2) ein korrektes PCR-Produkt aufwiesen, infiziert. Es wurden die Zelllysate gewonnen und mit Hilfe eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) im Western-Blot analysiert. Im Folgenden sind exemplarisch die Ergebnisse der Aufreinigung des Transgens^MGag dargestellt.

Bei der Analyse der Zelllysate der mit den Einzelplaques Nr.2 und Nr.5-8 infizierten Zellen aus der sechsten Aufreinigungsrunde zeigte sich durch den Nachweis einer Gag-spezifischen Bande bei 55 kD die Expression des Transgens^MGag. Die Infektion mit den Plaques Nr.1, Nr.3-4 und Nr.9-10 führte jedoch nur zu einer schwachen oder keiner Expression des eingebrachten Transgens (Abb. C-16, Abschnitt A). Auch in den Aufreinigungsrunden sieben und acht liesen sich sowohl Transgen exprimierende als auch nicht exprimierende Einzelplaques beobachten (Abb. C-16, Abschnitt B und C).

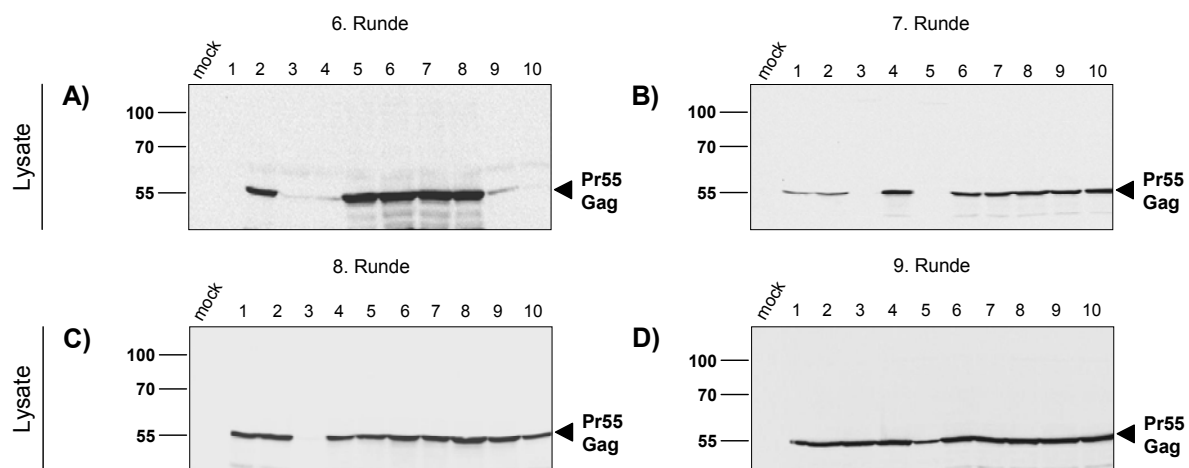


Abb. C-16: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens^MGag in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 6-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der verwendete Protein Marker ist jeweils mit den Größen 55 - 100 kD am linken Rand der Gele eingezeichnet.

Zur Infektion von BHK-21 Zellen für die jeweils nächste Aufreinigung wurden Plaquesuspensionen verwendet die sowohl eine sehr gute Expression des Transgens^MGag zeigten, als auch in der dazugehörigen PCR-Analyse ein korrektes PCR-Produkt hinsichtlich der Integration des Transgens sowie der Ausrekombination des Reportergens LacZ aufwiesen (z.B. aus Runde sechs Plaque Nr.5). Die Analyse des letzten Aufreinigungsschritts zeigte eine Expression des Transgens^MGag in allen getesteten Einzelplaques (Abb. C-16,

Abschnitt D). Mit NYVAC-wt infizierte Zellen (mock) dienten als Negativkontrolle und zeigten keine spezifischen Banden im Western-Blot.

Zur Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks wurde der Einzelplaque Nr.4 aus der neunten Aufreinigungsrunde verwendet.

C.3.2.4 *Plaque Assay und anschließende Western-Blot Analyse zeigen die Expression des Transgens in 100 % der rekombinanten NYVAC-^MGag*

Die hergestellten rekombinanten NYVAC sollen in nachfolgenden *in vivo* Studien eingesetzt, und hinsichtlich ihrer Fähigkeit Transgen-spezifische T-Zell Antworten zu induzieren untersucht werden. Für die Verwendung der Viren im Mausmodell ist eine sehr gute Expression des eingebrachten Transgens nötig.

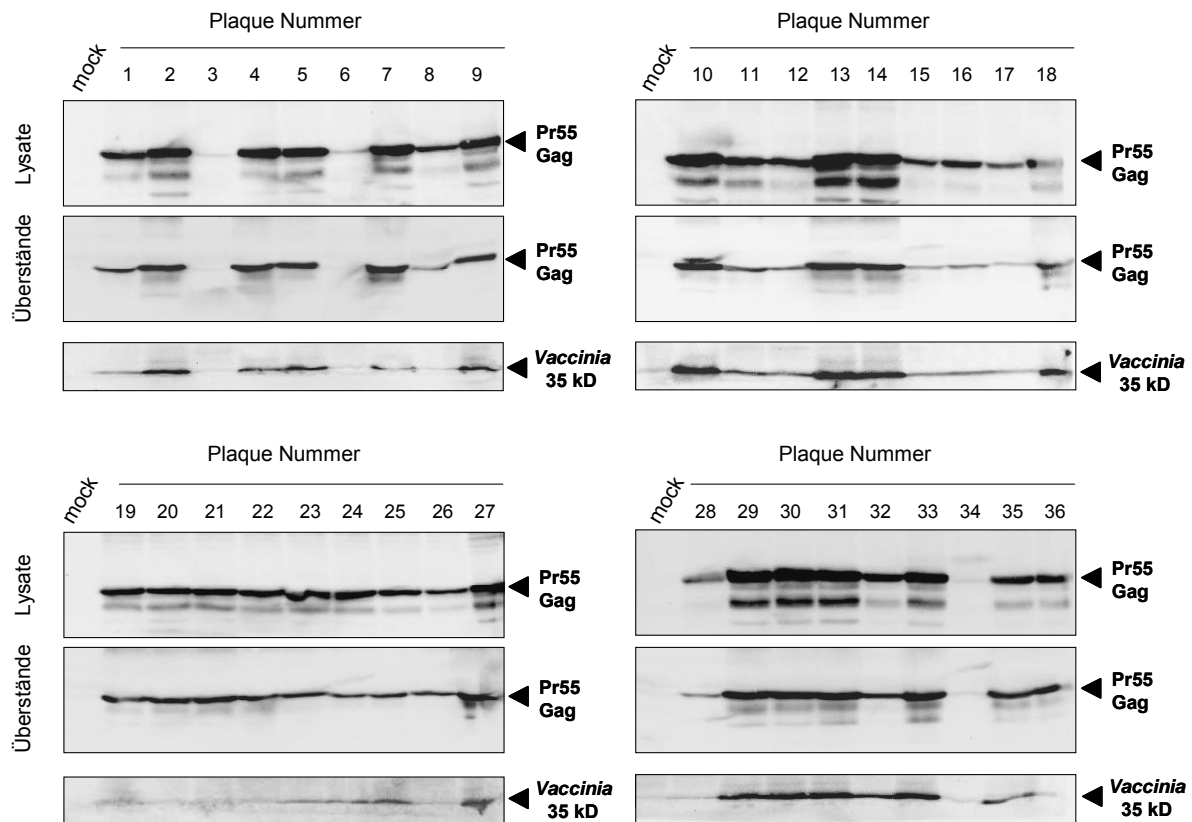


Abb. C-17: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC-^MGag mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Virusstocks infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5). Ein Zehntel des geernteten Überstands wurde mit Hilfe einer TCA/Aceton Fällung aufgearbeitet, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls im Western-Blot analysiert (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Der Nachweis eines Vacciniavirus-spezifischen Proteins (35 kD) diente zum Vergleich der Virusmengen in den aufgetragenen Proben.

Aus diesem Grund wurde die Expressionseffizienz in allen hochtitrigen Virusstocks mittels *Plaque Assay* und anschließender Western-Blot Analyse überprüft. Exemplarisch ist hier wiederum das Expressionsprofil von NYVAC-^MGag aufgeführt.

Für den Nachweis der Proteinexpression wurden BHK-21 Zellen mit 36 Einzelplaques infiziert. Im Anschluss wurden sowohl die Zelllysate als auch die Überstände unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) analysiert.

Die Western-Blot Daten zeigen die Expression des eingebrachten Transgens in 36 von 36 getesteten Plaques. Somit ergibt sich für NYVAC-^MGag eine Expressionseffizienz von 100 %. Der Nachweis von NYVAC mittels eines Vacciniavirus-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) erfolgte, um zu zeigen, dass vergleichbare Virusmengen in allen analysierten Einzelplaques vorhanden waren (Abb. C-17). Hierbei korrelierte die Stärke der Expression von ^MGag mit dem Nachweis des Vacciniavirus-spezifischen Proteins.

Die Bestimmung der Expressionseffizienz wurde für alle rekombinanten Viren durchgeführt und ist in der Tabelle C-2 zusammengefasst.

C.3.2.5 Mit rekombinanten NYVACs infizierte Zellen zeigen Expression der eingebrachten Transgene

Die am Beispiel des Transgens ^MGag gezeigte Verifizierung der rekombinanten NYVAC in den einzelnen Aufreinigungsrunden wurde für alle hergestellten Viren durchgeführt und es zeigten sich vergleichbare Ergebnisse.

Im Folgenden wurden alle rekombinanten Viren aus den hochtitrigen Virusstocks hinsichtlich der Transgenexpression in Western-Blot Analysen untersucht. Hierzu wurden sowohl die Lysate als auch die Überstände von mit rekombinantem NYVAC infizierten Zellen unter Verwendung Transgen-spezifischer Antikörper (Tab. B-5) im Western-Blot analysiert.

Wie in Abbildung C-18 (Abschnitt A) dargestellt, führte sowohl die Infektion mit NYVAC-C als auch die Infektion mit NYVAC-^{ΔM}GPN zur Expression des 160 kD Polyproteins GPN im analysierten Zelllysate, wobei sich im Vergleich der Expressionsstärken eine leichte Steigerung bei NYVAC-^{ΔM}GPN beobachten lässt.

Das Einfügen des natürlichen viralen *Frame-Shift* Signals zwischen dem Gag- und Pol-Leserahmen und die anschließende Analyse des daraus resultierenden NYVAC-^{ΔM}G^{FS}PN, zeigte einen vollständigen Rückgang der Expression des artifiziellen Polyproteins. Jedoch exprimieren die mit NYVAC-^{ΔM}G^{FS}PN infizierten Zellen eine deutlich erhöhte Menge des Pr55 Gag Vorläuferproteins, wie ebenfalls in der Auswertung des Zelllysates gezeigt.

Die Wiederherstellung der Myristoylierungsstelle im NYVAC-^MG^{FS}PN führte wiederum zu einer Expression des 160 kD Proteins GPN und zu einer ebenfalls deutlich erhöhten und mit NYVAC-^{ΔM}G^{FS}PN vergleichbaren Expression des Gag Proteins bei 55 kD.

Im Vergleich zur Infektion mit NYVAC-^MGag, welche zu einer sehr guten Expression des eingebrachten Transgens führte, weisen Zellen die mit NYVAC-^{ΔM}Gag infiziert wurden in der biochemischen Charakterisierung der Zellysate eine deutlich schwächere Expression des Pr55 Gag Proteins auf.

Sowohl die Infektion mit NYVAC-^MG^{FS}PN, als auch die Infektion mit NYVAC-^MGag führte zur Freisetzung von Gag, welche durch das Vorhandensein des Pr55 Gag Vorläuferproteins im Überstand nachgewiesen wurde. Die Auswertung der eingesetzten Überstände aus mit NYVAC-^{ΔM}G^{FS}PN infizierten Zellen weisen hingegen eine deutlich schwächere Expression des Pr55 Gag auf (Abb. C-18, Abschnitt B).

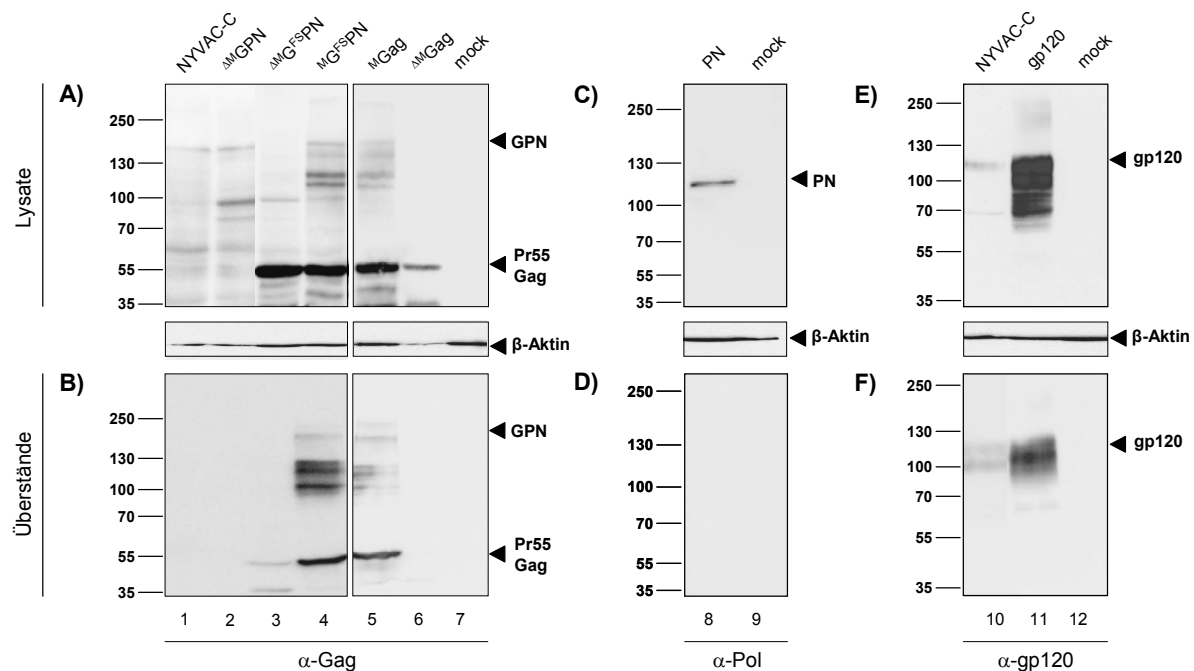


Abb. C-18: Nachweis der Transgenexpression mittels Western-Blot Analyse von BHK-21 Zellen nach Infektion mit unterschiedlichen rekombinanten NYVACs

BHK-21 Zellen wurden mit den angegebenen rekombinanten NYVACs mit einer MOI 0,5 infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und 50 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Unter Verwendung eines Transgen-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) erfolgte der Nachweis der Proteinexpression im Western-Blot. Ein Zehntel des geernteten Überstands wurde mit Hilfe einer TCA/Aceton Fällung aufgearbeitet, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und ebenfalls im Western-Blot analysiert (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Der Nachweis von β-Aktin (42 kD) diente als Ladekontrolle für die eingesetzte Proteinmenge. Die für das jeweilige Transgen spezifischen Banden sind mit einem Peil gekennzeichnet.

Der verwendete Protein Marker ist jeweils mit den Größen 35 - 250 kD am linken Rand der Gele dargestellt.

Die Expression der Transgene PolNef und gp120 nach Infektion eukaryotischer Zellen mit den entsprechenden rekombinanten Viren NYVAC-PN und NYVAC-gp120 wurde ebenfalls mittels Western-Blot analysiert. Dabei konnte, wie erwartet, die Expression des Transgens

PolNef bei 120 kD ausschließlich im Lysat von mit NYVAC-PN infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. C-18, Abschnitt C und D).

Hingegen führte, wie in den aufgetragenen Zelllysaten dargestellt, die Infektion mit NYVAC-gp120 zu einer effizienten und im Vergleich zur Infektion mit NYVAC-C zu einer deutlich verbesserten Expression des 120 kD großen Hüllproteins gp120. Auch lässt sich im Überstand der infizierten Zellen eine Expressionsbande bei 120 kD nachweisen. Diese ist in ihrer Expressionsstärke für das NYVAC-gp120, wiederum verglichen mit NYVAC-C, deutlich erhöht (Abb. C-18, Abschnitt E und F).

Der Nachweis von β -Aktin im Western-Blot erfolgte, um zu zeigen, dass vergleichbare Proteinmengen eingesetzt wurden (Abb. C-18).

C.3.3 Überblick rekombinante Viren

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. C-2) sind alle rekombinanten NYVAC, die im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit Dr. Kathrin Kindsmüller hergestellt wurden, mit ihrer Bezeichnung, einer kurzen, zusammenfassenden Beschreibung der eingebrachten Transgene sowie der jeweiligen Expressionseffizienz der hergestellten rekombinanten Viren aufgelistet.

Tab. C-2: Übersicht rekombinante NYVACs

Bezeichnung	Beschreibung Transgen	Expressions-effizienz
NYVAC-GFP	GFP (grün fluoreszierendes Protein)	-
NYVAC- ΔM GPN	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), nicht <i>budding</i> kompetent, kein ribosomaler <i>Frame Shift</i>	97 %
NYVAC- ΔM G ^{FS} PN	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), nicht <i>budding</i> kompetent, ribosomaler <i>Frame Shift</i> (95 % Gag / 5 % GPN)	100 %
NYVAC- ^M G ^{FS} PN	GagPolNef (Polyprotein: Gruppenspezifisches Antigen, Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, 97CN001 Gag und CN54 PN), <i>budding</i> kompetent, ribosomaler <i>Frame Shift</i> (95 % Gag / 5 % GPN)	100 %

Bezeichnung	Beschreibung Transgen	Expressions-effizienz
NYVAC- ^M Gag	Gag (Gruppenspezifisches Antigen; HIV-1 Clade C, 97CN001), <i>budding</i> kompetent	100 %
NYVAC- ^{ΔM} Gag	Gag (Gruppenspezifisches Antigen; HIV-1 Clade C, 97CN001), nicht <i>budding</i> kompetent	100 %
NYVAC-PN	PolNef (Reverse Transkriptase, Protease; HIV-1 Clade C, CN54)	94 %
NYVAC-gp120	gp120 (Teil des Hüllproteins Env; sezerniert; HIV-1 Clade C, CN54)	96 %

^M = Myristoylierungsstelle

^{ΔM} = mutierte Myristoylierungsstelle

^{FS} = ribosomaler *Frame Shift* (HIV-1)

C.4 *In vivo* Applikation der DNA-Konstrukte mit modifizierten Transgenen

C.4.1 Unterdrückung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten nach Verabreichung der 2a-Konstrukte sowie einer Mischung aus ^MGag und gp120

In ersten Immunisierungsstudien wurde der Einfluss von Env auf die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten im Zusammenhang mit den 2a-Konstrukten, welche eine Co-Lokalisierung von Env und Gag in einer infizierten Zelle gewährleisten (C.2.1.2), untersucht.

Je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe wurden hierzu einmal mit 70 µg des jeweils angegebenen 2a-Konstrukts, 57 µg ^MGag, 57 µg gp120, oder mit einer Mischung aus beiden Plasmiden pc^MGag und pcgp120 intramuskulär (i.m.) immunisiert (Abb. C-19, Abschnitt B, Mausgruppen 2-4, 6, 7). Weiterhin erhielt eine Mausgruppe eine räumlich getrennte Applikation von 57 µg ^MGag in den *tibialis anterior* des linken Beins und 57 µg gp120 in den gleichen Muskel des rechten Beins (Abb. C-19, Abschnitt B, Mausgruppe 5). Zwei Wochen später wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag- bzw. Env-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-19, Mausgruppe 1).

Die Auswertung der Daten zeigt, dass durch die Applikation der Plasmide pc^MGag bzw. pcgp120 eine effiziente Induktion Gag- bzw. Env-spezifischer T-Zell Antworten erzielt werden konnte (Abb. C-19, Mausgruppen 2, 3).

Wie aus den Ergebnissen vorangegangener Studien bereits bekannt, führt eine Co-Verabreichung von ^MGag und gp120 zur Unterdrückung der Gag-spezifischen zellulären Immunantworten²¹⁴. Auch in dieser Immunisierungsstudie konnte ein vermindertes Auftreten Gag-spezifischer T-Zellen nach Gabe einer Mischung aus beiden Plasmiden beobachtet werden (Abb. C-19, Mausgruppe 4).

Wie in der zuvor erläuterten FACS-Analyse (C.2.2.2) zu sehen führte die Transfektion der 2a-Konstrukte *in vitro* zur gemeinsamen Expression von ^MGag und gp120 in 26 % aller Zellen, wohingegen die Mischung von ^MGag und gp120 zu lediglich 8 % doppelt positiven Zellen führte. Wie aus den Ergebnissen der beiden Mausgruppen 6 und 7 in Abbildung C-19 ersichtlich, führte die Applikation beider 2a-Konstrukte *in vivo* ebenso wie die verabreichte Mischung von ^MGag und gp120 zur Unterdrückung der Gag-spezifischen zellulären Immunantworten. Eine räumlich getrennte Verabreichung von ^MGag und gp120 resultierte dagegen, wie bereits gezeigt²¹⁴, in der Aufhebung dieses negativen Effekts auf Gag (Abb. C-19, Mausgruppe 5). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gemeinsame Expression beider Transgene in einer Zelle nicht unbedingt ausschlaggebend ist. Eine räumliche Nähe Gag- und Env-infizierter Zellen könnte für die Unterdrückung der Gag-spezifischen Antworten ausreichend sein.

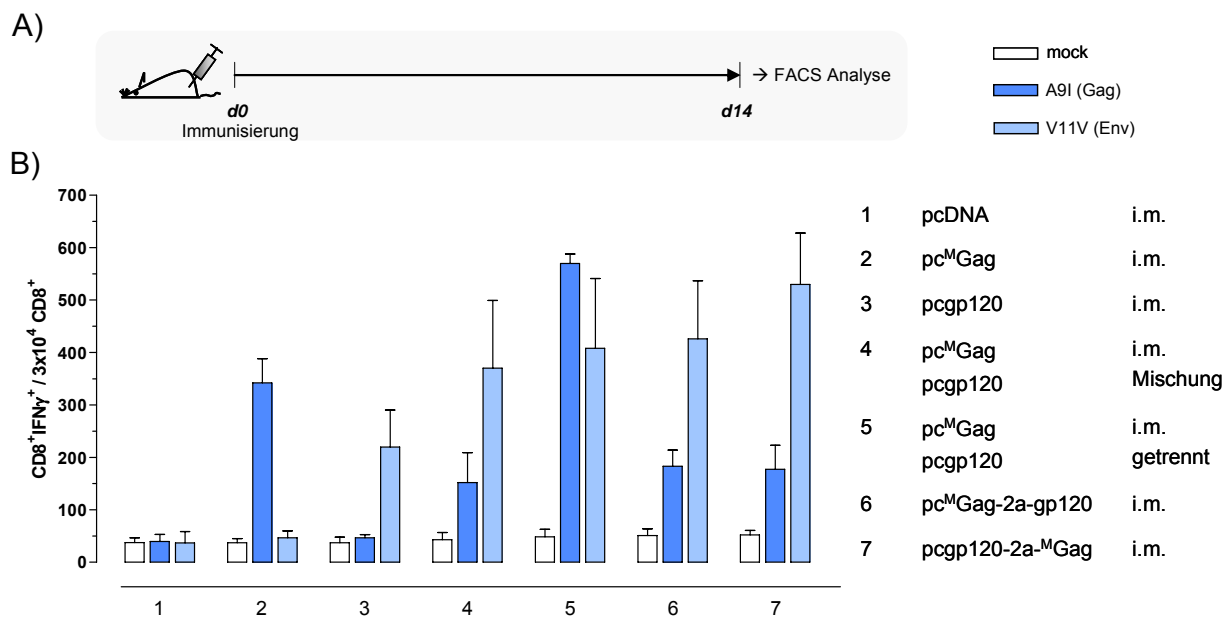


Abb. C-19: Effekt auf die Gag- und Env-spezifischen zellulären Immunantworten nach Immunisierung mit 2a-Konstrukten

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) Gag- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten: 2x10⁶ Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Env-spezifischen V11V Peptid oder mit Medium behandelt. Im Anschluss daran wurde die Anzahl CD8⁺/IFNγ⁺ Zellen pro 30.000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

C.4.2 Deletion des immundominanten Env-spezifischen Epitops V11V im gp120 führt zum Erhalt Gag-spezifischer T-Zell Antworten

Wie bereits erwähnt, könnte ein möglicher Mechanismus der Inhibition die Kompetition der immundominanten Epitope von Gag und Env um die Präsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen darstellen.

Um dies zu überprüfen, wurde in einer weiteren Immunisierungsstudie untersucht, welchen Einfluss (i) die Integration der immundominanten Epitope aus Gag und Env in das jeweils andere Transgen (C.2.1.3) und (ii) die Deletion des Env-spezifischen immundominanten Epitops V11V (C.2.1.3) auf die Unterdrückung Gag-spezifischer T-Zell Antworten hat.

Hierzu wurden je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe einmal mit 57 µg ^MGag, 57 µg ^MGag-V11V, 57 µg gp120 oder mit 57 µg gp120-A9I intramuskulär (i.m.) immunisiert (Abb. C-20, Abschnitt B, Mausgruppen 2-5). Des Weiteren erfolgte die i.m. Verabreichung von 57 µg gp120, 57 µg ^MGag, 57 µg gp120ΔV11V oder einer Mischung aus den beiden zuletzt genannten Plasmiden (Abb. C-20, Abschnitt C, Mausgruppen 2, 3, 5, 6). Als Kontrolle wurden Mäuse mit einer Mischung aus 57 µg ^MGag und 57 µg gp120 immunisiert (Abb. C-20, Abschnitt C, Mausgruppe 3).

Zwei Wochen später wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag- bzw. Env-spezifischen T-Zell Antworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-20, Abschnitt B und C, Mausgruppe 1).

Wie in Abbildung C-20, Abschnitt B und C zu sehen, konnten mit einer einmaligen intramuskulären Applikation der pcDNA Plasmide pc^MGag oder pcgp120 die erwarteten Gag- bzw. Env-spezifischen zellulären Immunantworten hervorgerufen werden (Abschnitt B, Mausgruppen 2, 4; Abschnitt C, Mausgruppen 2, 3). Im Gegensatz dazu lässt sich nach Verabreichung von pc^MGag-V11V eine mit pcgp120 vergleichbare Env-spezifische Immunantwort gegen das eingesetzte Epitop V11V induzieren, jedoch führt die Gabe dieses Plasmids ebenfalls zur Unterdrückung der Anzahl Gag-spezifischer T-Zellen (Abb. C-20, Abschnitt B, Mausgruppe 3). Ebenso konnte durch Verabreichung des pcgp120-A9I Plasmids eine Env-spezifische T-Zell Antwort induziert werden. Das Hervorrufen einer zellulären Immunantwort gegen das eingesetzte Gag-spezifische Epitop A9I war auch in diesem Fall nicht möglich (Abb. C-20, Abschnitt B, Mausgruppe 5). Die Verabreichung des pcgp120-A9I sowie des pc^MGag-V11V Plasmids und die daraus resultierende Anwesenheit beider Epitope (V11V und A9I) in einer Zelle führte somit zur Unterdrückung Gag-spezifischer T-Zellen.

