

Aus dem Lehrstuhl für
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Quantifizierung der Antikörperbindung gegenüber auf
Nanopartikeln präsentierten Antigenen mittels
Microscale Thermophorese

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Fischer

2024

Aus dem Lehrstuhl für
Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Prof. Dr. Dr. André Gessner
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Quantifizierung der Antikörperbindung gegenüber auf
Nanopartikeln präsentierten Antigenen mittels
Microscale Thermophorese

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Fischer

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ralf Wagner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Salzberger

Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2024

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 1 -
1.1.	Das Humane Immundefizienz Virus	- 1 -
1.1.1.	Auftreten und Ausbreitung	- 1 -
1.1.2.	Virustyp und Aufbau	- 3 -
1.1.3.	HIV-Lebenszyklus	- 6 -
1.1.4.	Das acquired immunodeficiency syndrome A.I.D.S.	- 7 -
1.1.5.	Behandlungsstrategien von A.I.D.S.	- 8 -
1.2.	Reverse Immunisierung	- 9 -
1.2.1.	Immunantwort auf HI-Viren	- 9 -
1.2.2.	Impfstoffentwicklung und Klinische Studien mit HIV-Vakzinen	- 10 -
1.2.3.	Besondere Herausforderungen der HIV-Vakzinierung	- 14 -
1.2.4.	Breitneutralisierende Antikörper	- 15 -
1.2.5.	Virus Like Particles als Vektoren	- 16 -
1.3.	Microscale Thermophorese zur Affinitätsbestimmung von Ag-Ak-Bindungen .-	- 17 -
1.3.1.	Microscale Thermophorese als neuer Weg der Affinitätsbestimmung	- 17 -
1.3.2.	Env/V3-Chimären-Modellsystem als Vergleichsbasis zwischen ELISA und MST	- 18 -
1.3.3.	Zielsetzung	- 19 -
2.	Material und Methoden	- 21 -
2.1.	Material	- 21 -
2.1.1.	Lösungen und Puffer	- 21 -
2.1.2.	Kits	- 22 -
2.1.3.	Vektoren	- 22 -
2.1.4.	Zellen	- 23 -
2.1.5.	Antikörper	- 23 -

2.1.6. Geräte.....	- 24 -
2.1.7. Software.....	- 24 -
2.1.8. Verbrauchsmaterial und Chemikalien	- 24 -
2.2. Methoden.....	- 25 -
2.2.1. Mikrobiologische Methoden.....	- 25 -
2.2.1.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen.....	- 25 -
2.2.1.2. Anzucht transformierter E. coli	- 25 -
2.2.2. Zellkultur Techniken	- 25 -
2.2.2.1. Kultivierung von 293F-Suspensionszellen.....	- 26 -
2.2.2.2. Transiente Transfektion der 293F-Suspensionszellen.....	- 26 -
2.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	- 27 -
2.2.3.1. Aufreinigung von Plasmid-DNA	- 27 -
2.2.4. Methoden zur VLP-Gewinnung und Aufreinigung.....	- 27 -
2.2.4.1. Ernten der VLPs aus dem Zellkulturmedium.....	- 27 -
2.2.4.2. Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten	- 28 -
2.2.5. Proteinbiochemische Methoden	- 28 -
2.2.5.1. Bestimmung der Gag-Menge mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant- Blau Färbung	- 28 -
2.2.5.2. Bestimmung der Gag-Menge mittels ELISA und p24-Standard	- 29 -
2.2.5.3. Bestimmung der Env-Menge mittels Slot-Blot.....	- 30 -
3. Ergebnisse.....	- 30 -
3.1. Produktion und Charakterisierung der Env/V3-Chimären-VLPs aus HEK293F Zellen.....	- 30 -
3.1.1. Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten	- 30 -
3.1.2. Bestimmung der Gag-Menge.....	- 32 -
3.1.2.1. Gag-Quantifizierung über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	- 32 -

3.1.2.2. Gag-Quantifizierung über p24 ELISA	- 33 -
3.1.2.3. Vergleich der Gag Quantifizierung	- 33 -
3.1.3. Bestimmung der Env Menge	- 34 -
3.1.3.1. Env Quantifizierung mittels Slot-Blot-Methode	- 34 -
3.1.4. Korrelation der Env Mengen mit den Gag Mengen aus SDS-PAGE und p24- ELISA	- 35 -
3.1.5. Berechnung der Env/V3-Chimären-Trimer-Anzahl der VLP-Oberfläche	- 37 -
3.2. Antigen-Antikörper-Affinitätsmessung der Env/V3-Chimären-VLPs gegen mAb 447-52D	- 37 -
3.2.1. Quantifizierung mittels ELISA	- 37 -
3.2.2. Quantifizierung mittels Microscale-Thermophorese	- 39 -
4. Diskussion	- 40 -
4.1. Herstellung und Quantifizierung der Env/V3-Chimären beladenen Gag-VLPs .-	40 -
4.2. Env/V3-Trimer-Oberflächenexpression der produzierten Env/V3-Chimären-Gag- VLPs	- 41 -
4.3. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp120 Monomeren und gp140 Trimeren im ELISA	- 42 -
4.4. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp140- besetzten Zellen	- 43 -
4.5. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp120 Monomeren und gp140 Trimeren in der MST	- 44 -
4.6. Messung der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs in der MST mit HBS- Puffer und humanem Serum	- 45 -
4.7. Die Wahl von VLPs als mögliche Vakzin-Kandidaten	- 46 -
4.8. Eignung der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs als Vakzinkandidat ...-	48 -
5. Schlussfolgerung	- 49 -
6. Ausblick	- 50 -

7.	Abstract.....	- 52 -
8.	Zusammenfassung	- 53 -
9.	References	- 55 -
	Abbildungsverzeichnis	I
	Tabellenverzeichnis.....	II
	Abkürzungsverzeichnis	III
	Danksagung.....	IV
	Curriculum vitae.....	V
	Selbstständigkeitserklärung.....	VII

1. Einleitung

1.1. Das Humane Immundefizienz Virus

1.1.1. Auftreten und Ausbreitung

Seit Montagnier und Barré-Sinoussi die Erstbeschreibung des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) im Jahr 1983 publizierten sind vier Jahrzehnte vergangen. Eine weltweite Ausbreitung und daraus resultierende Pandemie folgten (1). Das durch den Virus ausgelöste Acquired Immune Deficiency Syndrome (A.I.D.S.) kann mittlerweile durch Antiretrovirale Therapie eingedämmt werden (2). Die Entwicklung eines effektiven Vakzins zur Bekämpfung der Ausbreitung ist komplex und zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gelungen (3–5).

Es kann bei den ersten HIV-Infektionen von Zoonosen ausgegangen werden, da das mit dem Virus verwandte Simianen Immundefizienz Virus (SIV) in verschiedenen Affenarten Afrikas nachgewiesen werden konnte (6,7). Es wird von einer separaten Virusübertragung durch unterschiedliche Affenarten ausgegangen. Eine hohe Ähnlichkeit mit dem HIV-1 bestand bei SIV_{cpz}, das bei Schimpansen identifiziert wurde (8,9). Der Nachweis von SIV_{gor}, welcher dem Subtyp P von HIV-1 ähnelte, konnte bei Gorillas erfolgen. SIV_{sm}, welcher HIV-2 gleicht, wurde in Verbindung mit Rußmangaben gebracht (9).

Die Anzahl HIV-infizierter Menschen betrug laut United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) 2021 weltweit 38,4 Millionen , dies entspricht knapp 0,5% der Weltbevölkerung (10). WHO-Angaben aus dem Jahr 2016 zur Verbreitung der HIV-Infektion zeigten die höchste Anzahl Betroffener in Afrika, gefolgt von Süd-Ost-Asien und Amerika (siehe Abbildung 1).