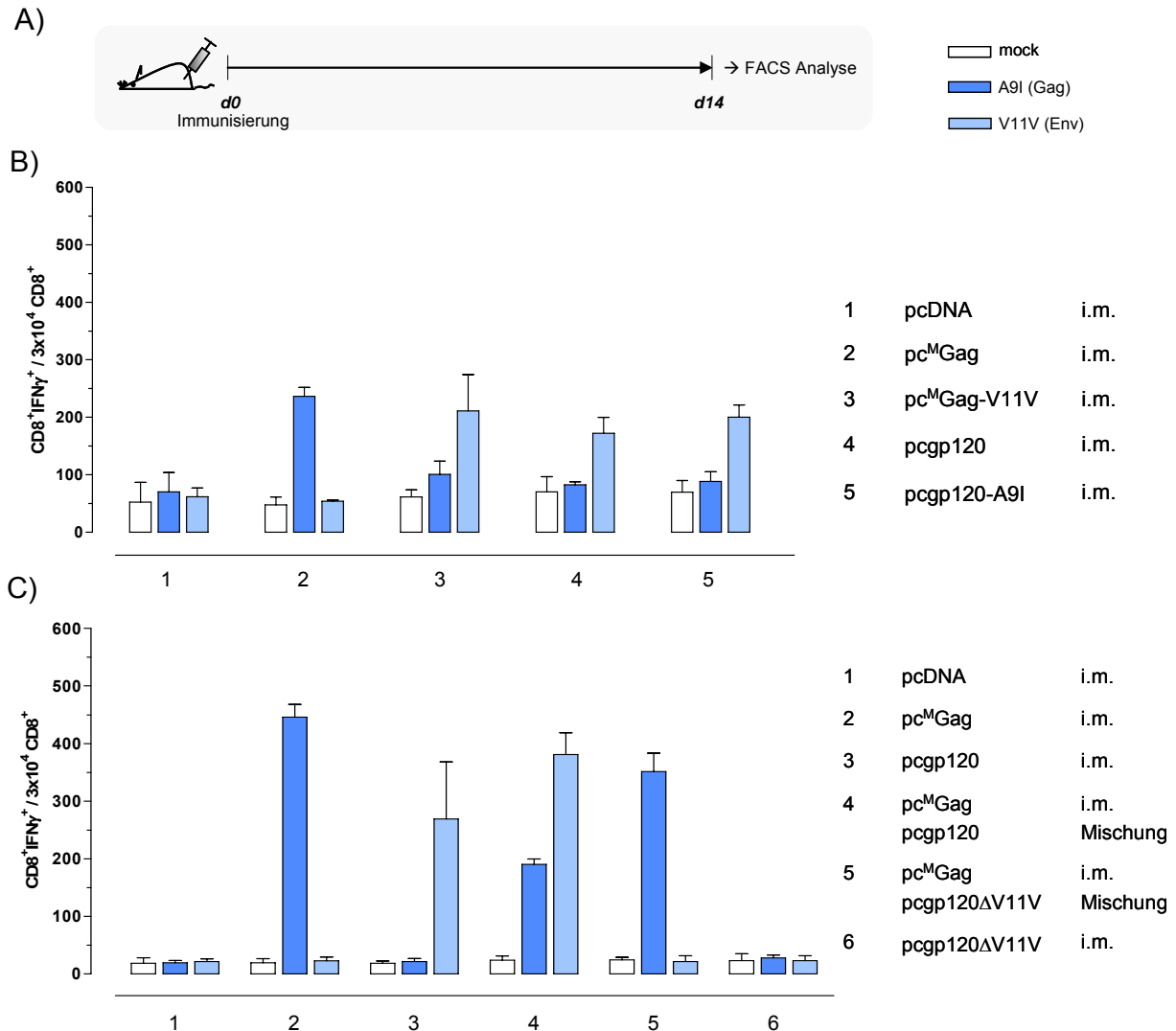


Abb. C-20: Effekt auf die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten nach Deletion des immundominanten Env-spezifischen Epitops V11V

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) und C) Gag- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Env-spezifischen V11V Peptid oder mit Medium behandelt. Im Anschluss daran wurde die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen pro 30.000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe1).

Die Auswertung der Daten zeigt weiterhin, dass durch die Applikation einer Mischung aus ^MGag und gp120ΔV11V die Induktion einer Gag-spezifischen T-Zell Antwort erreicht werden konnte (Abb. C-20, Abschnitt C, Mausgruppe 5). Zum Vergleich erfolgte die Gabe einer Mischung aus ^MGag und gp120, welche erwartungsgemäß zu einer Modulation der Gag-spezifischen Antworten führte (Abb. C-20, Abschnitt C, Mausgruppe 4).

Die Verabreichung des pcgp120 Δ V11V Plasmids alleine führt nicht zur Induktion Env-spezifischer T-Zellen und diente in dieser Studie als zusätzliche Kontrolle bezüglich der Env-spezifischen Immunantworten (Abb. C-20, Abschnitt C, Mausgruppen 2, 6).

Die Deletion des im murinen System immundominanten Env-spezifischen Epitops V11V führte somit nach gemeinsamer Verabreichung mit pc^MGag zur Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten, was die Theorie stützt, dass eine Kompetition der beiden Epitope aus Gag und Env um die Beladung auf MHC-Klasse-I Moleküle stattfindet.

C.4.3 Verbesserung der Gag-spezifischen T-Zell Antworten durch das Entfernen des artifiziellen Signalpeptids am gp120

Eine weitere Überlegung zur Untersuchung des Einflusses von Env auf die Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten ist die Veränderung der Lokalisierung von Env und Gag in andere Kompartimente der Zelle und die damit verbundene Veränderung der Prozessierung translatierter Proteine. Die Deletion des artifiziellen Signalpeptids an Env oder das Anfügen dieses Peptids an Gag verändert die typische Lokalisierung von Env und Gag und führt damit evtl. zu einer gesteigerten Präsentation des Gag Peptids.

Es wurden je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe einmal mit 57 μ g ^MGag, 57 μ g ^MGag-SP oder 57 μ g gp120 intramuskulär (i.m.) immunisiert (Abb. C-21, Abschnitt B und C, jeweils Mausgruppen 2, 3). Weitere Mausgruppen erhielten eine Mischung aus je 57 μ g ^MGag und gp120, je 57 μ g ^MGag und gp120 Δ SP sowie eine Mischung aus je 57 μ g ^MGag-SP und gp120 (Abb. C-21, Abschnitt B und C, Mausgruppen 4, 5).

Zwei Wochen später wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag- bzw. Env-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-21, Abschnitt B und C, Mausgruppe 1).

Die ausgelesenen zellulären Immunantworten zeigen einen leichten Anstieg der Gag-spezifischen T-Zell Antworten nach Co-Verabreichung einer Mischung aus ^MGag und gp120 Δ SP (Abb. C-21, Abschnitt B, Mausgruppe 5). Wie Abbildung C-21 für die Mausgruppen 2 und 3 zu entnehmen ist, führte die Applikation der Plasmide pc^MGag und pcgp120 zur Induktion typischer Gag- und Env-spezifischer zellulärer Immunantworten. Die Auswertung der Daten zeigt weiterhin wie erwartet einen Rückgang der Anzahl Gag spezifischer T-Zellen nach Verabreichung einer Mischung aus ^MGag und Env (Abb. C-21, Abschnitt B und C, Mausgruppe 4).

Das N-terminale Anfügen des Signalpeptids an Gag (^MGag-SP) führte sowohl bei alleiniger Applikation als auch bei Gabe in einer Mischung mit gp120 zu keiner Veränderung der Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten (Abb. C-21, Abschnitt C, Mausgruppen 3, 5).

Es lässt sich somit festhalten, dass durch die Deletion des artifiziellen Signalpeptids am Env und die damit verbundene Änderung der Prozessierung von Env ein leichter, wenn auch nicht signifikanter Anstieg Gag-spezifischer T-Zell Antworten erzielt werden konnte.

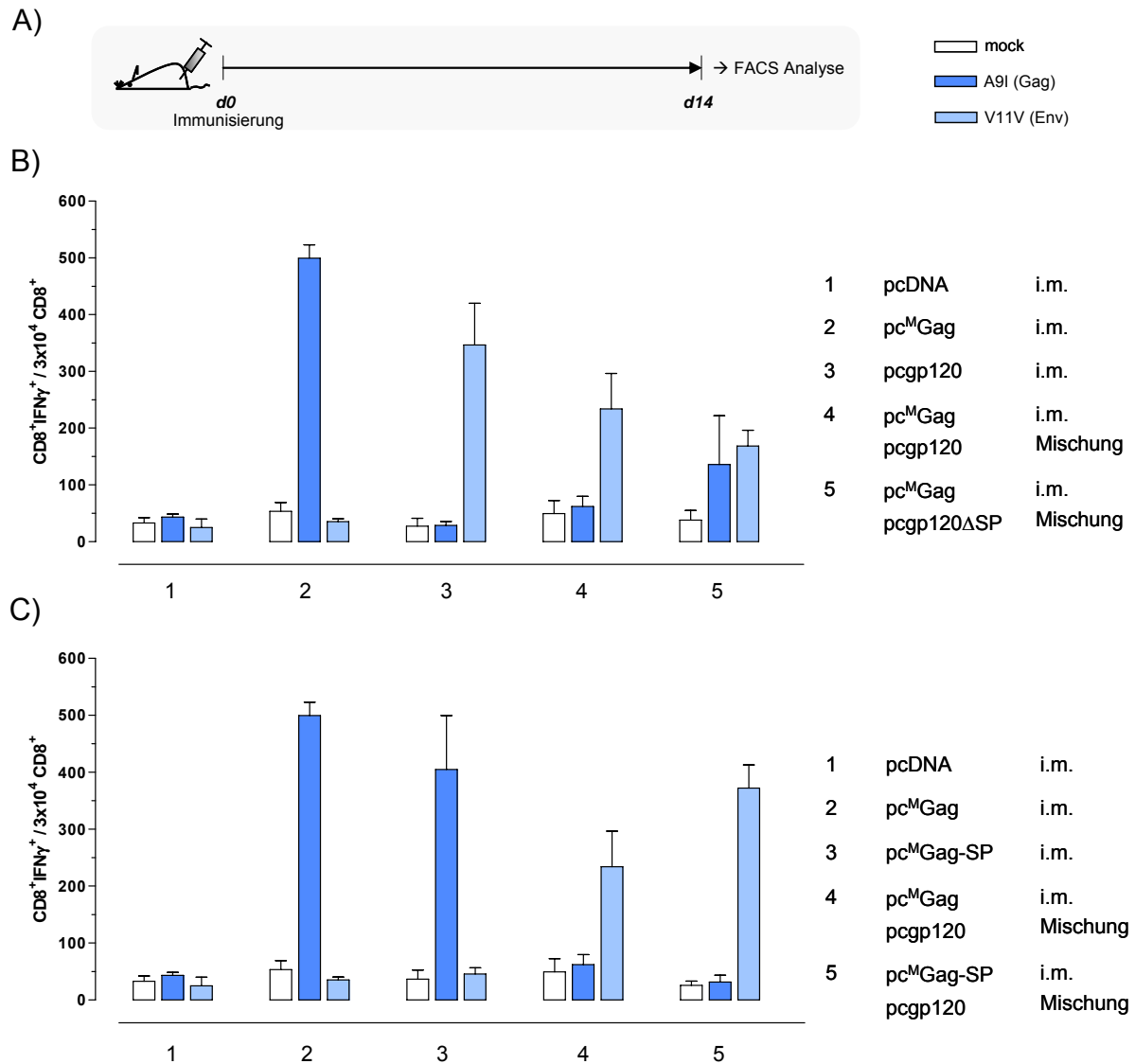


Abb. C-21: Nachweis einer Verbesserung der Gag-spezifischen Immunantworten durch das Entfernen des Signalpeptids an Env

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) und C) Gag- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Env-spezifischen V11V Peptid oder mit Medium behandelt. Im Anschluss daran wurde die Anzahl $CD8^+ / IFN\gamma^+$ Zellen pro $30.000 CD8^+$ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit pcDNA immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe1).

C.5 *In vivo* Applikation rekombinanter Viren

C.5.1 Steigerung der Gag- und Pol-spezifischen zellulären Immunantworten durch das Wiederherstellen des ribosomalen *Frame-Shift* Signals

Zur Austestung der immunogenen Eigenschaften der rekombinanten NYVACs *in vivo* wurden zunächst je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe mit verschiedenen NYVACs (NYVAC-C, NYVAC- Δ^M GPN, NYVAC- Δ^M G^{FS}PN, NYVAC-^MG^{FS}PN, NYVAC-^MGag, NYVAC- Δ^M Gag sowie NYVAC-PN) intramuskulär (i.m.) immunisiert. Dabei erhielten alle Mäuse einmal 1×10^7 *plaque-forming-units* (pfu) des jeweils angegebenen NYVAC (Abb. C-22, Abschnitt B, Mausgruppen 2-7, 10) oder eine Mischung aus je 1×10^7 pfu NYVAC-^MGag und NYVAC-PN (Mausgruppe 8) sowie je 1×10^7 pfu NYVAC- Δ^M Gag und NYVAC-PN (Mausgruppe 9).

Zwei Wochen später wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag- bzw. Pol-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-22, Abschnitt B, Mausgruppe 1).

Der HIV-Vakzine Kandidat NYVAC-C kodiert unter einem bidirektionalen Promotor sowohl das Transgen Δ^M GPN als auch gp120 und induziert bei einer einmaligen intramuskulären Verabreichung zwar Pol-spezifische, aber nur sehr schwache Gag-spezifische zelluläre Immunantworten (Abb. C-22, Mausgruppe 2). Die Trennung dieser beiden Transgene Δ^M GPN und gp120 auf unterschiedliche NYVACs ermöglichte des Weiteren die alleinige Applikation von NYVAC- Δ^M GPN. Im Vergleich zu einer einmaligen Gabe von NYVAC-C konnte jedoch durch die Verabreichung von NYVAC- Δ^M GPN keine Steigerung der Gag-spezifischen Antworten erzielt werden (Abb. C-22, Mausgruppen 2, 3).

Die Daten zeigen weiterhin, dass die intramuskuläre Verabreichung von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN verglichen mit einer Applikation von NYVAC- Δ^M GPN zu einer deutlich verbesserten Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten führte (Abb. C-22, Mausgruppen 3, 4). Das Einfügen des ribosomalen *Frame-Shift* Signals im Transgen GPN führte somit auch bei einer Gabe dieses Transgens mittels des viralen Vektors NYVAC zur Verbesserung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten.

Wie in Abb. C-22, Mausgruppen 5, 6 und 7 zu sehen, konnte durch die Wiederherstellung des Myristoylierungssignals im Transgen ^MG^{FS}PN oder durch die getrennte Verabreichung der Transgene ^MGag und Δ^M Gag keine zusätzliche Steigerung der Gag-spezifischen T-Zellen erzielt werden. Dies zeigte sich auch bei der Verabreichung einer Mischung aus NYVAC-PN zusammen mit NYVAC-^MGag oder NYVAC- Δ^M Gag. Verglichen mit der intramuskulären Applikation von NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC- Δ^M G^{FS}PN konnte durch die Gabe einer

Mischung von NYVAC-Gag-Varianten und NYVAC-PN keine weitere Verbesserung Gag-spezifischer T-Zell Antworten erreicht werden (Abb. C-22, Mausgruppen 4, 5 und 8, 9).

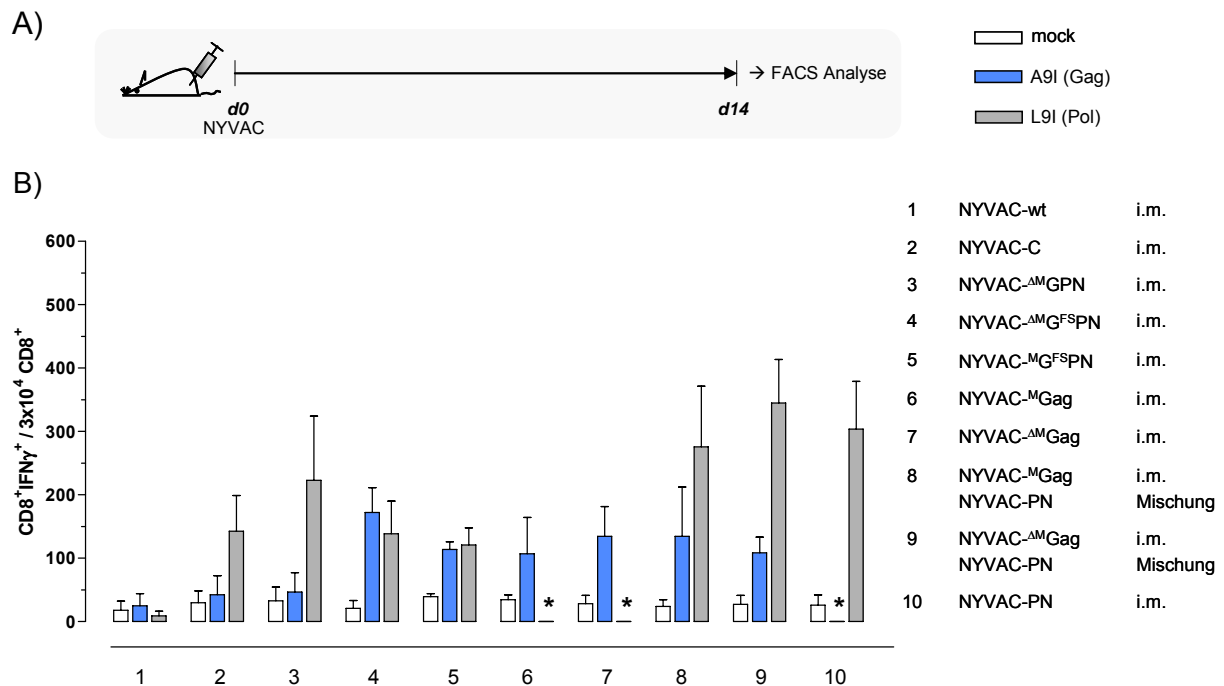


Abb. C-22: Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten nach Verabreichung der rekombinanten NYVAC

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Pol-spezifischen L9I Peptid oder mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen pro 30.000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

* = nicht bestimmt

Alle Immunisierungen führten zur Induktion Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten, welche jedoch anders als die Gag-spezifischen Antworten durch eine Trennung von Gag und PN auf unterschiedliche NYVACs gesteigert werden konnten. Hierbei zeigte sich, dass, im Vergleich zur Gabe der *Frame-Shift* Varianten, durch die Verabreichung einer Mischung aus NYVAC-PN zusammen mit NYVAC-MGag oder NYVAC- Δ MGag eine um den Faktor 2,3 (275 ± 96 zu 120 ± 27) bis 2,5 (345 ± 68 zu 138 ± 51) gesteigerte Pol-spezifische Immunantworten hervorgerufen werden konnte (Abb. C-22, Mausgruppen 4, 5 und 8, 9). Wie schon erwähnt tritt durch die Wiederherstellung der ribosomalen *Frame Shift* Sequenz zwischen dem Gag und Pol Leserahmen, ein Verhältnis von 10:1 bzw 20:1 in der Expression von Gag zu GagPolNef auf. Im Gegensatz dazu wird durch die Verabreichung einer Mischung aus NYVAC-PN und NYVAC-MGag eine deutlich höhere Menge des Transgens PN

exprimiert, was wiederum eine mögliche Erklärung für die Induktion höherer Pol-spezifischer T-Zell Antworten darstellen könnte.

Es lässt sich zusammenfassend festhalten, dass durch die Verbesserung des Transgens GPN hinsichtlich einer gesteigerten Proteinexpression, der Fähigkeit VLPs zu bilden sowie der Trennung der Leserrahmen von Gag und PN auch im Kontext des viralen Vektors NYVAC deutlich verbesserte Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten induziert werden konnten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sich durch die Gabe von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN im Vergleich zu NYVAC-C die Induktion Gag-spezifischer T-Zellen um den Faktor 4 (172 ± 39 verglichen mit 42 ± 30) steigern lässt. Auch führte die Applikation von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN, NYVAC- Δ^M Gag oder NYVAC- Δ^M Gag zur Verbesserung der Gag-spezifischen Antworten, wenn auch nur um den Faktor 2,5.

C.5.2 Durch eine homologe *Prime/Boost* Applikation konnten die Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten nicht verstärkt werden

Basierend auf den Ergebnissen der in Kapitel C.5.1 beschriebenen Immunisierungsstudie wurde in einer nachfolgenden Mausstudie untersucht, inwieweit die Induktion Gag- und Pol-spezifischer Immunantworten durch den Einsatz einer homologen *Prime/Boost*-Strategie verbessert werden kann.

Dafür wurden je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe mit 1×10^7 pfu des jeweils angegebenen NYVAC (Abb. C-23, Abschnitt B, Mausgruppen 2-7, 10) oder einer Mischung aus je 1×10^7 pfu NYVAC- Δ^M Gag und NYVAC-PN (Mausgruppe 8) sowie je 1×10^7 pfu NYVAC- Δ^M Gag und NYVAC-PN (Mausgruppe 9) intramuskulär grundimmunisiert (*Prime*). Eine Auffrischimmunisierung (*Boost*) erfolgte zwei Wochen später nach dem gleichen Immunisierungsschema. Wiederum zwei Wochen danach wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag- bzw. Pol-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Zweimal mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-23, Abschnitt B, Mausgruppe 1).

Die Auswertung der Daten zeigt eine marginale Steigerung der Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten nach einer zweifachen Applikation von NYVAC- Δ^M GPN im Vergleich zu einer zweifachen Immunisierung mit NYVAC-C (Abb. C-23, Mausgruppen 2, 3). Diese tendenzielle Verbesserung lässt sich auch nach Gag von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN, NYVAC- Δ^M G^{FS}PN sowie von NYVAC- Δ^M Gag und NYVAC- Δ^M Gag beobachten (Abb. C-23, Mausgruppen 4-7).

Auch eine Mischung aus NYVAC-PN und NYVAC-^MGag oder NYVAC-^{ΔM}Gag induzierte bei einer homologen *Prime/Boost*-Verabreichung verglichen mit NYVAC-C zum Teil verbesserte Gag-spezifische zelluläre Antworten (Abb. C-23, Mausgruppen 8, 9).

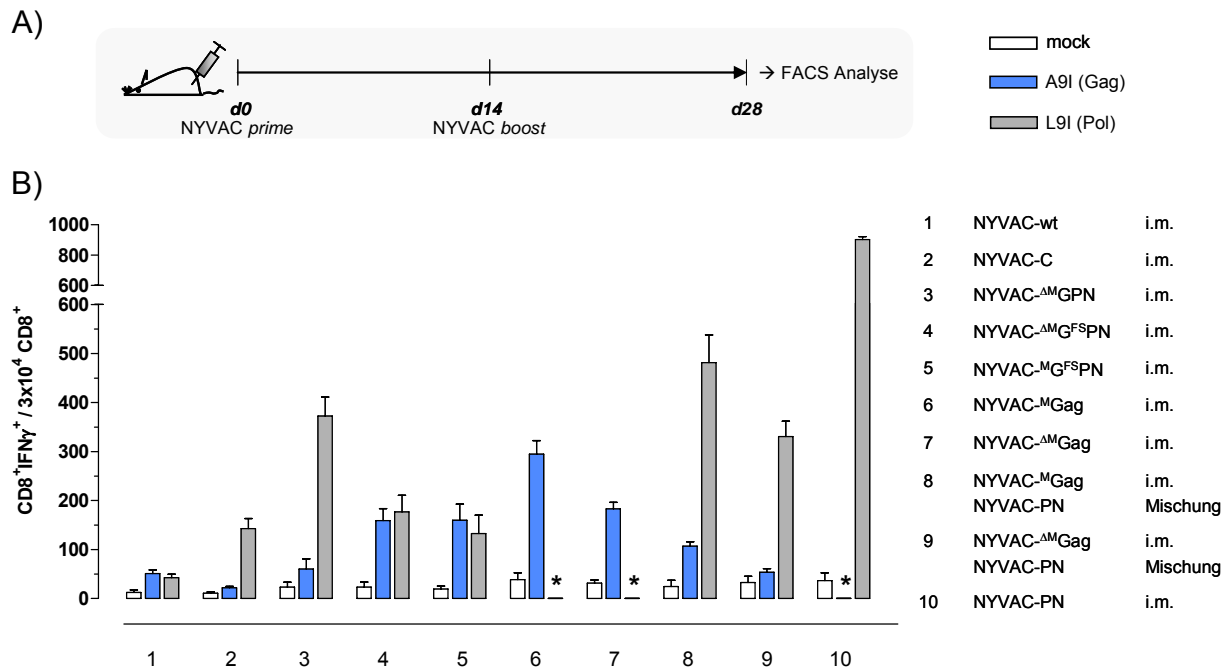


Abb. C-23: Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten induziert mit rekombinanten NYVAC unter Verwendung einer homologen *Prime/Boost*-Strategie

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Pol-spezifischen L9I Peptid oder mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl CD8⁺/IFN γ ⁺ Zellen pro 30.000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Zweimal mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe1).

* = nicht bestimmt

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Daten der unter C.5.1 beschriebenen einmaligen Applikation der jeweiligen NYVACs, so zeigt der Trend der nach zweifacher, homologer Verabreichung der rekombinanten Viren ausgelesenen Gag-spezifischen Immunantworten keine Verbesserung der zellulären Antworten (Abb. C-22 sowie Abb. C-23). Eine Ausnahme stellte hierbei die Immunisierung von NYVAC-^MGag dar. Obwohl beide Mausversuche nicht direkt miteinander vergleichbar sind, so lässt sich dennoch durch den Vergleich der Gruppen untereinander festhalten, dass die durch eine Grundimmunisierung mit NYVAC-^MGag erzielten Gag-spezifischen T-Zellen durch eine zweite Gabe des gleichen NYVAC gesteigert werden konnten (Abb. C-22 und C-23, jeweils Mausgruppe 6).

Der Vergleich der Ergebnisse aus beiden Mausversuchen zeigte außerdem, dass durch eine zweifache, homologe Applikation einer Mischung aus NYVAC-PN und NYVAC-^MGag oder

NYVAC- Δ^M Gag keine Verbesserung, sondern eher ein leichter Rückgang der Gag-spezifischen zellulären Immunantworten zu beobachten ist (Abb. C-22 und C-23, jeweils Mausgruppen 8, 9).