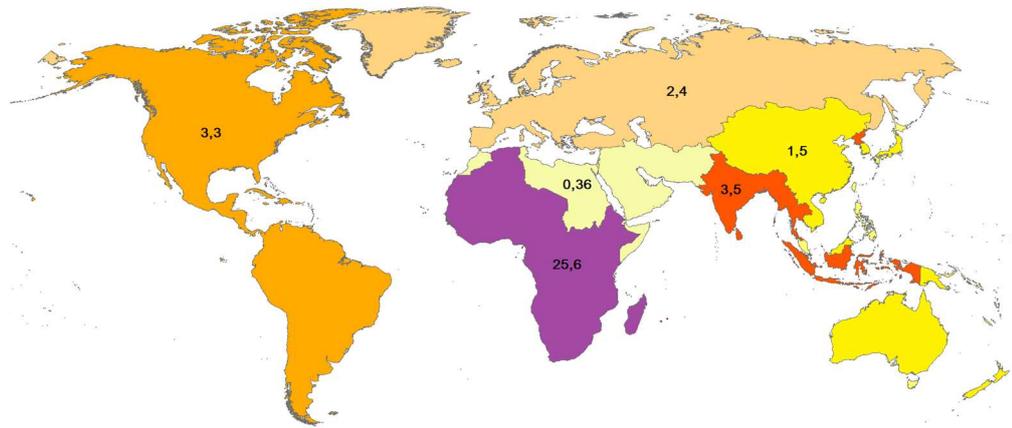


Abbildung 1: Weltweite Infektionen laut Schätzungen der WHO im Jahr 2016. Die einzelnen Regionen sind mit der Anzahl infizierter Menschen in Millionen gekennzeichnet. Die aktuellen Zahlen zeigen Ende 2021 einen Anstieg auf 38,4 Millionen infizierter Menschen weltweit. Trotz antiretroviraler Therapie kommt es in einigen Regionen erneut zum Anstieg der Neuinfektionen. Modifiziert nach (11)

Global betrachtet sind 2021 schätzungsweise 25,6 Millionen Menschen in Afrika mit dem HI-Virus infiziert. In Amerika und Süd-Ost-Asien sind circa 3,8 Millionen Menschen und in Europa circa 2,8 Millionen Menschen an dem Virus erkrankt (10).

Zählte A.I.D.S. in den 2000er Jahren in der WHO-Statistik noch zu den zehn häufigsten Todesursachen, ist dies verglichen mit den Daten aus dem Jahr 2019 nicht mehr gegeben (12). Die Antiretrovirale Therapie (ART) ermöglichte eine Eindämmung der durch HIV-Infektionen bedingten Sterbefälle. Verglichen mit 2004 (1,6-2,7 Millionen Menschen weltweit) und 2010 (1,1-1,8 Millionen Menschen weltweit) starben nach Angaben von UNAIDS 2021 weltweit noch ca. 650.000 Menschen an den Folgen einer A.I.D.S.-Erkrankung (10). Der afrikanische Kontinent weist nicht nur die höchsten Infektionszahlen auf, sondern auch den größten Anteil an Neuinfektionen mit fast 60% im Jahr 2021. Weltweit betrug die Neuinfektionsrate 1,5 Millionen Menschen (10). Die Ausbreitung des Virus ist dennoch nicht unterbunden und die Notwendigkeit der Entwicklung eines protektiven Vakzins ist weiterhin gegeben (13).

Trotz intensiver Forschung in verschiedene Richtungen konnten bis heute keine präventiven oder kurativen Maßnahmen entwickelt werden, um vor einer Infektion mit HIV zu schützen oder bereits infizierte Patienten eradikativ zu therapieren (14). Durch die ART konnte die Mortalität zwar gesenkt werden, jedoch benötigt es zur Eindämmung der Ausbreitung multimodale Ansätze (15). Neben der gesundheitlichen Aufklärung steht die Entwicklung eines Impfstoffs im Fokus präventiver Maßnahmen. Das bis heute kein effektiver Impfstoff entwickelt werden konnte, liegt vor allem an der Variabilität des Virus und der komplexen Interaktion mit dem Wirt (16). Um diese Hürden zu überwinden, sind weitere Forschung und genaueste Kenntnisse über den HI-Virus notwendig.

1.1.2. Virustyp und Aufbau

HI-Viren gehören als Lentiviren zur Familie der Retroviren (Retroviridae) (siehe Abb. 2). Retroviren zeichnen sich durch den Besitz einzelsträngiger RNA aus, welche zu doppelsträngiger DNA in der Wirtszelle umgebaut wird. Dafür besitzen die Viren die reverse Transkriptase, ein Enzym, das es ermöglicht, das Virus-Genom wirtskompatibel umzuschreiben. Zu den Lentiviren gehören noch andere immundefiziale Viren, zum Beispiel das bovine, feline oder simiane Immundefizienz-Virus (17).

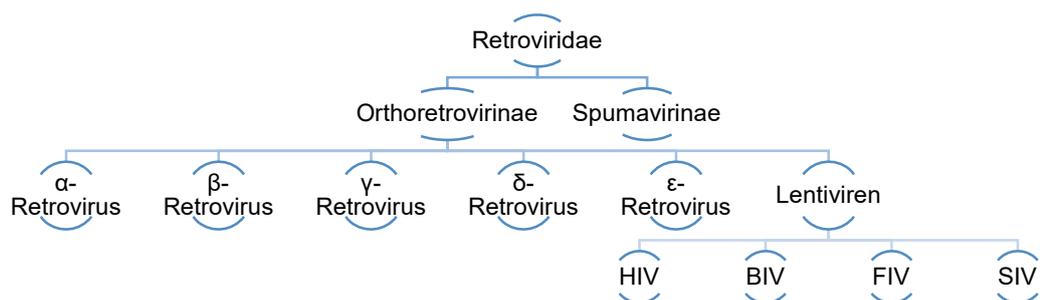


Abbildung 2: Einteilung des HI-Virus in die Familie der Retroviren. HIV: Humanes Immunodefiziensvirus; SIV: Simianes Immunodefiziensvirus; FIV: Felines Immunodefiziensvirus; BIV: bovines Immunodefiziensvirus.

Es existieren zwei Varianten des HI-Virus, HIV-1 und HIV-2, wobei erstere mit rund 95% für die Mehrheit der Infektionen ursächlich ist. HIV-1 besteht

wiederum aus vier Untergruppen: Gruppe M, N, O und P. Gruppe M verursacht hierbei die meisten Infektion, gefolgt von Gruppe O, die aber nur für rund 2 % der Infektionen verantwortlich ist. Gruppe N und P sind als untergeordnet einzustufen. Gruppe M wird in die Subtypen A, B, C, D, F, G, H, J und K unterteilt, wovon Typ C weltweit am weitesten verbreitet ist. Subtyp B liegt am häufigsten im westlichen Europa, Nord- und Südamerika sowie Australien vor. HIV-2 ist hauptsächlich in Westafrika vertreten und wird wie HIV-1 ebenfalls in Untergruppen geteilt (A, B, C, D, E, F, G, H). Die Untergruppe A ist dabei am häufigsten verbreitet. (18). Abbildung 3 illustriert die zuvor beschriebenen HIV-Genotypen.