Des Weiteren konnte in Bezug auf die Induktion Pol-spezifischer T-Zellen auch bei der homologen *Prime/Boost*-Verabreichung einer Mischung aus NYVAC-PN zusammen mit NYVAC- Δ^M Gag oder NYVAC- Δ^M Gag im Vergleich zu NYVAC- Δ^M G^{FS}PN sowie NYVAC- Δ^M G^{FS}PN eine um den Faktor 1,9 (330±63 zu 176±68) bis 3,6 (481±112 zu 132±75) verbesserte Induktion der Pol-spezifischen zellulären Immunantworten aufgezeigt werden. Jedoch konnte die Anzahl der Pol-spezifischen T-Zellen durch eine homologe *Prime/Boost*-Strategie, mit Ausnahme der Applikation von NYVAC-PN alleine (Mausgruppe 10), nicht verbessert werden (Abb. C-23).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine homologe Immunsierungsstrategie, vermutlich aufgrund der induzierten Vektorimmunität gegen NYVAC, zu keiner deutlichen Verbesserung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten führte.

C.5.3 Co-Verabreichung von gp120 führt nicht zur Unterdrückung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten

Wie in Kapitel C.4.1 beschrieben, konnte bereits in mehreren DNA-Immunisierungsstudien gezeigt werden, dass eine Co-Verabreichung von gp120 zur verminderten Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten führt (Abb. C-19, Mausgruppe 4).

Basierend auf diesen Beobachtungen sollte nun in einer weiteren Mausstudie untersucht werden, ob bei einer gemeinsamen Applikation von NYVAC-gp120 mit Gag exprimierenden rekombinanten NYVACs ebenfalls eine Unterdrückung Gag-spezifischer T-Zell Antworten stattfindet.

Je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe wurden hierfür mit jeweils 1×10^7 pfu NYVAC-C, NYVAC- Δ^M G^{FS}PN, NYVAC-gp120, NYVAC- Δ^M Gag oder NYVAC-PN sowie einer Mischung aus den letzten beiden genannten NYVACs intramuskulär (i.m.) immunisiert (Abb. C-24, Abschnitt B, Mausgruppen 2, 5, 7-9). Des Weiteren erfolgte die i.m. Verabreichung von NYVAC-gp120 zusammen mit NYVAC- Δ^M G^{FS}PN oder einer Mischung aus NYVAC- Δ^M Gag und NYVAC-PN (Abb. C-24, Abschnitt B, Mausgruppen 4, 6). Zwei Wochen später wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint, und in Doppelbestimmungen die Gag-, Pol- und Env-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-24, Abschnitt B, Mausgruppe 1).

Wie in Abbildung C-24 zu sehen, konnten durch eine alleinige Verabreichung von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN (Mausgruppe 3), NYVAC- Δ^M Gag (Mausgruppe 7), NYVAC-gp120 (Mausgruppe 8) und NYVAC-PN (Mausgruppe 9) zum Teil sehr hohe Gag-, Pol- und

Env-spezifische zelluläre Immunantworten induziert werden. Die intramuskuläre Applikation von NYVAC-C führte hingegen zur Induktion Pol- und Env-spezifischer T-Zell Antworten und verglichen mit NYVAC-wt zu einer nicht nachweisbaren Anzahl Gag-spezifischer T-Zellen (Abb. C-24, Mausgruppe 2).

Im Gegensatz zu den Ergebnissen einer Immunisierung mit pcDNA-Konstrukten (Abb. C-19, C-20 und C-21) zeigt die Auswertung dieser Daten, dass eine Co-Verabreichung von NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120 nicht zur Unterdrückung der Gag- und Pol-spezifischen Immunantworten führte (Abb. C-24, Mausgruppe 4).

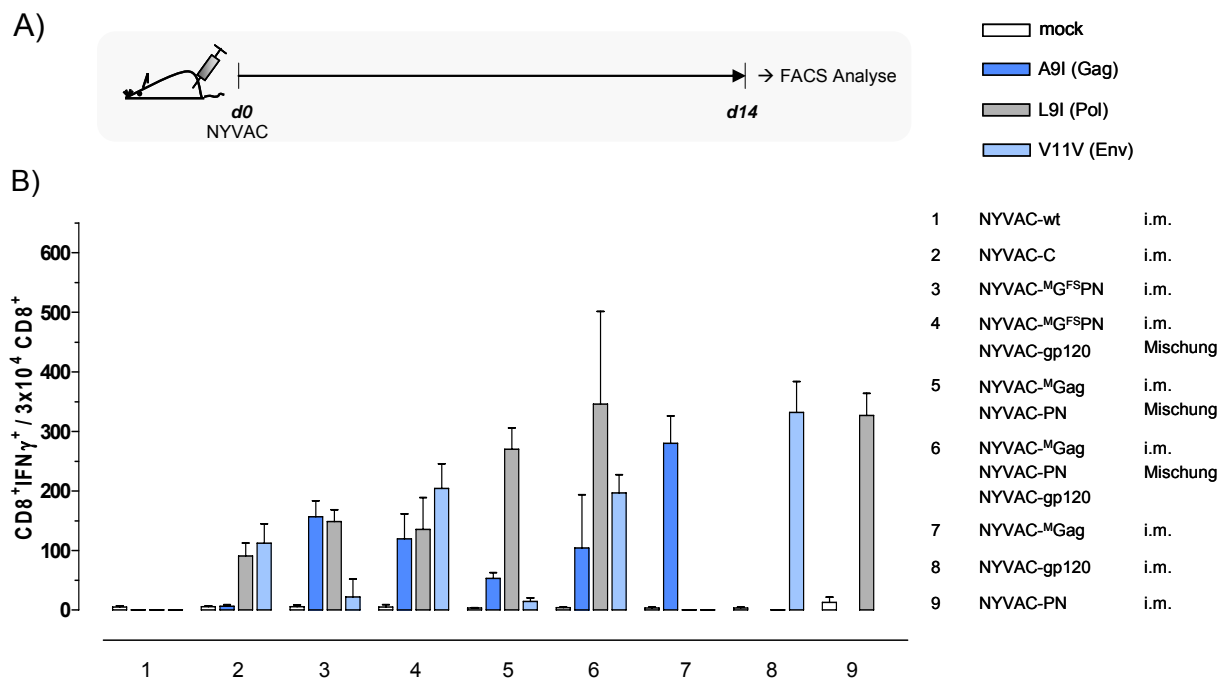


Abb. C-24: Gag-, Pol- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten nach Co-Verabreichung von NYVAC-gp120

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) Gag-, Pol- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Pol-spezifischen L9I Peptid, dem Env-spezifischen V11V Peptid oder mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl CD8⁺ / IFN γ ⁺ Zellen pro 30.000 CD8⁺ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe1).

Eine gemeinsame Verabreichung von NYVAC-^MGag, NYVAC-PN und NYVAC-gp120 führte ebenfalls zur Induktion einer effizienten, und im Vergleich zu einer Gabe von NYVAC-^MG^{FS}PN in Kombination mit NYVAC-gp120, zu einer verbesserten Induktion Pol-spezifischer T-Zellen (Abb. C-24, Mausgruppen 4, 6). Es konnte jedoch keine verbesserte Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten erreicht werden.

Dies zeigte sich auch bei einer Immunisierung mit einer Mischung aus NYVAC-^MGag und NYVAC-PN (Mausgruppe 5), durch welche sehr gute Pol-spezifische jedoch nur sehr marginale Gag-spezifische zelluläre Immunantworten hervorgerufen werden konnten.

Im Gegensatz zu einer Reduktion der Anzahl Gag-spezifischer T-Zellen, wie sie nach einer gemeinsamen Verabreichung der DNA-Plasmide pcgp120 und pc^MGag gezeigt werden konnte, führte eine Co-Verabreichung von NYVAC-gp120 und NYVAC-^MG^{FS}PN zu keiner Unterdrückung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten. Es lässt sich weiterhin festhalten, dass nach einer gemeinsamen Verabreichung von NYVAC-PN, NYVAC-^MGag und NYVAC-gp120 nur sehr geringe Gag-spezifische T-Zell Antworten generiert werden konnten. Auch die Applikation einer Mischung aus NYVAC-PN und NYVAC-^MGag führte bereits zur Induktion sehr schwacher Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten. Die Induktion dieser schwachen zellulären Immunantworten ist somit vermutlich auf die generelle Trennung der Transgene auf unterschiedliche NYVACs und nicht auf eine Co-Verabreichung von NYVAC-gp120 zurückzuführen.

C.5.4 Eine kombinierte Verabreichung von verbesserten Plasmid-DNA-Konstrukten und rekombinanten NYVACs verstärkt die Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten

Wie in Kapitel C.5.2 dargestellt, führte eine zweifache, homologe Verabreichung der rekombinanten Viren zu keiner Verbesserung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten.

Basierend auf diesen Ergebnissen sollte in einer nachfolgenden *in vivo* Studie untersucht werden, inwieweit die Induktion Gag-spezifischer T-Zellen durch die Verwendung einer heterologen *Prime/Boost*-Strategie verbessert werden kann (Abb. C-25, Abschnitt B). Hierbei sollte vor allem geklärt werden, ob die Verbesserung des DNA-*Prime* oder/und die Optimierung des NYVAC-*Boost* die Induktion Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten steigert.

Dafür wurden je sechs BALB/c Mäuse pro Gruppe intramuskulär (i.m.) mit DNA-C (80 µg pc^{ΔM}GPN und 57 µg pcgp120) (Abb. C-25, Mausgruppen 6, 7) oder einer äquimolaren Mischung aus 57 µg pc^MGag, 70 µg pcPN und 57 µg pcgp120 (Abb. C-25, Mausgruppen 8, 9) grundimmunisiert. Vierzehn Tage später erhielten die Versuchstiere eine *Booster*-Immunisierung mit 1x10⁷ pfu NYVAC-C (Abb. C-25, Mausgruppen 6, 8) oder einer 1:1 Mischung aus jeweils 1x10⁷ pfu NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120 (Abb. C-25, Mausgruppen 7, 9). Wiederum zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen entnommen, je drei Milzen pro Gruppe vereint und in Doppelbestimmungen wurden die Gag-, Pol- und Env-spezifischen Immunantworten mittels FACS-Analyse bestimmt. Mit NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle bezüglich der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten (Abb. C-25, Mausgruppe 1).

Ergänzt wurde der experimentelle Versuchsaufbau mit den relevanten Kontrollgruppen (Abb. C-25, Mausgruppen 2-5).

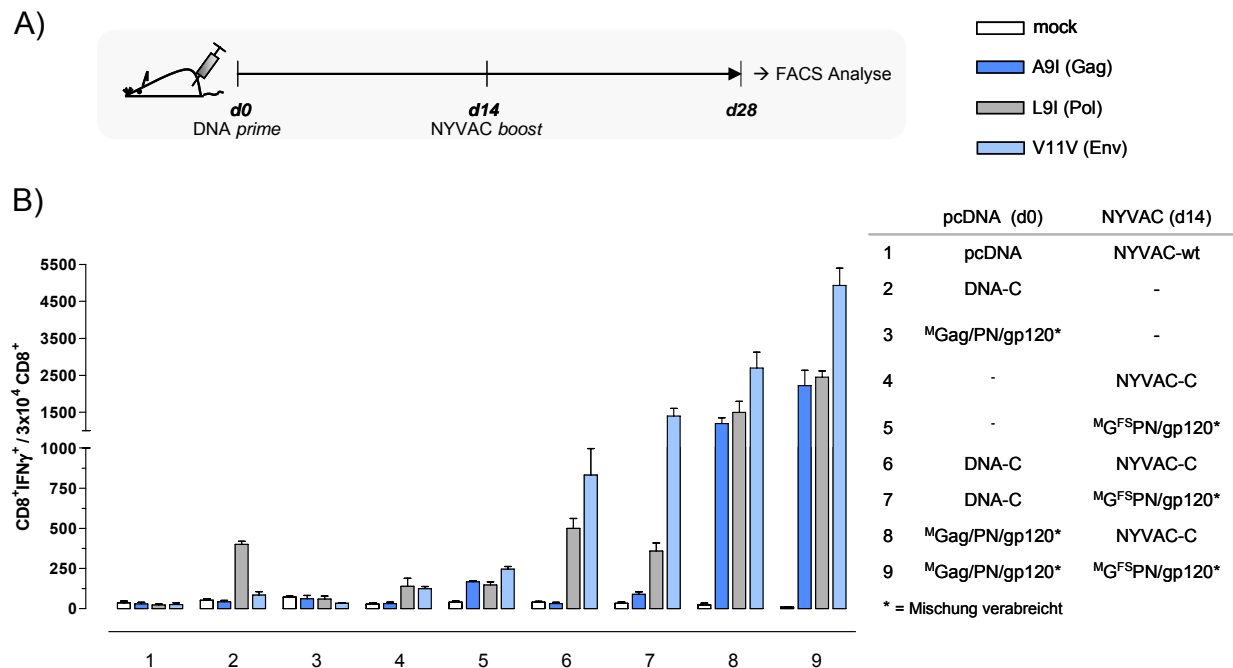


Abb. C-25: Gag-, Pol- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten nach Anwendung einer heterologen Prime/Boost-Strategie

A) Darstellung des Immunisierungsschemas.

B) Gag-, Pol- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten: 2×10^6 Splenozyten aus immunisierten BALB/c Mäusen wurden für 6 h mit dem Gag-spezifischen A9I Peptid, dem Pol-spezifischen L9I Peptid, dem Env-spezifischen V11V Peptid oder mit Medium behandelt und im Anschluss die Anzahl $CD8^+ / IFN\gamma^+$ Zellen pro $30.000 CD8^+$ Zellen mittels FACS Analyse bestimmt. Mit pcDNA und NYVAC-wt immunisierte Mäuse dienten als Negativkontrolle (Gruppe 1).

Die alleinige Verabreichung der DNA-Konstrukte an Tag 0 (Mausgruppen 2, 3) oder die Applikation der relevanten rekombinanten NYVACs an Tag 14 (Mausgruppen 4, 5) führte jeweils lediglich zu eher marginalen Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten.

Nach Gabe von DNA-C/NYVAC-C zeigt die Auswertung der Daten wie erwartet die Induktion starker Pol- und Env-spezifischer zellulärer Immunantworten, jedoch konnten keine Gag-spezifischen T-Zellen hervorgerufen werden (Abb. C-25, Mausgruppe 6). Die Applikation eines verbesserten NYVAC-Boost durch die Verwendung einer Mischung aus NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120 führte, wie in Abbildung C-25 Mausgruppe 7 dargestellt, in Kombination mit einer DNA-C Grundimmunisierung zu keiner Verbesserung der Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass durch die Verbesserung des DNA-Prime (äquimolare Mischung aus pc^MGag, pcPN und pcgp120) in einer heterologen Verabreichung mit NYVAC-C deutlich erhöhte Transgen-spezifische T-Zellen induziert wurden (Abb. C-25, Mausgruppe 8). Verglichen mit der Kombination aus

DNA-C und NYVAC-C zeigte sich, dass durch die Verbesserung der DNA-Konstrukte in der Grundimmunisierung dreifach gesteigerte Pol- und Env-spezifische zelluläre Immunantworten erreicht wurden (Pol: 499 ± 61 zu 1496 ± 298 , Env: 930 ± 166 zu 2693 ± 432). Die Gag-spezifischen zellulären Immunantworten konnten hierbei sogar um das fast vierzigfache (32 ± 7 zu 1194 ± 154) erhöht werden (Abb. C-25, Mausgruppen 6, 8). Die Verabreichung einer Mischung aus pc^M Gag, pcPN und pcgp120 gefolgt von der Gabe einer Mischung aus NYVAC- $^M G^{FS}$ PN und NYVAC-gp120 führte zu einem weiteren Anstieg der Transgen-spezifischen T-Zellen und damit zu einer deutlichen Verbesserung der gemessenen zellulären Immunantworten (Abb. C-25, Mausgruppe 9).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die heterologe Verabreichung neuer rekombinanter NYVACs in Kombination mit hinsichtlich der Transgenexpression verbesserten DNA-Konstrukten eine deutliche Steigerung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten erreicht werden konnte.

D. Diskussion

D.1 Entwicklung und Bewertung neuer DNA-Konstrukte

D.1.1 Die Optimierung der Transgenexpression verbesserte die Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten

Eine der vielversprechendsten Strategien zur Induktion effizienter Antigen-spezifischer Immunantworten stellt derzeit die Verabreichung einer Vakzine mittels einer heterologen *Prime/Boost*-Strategie dar. Hierzu konnte unter anderem gezeigt werden, dass durch eine Grundimmunisierung mit einem DNA-Vektor und eine Auffrischimmunisierung mit einem viralen Vektor starke T-Zell vermittelte Immunantworten generiert werden können. Die Verabreichung einer Kombination aus Plasmid-DNA (DNA-C), welche das artifizielle HIV-1 *Clade C* Polyprotein Gag, Pol, Nef (GPN) sowie das Hüllprotein gp120 exprimiert, und dem pockenviralen Vektor NYVAC-C, der die gleichen Antigene enthält, induzierte bezüglich der Stärke und Breite effiziente Antigen-spezifische T-Zell Antworten in präklinischen^{131,203} und in klinischen Phase I und II Studien^{128,129,204}. Jedoch waren die durch die Vakzine hervorgerufenen T-Zell Antworten hauptsächlich gegen Env gerichtet, während Gag-, Pol-, und Nef-spezifische Antworten in einem deutlich geringeren Ausmaß induziert worden waren.

Durch das Einfügen neuer Modifikationen in das Transgen GPN (C.2.1.1) konnte bereits eine Verbesserung der Proteinexpression sowie eine Verbesserung der Induktion Gag-spezifischer CTL-Antworten im BALB/c Mausmodell erzielt werden.

D.1.2 Der negative Einfluss des HIV-1 Hüllproteins Env auf die Expression und Präsentation co-verabreichter Antigene konnte bestätigt werden

Wie unter C.2.1.1 beschrieben, führte die Co-Immunisierung von Env zur Unterdrückung dieser verbesserten Gag-spezifischen Immunantworten, konnte jedoch durch eine räumlich oder zeitlich getrennte Verabreichung der verwendeten Transgene vermieden werden²¹⁴. Somit lässt sich momentan ein negativer Effekt von Env auf Gag durch die Wahl einer geeigneten Applikationsroute aufheben; der Mechanismus, welcher diesem Effekt zu Grunde liegt, konnte hingegen bis jetzt nicht geklärt werden.

Eine Konkurrenz zwischen HIV-1 gp120 und co-verabreichten Antigenen wurde nicht nur von unserer Arbeitsgruppe²¹⁴ und im Rahmen dieser Arbeit (C.4.1, Abb. C-19) aufgezeigt, sondern konnte auch in diversen anderen Untersuchungen bestätigt werden.

In einer Studie von Hovav *et al.* zeigt sich bei einer gemeinsamen Gabe von gp120-kodierender Plasmid-DNA zusammen mit Ovalbumin (OVA)- oder Luciferase (Luc)-Konstrukten eine verminderte Expression von Ova und Luc in BALB/c Mäusen.

Weiterhin konnte ebenfalls die Unterdrückung der Ova- und Luc-spezifischen zellulären und humoralen Immunantworten, jedoch nicht der gp120-spezifischen Antworten gezeigt werden²²⁵. Im Gegensatz zu unseren Daten, konnte in dieser Studie die Unterdrückung der spezifischen zellulären Immunantworten durch eine räumlich getrennte Applikation der Transgene in separate Hinterbeine der Maus nicht aufgehoben werden. Die Autoren diskutieren, dass die Antigenexpression der co-verabreichten Transgene systemisch und nicht nur lokal an der Immunisierungsstelle beeinflusst wird. Ein möglicher Kandidat ist dabei Typ-I Interferon ($\text{IFN}\alpha$), welches von plasmazytoiden Dendritischen Zellen (pDC) nach Aktivierung durch gp120 gebildet wird²²⁵, und die Leistung des zur Expression der kodierten Antigene verwendeten Cytomegalievirus-Promotor vermindern könnte^{226,227}. Dieser Theorie widerspricht jedoch eine Veröffentlichung von Martinelli *et al.* die beschreibt, dass gp120 in der Lage ist die Aktivierung und Maturation von pDCs durch die Verminderung der Produktion von $\text{IFN}\alpha$ zu unterdrücken, um dadurch deren immunogene Aktivität zu beeinflussen²²⁸.

Hovav *et al.* konnten zeigen, dass HIV-1 gp120 die Expression des co-verabreichten Antigens Luc im Muskelgewebe unterdrückt, und postulieren, dass dies vermutlich zu einer verminderten Präsentation Luc-spezifischer Epitope auf APCs und dadurch zu einer schwächeren Antigen-spezifischen Immunantwort führt. Sie vermuten weiterhin eine Interaktion von HIV-1 gp120 mit Chemokin-Rezeptoren, was wiederum die Aufnahme von Antigen durch APCs und deren Reifung und Migration in lymphatische Gewebe beeinflusst. Eine spezifische Interaktion des X4-gp120 mit dem CXCR4 Rezeptor und die dadurch vermittelte Signalwirkung in Maus- und Rattenzellen konnte bereits in diversen Arbeiten nachgewiesen werden²²⁹⁻²³¹. Obwohl dies im murinen System voraussichtlich nur für X4-trope Viren zutrifft²³² und der Tropismus für das in dieser Arbeit verwendete HIV-1-Isolat CN54 nicht bekannt ist, könnte der Einfluss von gp120 auf die Lokalisation von APCs oder T-Zellen eine Rolle spielen.

Auch die Arbeitsgruppe um Franklin Toapanta konnte einen starken Einfluss eines co-verabreichten gp120 auf die Höhe der Expression des Gruppenspezifischen Antigens (Gag) *in vitro* nachweisen. Sie konnten sowohl in einer Western-Blot Analyse als auch mit Hilfe eines ELISA zeigen, dass nach Co-Transfektion einer gp120 kodierenden Plasmid-DNA die Menge des Gag-Proteins im Überstand der Zellen deutlich reduziert ist²³³. Betrachtet man hingegen die Induktion Antigen-spezifischer zellulärer Immunantworten, so konnten sie, übereinstimmend mit unseren Daten (C.4.1, Abb. C-19), bei einer räumlich getrennten Verabreichung beider Transgene keinen signifikanten Einfluss von gp120 auf die Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten nachweisen. Allerdings zeigt sich bei der Betrachtung der Daten von Toapanta *et al.* ein deutlicher Rückgang der Gag-spezifischen Antikörperantworten. Lopez *et al.* beschreiben in einer älteren Veröffentlichung die MHC-Kompetition

von HIV-1 gp160 und dem Phosphoprotein pp89 des Cytomegalievirus bei Co-Expression in einer Zelle. Die Daten weisen darauf hin, dass die Kompetition der beiden analysierten viralen Epitope aus gp160 und pp89 (beide L^d-restringiert) auf der Ebene der MHC-Beladung und Stabilisierung stattfindet, was die Expression oder die Aufnahme beider Proteine durch die gleiche Zelle voraussetzt²³⁴.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Veröffentlichungen lässt sich spekulieren, ob eine Interferenz zwischen gp120 und den co-verabreichten Transgenen bereits an der Immunisierungsstelle, in diesem Fall in den Muskelzellen stattfindet, und ob dies die Aufnahme von Antigen und die Präsentation spezifischer Epitope auf MHC-Molekülen in APCs beeinflusst. Voraussetzung zur Überprüfung dieser Annahmen ist die Gewährleistung der gemeinsamen Expression beider Transgene in einer Zelle.

D.1.3 Transgenvarianten zur Analyse der Env/Gag-Kompetition zeigten in biochemischen Analysen die erwarteten Proteinexpressionen

Zur genaueren Analyse der Env/Gag-Kompetition wurden basierend auf den Beobachtungen von Lopez, Toapanta und Hovav^{233,234,225} im Rahmen dieser Arbeit Transgenvarianten hergestellt, welche (i) die Lokalisation und somit die Expression von Gag und Env in einer Zelle gewährleisten, (ii) die Prozessierung von Env und Gag in einer Zelle beeinflussen und (iii) eine genauere Betrachtung einer evtl. vorhandenen Kompetition um die Beladung auf MHC-Molekülen ermöglichen sollen.

Hierzu wurden, wie unter C.2.1.2 erläutert, Plasmid-DNA-Konstrukte hergestellt, welche ^MGag über eine TaV2a-Sequenz an gp120 verbunden enthalten und somit die Expression beider Proteine in gleicher Menge in einer transfizierten Zelle sicherstellen. Die Expressionsstärke von Gag und Env war hierbei in beiden Konstrukten mit der Transfektion von Plasmiden, die nur ein Antigen kodieren (^MGag oder gp120) oder mit einer transfizierten äquimolaren Mischung beider Plasmid-DNAs vergleichbar (C.2.2.1).

Der Nachweis einer Co-Lokalisierung von Gag und Env in einer Zelle ist für eine genauere Untersuchung des Mechanismus der Kompetition zwischen den beiden Transgenen jedoch nicht ausreichend. Wie unter C.2.1.3 beschrieben besteht die Möglichkeit der Kompetition immundominanter Epitope von Gag und Env um die Präsentation auf MHC-Klasse-I Molekülen, eine Möglichkeit welche auch von Lopez *et al.* postuliert wurde. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde eine gp120 Transgenvariante hergestellt, welche eine Deletion des BALB/c gp120-spezifischen Epitops V11V aufweist. Des Weiteren erfolgte die Integration des Gag- bzw. gp120-spezifischen Epitops in das jeweils andere Transgen. Die biochemische Charakterisierung bestätigte die korrekte Expression der veränderten Transgene (C.2.2.1). Die C-terminale Verlängerung von ^MGag und gp120 um das jeweils

andere spezifische Epitop (V11V oder A9I) hat somit keinen Einfluss auf die Expression der veränderten Transgene.

Wie in vorangegangenen Immunisierungsstudien in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, lässt sich eine Unterdrückung Gag-spezifischer Immunantworten durch die Co-Verabreichung einer geringeren DNA-Menge des gp120 Konstrukts im Verhältnis zu Gag aufheben²¹⁴. Eine Veränderung der Prozessierung von Gag und Env und eine damit verbundene Beeinflussung der Expressionsstärke der beiden Transgene war ebenfalls Teil dieser Arbeit. Die hierfür hergestellten Transgenvarianten (^MGag-SP und gp120ΔSP) dienten zur weiteren Untersuchung einer möglicherweise in der exprimierenden Zelle stattfindenden Konkurrenz (C.2.1.4). Das wie unter C.2.1.4 beschriebene Anfügen der Gensequenz des artifiziellen Signalpeptids N-terminal an das Transgen ^MGag vermittelt den Transport von ^MGag in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und somit in den sekretorischen Weg²³⁵. Um den korrekten Transport der Proteine aus dem ER zum Trans-Golgi-Netzwerk zu ermöglichen, durchläuft jedes Protein co- und post-translationale Veränderungen. Ohne diese Modifikationen kommt es zum kontrollierten lysosomalen oder proteasomalen Abbau der Proteine¹¹⁷.