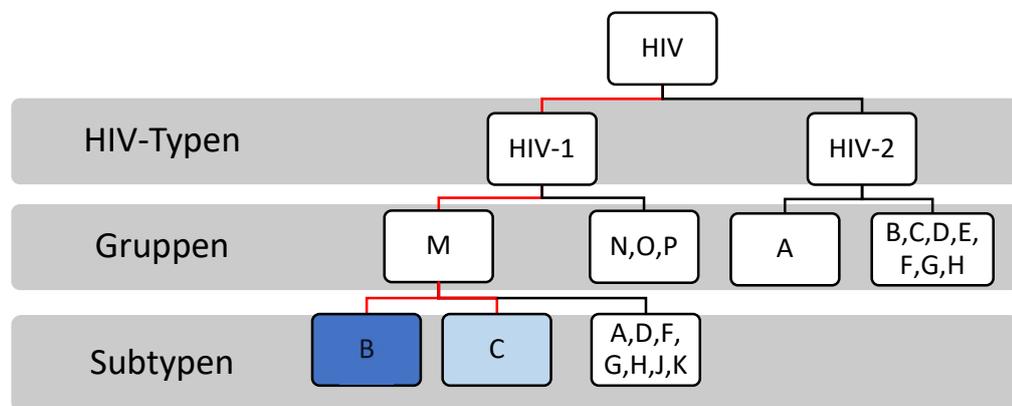


Abbildung 3: Schematische Darstellung der HIV-Genotypen. Dunkelblaue Markierung: Subtyp B mit größter Inzidenz in Europa, Amerika und Australien. Hellblaue Markierung: Subtyp C mit weltweit höchster Inzidenz. Die rote Markierung verdeutlicht die enge genetische Verwandtschaft der beiden häufigsten HI-Virus Subtypen.

HI-Viren besitzen ein konisches Kapsid mit diploider Einzelstrang-RNA (single stranded RNA, kurz ss(+) RNA) und werden von einer Hülle umgeben (siehe Abbildung 4A und 4B). Die drei hauptsächlich Genome *gag*, *pol* und *env* verschlüsseln dabei strukturelle Proteine. Das *gag*-Genom verschlüsselt die gruppenspezifischen Antigene (Gag), welches in Proteine des Nukleokapsids, Kapsids und der Matrix gespalten wird. Das Kapsid besteht aus Kapsidprotein Protein 24 (p24; siehe Abbildung 4A), das gemeinsam mit Protein 17 (p17), dem Matrixprotein, aus dem Vorläufer Protein 55 (p55) gespalten wird (19).

Durch *env* werden Proteine der Virushülle (engl. *envelope*, kurz Env), etwa das Glykoprotein 160 (gp160) codiert, aus dem Glykoprotein 120 (gp120) und Glykoprotein 41 (gp41) abgespalten werden. Die Hüllmembran des HI-Virus leitet sich von der Wirtszellmembran ab und besitzt somit neben viralen auch humane Oberflächenproteine. Diese viralen Oberflächenproteine sind teilweise stark glykosyliert und spielen daher eine entscheidende Rolle in der Vermeidung der Immunantwort. Sie setzen sich aus dem exogenen Teil gp120 und der Transmembrandomäne gp41 zusammen, die nicht kovalent miteinander verbunden sind (17).

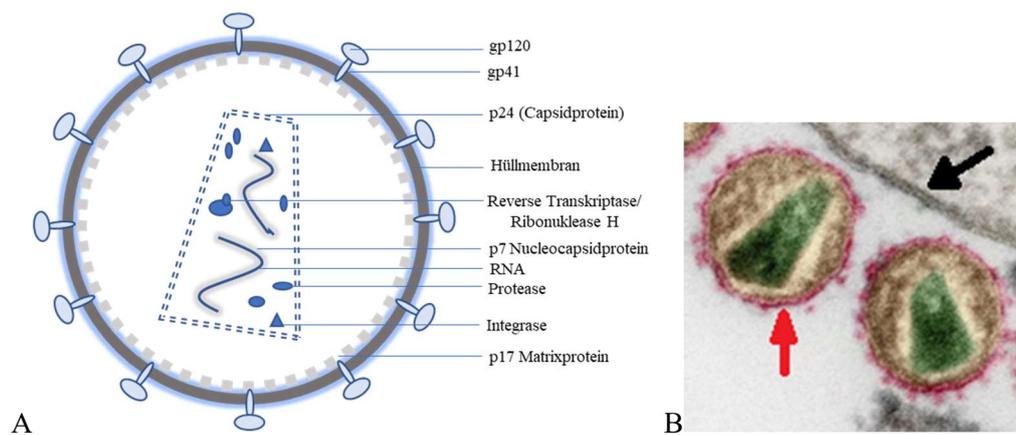


Abbildung 4: Aufbau des HI-Virus A) Schematischer Aufbau eines HIV Partikels; Abbildung 4: B) colorierte EM Aufnahme von HI-Viren. Modifiziert nach (20). Die Hüllmembran (roter Pfeil) leitet sich aus der Doppellipidschicht der Wirtszelle (schwarzer Pfeil) ab, die durch das p17 Matrixprotein zum Formen der Virus-Sphäre gebracht wird