In einer ersten Analyse der Proteinexpression zeigte sich, dass weder ^MGag-SP noch gp120ΔSP im Überstand transient transfizierter Zellen nachweisbar waren (C.2.2.1). Da eine Expression von ^MGag-SP im Zelllysat, jedoch nicht im Überstand transfizierter Zellen gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass durch eine fehlende Oligomerisierung und eine somit auftretende Fehlfaltung ^MGag im ER zurückgehalten wird. Dort kommt es dann z.B. nach Erkennung durch Chaperone zum Rücktransport ins Zytosol, zur Ubiquitinierung und damit zum Abbau des Proteins über das Proteasom.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neue Transgenvarianten hergestellt werden konnten, die in ersten biochemischen Charakterisierungen die gewünschten Veränderungen aufzeigen und nun in *in vivo* Studien untersucht werden konnten.

D.1.4 Die Verabreichung der 2a-Konstrukte zeigte *in vitro* eine gemeinsame Expression der Proteine in einer Zelle und führte *in vivo* zur Unterdrückung Gag-spezifischer T-Zell Antworten

Unter der Annahme, dass eine Interferenz zwischen gp120 und einem co-verabreichten Transgen (wie z.B. Gag) entweder bei der gemeinsamen Prozessierung und Expression in der infizierten Zelle oder aber auch nach gemeinsamer Aufnahme in eine APC auftritt, ist die gemeinsame Anwesenheit von Gag und gp120 in der gleichen Zelle ausschlaggebend.

In allen vorangegangenen Studien erfolgte stets die Gabe einer Mischung aus gp120 und einem zweiten Antigen^{225,233,234}. Dadurch kann das Vorhandensein beider Transgene in einer Zelle nur vermutet, keinesfalls jedoch sichergestellt werden. Mit Plasmid-DNA-

Konstrukten (2a-Konstrukte), welche beide Transgene in vergleichbarer Stärke exprimieren und somit äquimolare Mengen von Gag und gp120 in einer Zelle gewährleisten (C.2.2.1, Abb. C-5), lässt sich nun eine mögliche Interferenz auf Zellebene untersuchen.

Die Überprüfung der Lokalisierung beider Transgene in einer Zelle mittels FACS-Analyse zeigte nach einer transienten Transfektion der 2a-Konstrukte die Expression beider Immunogene in 26 % aller Zellen, wohingegen nur 10 % (Gag) bzw. 0,4 % (Env) der Zellen ausschließlich eines der beiden Immunogene exprimierten. Während die Transfektion einer Mischung beider Plasmide zu 27 % Gag-positiver und 10 % Env-positiver Zellen führte, lag die Zahl der doppelt positiven Zellen bei lediglich 8 % (C.2.2.2, Abb. C-8).

Gleichwohl führten die intramuskuläre Verabreichung einer äquimolaren Mischung beider Plasmide (^MGag und gp120) sowie die Gabe der 2a-Konstrukte in gleicher Weise zur Unterdrückung der Gag-spezifischen zellulären Immunantworten (C.4.1, Abb. C-19). Wenngleich sich die *in vivo* von der *in vitro* Situation unterscheiden könnte, so deuten diese Ergebnisse dennoch an, dass die Co-Expression beider Transgene in einer Zelle nicht notwendig ist.

Eine wichtige Bedeutung für das Induzieren einer CD8⁺ T-Zell Antwort kommt dem Mechanismus der sogenannten Cross-Präsentation zu. Hierbei werden in DCs über Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommene exogene Antigene prozessiert und auf MHC-Klasse-I Molekülen zytotoxischen T-Zellen präsentiert^{236,237}. In einer *in vivo* Studie, in welcher ausschließlich nicht-hämatopoetische Stammzellen mit Virus infiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass APCs virale Antigene von mit Virus infizierten Zellen über *cross-priming* aufnehmen und dadurch eine spezifische CTL-Antwort generieren können²³⁸. Es wäre somit auch vorstellbar, dass die Proteinexpression der intramuskulär verabreichten Transgene *gag* und *env* in der gleichen oder aber auch in unterschiedlichen Muskelzellen stattfindet und dass anschließend im lymphatischen Gewebe beide Proteine durch eine APC über *cross-priming* aufgenommen werden. Eine mögliche Interferenz zwischen Gag und Env würde somit nicht in der Muskelzelle, sondern in einer Antigen-präsentierenden Zelle auftreten. Da bei der Verabreichung von Vakzinekomponenten in verschiedene Beine der Maus unterschiedliche lymphatische Kompartimente angesprochen werden, würde auch die effiziente Induktion Gag-spezifischer T-Zellen nach räumlich getrennter Immunisierung diese Theorie unterstützen.

Des Weiteren bindet das HIV-1 Glykoprotein gp120 an den auf pDCs und mdDCs befindlichen Oberflächenrezeptor DC-SIGN und wird dadurch von Dendritischen Zellen aufgenommen²³⁹. Eine DC-SIGN-HIV-1 Interaktion reguliert weiterhin die durch *Toll-like* Rezeptoren (TLR) vermittelte angeborene Immunantwort und greift somit in immunstimulatorische Signalkaskaden ein²⁴⁰⁻²⁴². Ebenso konnte für gp120 ein Einfluss auf die Maturation von mdDCs sowie auf die Expression bestimmter Zytokine gezeigt

werden^{243,244}. Eine Behandlung von humanen Endothelzellen zeigte weiterhin eine durch HIV-1 gp120 und gp160 induzierte Apoptose in diesen Zellen²⁴⁵. Diverse Gruppen konnten in diesem Zusammenhang nahelegen, dass apoptotische Zellen die Aufnahme von Antigen in Verbindung mit apoptotischen Vesikeln durch „bystander-DC“, welche die Fähigkeit besitzen T-Zell Antworten zu vermitteln, erhöhen^{246,247}.

HIV-1 Env weist einige Mechanismen auf, welche die Immunreaktion des Wirts unterdrücken können. Es wäre somit auch denkbar, dass Env dadurch die Immunogenität einer Vakzine beeinflusst.

D.1.5 Die Induktion Gag-spezifischer Immunantworten nach Gabe einer Mischung aus ^MGag und gp120ΔV11V deutet auf eine Konkurrenz um die Präsentation auf MHC-I Molekülen hin

Die Verabreichung einer Mischung der beiden DNA-Plasmide pc^MGag und pcgp120ΔV11V führte in einer *in vivo* Studie im BALB/c Mausmodell zur Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten (C.4.2, Abb. C-20). Wie bereits unter D.1.4 postuliert, deuten sowohl die *in vitro* als auch die *in vivo* Untersuchungen der 2a-Konstrukte darauf hin, dass die Proteinexpression der co-verabreichten Antigene in der gleichen oder aber auch in unterschiedlichen Muskelzellen stattfindet, und dass eine mögliche Interferenz zwischen Gag und Env anschließend in einer APC auftritt, welche z.B. über *cross-priming* beide Antigene gleichzeitig aufgenommen hat. Da die unter C.4.2 beschriebene Mausstudie zeigen konnte, dass die Deletion des BALB/c gp120-spezifischen Epitops V11V bei gemeinsamer Gabe des modifizierten Plasmids zusammen mit pc^MGag zum Erhalt Gag-spezifischer T-Zellen führt, lässt sich spekulieren, ob eine Konkurrenz beider Epitope aus Gag und Env um die Beladung auf MHC-Klasse-I Moleküle eine mögliche Erklärung des negativen Effekts von Env auf Gag darstellt.

Viren kodieren für eine Vielzahl potentieller Epitope, welche auf MHC-I Molekülen präsentiert werden und die Generierung zytotoxischer T-Zell Antworten vermitteln können. Untersuchungen zur Präsentation verschiedener viraler Epitope auf MHC-I Molekülen konnten zeigen, dass die Erkennung präsentierter Epitope und die damit verbundene Induktion einer Immunantwort gegen unterschiedliche virale Epitope in ihrer Stärke stark variieren kann²⁴⁸⁻²⁵⁰. Des Weiteren ist eine antivirale CTL Antwort *in vivo* typischerweise nur gegen ein Einziges oder eine geringe Anzahl dieser potentiellen Epitope gerichtet. Dieses Phänomen wird als Immundominanz bezeichnet²⁵¹. Einige zum Teil bereits bekannte Faktoren beeinflussen jedoch die Wahl eines immundominanten Epitops zur Generierung CD8+ T-Zell vermittelter Immunantworten²⁵². Hierzu zählen z.B. der Ablauf der viralen Proteinexpression²⁵³, die Spezifität der Antigen Prozessierung und Präsentation²⁵⁴⁻²⁵⁶, die Bindungsaffinität zwischen dem T-Zell Rezeptor und dem MHC-Peptid-Komplex²⁵⁷ oder aber

auch die genetischen Veränderungen des Virus selbst²⁵⁸. Wie bereits oben erwähnt konnten Lopez *et al.* durch einen Vergleich zweier viraler Epitope aus gp160 und pp89 eine Konkurrenz aufzeigen, welche vermutlich bereits auf der Ebene der MHC-Beladung und Stabilisierung stattfindet²³⁴. Es könnte somit sein, dass die Anwesenheit eines immundominanten Epitops die Beladung eines weniger gut präsentierten Epitops auf MHC-Moleküle durch eine Konkurrenz mit diesem z.B. bei der Expression in der infizierten Zelle oder in einer Antigen-präsentierenden Zelle verhindert²³⁴. In weiteren *ex vivo* Studien wurden humane Dendritische Zellen mit rekombinanten pockenviralen Vektoren infiziert und die Transgen-spezifischen CTL Antworten unter Verwendung eines spezifischen T-Zell-Klons bestimmt. In diesen Studien, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte kein Einfluss gp120-spezifischer Epitope auf die Beladung Gag-spezifischer Epitope auf MHC-Moleküle gezeigt werden (Dissertation Philip Rosenstock, durchgeführt am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Regensburg).

Jedoch deuten sowohl die Ergebnisse der Untersuchung der 2a-Konstrukte als auch die *in vivo* Daten nach Verabreichung einer Mischung aus ^MGag und gp120ΔV11V an, dass eine Konkurrenz vermutlich auf der Ebene der APC stattfindet. Diese Theorie würde auch durch die Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten nach räumlich getrennter Verabreichung von Env und Gag unterstützt werden, da aufgrund dieser Applikationsroute prozessierte Proteine in getrennte lymphatische Kompartimente transportiert werden.

D.1.6 Die Deletion des artifiziellen Signalpeptids von Env verbesserte in gleicher Weise die Gag-spezifischen Immunantworten wie eine Verringerung der verabreichten Menge an Env

Das HIV-1 Glykoprotein Env enthält wie alle Membranproteine ein Amino-terminales Signalpeptid (SP)²⁵⁹, welches für den Transport der entstehenden Polypeptide in das Endoplasmatische Retikulum (ER) sorgt²⁶⁰. Die Spaltung des HIV-Env-SP findet im Anschluss daran an der Membran des ER statt, und induziert die weitere Prozessierung des Hüllproteins. Des Weiteren vermittelt das HIV-Signalpeptid die Bindung von Env an diverse Chaperone im ER, wie z.B. Calnexin, was wiederum die Faltung und Glykosylierung des Proteins beeinflusst^{262,263}.

Durch die Entfernung des artifiziellen Signalpeptids am gp120 konnte in der vorliegenden Arbeit sowohl ein Einfluss auf die *in vitro* Expression als auch auf die Induktion gp120-spezifischer zellulärer Immunantworten *in vivo* gezeigt werden. Hierzu konnte in einer ersten biochemischen Charakterisierung nachgewiesen werden, dass nach transienter Transfektion des DNA-Plasmids gp120ΔSP weder im Lysat noch im Überstand gp120-Protein vorhanden war. Im Vergleich dazu konnte eine effiziente Proteinexpression des Transgens gp120 mit Signalpeptid gezeigt werden (C.2.2.1, Abb. C-7). Bei

intramuskulärer Verabreichung einer Mischung aus gp120 Δ SP und ^MGag zeigte sich weiterhin ein Rückgang der Induktion Env-spezifischer T-Zell Antworten (C.4.3, Abb. C-21). Nicht nur die vollständige Deletion des Signalpeptids, sondern auch der Austausch des HIV-SP durch heterologe SP-Sequenzen führt, wie von Pfeiffer *et al.* dargestellt, bei der Prozessierung von gp160 aus einem vollständigen Provirusisolat zum Rückgang der Verpackung von Env in virale Partikel und zu einer verminderten Infektiosität der Viren²⁶⁴. Im Gegensatz dazu konnten andere Studien zeigen, dass der Austausch des SP durch eine Signalsequenz des Erythropoetins (Epo) oder des *tissue-plasminogen activator* (tPA) zur Erhöhung der Sekretion von gp120 führt^{265,266}. Obwohl zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vorliegen, scheint es sich bei dem HIV-Signalpeptid nicht nur um ein passives Transportsignal, sondern um einen aktiven Regulator zur Bildung und Funktion von Hüllproteinen zu handeln.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass durch die Deletion des Signalpeptids am gp120 und die damit verbundene Veränderung der Prozessierung von Env ein tendenzieller, jedoch keinesfalls signifikanter Anstieg Gag-spezifischer T-Zellen erzielt werden konnte (C.4.3, Abb. C-19). Dieser Anstieg Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten lässt sich jedoch auch durch die Co-Verabreichung einer geringeren DNA-Menge des gp120 Konstrukts im Verhältnis zu Gag erreichen²¹⁴. Sowohl die Applikation einer geringeren Menge des gp120-DNA-Plasmids als auch die Veränderung der Prozessierung von gp120 führen des Weiteren zu einem generellen Rückgang der exprimierten gp120 Proteinmenge. Es ist somit sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem Anstieg Gag-spezifischer T-Zellen um einen Effekt handelt, der ausschließlich auf die Anwesenheit einer geringeren Menge an Env zurückzuführen ist.

Wie bereits aus den biochemischen Charakterisierungen ersichtlich (C.2.2.1, Abb. C-7), konnte durch das Anfügen des Signalpeptids an ^MGag keine Verbesserung der Prozessierung von Gag erzielt werden. Vielmehr führt die Modifikation am Transgen *gag* wie schon unter D.1.3 beschrieben vermutlich zu einer Fehlfaltung von ^MGag und somit zum proteasomalen Abbau des Proteins. Aus diesem Grund führt das N-terminale Anfügen des SP an Gag auch bei alleiniger Verabreichung oder bei der Gabe in einer Mischung mit gp120 nicht zu einer Verbesserung Gag-spezifischer T-Zell Antworten (C.4.3, Abb. C-21).

Die Herstellung und Charakterisierung der neuen Transgenvarianten konnte erste Anhaltspunkte für den Mechanismus, welcher der Interferenz zwischen Env und Gag zu Grunde liegt, aufzeigen. Es bedarf jedoch weiterer präklinischer Studien, um diesen negativen Effekt von Env genauer erklären zu können.

D.2 Herstellung und Bewertung rekombinanter NYVAC

D.2.1 Unter Verwendung der homologen Rekombination wurden neue NYVAC-Varianten hergestellt

Die Methode der homologen Rekombination bietet eine aufwendige jedoch erfolversprechende Methode zur Herstellung rekombinanter Viren und konnte nicht nur für die Generierung rekombinanter NYVAC, sondern auch für die Herstellung von rekombinanten MVA erfolgreich eingesetzt werden ¹²⁵.

Diese Rekombinationsmethode beruht auf einem zweistufigen Prozess bei welchem in einem ersten Schritt, unter Verwendung eines Transfervektors, eine Expressionskassette für ein gewünschtes Transgen zusammen mit einem geeigneten Reportergen in den Lokus des deletierten Thymidinkinasegens im NYVAC Genom gerichtet einrekombiniert wird. Das verwendete Transferkonstrukt enthält interne homologe Sequenzbereiche welche in einem zweiten Schritt die Ausrekombination des Reportergens ermöglichen. Da Vacciniaviren vollständig im Zytoplasma der Zelle replizieren und somit die Synthese der RNA auch dort und nicht im Zellkern stattfindet ⁶, ist für die korrekte Transkription des Transgens ein Vacciniavirus-spezifischer Promotor nötig. Dieser ist ebenfalls auf dem Transferkonstrukt enthalten und wurde zusammen mit der Expressionskassette einrekombiniert.

Die Anreicherung der hergestellten NYVACs erfolgte mittels einer aufwendigen Plaque-Aufreinigung. Durch die Selektion auf Transgen-positive Einzelplaques konnten genetische Veränderungen im integrierten Transgen erkannt und bezüglich der Expression des Transgens sehr effiziente rekombinante Viren generiert und hochtitrig vermehrt werden. Ziel dieser Arbeit war es, veränderte Transgenvarianten mittels dieser homologen Rekombinationsmethode in das NYVAC Genom einzubringen und so neue rekombinante NYVACs herzustellen. Es konnten insgesamt acht virale Konstrukte generiert werden (C.3.3, Tab. C-2), die mittels PCR- und Western-Blot Analyse verifiziert wurden.

D.2.2 Die Verifizierung der rekombinanten NYVACs bestätigte eine Expression der Transgene und eine hohe Expressionseffizienz in allen rekombinanten Viren

Zur Verifizierung des ersten Rekombinationsschritts erfolgte in einer PCR-Analyse die Überprüfung der Integration der Expressionskassette zusammen mit dem Reportergen LacZ. Dabei wurden unter Verwendung spezifischer Primer mehrere Einzelplaques untersucht, und es konnten abhängig von der Aufreinigungsrunde 60-100 % der analysierten Plaques auf positive Integration des Transferkonstrukts getestet werden (gezeigt für NYVAC-^MGag: C.3.1.3.2, Abb. C-14). Des Weiteren erfolgte in den jeweils letzten beiden Reinigungsschritten die Untersuchung der Ausrekombination des Reportergens LacZ und

somit die Verifizierung des zweiten Rekombinationsschritts. Hierbei lag die Effizienz, wie am Beispiel des NYVAC-^MGag gezeigt, bei 100 % (C.3.1.3.2, Abb. C-15).

Im Gegensatz zu einer Veröffentlichung von Gomez *et al.*, in welcher die genetische Stabilität der hergestellten rekombinanten Viren durch die Infektion von primären Hühnerfibroblasten mit dem vollständig aufgereinigten Virusstock überprüft wurde¹²⁵, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Verifizierung der rekombinanten NYVAC mittels der genaueren Analyse von Einzelplaquesuspensionen.

Anders als der hochattenuierte NYVAC-Stamm, welcher durch eine zielgerichtete Deletion von 18 offenen Leserahmen aus der Sequenz des Kopenhagen Stamms generiert wurde³⁷, erfolgte die Herstellung von MVA durch mehrmaliges Passagieren des *chorioallantoid vaccinia Ankara* (CVA) auf primären Hühnerfibroblasten⁴⁷. Ziel dieses Passagierens ist das zufällige Einfügen genetischer Mutationen im Virusgenom, welche im Falle von MVA unter anderem die Replikation des Virus in Hühnerzellen begünstigen und somit in humanen Zellen vermindern, oder die Virulenz des Virus in den untersuchten Tieren unterdrücken¹⁵⁴. Jedoch stellt auch die Aufreinigung neuer rekombinanter Viren nach der Integration unterschiedlicher Transgene in die bereits attenuierten viralen Vektoren eine Passagierung dieser Viren während der Plaquareinigung dar. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass während der Aufreinigung Mutationen im Transgen oder im *Backbone* auftreten, die zum einen die Expressionseffizienz herabsetzen und zum anderen die Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten *in vivo* vermindern.

Um das Auftreten solcher Mutationen oder das vollständige Entfernen des Transgens während der Aufreinigung verifizieren zu können, wurden Einzelplaques im Western-Blot analysiert (C.3.2.3 und C.3.2.4). Zusätzlich erfolgte die Überprüfung der Transgen-Expression nach Infektion von BHK-21 Zellen mit den aufgereinigten rekombinanten NYVACs (C.3.2.5). Ebenso wie für die Charakterisierung der Proteinexpression nach Transfektion der pcDNA-Konstrukte²¹⁴ ergaben sich auch im Kontext des viralen Vektors NYVAC, abhängig von den eingefügten Modifikationen in den integrierten Transgenen, die erwarteten Proteinbanden (C.3.2.5, Abb. C-18). Mit Hilfe der Western-Blot Analyse konnte eine erfolgreiche und im Vergleich zu NYVAC-C deutlich verbesserte Expression aller eingebrachten Transgene bestätigt werden.

Im Verlauf der Verifizierung der Einzelplaquesuspensionen aus den rekombinanten Viren konnten jedoch deutliche Unterschiede in der Stabilität aufgezeigt werden. Während für die Aufreinigung von NYVAC-PN lediglich eine Expressionseffizienz von 94 % erzielt werden konnte, exprimierten die nach Infektion mit NYVAC-^MGag analysierten Zelllysate zu 100 % das eingebrachte Transgen (C.3.2.4, Abb. C-17 sowie E.2.5, Abb. E-9). Obwohl das Auftreten von Mutationen im integrierten Transgen durch eine Verifizierung der rekombinanten Viren mittels Einzelplaquesuspensionen nicht verhindert werden konnte,

ermöglichte diese Verifizierung ein deutlich schnelleres Erkennen genetischer Veränderungen und eine Selektion auf korrekt exprimierte Transgene. Rekombinante Viren, welche eine Mutation im integrierten Transgen aufweisen, könnten unter Umständen schneller replizieren, sich somit schneller in infizierten Zellen vermehren, und dadurch zur Verunreinigung eines hochtitrigen Virusstocks beitragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Verifizierung der rekombinanten NYVAC konnte zeigen, dass eine Bestimmung der Expressionseffizienz und somit ein Nachweis der Stabilität der rekombinanten Viren durch eine biochemische Charakterisierung von Einzelplaquesuspensionen für die Herstellung hochtitriger Virusstocks wichtig ist.

D.2.3 Verifizierung neuer rekombinanter NYVACs hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Induktion spezifischer zellulärer Immunantworten

Durch die Herstellung und Austestung des Vakzine-Kandidaten NYVAC-C in präklinischen und klinischen Phase I und II Studien konnten Pockenviren bereits erfolgreich als geeignete Vektoren etabliert werden^{129-131,204}. Jedoch zeigten sich in heterologen *Prime/Boost*-Studien zusammen mit DNA-C sehr gute Antigen-spezifische zelluläre Immunantworten gegen das in NYVAC-C und DNA-C integrierte gp120. Gag- und Pol-spezifische Immunantworten konnten dabei, vermutlich aufgrund der schwachen Expression des eingebrachten Polyproteins bestehend aus GagPolNef, nur sehr marginal induziert werden.

Studien an *Elite Controllern* konnten zeigen, dass neben der Induktion breit-neutralisierender Antikörper⁸²⁻⁸⁴ das Hervorrufen einer schützenden CTL Immunantwort für die Kontrolle der Virusreplikation wichtig ist^{101,102,103}. In diesem Zusammenhang stellte sich jedoch heraus, dass genau die gegen HIV-1 Epitope aus Gag und Pol gerichteten CTLs in der Lage sind eine Virusreplikation zu kontrollieren. Somit ist die Verbesserung der Expression des Polyproteins GagPolNef für die Induktion gesteigerter Gag- und Pol-spezifischer T-Zellen entscheidend.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine nicht-progressiv verlaufende HIV-1 Infektion mit einer polyfunktionalen CD4+ und CD8+ spezifischen zellulären Immunantwort verbunden ist^{108,109}. Eine effektive HIV-Vakzine sollte somit in der Lage sein, nicht nur eine qualitativ gute und lang anhaltende B-Zell vermittelte Immunantwort, sondern auch eine HIV-spezifische T-Zell Antwort gegen konservierte Epitope insbesondere in Gag und Pol hervorzurufen^{110,111}. Da trotz intensiver Forschung noch kein Impfstoff zur Verfügung steht, welcher eine effiziente breit-neutralisierende Antikörper Antwort induzieren kann, ist z.B. die Weiterentwicklung von NYVAC-C zu einer verbesserten T-Zell Vakzine ebenfalls von großer Bedeutung.

Um das Potential der neuen rekombinanten Viren dahingehend bewerten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Fähigkeit zur Induktion Transgen-spezifischer CD8+ zellulärer Immunantworten untersucht.

D.2.4 Das Einfügen des ribosomalen *Frame-Shift* Signals bewirkte nach Applikation des NYVAC- Δ^M G^{FS}PN bei der Analyse aller NYVAC-Varianten eine Verbesserung Gag-spezifischer T-Zell Antworten

In einer ersten Immunisierungsstudie konnte gezeigt werden, dass durch eine Verbesserung der Transgenexpression eine Steigerung der Gag-spezifischen T-Zell Antworten erreicht werden kann (C.5.1, Abb. C-22).

Eine einmalige intramuskuläre Applikation von NYVAC-C führte wie erwartet zur Induktion Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten, jedoch liessen sich nach Gabe von NYVAC-C nur marginale zelluläre Immunantworten gegen das Transgen Gag hervorrufen.

Bereits *in vitro* konnte durch eine Infektion mit NYVAC- Δ^M GPN im Vergleich zu NYVAC-C keine verbesserte Expression des Polyproteins Δ^M GPN nachgewiesen werden (C.3.2.5, Abb. C-18). Erwartungsgemäß führte auch die Verabreichung von NYVAC- Δ^M GPN *in vivo* zu keiner Verbesserung der Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten. Im Gegensatz dazu konnte durch die Applikation von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN eine im Vergleich zur Gabe von NYVAC- Δ^M GPN um den Faktor 3,8 (172 ± 39 zu 46 ± 30) gesteigerte Gag-spezifische zelluläre Immunantworten induziert werden. Wenn die Daten, welche *in vitro* generiert wurden die Situation *in vivo* widerspiegeln, so lässt sich die deutliche Verbesserung der Transgen-spezifischen T-Zellen vermutlich auf die Expression einer erhöhten Menge des Pr55 Gag Vorläuferproteins nach Verabreichung von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN zurückführen. Das Einfügen des ribosomalen *Frame-Shift* Signals zwischen den Gag und Pol Leserahmen vermittelte somit *in vitro* eine gesteigerte Expression des Transgens und *in vivo* eine verbesserte Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten.

Durch die Herstellung von NYVAC- Δ^M G^{FS}PN konnte im Rahmen dieser Arbeit eine neue NYVAC-Variante generiert werden, welche, verglichen mit NYVAC-C, in der Lage ist die Anzahl Gag-spezifischer CD8⁺ T-Zellen um das Vierfache zu steigern (C.5.1, Abb. C-22).

D.2.5 Die Fähigkeit zur Bildung Virus-ähnlicher Partikel sowie die Trennung der Transgene auf unterschiedliche NYVACs führte zu keiner weiteren Verbesserung der zellulären Immunantworten

In einer vorangegangenen Mausstudie konnte bei der Austestung von DNA-Konstrukten gezeigt werden, dass die intramuskuläre Verabreichung des pc^MG^{FS}PN Plasmids sowie die Trennung von ^MGag und PN auf unterschiedliche DNA-Konstrukte zu einer Verbesserung der Gag-spezifischen T-Zell Antworten führt ²¹⁴.

Neben dem Einfügen des ribosomalen *Frame-Shift* Signals sollte somit in einer weiteren *in vivo* Studie auch der Einfluss der Befähigung zur Bildung von Virus-ähnlichen Partikeln sowie der Einfluss der Trennung der Transgene *gag* und *polnef* auf die T-Zell Antworten nach Applikation der unterschiedlichen NYVACs untersucht werden.

Wie in Kapitel D.2.4 beschrieben, konnte durch die Gabe von NYVAC- $\Delta^M G^{FS}$ PN eine um das Vierfache gesteigerte Gag-spezifische T-Zell Antwort induziert werden. Die Wiederherstellung des Myristoylierungssignals im Transgen $M G^{FS}$ PN und die Verabreichung dieses Transgens mittels des viralen Vektors NYVAC zeigte keine zusätzliche Steigerung der Anzahl Gag-spezifischer CD8+ T-Zellen (C.5.1, Abb. C-22). Auch führte die Applikation der Transgene M Gag, Δ^M Gag und PN ebenfalls zu keiner Verbesserung der induzierten Gag-spezifischen zellulären Immunantworten.

In einer Western-Blot Analyse konnte sowohl für die Transfektion der DNA-Konstrukte als auch für die Infektion mit NYVAC gezeigt werden, dass die Wiederherstellung des Myristoylierungssignals sowie die Trennung der Leserahmen von Gag und PN zu keiner zusätzlichen Verbesserung der Transgenexpression beitragen (Abb. C-18 sowie ²¹⁴). *In vitro* konnte somit kein Unterschied in der Expression der Transgene aufgezeigt werden. Die intramuskuläre Verabreichung der Transgenvarianten im Kontext des viralen Vektors NYVAC führte jedoch im Gegensatz zur Gabe der DNA-Konstrukte nicht zu einer Verbesserung der Gag-spezifischen zellulären Immunantworten. Ein direkter Einfluss des rekombinant hergestellten NYVAC auf die Induktion spezifischer Immunantworten ist somit nicht auszuschließen.

Bezüglich der Induktion effizienter Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten konnte der hochattenuierte Vacciniavirus Stamm NYVAC als virale Vektor-Vakzine sehr erfolgreich eingesetzt werden ^{129-131,204}. Bei der Bewertung von NYVAC als virales Vektorsystem muss jedoch auch die Untersuchung der Wirtsantwort als Reaktion auf die Applikation von NYVAC betrachtet werden. In einer *in vitro* Studie konnten Guerra *et al.* nach Infektion von HeLa-Zellen mit NYVAC die vermehrte Expression diverser Zwischenprodukte der Apoptose-Signalkaskade, wie z.B. der Caspase-9 oder aber auch die Aktivierung von NF- κ B nachweisen ²⁶⁷. Ein direkter Zusammenhang zwischen einer durch NYVAC vermittelten Apoptose oder der Aktivierung von NF- κ B auf die Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten ist dabei jedoch noch nicht geklärt.

Bei der Betrachtung von mit DNA immunisierten Mäusen, im Vergleich zu solchen, die eine Applikation mit NYVAC erhalten haben, zeigen sich deutlich höhere Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten ^{131,214}. Die Daten legen die Vermutung nahe, dass durch die Verabreichung der DNA-Konstrukte *per se* eine quantitativ höhere Immunantwort erreicht werden kann und dass mittels des attenuierten NYVACs generell nur eine bestimmte Quantität und Qualität an Transgen-spezifischen Immunantworten zu erreichen ist.

Wie auch im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Immunisierung von Mäusen in den vorangegangenen Studien 1×10^7 infektiöse Partikel des zu testenden pockenviralen Vektors eingesetzt ^{126,131}. Insbesondere bei der Verabreichung einer Mischung aus 1×10^7 NYVAC- M Gag und 1×10^7 NYVAC-PN könnte die Gabe einer solch hohen Menge an

NYVAC selbst die Höhe der induzierten Transgen-spezifischen T-Zell Antworten beeinflussen. Möglicherweise könnte ein durch NYVAC hervorgerufener Effekt auf die Höhe der induzierten Gag-spezifischen Immunantworten durch die Verabreichung einer deutlich geringeren Menge an infektiösen Partikeln vermindert werden. Jedoch muss eine mögliche Auswirkung auf die Höhe der induzierten Transgen-spezifischen T-Zell Antworten berücksichtigt werden.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten, welcher von anderen Arbeitsgruppen bereits untersucht wird, ist die Modifikation des NYVAC-Vektors selbst. Hierbei wird zum einen durch das Wiedereinfügen der *host-range*-Gene K1L und C7L die Replikationsfähigkeit des viralen Vektors in humanen Zellen erhöht, zum anderen führt die Deletion des Gens B19R, welches für einen löslichen Faktor kodiert, der die Bindung von Typ-I Interferonen an ihren natürlichen Rezeptor verhindert, zur Unterdrückung der antiviralen Antwort des Wirts²⁶⁸.

D.2.6 Im Kontext des viralen Vektors NYVAC zeigte sich kein Einfluss der Co-Verabreichung von gp120 auf die Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten

Die Kombination aus HIV-1 gp120 und ^MGag führte bei einer Applikation dieser Transgene unter Verwendung eines DNA-Vektors zur Unterdrückung der Induktion zellulärer Immunantworten gegen das co-verabreichte Antigen Gag²¹⁴. Der Einfluss des Hüllproteins Env konnte in diversen Arbeiten bestätigt werden^{234,225,233}. Jedoch ist der Mechanismus, welcher diesem Effekt zu Grunde liegt, bis jetzt nicht vollständig geklärt. Dennoch weist das HIV-1 Env einige Eigenschaften auf, welche die Induktion einer Immunantwort gegen co-verabreichte Antigene schwächen könnten²⁴⁰⁻²⁴⁵.

Um einen möglichen negativen Einfluss von gp120 auch im Kontext des viralen Vektors NYVAC genauer untersuchen zu können, wurden in einer weiteren *in vivo* Studie die rekombinanten viralen Vektoren NYVAC-^MG^{FS}PN sowie NYVAC-Gag und NYVAC-PN in Kombination mit NYVAC-gp120 verabreicht. Die Auswertung der Daten zeigt, dass das Hüllprotein gp120 in einer einmaligen intramuskulären Applikation zusammen mit NYVAC-^MG^{FS}PN oder einer Mischung aus NYVAC-Gag und NYVAC-PN keinen negativen Einfluss auf die Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten hat (C.5.3, Abb. C-24). Wie bereits postuliert, wurden im Rahmen dieser Arbeit durch die Gabe von 1×10^7 infektiösen Partikeln des jeweils zu testenden rekombinanten NYVAC, sehr hohe Mengen des viralen Vektors verabreicht. Es liegt somit die Vermutung nahe, dass bei der Verabreichung von NYVAC-^MG^{FS}PN *per se* keine quantitativ höheren Transgen-spezifischen Immunantworten erreicht werden können. Ein vorhandener Einfluss von gp120 auf die Höhe der induzierten

zellulären Immunantworten könnte somit evtl. durch die Verabreichung einer geringeren Menge an infektiösen Partikeln untersucht werden.

Des Weiteren zeigte sich bei der Betrachtung der Applikation von NYVAC-^MGag in einer Mischung mit NYVAC-PN im Vergleich zur Gabe von NYVAC-^MG^{FS}PN keine Verbesserung der Gag-spezifischen T-Zellen (C.5.3, Abb. C-24). Jedoch konnte, wie in Abbildung C-24 dargestellt, ein Anstieg der Pol-spezifischen zellulären Immunantworten nachgewiesen werden. Die Trennung der Transgene ^MGag und PN führte in diesem Mausexperiment sogar zum Rückgang der Anzahl Gag-spezifischer T-Zellen. Da die alleinige Verabreichung von NYVAC-^MGag, NYVAC-PoINef und NYVAC-gp120 zu einer sehr starken Induktion zellulärer Immunantworten gegen das jeweilige Transgen führte, könnte auch hier nicht die Trennung der Transgene *per se*, sondern die erhöhte NYVAC-Menge eine mögliche Erklärung darstellen. Dies könnte z.B. durch die Co-Verabreichung einer gesteigerten Menge an NYVAC-wt weiter untersucht werden.

D.2.7 Eine homologe *Prime/Boost*-Strategie konnte die Induktion effizienter Antigen-spezifischer T-Zell Antworten nicht zusätzlich verbessern

Die in einer vorangegangenen Studie durchgeführte Untersuchung zeigte eindeutig, dass bei Verwendung einer heterologen *Prime/Boost*-Strategie (DNA/NYVAC), im Vergleich zu einer homologen Applikation von NYVAC alleine, deutlich verbesserte Transgen-spezifische zelluläre Immunantworten induziert werden ¹³¹. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die homologe Verabreichung der rekombinanten Viren eine Immunantwort gegen den Vektor selbst induziert und dadurch die Unterdrückung Vakzine-spezifischer Immunantworten hervorgerufen wurde ¹⁵⁹.

Experimentell wird dieser Verdacht durch die Ergebnisse, welche in einer weiteren Mausexperiment generiert wurden, bestätigt. Durch ein intramuskuläres *Priming* mit NYVAC-^{ΔM}G^{FS}PN und einen nachfolgenden *Boost* mit dem gleichen rekombinanten NYVAC konnte im Vergleich zu einer einmaligen Immunisierung (C.5.1, Abb. C-22) keine Steigerung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten induziert werden (C.5.2, Abb. C-23). Dies zeigte sich mit Ausnahme von NYVAC-^MGag für alle analysierten NYVAC-Varianten.

Betrachtet man die Induktion der Pol-spezifischen T-Zell Antworten, so führte ebenfalls ausschließlich die zweifache Verabreichung von NYVAC-PN zu einer leichten Verbesserung der Pol-spezifischen zellulären Immunantworten.

Obwohl zwei unterschiedliche Mausexperimente nicht direkt miteinander vergleichbar sind, lässt sich dennoch festhalten, dass die durch eine Grundimmunisierung erzielten Gag- und Pol-spezifischen zellulären Immunantworten durch eine zweite Gabe des jeweils gleichen NYVACs nicht gesteigert werden können.

Da durch die Erstimmunisierung mit einem DNA-Plasmid vor allem das Problem der Vektorimmunität umgangen werden kann, sind heterologe *Prime/Boost*-Immunisierungen bei der Verabreichung eines viralen Vektors als HIV-Vakzine einer homologen Strategie vorzuziehen.

D.2.8 Die Verbesserung der DNA-Konstrukte sowie der rekombinanten Viren führte in einer heterologen *Prime/Boost*-Verabreichung zu einer deutlich gesteigerten Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten

Wie bereits in diversen präklinischen und klinischen Phase I und II Studien gezeigt, konnten durch die heterologe *Prime/Boost*-Verabreichung eines rekombinanten Virus zusammen mit einer DNA-Vakzine die Transgen-spezifischen zellulären Immunantworten, im Vergleich zu einer einmaligen Gabe des Virus deutlich gesteigert werden^{129,131,204}. Betrachtet man eine Studie, in welcher die Kombination aus DNA-C und NYVAC-C untersucht wurde, genauer, so zeigt sich, dass diese heterolog verabreichten Vakzine-Kandidaten in der Lage waren, sehr starke Env-spezifische T-Zell Antworten zu induzieren, dass jedoch zelluläre Immunantworten gegen Gag und Pol nur sehr schwach hervorgerufen werden konnten^{129,204}. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Verbesserung dieser heterologen *Prime/Boost*-Kombination hinsichtlich der Steigerung Gag- und Pol-spezifischer zellulärer Immunantworten erreicht werden.

Erste Hinweise deuten an, dass eine heterologe *Prime/Boost*-Immunisierung in der Lage ist, sowohl quantitativ als auch qualitativ hohe Immunantworten zu generieren²⁶⁹. Da die für einen *Prime* verwendete Plasmid-DNA selbst nicht immunogen ist, sind die induzierten Immunantworten ausschließlich gegen das kodierte Antigen gerichtet. Im Gegensatz dazu werden bei Vektor-basierten Impfstoffen Immunantworten sowohl gegen das übertragene Transgen als auch gegen den Vektor selbst induziert. Im Rahmen einer heterologen *Prime/Boost*-Immunisierung führt die Vektor-bedingte Expression großer Mengen an Transgen zu einer raschen und potenten Steigerung der durch die Plasmid-DNA-Grundimmunisierung hervorgerufenen Immunreaktionen wie auch zu einer niedrigeren Vektorimmunität^{161,162}. Dies konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Wie in Abbildung C-25 dargestellt, führte die Verabreichung einer Kombination aus DNA-C und NYVAC-C lediglich zur Induktion effizienter Pol- und Env-spezifischer zellulärer Immunantworten. Gag-spezifische T-Zell Antworten konnten hierbei nur sehr marginal hervorgerufen werden. Auch führte die Verabreichung eines verbesserten NYVAC-Boost durch die Verwendung einer Mischung aus NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120, zusammen mit einer DNC-C Grundimmunisierung, zu keiner Verbesserung Transgen-spezifischer

Immunantworten. Im Gegensatz dazu konnte durch die Erstimmunisierung mit einem verbesserten DNA-Prime (äquimolare Mischung der Plasmid-DNAs pc^MGag, pcPN und pcgp120) in einer heterologen Verabreichung sowohl mit NYVAC-C als auch mit einer Mischung aus NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120 eine deutliche Steigerung Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten erreicht werden. Bereits bei einer *Boost*-Immunisierung mit NYVAC-C konnte dabei eine um den Faktor 37 verbesserte Induktion Gag-spezifischer T-Zell Antworten gezeigt werden. Ebenso zeigte sich für die Pol-spezifischen sowie für die Env-spezifischen T-Zell Antworten eine Steigerung um das Dreifache (C.5.4, Abb. C-25). Im Vergleich zu NYVAC-C führte die *Boost*-Verabreichung einer Mischung aus NYVAC-^MG^{FS}PN und NYVAC-gp120 zu einem weiteren leichten Anstieg der Transgen-spezifischen Immunantworten.

Die Auswertung der durchgeführten heterologen *Prime/Boost*-Immunisierung zeigte somit, dass eine Verbesserung der Grundimmunisierung mit DNA zu einer deutlich gesteigerten Induktion Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten führte (C.5.4, Abb. C-25). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die zur Auffrischimmunisierung verwendeten neuen rekombinanten NYVACs in Kombination mit einer DNA-C Grundimmunisierung zu keiner Verbesserung der gemessenen zellulären Immunreaktionen beitrugen (C.5.4, Abb. C-25). Eine effektive Erstimmunisierung mit DNA, welche im idealen Fall bereits zur Induktion einer erhöhten Anzahl an *Memory*-T-Zellen führt, scheint die entscheidendere Komponente in einem heterologen *Prime/Boost*-System darzustellen.

Ein weiterer Vorteil eines heterologen Systems sind die unterschiedlichen adjuvierenden Eigenschaften von DNA-Vektoren und viralen Vektorsystemen. So können durch die Verwendung eines heterologen Systems nicht nur deutlich verbesserte Immunantworten hervorgerufen werden, auch die adjuvierenden und zum Teil synergistischen Eigenschaften der für den *Prime* und *Boost* verwendeten Vektorsysteme können zur Verbesserung der Immunantworten beitragen ¹⁶⁰.

Auch die Verabreichung verschiedener Vektor-Vakzinen unter Verwendung unterschiedlicher Applikationsrouten könnte zu einer Steigerung zellulärer Immunantworten führen. So könnte durch eine intramuskuläre Verabreichung eines DNA-Vektors gefolgt von einer z.B. intranasalen Gabe des viralen Vektors EHV-1 (Equines Herpesvirus Typ1) ²⁷⁰ oder durch die Applikation eines pockenviralen Vektors mittels Skarifizierung (PTVDC Konsortium: Daten von Petra Moij, in Bearbeitung) eine zuvor systemisch induzierte Immunantwort deutlich verstärkt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass durch die Herstellung neuer rekombinanter Viren Vakzine-Kandidaten generiert werden konnten, die im Vergleich zu einem bestehenden Kandidaten (NYVAC-C) sowohl bei alleiniger Applikation als auch in einer heterologen

Prime/Boost-Immunisierung eine deutliche Steigerung Gag-spezifischer T-Zell Antworten erzielen. Der Mechanismus welcher einem inhibitorischen Effekt von Env auf die Induktion Gag-spezifischer zellulärer Immunantworten zu Grunde liegt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nur in Ansätzen erläutert werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

D.3 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue, auf dem viralen Vektor NYVAC basierende rekombinante Viren hergestellt werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese rekombinanten NYVACs im Vergleich zu dem bereits etablierten NYVAC-C eine deutlich verbesserte Expression der eingebrachten Transgene aufweisen und des Weiteren in der Lage sind, eine Steigerung Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten hervorzurufen.

D.3.1 Durchführung weiterer heterologer *Prime/Boost*-Studien

In ersten heterologen *Prime/Boost*-Studien konnte durch die Applikation eines modifizierten DNA-Konstrukts zusammen mit einem optimierten rekombinanten NYVAC eine verbesserte Strategie zur Induktion effizienter spezifischer zellulärer Immunantworten aufgezeigt werden. Ebenso konnte in diesen *in vivo* Mausmodellen dargestellt werden, dass vor allem eine Verbesserung des DNA-*Prime* zu dieser Steigerung der Immunantworten beiträgt. In nachfolgenden Mausstudien sollte diese Vakzinierungsstrategie jedoch weiter verbessert und die optimale Kombination aus DNA und NYVAC untersucht werden. Hierbei könnte auch eine Änderung der *Prime/Boost*-Strategie durch die Verwendung eines NYVAC-*Prime* und eines DNA-*Boost* auf die Induktion Transgen-spezifischer zellulärer Immunantworten untersucht werden.

Auch könnte durch eine mehrfache Grundimmunisierung mit DNA oder eine Wiederholung der Auffrischimmunisierung durch NYVAC eine weitere Steigerung Transgen-spezifischer T-Zellen erreicht werden. Basierend auf diesen Überlegungen werden bereits sowohl Plasmid-DNA Konstrukte als auch NYVAC- bzw. ALVAC-Vektoren, welche die von unserer Arbeitsgruppe optimierten Immunogene enthalten, in Makakenmodellen getestet. Dabei beruhen alle aktuellen Immunisierungsansätze jedoch auf einer mehrmaligen Verabreichung der DNA-Vektoren, einer zwei- bis dreimaligen Auffrischimmunisierung mit einem viralen Vektor (z.B. NYVAC oder ALVAC) sowie teilweise auf einer dritten Applikation rekombinanter Proteine. Da für einen flächendeckenden Einsatz einer HIV-Vakzine, z.B. in der afrikanischen Bevölkerung, eine mehrfache Grundimmunisierung mit DNA und ein wiederholter NYVAC- und/oder Protein-*Boost* nicht durchführbar ist, liegt der Fokus neuer präklinischer Studien vor allem auf der Verbesserung des Immunisierungsschemas. Auch die

in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse werden hierzu in die Ausarbeitung neuer Immunisierungsstrategien einbezogen. Anhand der heterologen *Prime/Boost*-Immunisierungen konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine effektive Erstimmunisierung mit DNA die entscheidendere Komponente in einem heterologen System darstellt und dass die Co-Verabreichung des Hüllproteins Env im Kontext von NYVAC keinen negativen Einfluss auf die Induktion effizienter Transgen-spezifischer T-Zellen darstellt. Somit spielt die Trennung einzelner Antigenkomponenten bei der Verabreichung des viralen Vektors NYVAC keine ausschlaggebende Rolle. Es wäre somit vorstellbar, dass eine räumlich getrennt verabreichte DNA-Grundimmunisierung gefolgt von einer Auffrischimmunisierung bestehend aus der Kombination eines viralen Vektors zusammen mit einem aufgereinigten rekombinanten Protein eine erste Immunisierungsstrategie darstellt, welche die Anzahl der benötigten Applikationen verringert. Die Austestung der Verträglichkeit (klinische Phase I) der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten neuen Vakzine-Komponenten sowie die Bewertung der Induktion spezifischer zellulärer Immunantworten (klinische Phase II) ist ebenfalls in weiteren Studien zu überprüfen.

D.3.2 Entwicklung eines Transgen-gekoppelten Selektionssystems zur Produktion rekombinanter Vacciniaviren

Bei der Betrachtung der Stabilität der Viren zeigten sich Unterschiede in der Expressionseffizienz der eingebrachten Transgene. Obwohl auftretende genetische Veränderungen in den integrierten Transgenen durch eine Verifizierung der rekombinanten Viren mittels Einzelplaquesuspensionen nicht verhindert werden konnten, zeigte sich dennoch, wie wichtig die Analyse von Einzelplaquesuspensionen für die Charakterisierung hochtitriger Virusstocks ist.

Die Entwicklung eines Transgen-gekoppelten Selektionssystems könnte eine Möglichkeit darstellen, das Auftreten und die Vermehrung veränderter NYVACs zu unterbinden und somit die Verunreinigung rekombinant hergestellter Viren zu verhindern. Vorstellbar wäre, die kodierende Sequenz eines beliebigen Transgens über das TaV2a-Peptid des *Thosea asignia virus* an ein essentielles Gen von NYVAC zu koppeln und diese Expressionskassette an die Stelle der deletierten Thymidinkinase in das NYVAC Genom einzurekombinieren (Abb. D-1, Abschnitt A). Der dem 2a-Peptid vorgelagerte ORF enthält keine Terminationssequenz, was dazu führt, dass nur bei korrekter Transkription des ersten Gens die Translation beider Gene in gleicher Weise ermöglicht wird. Durch die Deletion des gleichen essentiellen Gens im NYVAC Genom selbst würden somit nur solche Viren vollständig gebildet werden, welche die Transkription und somit Expression eines korrekten Transgens aufweisen (Abb. D-1, Abschnitt B).

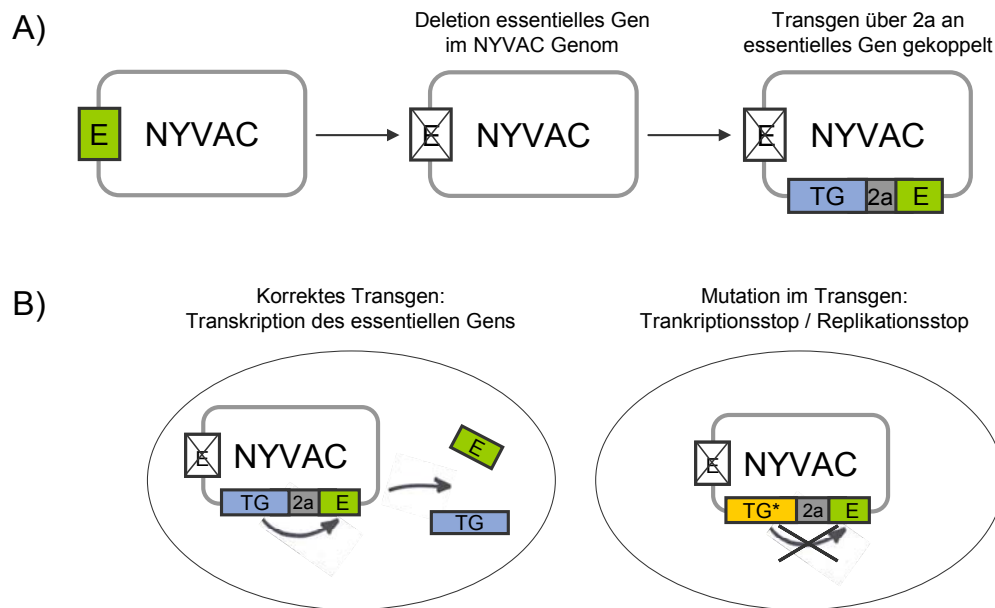


Abb. D-1: Schematische Darstellung des Transgen-gekoppelten Selektionssystems

A) Darstellung der Deletion eines essentiellen Gens im NYVAC Genom sowie der Integration einer Expressionskassette bestehend aus einem über das TaV2a-Peptid des *Thomoxys asynia virus* an ein essentielles Gen von NYVAC gekoppeltes Transgen.

B) Dargestellt ist die Expression von Transgen und essentielltem Gen bei korrekter Transkription der Expressionskassette sowie einem Transkriptionsstop und einem damit verbundenen Replikationsstop des NYVAC bei einer auftretenden Mutationen im Transgen.

E = essentielles Gen von NYVAC, TG = Transgen, 2a = TaV2a-Peptid

D.3.3 Weiterentwicklung einer schnelleren Herstellung rekombinanter NYVACs durch die Verwendung einer BAC-Technologie

Die Herstellung rekombinanter Viren mittels homologer Rekombination und anschließender Selektion in eukaryotischen Zellen ist langwierig und arbeitsaufwendig. Die Selektion einer einheitlichen Population rekombinanter Viren beruht dabei auf einer wiederholten Plaque-Aufreinigung, was, wie schon erläutert, zum Auftreten unerwünschter genetischer Veränderungen im rekombinanten Virus führen kann. Die Herstellung rekombinanter NYVACs mittels einer BAC-Technologie würde die aufwendige Generierung in Eukaryoten durch die Vermehrung und Mutagenese des viralen Genoms in Prokaryoten umgehen. Dieses Verfahren findet bereits einen Einsatz in der Herstellung rekombinanter equiner Herpesviren (EHV-1)²⁷¹, in der Herstellung und Charakterisierung eines auf dem humanen Cytomegalievirus basierenden rekombinanten Virus²⁷² sowie in der Generierung eines rekombinanten MVA-Stocks^{273,274}. Auch für eine schnellere und kostengünstigere Herstellung rekombinanter NYVACs wäre dies eine Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden könnte.