Die viruseigenen Enzyme Protease, Integrase und Reverse Transkriptase entstehen durch die Spaltung des Polymerase-Proteins (Pol), welches durch *pol* codiert wird (18). Das ss(+)-RNA Genom des HIV besitzt mit einer 5'-Cap-Struktur und einer 3'-Polyadenylierung typische Charakteristika eukaryontischer RNA (siehe Abb. 5). Neben den Produkten Gag, Pol und Env sind weitere regulatorische und akzessorische Proteine codiert (17).

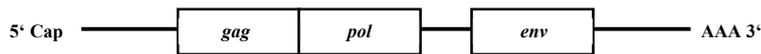


Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Retroviren RNA-Genoms. Die Reihenfolge 5'Cap-gag-pol-env-AAA3' ist typisch für Retroviren. Das 5'Cap-Ende dient nicht nur zur RNA-Prozessierung, sondern auch beim Transport der beiden RNA-Einzelstränge in die abspaltende Virushülle. Modifiziert nach (21)

1.1.3. HIV-Lebenszyklus

Der HIV-Lebenszyklus wird in Abbildung 6 dargestellt und durch die nachfolgenden Ausführungen erläutert. Auf der viralen Membranoberfläche befinden sich die antigenen Strukturen gp120 und gp41, die an den Zellrezeptor „Unterscheidungsgruppe 4“ (cluster of differentiation 4, kurz CD4) und dem Ko-Rezeptor „CC-Motiv-Chemokinin-Rezeptor 5“ (kurz CCR5) der Zielzelle binden können (22). Der Primärrezeptor CD4 wird auf T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten präsentiert (CD4⁺-Zellen). Wenn eine Bindung eingetreten ist, sorgt gp41 für eine Verschmelzung des HI-Virus mit der Wirtszelle (23). Nach Eintritt in die Wirtszelle erfolgt die sogenannte reverse Transkription. Durch virale Enzyme werden die zwei Einfachstränge RNA in eine komplementäre doppelsträngige DNA (*complementary DNA* = cDNA) umgebaut. Diese virale cDNA wird durch die Integrase in den Kern der Wirtszelle aufgenommen und zu proviraler DNA dupliziert. Die virale Replikation erfolgt durch die Transkription neuer ss(+)-RNA Moleküle aus der proviralen DNA. Durch Translation entstehen wiederum die Polyproteine Gag, Pol und Env. Das virale Genom wird mit dem Nucleokapsid-Protein p7 verpackt und vom Viruskapsid, gebildet aus p24-Polymeren, umschlossen (24). Beim Abknospen durch p17 aus der Wirtszelle entsteht die Hülle des HI-Virus aus der Doppellipidschicht der Wirtszelle. (18)