E. Anhang

E.1 Abkürzungsverzeichnis

Ad	Adenovirus	kb	Kilobase
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>	LPS	Lipopolysaccharid
ALVAC	<i>Canarypox</i> Vektor Vakzine	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Amp.	Ampicillin	MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
BFA	Brefeldin A	MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
bNab	breit neutralisierende Antikörper	mdDC	<i>Monocyte derived dendritic cell</i>
bzw.	beziehungsweise	Nef	<i>Negative Regulatory Factor</i>
CD	<i>Cellular Determinant</i>	NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
CEV	<i>cell-associated enveloped virion</i>	NYVAC	<i>New York Vacciniavirus</i>
CTL	zytotoxische T-Zelle	ORF	<i>Open reading frame</i>
DC	<i>Dendritic Cell</i>	PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
d.h.	das heißt	PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid	PCR	Polymerasekettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PEI	Polyethylenimin
EEV	<i>extracellular enveloped virion</i>	PFA	Paraformaldehyd
Env	<i>Envelope Glycoprotein</i>	pfu	<i>plaque forming units</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum	PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
Evtl.	Eventuell	Pol	Polymerase
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FKS	Fötales Kälberserum	RT	Reverse Transkriptase
FS	<i>Frame-Shift</i> Signal (HV-1)	SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
Gag	Gruppenspezifisches Antigen	SHIV	<i>simian-human immunodeficiency virus</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein	TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing</i>
h	Stunde	TGN	trans-Golgi-Netzwerk
HA	Hämagglutinin	TK	Thymidinkinase
HIV-1	Humanes Immundefizienz Virus 1	TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>	TNF	Tumornekrosefaktor
HRP	Meerrettichperoxidase	TTBS	Tween-haltige Tris-gepufferte Kochsalzlösung
IEV	<i>intracellular enveloped virion</i>	U	Units
IFN γ	Interferon gamma	VACV	Vacciniavirus
i.m.	intramuskulär	WHO	World Health Organisation
IMV	<i>intracellular mature virion</i>		
IV	<i>intracellular virion</i>		
IL2	Interleukin 2		
Iono	Ionomycin		

E.2 Ergänzende Abbildungen

E.2.1. Verifizierung NYVAC- Δ^M GPN

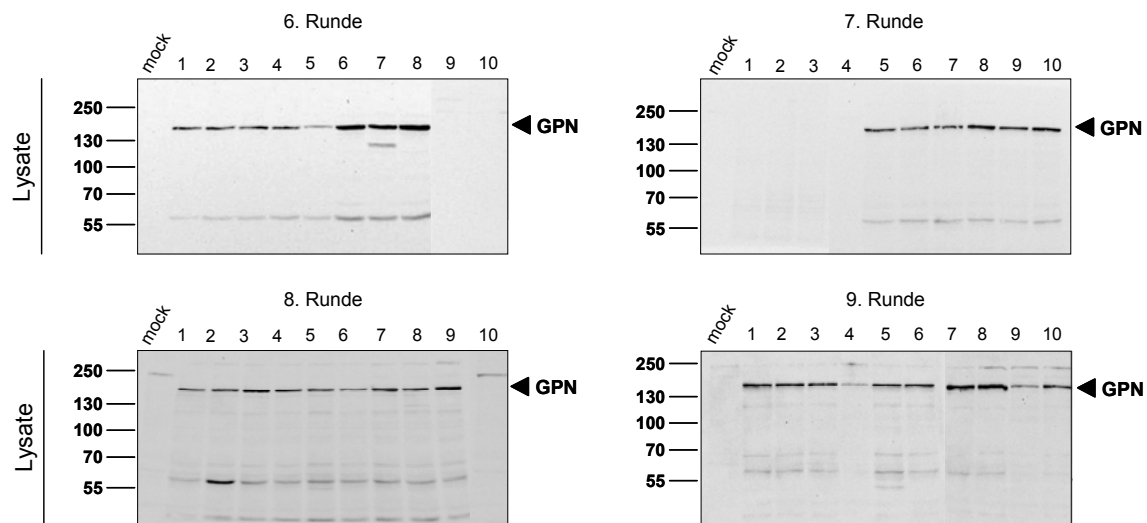


Abb. E-1: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens Δ^M GPN in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 6-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

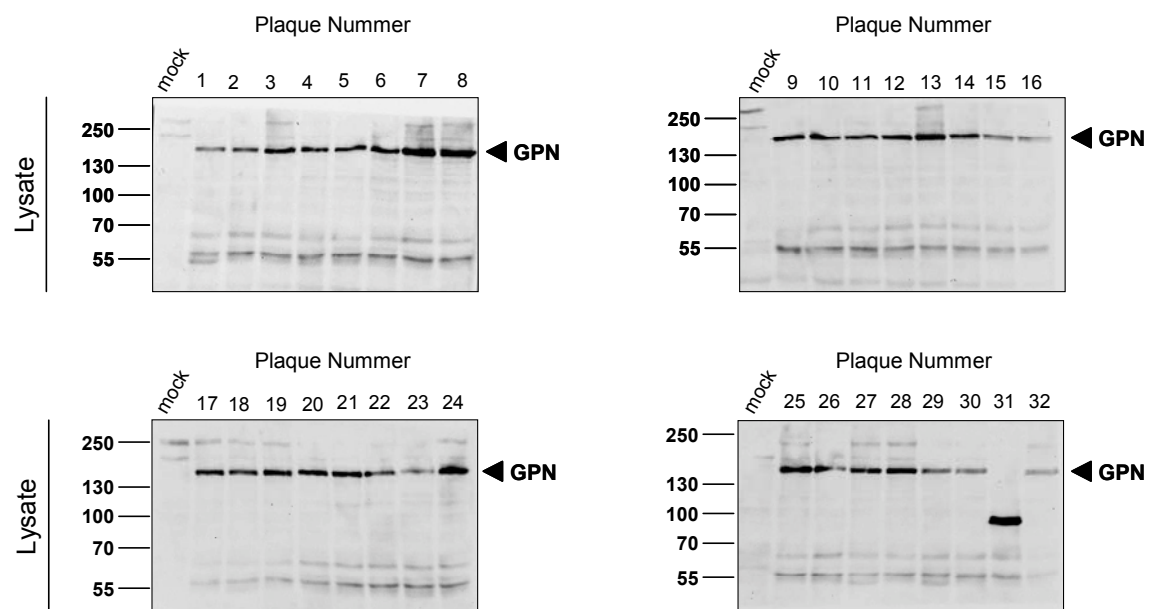


Abb. E-2: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC- Δ^M GPN mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

E.2.2. Verifizierung NYVAC- ΔM^{FS} PN

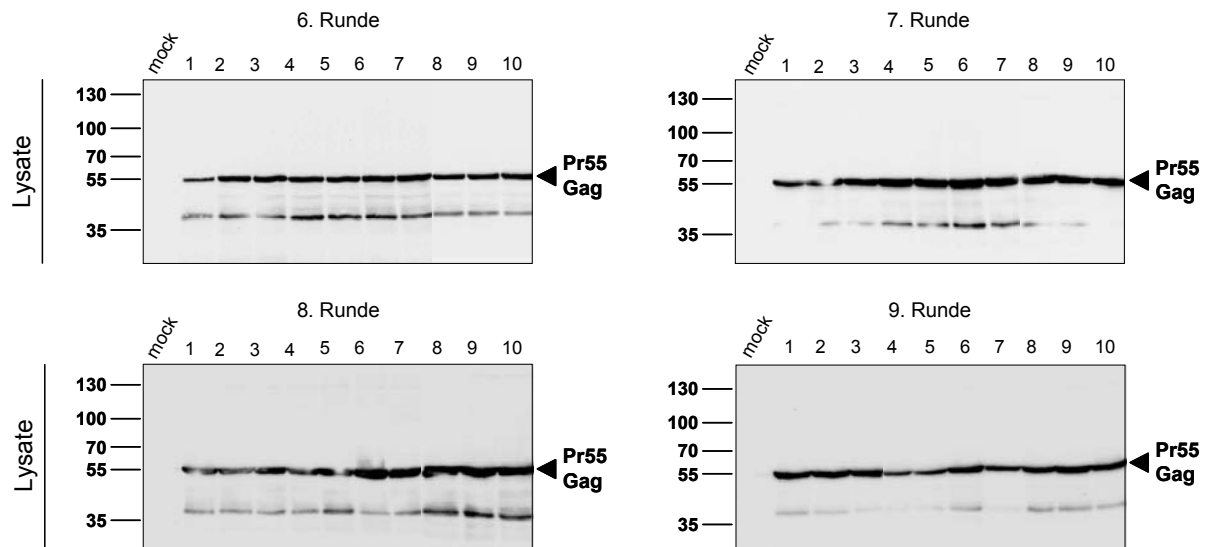


Abb. E-3: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens ΔM^{FS} PN in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 6-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

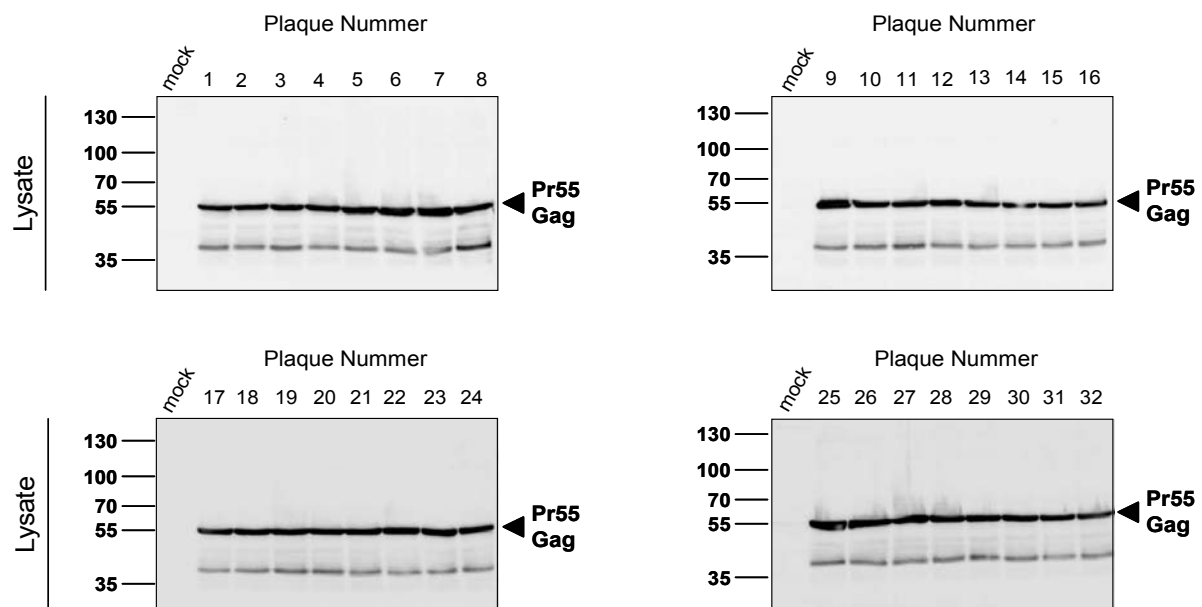


Abb. E-4: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC- ΔM^{FS} PN mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

E.2.3. Verifizierung NYVAC-^MG^{FS}PN

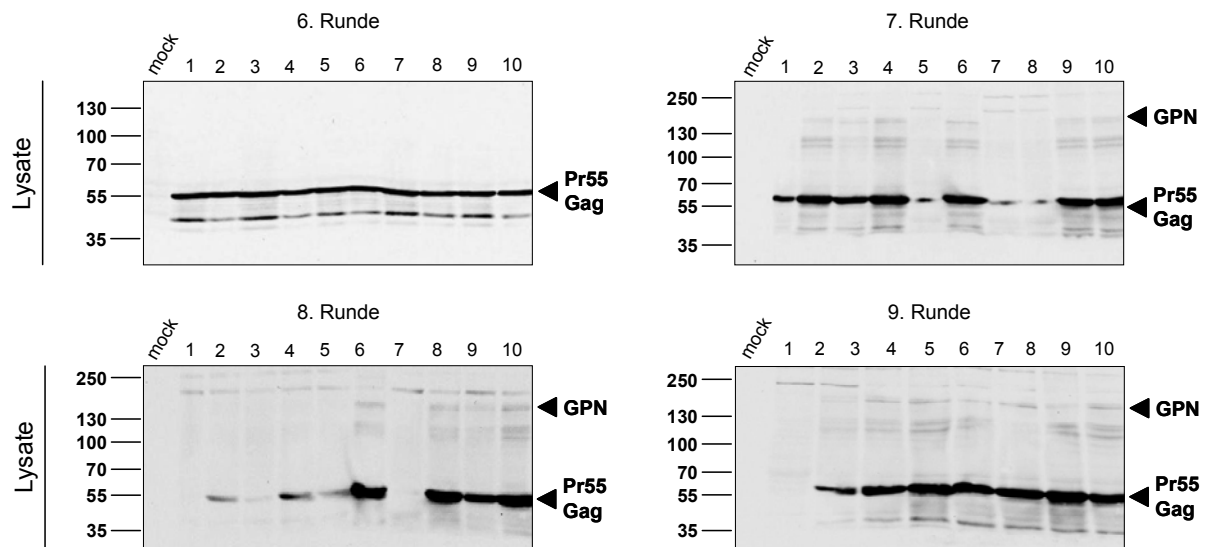


Abb. E-5: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens ^MG^{FS}PN in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 6-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifischen Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

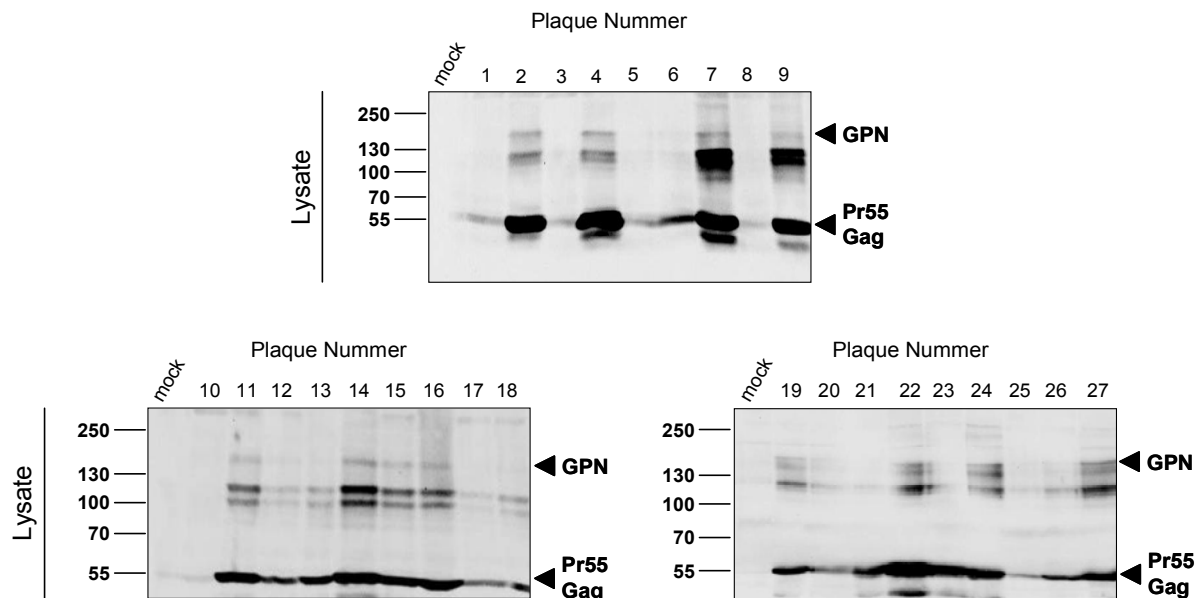


Abb. E-6: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC-^MG^{FS}PN mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifischen Banden sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

E.2.4. Verifizierung NYVAC- Δ^M Gag

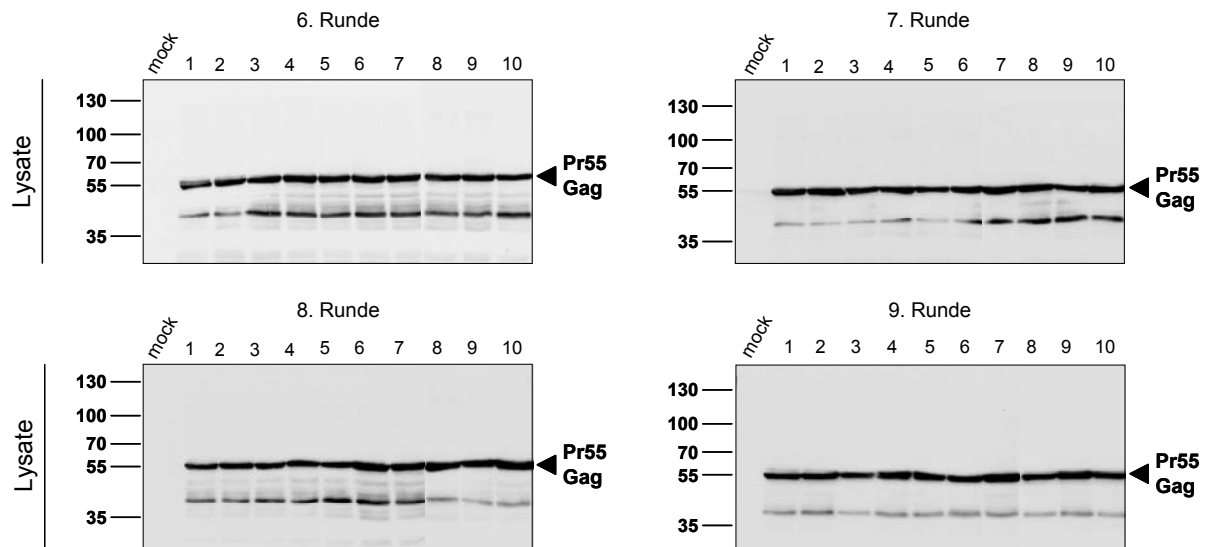


Abb. E-7: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens Δ^M Gag in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 6-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

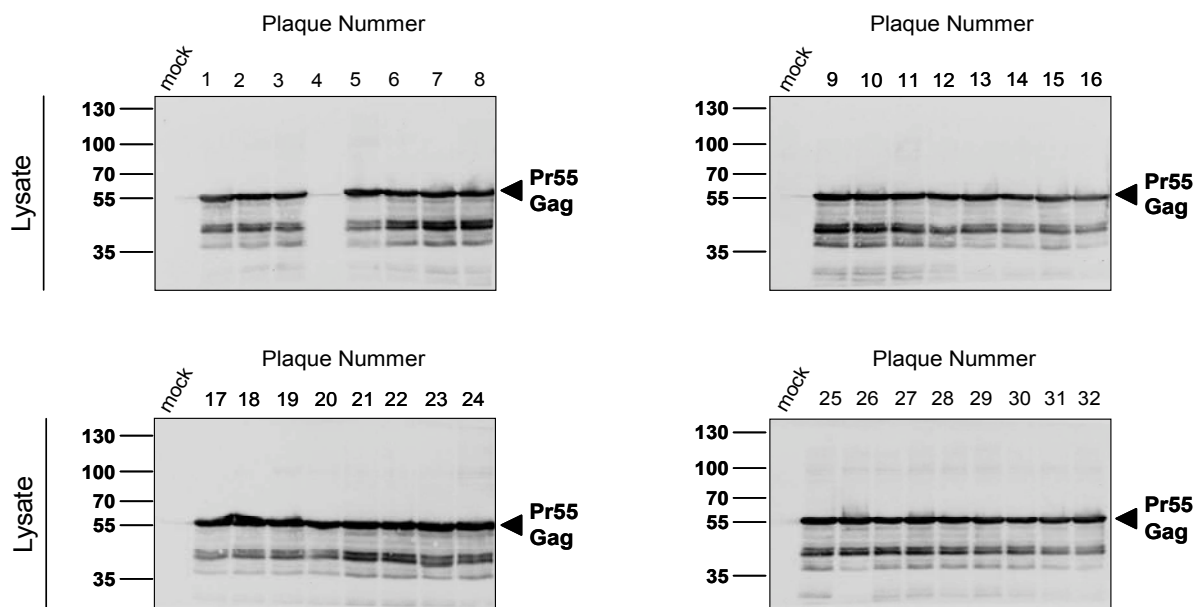


Abb. E-8: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC- Δ^M Gag mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 μ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Gag-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

E.2.5. Verifizierung NYVAC_PN

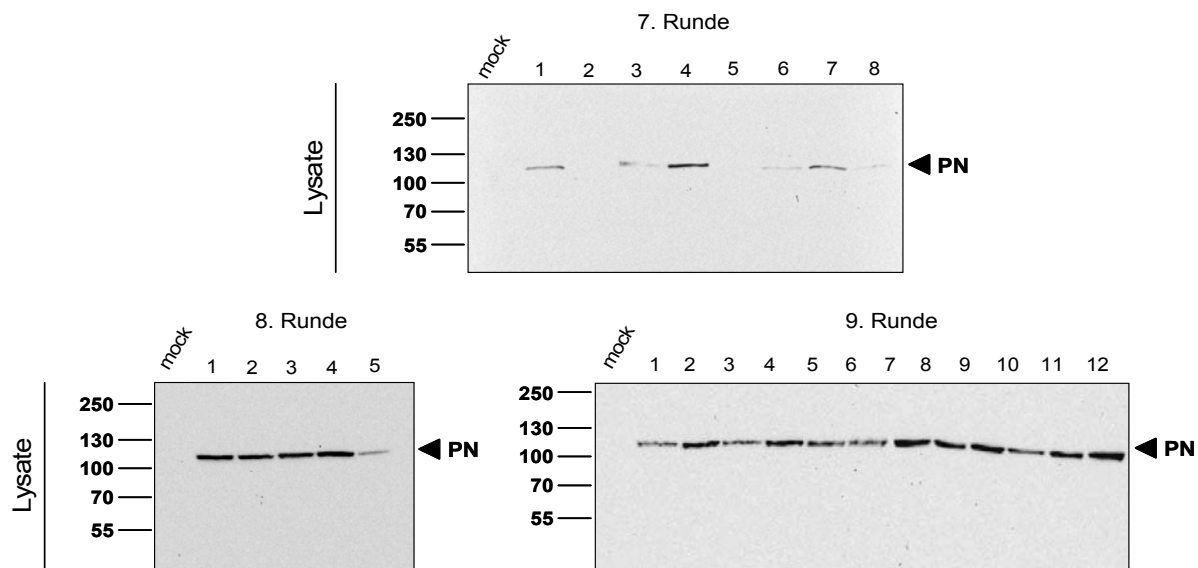


Abb. E-9: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens PN in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 7-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Pol-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

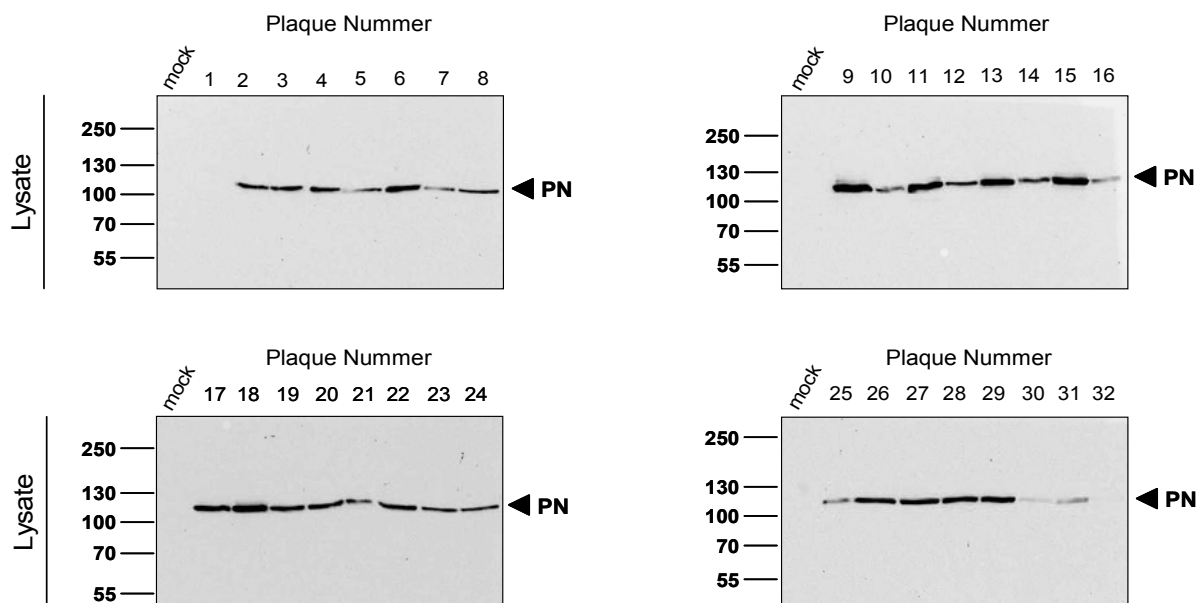


Abb. E-10: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC-PN mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines Pol-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

E.2.6. Verifizierung NYVAC_gp120

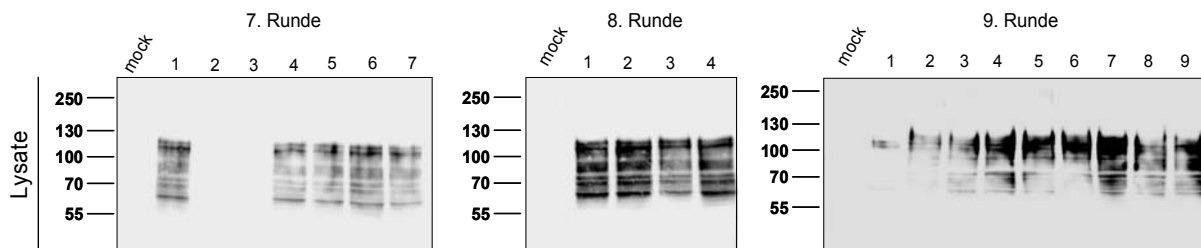


Abb. E-11: Untersuchung der Expression des eingebrachten Transgens gp120 in den einzelnen Aufreinigungsrunden

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen aus den Aufreinigungsrunden 7-9 infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines gp120-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5) (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen). Die für das Transgen spezifische Proteinbande beträgt 120 kD .

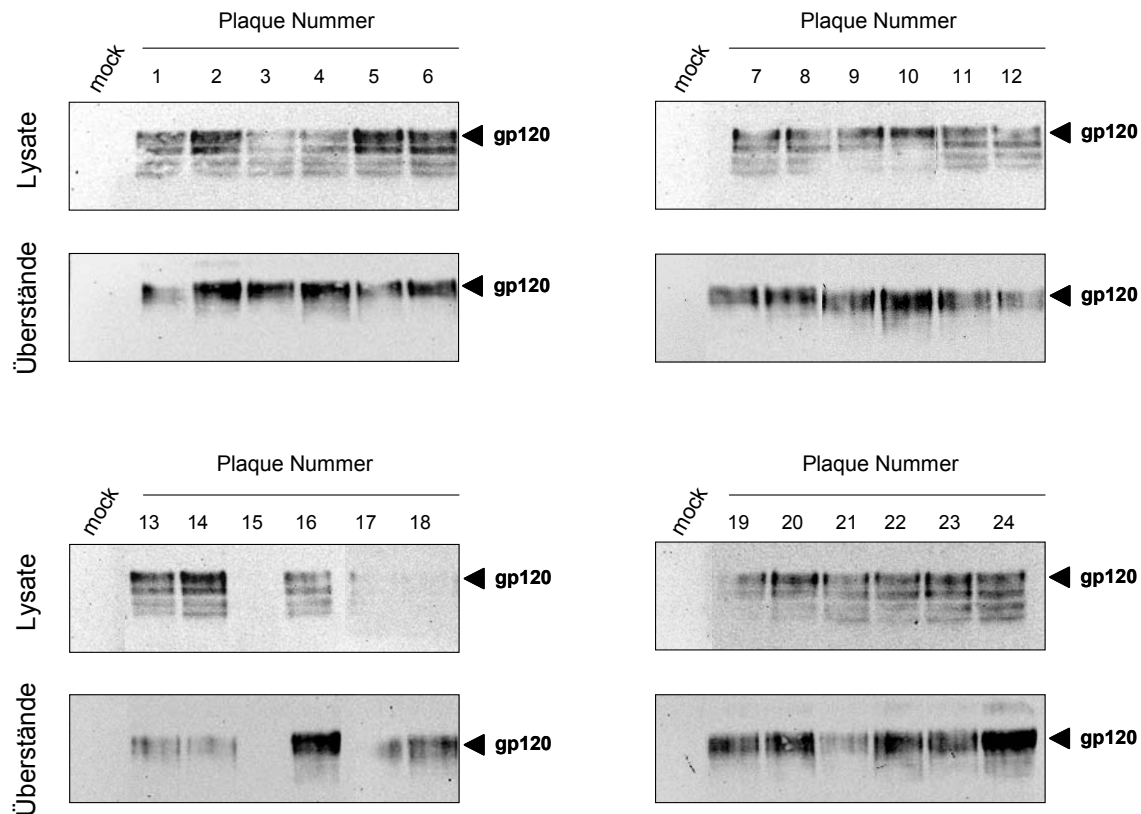


Abb. E-12: Bestimmung der Expressionseffizienz des hergestellten NYVAC-gp120 mittels Plaque Assay und anschließender Western-Blot Analyse

BHK-21 Zellen wurden mit den Einzelplaquesuspensionen infiziert und 48 h nach Infektion geerntet. 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western-Blot analysiert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte unter Verwendung eines gp120-spezifischen Antikörpers (Tab. B-5). Ein Zehntel des geernteten Überstands wurde ebenfalls in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert (mock: mit NYVAC-wt infizierte Zellen, bzw. deren Überstände). Die für das Transgen spezifische Bande ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

gcgggcgacgtggaggtgaccacccacagcttcaactgcagggcgagttcttactgcaacaccagcggtgttaacggcgccctac
 accccaacggcaccaagagcaacagcagcagcatcatcaccatccccctgcaggatcaagcagatcatcaacatgtggcaggaggtggg
 cagggccatgtacgcccctccatcaagggaacatcacctgcaagagcaacatcaccggcctgtgtgtgtagggagcggcggcaccga
 gccaaacgacaccgagaccttcagggccggcgcgacatgaggaacaactggagggagcagctgtacaagtacaaggtgtggag
 atcaagcccctggcggtggccccaccaccaccaagaggaggggtgtggagaggagaagaggaggaggcagaggaaagtctgtaacat
 gcggtgacgtcgaggagaatctggcccagctagcgagacgatggcgccaggggccagcatcctgagggcggaagctggacaagt
 ggagaagatccggctgcggcctggcggaagaaactacatgtgaagcacctggtctggccagccgggagctggaacggttcgccct
 gaaccccggtgtgtgaaaccagcgagggtgtgaagcagattgaagcagctgcagcctgcctgcagaccggcaccgaggaactgc
 ggagcctgttcaacacgtggccaccctgtactgctgcacaccgagatcgactgcgggacaccaaaaggccctggacaagatcgagg
 aagagcagaacaagatccagcagaaaaccagcaggccaaagaagccgacggcaaggtctccagaactaccccatcgtgcagaacc
 tgcagggccagatggtgcaccagcccacagccccggaccctgaacgctgggtgaaggtgtggaggaaaaggccttcagccccgag
 gtgatcccatgttcagcgccctgagcgaggcgccacccccaggacctgaacacatgtgaacacgtggcgccaccaggtgtct
 atgcagatcctgaaggacaccatcaacgaggaagccgagtgaggaccggtgcaccctgtgcacggcggaccatcgccccgtggca
 gatcggggagccaggggagcgacatcgccggcaccacctccaactgcaagaacagatcgctggatgaccagcaaccccccggtgc
 ccgtggggacatctacaagcggtggtatcctctgggctgaacaagatcgctcggtgtacagccccacctccatcctggacatcaagcag
 ggccccaaagagcccttcgggactacgtggaccggttctcaagaccctgcggcgagcagggccaccagcagtgagaactggatg
 accgacacccctgctggtgcagaacgccaaccccgactgcaagaccatcctgagagcactcgggccaggcgcaagcatcgaggaaatgat
 gaccgctgccaggggctgtggcgaccagccacaaggccaaggtgtgtggcgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatg
 cagcgaggcaacttcaaggcgagcaagaggatcgtgaagtgttcaactgcggcaagaggggccacatcgcccggaactgcagggcccc
 caggaagaagggtgtgtgaagtgcggcaagaaggacaccagatgaaggactgcaccgagcggcaggccaacttctgggcaagatc
 tggccctccacaaggcgaggcccgcaacttctgcagaacggccctgagcccaccgccccctccgaggaaagcttcgggttcggcgag
 gaaaccaccaccccgagccagaagcaggaacccatcgacaaagagctgtaccccctgaccagcctgaagagcctgttcggcaacgacc
 cagcagccagtgatga

^MGag-V11V

gccacatggcgccaggggccagcatcctgagggcggaagctggacaagtgggagaagatccggctgcggcctggcggaagaac
 actacatgtgaagcacctggtctggccagccgggagctggaacggttcgcccgaaccccggtctgtgaaaccagcgagggtgtga
 gcagattatgaagcagctgcagcctgcctgcagaccggcaccgaggaactgcggagcctgttcaacaccgtggccaccctgtactgctgc
 acaccgagatcgactgcgggacaccaaaggccctggacaagatcgaggaagagcagaacaagatccagcagaaaaccagcag
 gccaaagaagccgacggcaaggtctccagaactaccccatcgtgcagaacctgcagggccagatggtgcaccagcccatcagccccg
 gaccctgaacgcctgggtgaaggtgtggaggaaaaggccttcagccccgaggtgatcccatgttcagcgccctgagcgaggcgccac
 acccagagactgaacacccatgtgaacaccgtggcgccaccaggtgctatgcagatcctgaaggacaccatcaacgaggaagccg
 ccgagtgggaccggctgcaccctgtgcacggcgaccatcgccccctggcagatgcgggagccaggggcagcgacatcgccggcacc
 acctccaaacttgaagaacagatcgctggatgaccagcaaccccccggtgcggcgacatctacaagcggtggatcatcctgggccc
 tgaacaagatcgtcggtgtacagccccacccatcctggacatcaagcaggggcccaagagcccttcgggactacgtggaccggttc
 tcaagaccctgcggcgagcaggccaccagcagtgagaactggatgaccgacaccctgctggtgcagaacgccaaccccgactg
 caagaccatcctgagagcactcgcccgaggcgcaagcatcgaggaaatgatgaccgctgccaggcggtggcgaccagccacaag
 gccaaaggtgtggcgaggccatgagccagaccaacagcgccatcctgatgcagcgagcaactcaaggcgagcaagaggatcgtgaa
 gtgttcaactgcggcaagaggggccacatcgccggaactgcagggccccaggaagaagggtgtgtgaagtgcggcaagaagga
 caccagatgaaggactgcaccgagcgccagggcaacttctgggaagatctggccctccacaaggcgaggccggcaacttctgcag
 aacggccctgagcccaccgccccctccgaggaaagcttcgggttcggcgaggaaccaccaccccgagccagaagcaggaacccatcg
 acaaagagctgtaccccctgaccagcctgaagagcctgttcggcaacgaccccgagcagcaggtgtgggcccaccacgctgtgtccg
 ccgaccccaaccccgaggatggtgtgtggagaactgaccgagaactgatga

gp120-A9I

gaattcgccgacagcatggacagggccaagctgctgctgctgctgctgctgctgccccaggccaggccgtgggcaacctgtgggtg
 accgtgtactacggcgtgcccgtgtggaaggcgccaccaccacccctgttctgcgcagcgacccaaggcctacgacaccgaggtgcac
 aacgtgtgggcccaccacgctgtgctgcccggaccccaacccccaggagatggtgtggaagacgtgaccgagaactcaacatgtgg
 aagaacgagatggtgaaccagatgcaggaggacgtcatcagcctgtggaccagagcctgaagccctgctgaagctgacccccgtgtgc
 gtgaccctggagtgacgaacgtgagcagcaacgacacacccatccacgagacatgaaggatgaagaact
 gcagcttcaacgcccaccacgtggtgagggacaggaagcagaccgtgtacgcccgttctacaggctggacatcgtgcccgtgaccaagaa
 gaactacagcgagaacagcagcgagtactacaggctgatcaactgcaacaccagcgccatcaccaggcctgccccagggtgaccttca
 ccccatccccatccactactgcaccccccggttacgcatcctgaagtgaacgacaagatcttcaacggcaccggccccctgccacaac
 gtgagcaccgtgcagtgacccacggcatcaagccggtgtgagcaccagctgctgtgaacggcagcctggcgaggcgagatcatc
 atcaggagcgagaacctgaccaacaacgtgaaaaccatcatcgtgcacctgaaccagagcgtggagatcgtgtgaccaggccccggcaa
 caacaccaggaagagcatcaggatcgccccggccagaccttctacgcccagggcgacatcatcggcagatcaggcagggccactgca
 acatcagcgaggagaagtgaacgagaccctgcagagggtgagcaagaagcttccgagcacttccagaacaagaccatcaagttcgcc
 agcagcagcgggcgacgtggaggtgaccacccacagcttcaactgcagggcgagttcttactgcaacaccagcggtcttcaacg

gtggagatcgtgtgcaccaggccccggcaacaacaccaggaagagcatcaggatcgccccggccagaccttctacgccaccggcgacat
catcggcgacatcaggcaggccactgcaacatcagcaggacaagtgaacgagaccctgcagagggtagcaagaagcttgccgag
cacttcagaacaagaccatcaagttcgccagcagcagcggcgacctggaggtagaccaccacagcttcaactgcagggcgagttct
tctactgcaacaccagcggcctgttcaacggcgcctacaccccaacggcaccaagagcaacagcagcagcatcatcaccatcccctgca
ggatcaagcagatcatcaacatgtggcaggaggtgggcaggggccatgtacggccctcccatcaagggcaacatcacctgcaagagcaaca
tcaccggcctgctgctggtagggacggcggcaccgagcccaacgacaccgagaccttcaggccggcgggcgacatgaggaacaa
ctggaggagcgagctgtacaagtacaaggtggtagatcaagccctgggcgtggccccaccaccaccaagaggagggtggtagaga
gggagaagaggtgataa

E.4 Literaturverzeichnis

1. Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner*. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
2. Jenner E. *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England, Particularly*. Unknown; 2009.
3. Huygelen C. [Jenner's cowpox vaccine in light of current vaccinology]. *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.* 1996;58(5):479-536; discussion 537-538.
4. Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, u. a. The complete DNA sequence of Vacciniavirus. *Virology*. 1990;179(1):247-266, 517-563.
5. Stanley A Plotkin WAO. Smallpox and Vaccinia. 1999. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7294/>.
6. De Silva FS, Moss B. Origin-independent plasmid replication occurs in Vacciniavirus cytoplasmic factories and requires all five known poxvirus replication factors. *Viol. J.* 2005;2:23.
7. Moss B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*. 2006;344(1):48-54.
8. Hollinshead M, Vanderplasschen A, Smith GL, Vaux DJ. Vacciniavirus intracellular mature virions contain only one lipid membrane. *J. Virol.* 1999;73(2):1503-1517.
9. Cyrklaff M, Risco C, Fernández JJ, u. a. Cryo-electron tomography of Vacciniavirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005;102(8):2772-2777.
10. Hiller G, Weber K. Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for Vacciniavirus envelopment. *J. Virol.* 1985;55(3):651-659.
11. Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, Kern H. Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur. J. Cell Biol.* 1993;60(1):163-178.
12. Schmelz M, Sodeik B, Ericsson M, u. a. Assembly of Vacciniavirus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J. Virol.* 1994;68(1):130-147.
13. Smith GL, Vanderplasschen A, Law M. The formation and function of extracellular enveloped Vacciniavirus. *J. Gen. Virol.* 2002;83(Pt 12):2915-2931.
14. Roberts KL, Smith GL. Vacciniavirus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* 2008;16(10):472-479.
15. Chung CS, Hsiao JC, Chang YS, Chang W. A27L protein mediates Vacciniavirus interaction with cell surface heparan sulfate. *J. Virol.* 1998;72(2):1577-1585.
16. Hsiao JC, Chung CS, Chang W. Vacciniavirus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J. Virol.* 1999;73(10):8750-8761.
17. Lin CL, Chung CS, Heine HG, Chang W. Vacciniavirus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J. Virol.* 2000;74(7):3353-3365.
18. Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL. Entry of the Vacciniavirus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* 2005;86(Pt 5):1279-1290.
19. Townsley AC, Weisberg AS, Wagenaar TR, Moss B. Vacciniavirus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J. Virol.* 2006;80(18):8899-8908.
20. Law M, Carter GC, Roberts KL, Hollinshead M, Smith GL. Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(15):5989-5994.
21. Smith GL, Law M. The exit of Vacciniavirus from infected cells. *Virus Res.* 2004;106(2):189-197.

22. Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J. Vacciniavirus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol. Biol. Cell.* 2001;12(7):2031-2046.
23. Ward BM. Visualization and characterization of the intracellular movement of Vacciniavirus intracellular mature virions. *J. Virol.* 2005;79(8):4755-4763.
24. Rodriguez JF, Smith GL. IPTG-dependent Vacciniavirus: identification of a virus protein enabling virion envelopment by Golgi membrane and egress. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(18):5347-5351.
25. Blasco R, Moss B. Role of cell-associated enveloped Vacciniavirus in cell-to-cell spread. *J. Virol.* 1992;66(7):4170-4179.
26. Cudmore S, Cossart P, Griffiths G, Way M. Actin-based motility of Vacciniavirus. *Nature.* 1995;378(6557):636-638.
27. van Eijl H, Hollinshead M, Smith GL. The Vacciniavirus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles. *Virology.* 2000;271(1):26-36.
28. Payne LG. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *J. Gen. Virol.* 1980;50(1):89-100.
29. Law M, Hollinshead R, Smith GL. Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by Vacciniavirus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread. *J. Gen. Virol.* 2002;83(Pt 1):209-222.
30. Mackett M, Smith GL, Moss B. Vacciniavirus: a selectable eukaryotic cloning and expression vector. 1982. *Biotechnology.* 1992;24:495-499.
31. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious Vacciniavirus. 1982. *Biotechnology.* 1992;24:503-507.
32. Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA. *Gene.* 1983;25(1):21-28.
33. Perkus ME, Piccini A, Lipinskas BR, Paoletti E. Recombinant Vacciniavirus: immunization against multiple pathogens. *Science.* 1985;229(4717):981-984.
34. Clark PS, Lane JM. Complications of smallpox vaccination, 1968. Results of a statewide survey in Alaska. *Calif Med.* 1971;115(3):7-10.
35. Redfield RR, Wright DC, James WD, u. a. Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N. Engl. J. Med.* 1987;316(11):673-676.
36. Pastoret P-P, Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2003;26(5-6):343-355.
37. Tartaglia J, Perkus ME, Taylor J, u. a. NYVAC: a highly attenuated strain of Vacciniavirus. *Virology.* 1992;188(1):217-232.
38. Buller RM, Smith GL, Cremer K, Notkins AL, Moss B. Decreased virulence of recombinant Vacciniavirus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype. *Nature.* 1985;317(6040):813-815.
39. Child SJ, Palumbo GJ, Buller RM, Hruby DE. Insertional inactivation of the large subunit of ribonucleotide reductase encoded by Vacciniavirus is associated with reduced virulence in vivo. *Virology.* 1990;174(2):625-629.
40. Shida H, Hinuma Y, Hatanaka M, u. a. Effects and virulences of recombinant Vacciniviruses derived from attenuated strains that express the human T-cell leukemia virus type I envelope gene. *J. Virol.* 1988;62(12):4474-4480.
41. Kotwal GJ, Moss B. Vacciniavirus encodes a secretory polypeptide structurally related to complement control proteins. *Nature.* 1988;335(6186):176-178.
42. Kotwal GJ, Isaacs SN, McKenzie R, Frank MM, Moss B. Inhibition of the complement cascade by the major secretory protein of Vacciniavirus. *Science.* 1990;250(4982):827-830.

43. Patel DD, Pickup DJ. Messenger RNAs of a strongly-expressed late gene of cowpox virus contain 5'-terminal poly(A) sequences. *EMBO J.* 1987;6(12):3787-3794.
44. Buller RM, Chakrabarti S, Cooper JA, Twardzik DR, Moss B. Deletion of the Vacciniavirus growth factor gene reduces virus virulence. *J. Virol.* 1988;62(3):866-874.
45. Kotwal GJ, Hügin AW, Moss B. Mapping and insertional mutagenesis of a Vacciniavirus gene encoding a 13,800-Da secreted protein. *Virology.* 1989;171(2):579-587.
46. Beattie E, Tartaglia J, Paoletti E. Vacciniavirus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology.* 1991;183(1):419-422.
47. Gómez CE, Nájera JL, Krupa M, Perdiguero B, Esteban M. MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther.* 2011;11(3):189-217.
48. Taylor G, Stott EJ, Wertz G, Ball A. Comparison of the virulence of wild-type thymidine kinase (tk)-deficient and tk+ phenotypes of Vacciniavirus recombinants after intranasal inoculation of mice. *J. Gen. Virol.* 1991;72 (Pt 1):125-130.
49. Brown CK, Turner PC, Moyer RW. Molecular characterization of the Vacciniavirus hemagglutinin gene. *J. Virol.* 1991;65(7):3598-3606.
50. Oie M, Shida H, Ichihashi Y. The function of the vaccinia hemagglutinin in the proteolytic activation of infectivity. *Virology.* 1990;176(2):494-504.
51. Gillard S, Spehner D, Drillien R, Kim A. Localization and sequence of a Vacciniavirus gene required for multiplication in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1986;83(15):5573-5577.
52. Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, u. a. Vacciniavirus host range genes. *Virology.* 1990;179(1):276-286.
53. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, u. a. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science.* 1983;220(4599):868-871.
54. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science.* 1984;224(4648):497-500.
55. Gnanakaran S, Lang D, Daniels M, u. a. Clade-specific differences between human immunodeficiency virus type 1 clades B and C: diversity and correlations in C3-V4 regions of gp120. *J. Virol.* 2007;81(9):4886-4891.
56. Lal RB, Chakrabarti S, Yang C. Impact of genetic diversity of HIV-1 on diagnosis, antiretroviral therapy & vaccine development. *Indian J. Med. Res.* 2005;121(4):287-314.
57. Eigen M, Schuster P. The hypercycle. A principle of natural self-organization. Part A: Emergence of the hypercycle. *Naturwissenschaften.* 1977;64(11):541-565.
58. Meyerhans A, Cheynier R, Albert J, u. a. Temporal fluctuations in HIV quasispecies in vivo are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell.* 1989;58(5):901-910.
59. Neher RA, Leitner T. Recombination rate and selection strength in HIV intra-patient evolution. *PLoS Comput. Biol.* 2010;6(1):e1000660.
60. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* 1995;69(8):5087-5094.
61. Preston BD. Reverse transcriptase fidelity and HIV-1 variation. *Science.* 1997;275(5297):228-229; author reply 230-231.
62. Abram ME, Ferris AL, Shao W, Alvord WG, Hughes SH. Nature, position, and frequency of mutations made in a single cycle of HIV-1 replication. *J. Virol.* 2010;84(19):9864-9878.
63. Wei X, Ghosh SK, Taylor ME, u. a. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature.* 1995;373(6510):117-122.
64. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science.* 1996;271(5255):1582-1586.

65. Perelson AS, Ribeiro RM. Estimating drug efficacy and viral dynamic parameters: HIV and HCV. *Stat Med.* 2008;27(23):4647-4657.
66. Koch M, Pancera M, Kwong PD, u. a. Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology.* 2003;313(2):387-400.
67. Dacheux L, Moreau A, Ataman-Onal Y, u. a. Evolutionary dynamics of the glycan shield of the human immunodeficiency virus envelope during natural infection and implications for exposure of the 2G12 epitope. *J. Virol.* 2004;78(22):12625-12637.
68. Ye Y, Si ZH, Moore JP, Sodroski J. Association of structural changes in the V2 and V3 loops of the gp120 envelope glycoprotein with acquisition of neutralization resistance in a simian-human immunodeficiency virus passaged in vivo. *J. Virol.* 2000;74(24):11955-11962.
69. Kwong PD, Doyle ML, Casper DJ, u. a. HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature.* 2002;420(6916):678-682.
70. Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP. A review of vaccine research and development: the human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine.* 2006;24(19):4062-4081.
71. Hoxie JA. Toward an antibody-based HIV-1 vaccine. *Annu. Rev. Med.* 2010;61:135-152.
72. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. *Nat. Med.* 2004;10(8):806-810.
73. Letvin NL. Correlates of immune protection and the development of a human immunodeficiency virus vaccine. *Immunity.* 2007;27(3):366-369.
74. Robinson HL. HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007;82(6):686-693.
75. Hubert JB, Burgard M, Dussaix E, u. a. Natural history of serum HIV-1 RNA levels in 330 patients with a known date of infection. The SEROCO Study Group. *AIDS.* 2000;14(2):123-131.
76. Walker BD. Elite control of HIV Infection: implications for vaccines and treatment. *Top HIV Med.* 2007;15(4):134-136.
77. Fowke KR, Nagelkerke NJ, Kimani J, u. a. Resistance to HIV-1 infection among persistently seronegative prostitutes in Nairobi, Kenya. *Lancet.* 1996;348(9038):1347-1351.
78. Kimani J, Kaul R, Nagelkerke NJD, u. a. Reduced rates of HIV acquisition during unprotected sex by Kenyan female sex workers predating population declines in HIV prevalence. *AIDS.* 2008;22(1):131-137.
79. Alimonti JB, Kimani J, Matu L, u. a. Characterization of CD8 T-cell responses in HIV-1-exposed seronegative commercial sex workers from Nairobi, Kenya. *Immunol. Cell Biol.* 2006;84(5):482-485.
80. Kaul R, Trabattoni D, Bwayo JJ, u. a. HIV-1-specific mucosal IgA in a cohort of HIV-1-resistant Kenyan sex workers. *AIDS.* 1999;13(1):23-29.
81. Broliden K, Hinkula J, Devito C, u. a. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol. Lett.* 2001;79(1-2):29-36.
82. Muster T, Steindl F, Purtscher M, u. a. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1993;67(11):6642-6647.
83. Purtscher M, Trkola A, Gruber G, u. a. A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1994;10(12):1651-1658.
84. Stiegler G, Kunert R, Purtscher M, u. a. A potent cross-clade neutralizing human monoclonal antibody against a novel epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2001;17(18):1757-1765.
85. Mascola JR, Lewis MG, Stiegler G, u. a. Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 1999;73(5):4009-4018.

86. Messer RJ, Dittmer U, Peterson KE, Hasenkrug KJ. Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(33):12260-12265.
87. Srivastava IK, Ulmer JB, Barnett SW. Neutralizing antibody responses to HIV: role in protective immunity and challenges for vaccine design. *Expert Rev Vaccines*. 2004;3(4 Suppl):S33-52.
88. Zinkernagel RM, Hengartner H. Protective „immunity“ by pre-existent neutralizing antibody titers and preactivated T cells but not by so-called „immunological memory“. *Immunol. Rev.* 2006;211:310-319.
89. Cagigi A, Nilsson A, De Milito A, Chiodi F. B cell immunopathology during HIV-1 infection: lessons to learn for HIV-1 vaccine design. *Vaccine*. 2008;26(24):3016-3025.
90. Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, u. a. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins. *J. Virol.* 1998;72(10):7992-8001.
91. Poon B, Safritz JT, McClure H, u. a. Induction of humoral immune responses following vaccination with envelope-containing, formaldehyde-treated, thermally inactivated human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2005;79(8):4927-4935.
92. Lifson JD, Rossio JL, Piatak M Jr, u. a. Evaluation of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of whole inactivated simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines with conformationally and functionally intact envelope glycoproteins. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004;20(7):772-787.
93. Berman PW, Gregory TJ, Riddle L, u. a. Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature*. 1990;345(6276):622-625.
94. Stott EJ, Almond N, Kent K, u. a. Evaluation of a candidate human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) vaccine in macaques: effect of vaccination with HIV-1 gp120 on subsequent challenge with heterologous simian immunodeficiency virus-HIV-1 chimeric virus. *J. Gen. Virol.* 1998;79 (Pt 3):423-432.
95. Mascola JR, Snyder SW, Weislow OS, u. a. 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.* 1996;173(2):340-348.
96. McInerney TL, McLain L, Armstrong SJ, Dimmock NJ. A human IgG1 (b12) specific for the CD4 binding site of HIV-1 neutralizes by inhibiting the virus fusion entry process, but b12 Fab neutralizes by inhibiting a postfusion event. *Virology*. 1997;233(2):313-326.
97. Zwick MB. The membrane-proximal external region of HIV-1 gp41: a vaccine target worth exploring. *AIDS*. 2005;19(16):1725-1737.
98. Cardoso RMF, Zwick MB, Stanfield RL, u. a. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity*. 2005;22(2):163-173.
99. Brunel FM, Zwick MB, Cardoso RMF, u. a. Structure-function analysis of the epitope for 4E10, a broadly neutralizing human immunodeficiency virus type 1 antibody. *J. Virol.* 2006;80(4):1680-1687.
100. Ashish, Solanki AK, Boone CD, Krueger JK. Global structure of HIV-1 neutralizing antibody IgG1 b12 is asymmetric. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;391(1):947-951.
101. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 1994;68(9):6103-6110.
102. Bouscarat F, Levacher-Clergeot M, Dazza MC, u. a. Correlation of CD8 lymphocyte activation with cellular viremia and plasma HIV RNA levels in asymptomatic patients infected by human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996;12(1):17-24.
103. Carrington M, O'Brien SJ. The influence of HLA genotype on AIDS. *Annu. Rev. Med.* 2003;54:535-551.
104. Kiepiela P, Leslie AJ, Honeyborne I, u. a. Dominant influence of HLA-B in mediating the potential co-evolution of HIV and HLA. *Nature*. 2004;432(7018):769-775.

105. Honeyborne I, Prendergast A, Pereyra F, u. a. Control of human immunodeficiency virus type 1 is associated with HLA-B*13 and targeting of multiple gag-specific CD8+ T-cell epitopes. *J. Virol.* 2007;81(7):3667-3672.
106. Geldmacher C, Currier JR, Herrmann E, u. a. CD8 T-cell recognition of multiple epitopes within specific Gag regions is associated with maintenance of a low steady-state viremia in human immunodeficiency virus type 1-seropositive patients. *J. Virol.* 2007;81(5):2440-2448.
107. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol.* 2004;22:745-763.
108. Harari A, Petitpierre S, Vallelian F, Pantaleo G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood.* 2004;103(3):966-972.
109. Pantaleo G, Harari A. Functional signatures in antiviral T-cell immunity for monitoring virus-associated diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(5):417-423.
110. Fauci AS, Johnston MI, Dieffenbach CW, u. a. HIV vaccine research: the way forward. *Science.* 2008;321(5888):530-532.
111. Barouch DH. Challenges in the development of an HIV-1 vaccine. *Nature.* 2008;455(7213):613-619.
112. Yewdell JW. Plumbing the sources of endogenous MHC class I peptide ligands. *Curr. Opin. Immunol.* 2007;19(1):79-86.
113. Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol. Rev.* 2005;207:229-241.
114. Murphy KM, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; 2009.
115. Goldberg AL, St John AC. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells: Part 2. *Annu. Rev. Biochem.* 1976;45:747-803.
116. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 1992;61:761-807.
117. Ellgaard L, Helenius A. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001;13(4):431-437.
118. Yewdell JW, Bennink JR. Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv. Immunol.* 1992;52:1-123.
119. Townsend A, Trowsdale J. The transporters associated with antigen presentation. *Semin. Cell Biol.* 1993;4(1):53-61.
120. Rock KL, Gamble S, Rothstein L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science.* 1990;249(4971):918-921.
121. Chemali M, Radtke K, Desjardins M, English L. Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.* 2011;68(9):1533-1541.
122. Liu MA. Gene-based vaccines: Recent developments. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2010;12(1):86-93.
123. Liu MA. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity.* 2010;33(4):504-515.
124. Trinvuthipong C. Thailand's Prime-Boost HIV Vaccine Phase III. *Science.* 2004;303(5660):954-955.
125. Gómez CE, Esteban M. Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candidates targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine.* 2007;25(11):1969-1992.
126. Gómez CE, Esteban M. Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine.* 2007;25(15):2863-2885.

127. Bråve A, Boberg A, Gudmundsdotter L, u. a. A new multi-clade DNA prime/recombinant MVA boost vaccine induces broad and high levels of HIV-1-specific CD8(+) T-cell and humoral responses in mice. *Mol. Ther.* 2007;15(9):1724-1733.
128. Bart P-A. EV01: a phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine.* 2008;26(25):3153-3161.
129. McCormack S. EV02: a Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine.* 2008;26(25):3162-3174.
130. Mooij P, Heeney JL. Comparison of human and rhesus macaque T-cell responses elicited by boosting with NYVAC encoding human immunodeficiency virus type 1 clade C immunogens. *J. Virol.* 2009;83(11):5881-5889.
131. Wild J. Preclinical evaluation of the immunogenicity of C-type HIV-1-based DNA and NYVAC vaccines in the Balb/C mouse model. *Viral Immunol.* 2009;22(5):309-319.
132. Bråve A, Ljungberg K, Wahren B, Liu MA. Vaccine delivery methods using viral vectors. *Mol. Pharm.* 2007;4(1):18-32.
133. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell.* 1976;9(4 PT 2):695-705.
134. Létourneau S, Im E-J, Mashishi T, u. a. Design and pre-clinical evaluation of a universal HIV-1 vaccine. *PLoS ONE.* 2007;2(10):e984.
135. Rosario M, Bridgeman A, Quakkelaar ED, u. a. Long peptides induce polyfunctional T cells against conserved regions of HIV-1 with superior breadth to single-gene vaccines in macaques. *Eur. J. Immunol.* 2010;40(7):1973-1984.
136. Santra S, Liao H-X, Zhang R, u. a. Mosaic vaccines elicit CD8+ T lymphocyte responses that confer enhanced immune coverage of diverse HIV strains in monkeys. *Nat. Med.* 2010;16(3):324-328.
137. Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, u. a. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat. Med.* 2010;16(3):319-323.
138. Rerks-Ngarm S. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* 2009;361(23):2209-2220.
139. Liu X, Broberg E, Watanabe D, u. a. Genetic engineering of a modified herpes simplex virus 1 vaccine vector. *Vaccine.* 2009;27(21):2760-2767.
140. Robert-Guroff M. Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007;18(6):546-556.
141. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-252.
142. Lasaro MO, Ertl HCJ. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol. Ther.* 2009;17(8):1333-1339.
143. Soloff AC, Liu X, Gao W, u. a. Adenovirus 5- and 35-based immunotherapy enhances the strength but not breadth or quality of immunity during chronic SIV infection. *Eur. J. Immunol.* 2009;39(9):2437-2449.
144. Gabitzsch ES, Xu Y, Yoshida LH, u. a. A preliminary and comparative evaluation of a novel Ad5 [E1-, E2b-] recombinant-based vaccine used to induce cell mediated immune responses. *Immunol. Lett.* 2009;122(1):44-51.
145. Bayer W, Tenbusch M, Lietz R, u. a. Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection. *J. Virol.* 2010;84(4):1967-1976.
146. Kahl CA, Bonnell J, Hirianna S, u. a. Potent immune responses and in vitro pro-inflammatory cytokine suppression by a novel adenovirus vaccine vector based on rare human serotype 28. *Vaccine.* 2010;28(35):5691-5702.
147. Santra S, Sun Y, Koriath-Schmitz B, u. a. Heterologous prime/boost immunizations of rhesus monkeys using chimpanzee adenovirus vectors. *Vaccine.* 2009;27(42):5837-5845.

148. Tatsis N, Lasaro MO, Lin S-W, u. a. Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. *J. Immunol.* 2009;182(10):6587-6599.
149. Robinson HL. New hope for an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2002;2(4):239-250.
150. Pastoret P-P, Vanderplasschen A. Poxviruses as vaccine vectors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2003;26(5-6):343-355.
151. Nájera JL, Gómez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, Esteban M. Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Virol.* 2006;80(12):6033-6047.
152. Perkus ME, Tartaglia J, Paoletti E. Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases. *J. Leukoc. Biol.* 1995;58(1):1-13.
153. Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93(21):11349-11353.
154. Sutter G, Staib C. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified Vacciniavirus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord.* 2003;3(3):263-271.
155. Hanke T, Goonetilleke N, McMichael AJ, Dorrell L. Clinical experience with Plasmid-DNA- and modified Vacciniavirus Ankara-vectored human immunodeficiency virus type 1 clade A vaccine focusing on T-cell induction. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt 1):1-12.
156. Mastrangelo MJ, Eisenlohr LC, Gomella L, Lattime EC. Poxvirus vectors: orphaned and underappreciated. *J. Clin. Invest.* 2000;105(8):1031-1034.
157. Gómez CE, Nájera JL, Domingo-Gil E, u. a. Virus distribution of the attenuated MVA and NYVAC poxvirus strains in mice. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt 9):2473-2478.
158. Rollier CS, Reyes-Sandoval A, Cottingham MG, Ewer K, Hill AVS. Viral vectors as vaccine platforms: deployment in sight. *Curr. Opin. Immunol.* 2011;23(3):377-382.
159. Robinson HL. HIV/AIDS vaccines: 2007. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2007;82(6):686-693.
160. Woodland DL. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol.* 2004;25(2):98-104.
161. Ramshaw IA, Ramsay AJ. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol. Today.* 2000;21(4):163-165.
162. Yang Z-yong, Wyatt LS, Kong W-P, u. a. Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting. *J. Virol.* 2003;77(1):799-803.
163. Wolff JA, Malone RW, Williams P, u. a. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949 Pt 1):1465-1468.
164. Hengge UR, Walker PS, Vogel JC. Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J. Clin. Invest.* 1996;97(12):2911-2916.
165. Sato Y, Roman M, Tighe H, u. a. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science.* 1996;273(5273):352-354.
166. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, u. a. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(24):11478-11482.
167. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:617-648.
168. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, u. a. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993;259(5102):1745-1749.
169. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, u. a. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* 1997;3(6):362-371.

170. Ulmer JB, Otten GR. Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming. *Dev Biol (Basel)*. 2000;104:9-14.
171. Klinman DM, Yamshchikov G, Ishigatsubo Y. Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines. *J. Immunol.* 1997;158(8):3635-3639.
172. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, u. a. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408(6813):740-745.
173. Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. Protection against malaria by immunization with Plasmid-DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(21):9866-9870.
174. Manickan E, Yu Z, Rouse RJ, Wire WS, Rouse BT. Induction of protective immunity against herpes simplex virus with DNA encoding the immediate early protein ICP 27. *Viral Immunol.* 1995;8(2):53-61.
175. Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch. Virol.* 1996;141(3-4):743-749.
176. Wang B, Boyer J, Srikantan V, u. a. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* 1993;12(9):799-805.
177. Fuller DH, Haynes JR. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1994;10(11):1433-1441.
178. Boyer JD, Ugen KE, Wang B, u. a. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat. Med.* 1997;3(5):526-532.
179. Mwau M, Cebere I, Sutton J, u. a. A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified Vacciniavirus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J. Gen. Virol.* 2004;85(Pt 4):911-919.
180. Letvin NL. Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 2006;6(12):930-939.
181. Chiarella P, Fazio VM, Signori E. Application of electroporation in DNA vaccination protocols. *Curr Gene Ther.* 2010;10(4):281-286.
182. Luckay A, Sidhu MK, Kjekken R, u. a. Effect of Plasmid-DNA vaccine design and in vivo electroporation on the resulting vaccine-specific immune responses in rhesus macaques. *J. Virol.* 2007;81(10):5257-5269.
183. Luxembourg A, Evans CF, Hannaman D. Electroporation-based DNA immunisation: translation to the clinic. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7(11):1647-1664.
184. Denis-Mize KS, Dupuis M, Singh M, u. a. Mechanisms of increased immunogenicity for DNA-based vaccines adsorbed onto cationic microparticles. *Cell. Immunol.* 2003;225(1):12-20.
185. DeLong RK, Akhtar U, Sallee M, u. a. Characterization and performance of nucleic acid nanoparticles combined with protamine and gold. *Biomaterials*. 2009;30(32):6451-6459.
186. Xiang SD, Selomulya C, Ho J, Apostolopoulos V, Plebanski M. Delivery of DNA vaccines: an overview on the use of biodegradable polymeric and magnetic nanoparticles. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010;2(3):205-218.
187. Rottinghaus ST, Poland GA, Jacobson RM, Barr LJ, Roy MJ. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine*. 2003;21(31):4604-4608.
188. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr. Opin. Immunol.* 2009;21(3):346-351.
189. Hu SL, Abrams K, Barber GN, u. a. Protection of macaques against SIV infection by subunit vaccines of SIV envelope glycoprotein gp160. *Science*. 1992;255(5043):456-459.
190. Zagury D, Bernard J, Cheynier R, u. a. A group specific anamnestic immune reaction against HIV-1 induced by a candidate vaccine against AIDS. *Nature*. 1988;332(6166):728-731.

191. Lu S, Wang S, Grimes-Serrano JM. Current progress of DNA vaccine studies in humans. *Expert Rev Vaccines*. 2008;7(2):175-191.
192. Barnett SW, Rajasekar S, Legg H, u. a. Vaccination with HIV-1 gp120 DNA induces immune responses that are boosted by a recombinant gp120 protein subunit. *Vaccine*. 1997;15(8):869-873.
193. Richmond JF, Lu S, Santoro JC, u. a. Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J. Virol*. 1998;72(11):9092-9100.
194. Beddows S, Schülke N, Kirschner M, u. a. Evaluating the immunogenicity of a disulfide-stabilized, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 2005;79(14):8812-8827.
195. Wang S, Arthos J, Lawrence JM, u. a. Enhanced immunogenicity of gp120 protein when combined with recombinant DNA priming to generate antibodies that neutralize the JR-FL primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol*. 2005;79(12):7933-7937.
196. Wang S, Pal R, Mascola JR, u. a. Polyvalent HIV-1 Env vaccine formulations delivered by the DNA priming plus protein boosting approach are effective in generating neutralizing antibodies against primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from subtypes A, B, C, D and E. *Virology*. 2006;350(1):34-47.
197. Pal R, Kalyanaraman VS, Nair BC, u. a. 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*. 2006;348(2):341-353.
198. Wang S, Kennedy JS, West K, u. a. Cross-subtype antibody and cellular immune responses induced by a polyvalent DNA prime-protein boost HIV-1 vaccine in healthy human volunteers. *Vaccine*. 2008;26(31):3947-3957.
199. Kent SJ, Zhao A, Best SJ, u. a. Enhanced T-cell immunogenicity and protective efficacy of a human immunodeficiency virus type 1 vaccine regimen consisting of consecutive priming with DNA and boosting with recombinant fowlpox virus. *J. Virol*. 1998;72(12):10180-10188.
200. Shiver JW, Fu T-M, Chen L, u. a. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*. 2002;415(6869):331-335.
201. Barouch DH, McKay PF, Sumida SM, u. a. Plasmid Chemokines and Colony-Stimulating Factors Enhance the Immunogenicity of DNA Priming-Viral Vector Boosting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccines. *J. Virol*. 2003;77(16):8729-8735.
202. Amara RR, Villinger F, Altman JD, u. a. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 2001;292(5514):69-74.
203. Mooij P, Balla-Jhagjhoorsingh SS, Koopman G, u. a. Differential CD4+ versus CD8+ T-cell responses elicited by different poxvirus-based human immunodeficiency virus type 1 vaccine candidates provide comparable efficacies in primates. *J. Virol*. 2008;82(6):2975-2988.
204. Harari A, Pantaleo G. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med*. 2008;205(1):63-77.
205. Swigut T, lafrate AJ, Muench J, Kirchhoff F, Skowronski J. Simian and human immunodeficiency virus Nef proteins use different surfaces to downregulate class I major histocompatibility complex antigen expression. *J. Virol*. 2000;74(12):5691-5701.
206. Williams M, Roeth JF, Kasper MR, u. a. Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking. *J. Virol*. 2002;76(23):12173-12184.
207. News in Brief. HIV vaccine failure prompts Merck to halt trial. *Nature*. 2007;449(7161):390.
208. Ledford H. HIV vaccine may raise risk. *Nature*. 2007;450(7168):325.
209. O'Brien KL, Liu J, King SL, u. a. Adenovirus-specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nat. Med*. 2009;15(8):873-875.

210. Hutnick NA, Carnathan DG, Dubey SA, u. a. Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5 HIV vaccine-induced expansion of adenovirus-specific CD4+ T cells. *Nat. Med.* 2009;15(8):876-878.
211. Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 1983;166(4):557-580.
212. MACPHERSON I, STOKER M. Polyoma transformation of hamster cell clones--an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology.* 1962;16:147-151.
213. Himly M, Foster DN, Bottoli I, Iacovoni JS, Vogt PK. The DF-1 chicken fibroblast cell line: transformation induced by diverse oncogenes and cell death resulting from infection by avian leukosis viruses. *Virology.* 1998;248(2):295-304.
214. Böckl K, Wild J, Bredl S, u. a. Impact of budding competence and separation of reading frames on the efficacy of a Gag-Pol-Nef HIV-1 DNA candidate vaccine in the BALB/c mouse model. 2011.
215. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. 3. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory; 2000.
216. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992;24:104-108.
217. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988;239(4839):487-491.
218. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-685.
219. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology.* 1992;24:145-149.
220. Su L, Graf M, Zhang Y, u. a. Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in China. *J. Virol.* 2000;74(23):11367-11376.
221. Berglund P, Quesada-Rolander M, Putkonen P, u. a. Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1997;13(17):1487-1495.
222. Wild J, Bieler K, Köstler J, u. a. Preclinical evaluation of the immunogenicity of C-type HIV-1-based DNA and NYVAC vaccines in the Balb/C mouse model. *Viral Immunol.* 2009;22(5):309-319.
223. Staple DW, Butcher SE. Solution structure of the HIV-1 frameshift inducing stem-loop RNA. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(15):4326-4331.
224. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, u. a. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single „self-cleaving“ 2A peptide-based retroviral vector. *Nat. Biotechnol.* 2004;22(5):589-594.
225. Hovav A-H, Santosuosso M, Bivas-Benita M, u. a. X4 human immunodeficiency virus type 1 gp120 down-modulates expression and immunogenicity of co-delivered antigens. *J. Virol.* 2009;83(21):10941-10950.
226. Gribaudo G, Ravaglia S, Caliendo A, u. a. Interferons inhibit onset of murine cytomegalovirus immediate-early gene transcription. *Virology.* 1993;197(1):303-311.
227. Sellins K, Fradkin L, Liggitt D, Dow S. Type I interferons potently suppress gene expression following gene delivery using liposome(-)DNA complexes. *Mol. Ther.* 2005;12(3):451-459.
228. Martinelli E, Cicala C, Van Ryk D, u. a. HIV-1 gp120 inhibits TLR9-mediated activation and IFN- α secretion in plasmacytoid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(9):3396-3401.
229. Köller H, Schaal H, Rosenbaum C, u. a. Functional CXCR4 receptor development parallels sensitivity to HIV-1 gp120 in cultured rat astroglial cells but not in cultured rat cortical neurons. *J. Neurovirol.* 2002;8(5):411-419.
230. Brainard DM, Tharp WG, Granado E, u. a. Migration of antigen-specific T cells away from CXCR4-binding human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J. Virol.* 2004;78(10):5184-5193.

231. Tran PB, Ren D, Miller RJ. The HIV-1 coat protein gp120 regulates CXCR4-mediated signaling in neural progenitor cells. *J. Neuroimmunol.* 2005;160(1-2):68-76.
232. Ronaldson PT, Bendayan R. HIV-1 viral envelope glycoprotein gp120 triggers an inflammatory response in cultured rat astrocytes and regulates the functional expression of P-glycoprotein. *Mol. Pharmacol.* 2006;70(3):1087-1098.
233. Toapanta FR, Craigo JK, Montelaro RC, Ross TM. Reduction of anti-HIV-1 Gag immune responses during co-immunization: immune interference by the HIV-1 envelope. *Curr. HIV Res.* 2007;5(2):199-209.
234. López D, Samino Y, Koszinowski UH, Del Val M. HIV envelope protein inhibits MHC class I presentation of a cytomegalovirus protective epitope. *J. Immunol.* 2001;167(8):4238-4244.
235. Land A, Zonneveld D, Braakman I. Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. *FASEB J.* 2003;17(9):1058-1067.
236. Lizée G, Basha G, Tiong J, u. a. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 2003;4(11):1065-1073.
237. Bevan MJ. Cross-priming. *Nat. Immunol.* 2006;7(4):363-365.
238. Sigal LJ, Crotty S, Andino R, Rock KL. Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen. *Nature.* 1999;398(6722):77-80.
239. Su SV, Hong P, Baik S, u. a. DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *J. Biol. Chem.* 2004;279(18):19122-19132.
240. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, u. a. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell.* 2000;100(5):587-597.
241. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, u. a. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 2007;26(5):605-616.
242. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Geijtenbeek TBH. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to Mycobacterium tuberculosis, HIV-1 and Helicobacter pylori. *Nat. Immunol.* 2009;10(10):1081-1088.
243. Capobianchi MR. Induction of lymphomonocyte activation by HIV-1 glycoprotein gp120. Possible role in AIDS pathogenesis. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 1996;10(4):83-91.
244. Williams MA, Trout R, Spector SA. HIV-1 gp120 modulates the immunological function and expression of accessory and co-stimulatory molecules of monocyte-derived dendritic cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* 2002;11(5):829-847.
245. Ullrich CK, Groopman JE, Ganju RK. HIV-1 gp120- and gp160-induced apoptosis in cultured endothelial cells is mediated by caspases. *Blood.* 2000;96(4):1438-1442.
246. Schaible UE, Winau F, Sieling PA, u. a. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 2003;9(8):1039-1046.
247. Winau F, Weber S, Sad S, u. a. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.* 2006;24(1):105-117.
248. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell.* 1992;70(6):1035-1048.
249. Gallimore A, Dumrese T, Hengartner H, Zinkernagel RM, Rammensee HG. Protective immunity does not correlate with the hierarchy of virus-specific cytotoxic T cell responses to naturally processed peptides. *J. Exp. Med.* 1998;187(10):1647-1657.
250. Frahm N, Kiepiela P, Adams S, u. a. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 2006;7(2):173-178.
251. Nowak MA, May RM, Phillips RE, u. a. Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature.* 1995;375(6532):606-611.

252. Lichterfeld M, Yu XG, Le Gall S, Altfeld M. Immunodominance of HIV-1-specific CD8(+) T-cell responses in acute HIV-1 infection: at the crossroads of viral and host genetics. *Trends Immunol.* 2005;26(3):166-171.
253. Probst HC, Tschannen K, Gallimore A, u. a. Immunodominance of an antiviral cytotoxic T cell response is shaped by the kinetics of viral protein expression. *J. Immunol.* 2003;171(10):5415-5422.
254. Sette A, Vitiello A, Reheman B, u. a. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 1994;153(12):5586-5592.
255. Lauvau G, Kakimi K, Niedermann G, u. a. Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J. Exp. Med.* 1999;190(9):1227-1240.
256. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR. Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 2001;193(11):1319-1326.
257. Yewdell JW, Bennink JR. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:51-88.
258. van der Most RG, Murali-Krishna K, Lanier JG, u. a. Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. *Virology.* 2003;315(1):93-102.
259. Walter P, Gilmore R, Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1984;38(1):5-8.
260. Andrews DW, Johnson AE. The translocon: more than a hole in the ER membrane? *Trends Biochem. Sci.* 1996;21(10):365-369.
261. Asmal M, Hellmann I, Liu W, u. a. A signature in HIV-1 envelope leader peptide associated with transition from acute to chronic infection impacts envelope processing and infectivity. *PLoS ONE.* 2011;6(8):e23673.
262. Li Y, Luo L, Thomas DY, Kang CY. The HIV-1 Env protein signal sequence retards its cleavage and down-regulates the glycoprotein folding. *Virology.* 2000;272(2):417-428.
263. Land A, Zonneveld D, Braakman I. Folding of HIV-1 envelope glycoprotein involves extensive isomerization of disulfide bonds and conformation-dependent leader peptide cleavage. *FASEB J.* 2003;17(9):1058-1067.
264. Pfeiffer T, Pisch T, Devitt G, Holtkotte D, Bosch V. Effects of signal peptide exchange on HIV-1 glycoprotein expression and viral infectivity in mammalian cells. *FEBS Lett.* 2006;580(15):3775-3778.
265. Li Y, Luo L, Thomas DY, Kang CY. Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology.* 1994;204(1):266-278.
266. Herrera AM, Musacchio A, Fernández JR, Duarte CA. Efficiency of erythropoietin's signal peptide for HIV(MN)-1 gp 120 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000;273(2):557-559.
267. Guerra S, López-Fernández LA, Pascual-Montano A, u. a. Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J. Virol.* 2006;80(2):985-998.
268. Kibler KV, Gomez CE, Perdiguero B, u. a. Improved NYVAC-Based Vaccine Vectors. *PLoS ONE.* 2011;6(11):e25674.
269. Wu L, Kong W-P, Nabel GJ. Enhanced breadth of CD4 T-cell immunity by DNA prime and adenovirus boost immunization to human immunodeficiency virus Env and Gag immunogens. *J. Virol.* 2005;79(13):8024-8031.
270. Hofmann-Sieber H, Wild J, Fiedler N, u. a. Impact of ETIF deletion on safety and immunogenicity of equine herpesvirus type 1-vectored vaccines. *J. Virol.* 2010;84(22):11602-11613.
271. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile high-efficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *BioTechniques.* 2006;40(2):191-197.
272. Sanchez V, Clark CL, Yen JY, Dwarakanath R, Spector DH. Viable human cytomegalovirus recombinant virus with an internal deletion of the IE2 86 gene affects late stages of viral replication. *J. Virol.* 2002;76(6):2973-2989.

273. Domi A, Moss B. Cloning the Vacciniavirus genome as a bacterial artificial chromosome in *Escherichia coli* and recovery of infectious virus in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002;99(19):12415-12420.
274. Cottingham MG, Andersen RF, Spencer AJ, u. a. Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified Vacciniavirus Ankara (MVA). *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1638.

Danksagung

Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, sowie die Finanzierung und Betreuung meiner Arbeit. Im Besonderen für die Unterstützung zur Aufnahme in den Promotionsstudiengang zum Dr.rer.physiol. und dafür, dass er wieder einmal den Glauben bewiesen hat, dass auch ein Fachhochschulabschluss zum wissenschaftlichen Arbeiten befähigt.

Herrn Prof. Dr. Peter Oefner sowie Herrn Prof. Dr. Joachim Hauber danke ich vielmals für die Übernahme des Mentorats. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Hauber auch für die Übernahme des zweiten Gutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Wolf und Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie & Hygiene.

Bei Josef, Jens und Kathrin möchte ich mich für die Betreuung und Unterstützung während dieser Arbeit bedanken. Ihr hattet immer einen passenden und hilfreichen Rat zur Hand und habt mir in vielerlei Hinsicht sehr weitergeholfen. Ein großer Dank geht hierbei an Jens, vor allem für die tatkräftige Unterstützung bei den Mausversuchen. Lieben Dank auch an Jens, Kathrin, Benedikt, Josef und Helga für das Korrekturlesen und euren Beitrag den ihr durch zahlreiche Diskussionen zu dieser Arbeit geleistet habt.

Ein besonders großer Dank geht dabei auch an Kathrin die durch ihre tatkräftige Unterstützung zur Herstellung der zahlreichen rekombinanten NYVACs beigetragen hat.

Vielen lieben Dank auch an alle Kollegen in der Arbeitsgruppe die in den vergangenen Jahren nicht nur eine kollegiale sondern auch eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre geschaffen haben. Besonders an Ruth und an alle anderen Sportlichen in der AG die sich mit mir am Abend die Bälle um die Ohren geschlagen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an die Crew des 80er Labors: Kathrin, Silke, Philip, Denijal und an alle die im Laufe der Zeit in diesem Labor ein und aus gegangen sind. Ihr habt die Zeit unvergesslich gemacht.

An Helga und Timo: mit euch verbindet mich nicht nur eine sehr gute Freundschaft und ein grandios tolles Patenkind, sondern auch die Tatsache, dass ich ohne die „moralische“ Unterstützung von Helga nicht promoviert hätte. Ein riesengroßer Dank dafür.

Ein dickes Danke an fünf Mädels ohne die das ganze Leben nur halb so toll wäre. Anja, Jacky, Marion, Maria und Katrin ihr seid die Besten.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie. An meine Eltern, an Johannes, Wolfgang und Martina und an die beiden Kids Leon und Eliana. Danke dass ihr mich in allem unterstützt habt und mir in schwierigeren Zeiten bewusst oder manchmal auch unbewusst weitergeholfen habt.