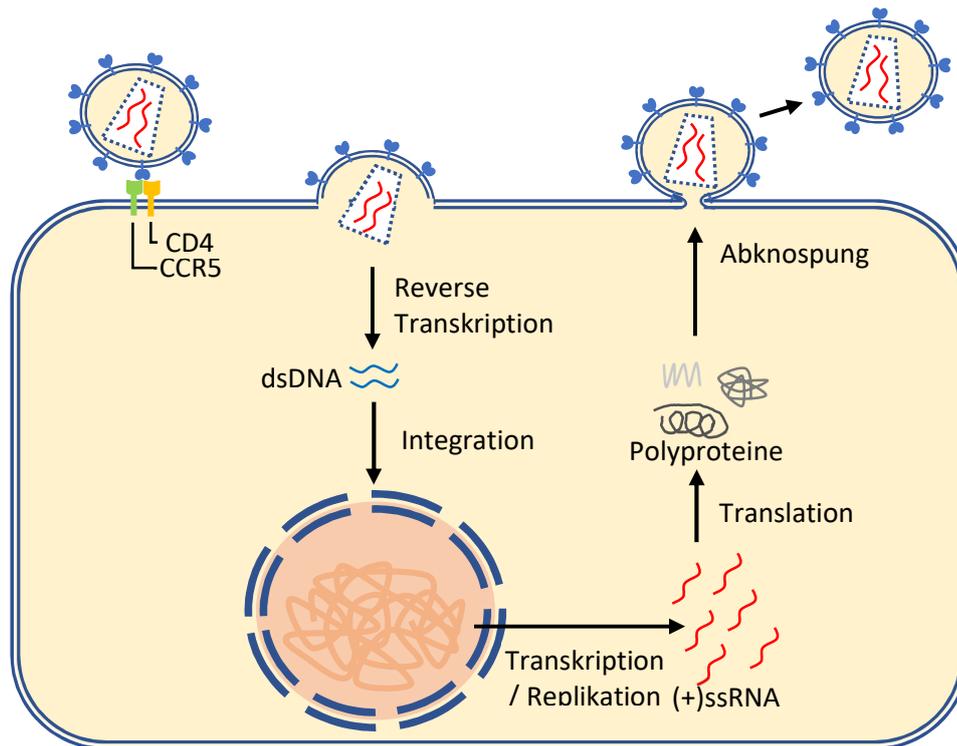


Abbildung 6: Schematische Darstellung des HIV-Lebenszyklus. Nach Andocken an CD4- und CCR5-Rezeptoren kommt es zum Verschmelzen des Viruspartikels mit der Wirtszelle. Durch reverse Transkription wird die Virus-RNA in doppelsträngige DNA umgebaut und nach Aufnahme in den Zellkern repliziert. Durch Transkription werden neue RNA-Stränge produziert, die einerseits als Virus-Genom, andererseits mittels Translation für die Synthese neuer Virus-Proteine dienen. Durch Abknospung der wirtseigenen Zellmembran entstehen die neuen, matten Viruspartikel. Modifiziert nach (18)

1.1.4. Das acquired immunodeficiency syndrome A.I.D.S.

Wenn durch Kontamination mit Blut oder anderen infektiösen Körperflüssigkeiten eine Infektion mit matten HIV-Partikeln erfolgt, binden die Viruspartikel über ihre Envelope-Proteine an CD4⁺-Zellen der Immunabwehr (17). Der anschließende Krankheitsverlauf kann in drei Phasen unterschieden werden. Nach einer Inkubationszeit von ein bis vier Wochen erfolgt eine akute HIV-Infektion (Primärinfektion), die sich entweder asymptomatisch oder in unspezifischen Symptomen wie Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust, geschwollenen Lymphknoten oder einem Exanthem äußert (25). Es schließt sich eine Latenz-Phase von rund 10 Jahren an, in der zwar keine Symptome zu spüren sind, sich jedoch die Anzahl CD4⁺- Zellen stetig

verringert. Erfolgt keine Behandlung kommt es ab einer Konzentration ≤ 400 CD4⁺-Zellen pro μl Blut zur Ausprägung des erworbenen Immunschwäche Syndroms (acquired immunodeficiency syndrome – A.I.D.S.) (25). Mit sinkender CD4⁺-Zellzahl steigt das Risiko für opportunistische Erreger, wie Mycobacterium tuberculosis oder Candida spp. (26,27). Marker-Infektionen eines A.I.D.S. können sich durch Lymphadenopathien, oesophageale Candidiasis, Herpes Zoster oder das Kaposi-Sarkom erstmals zeigen. Fällt die Zahl der Abwehrzellen weiter, verlaufen die Infektionen meist ordinärer Erreger letal (17).

1.1.5. Behandlungsstrategien von A.I.D.S.

Die Infektion mit HIV bedeutet heutzutage nicht mehr die Verkürzung der Lebenszeit auf 10-15 Jahre. Unter dem Kürzel „ART“, für Anti-Retrovirale Therapie, verbirgt sich eine ganze Bandbreite von Medikamenten, die die Ausbreitung des HI-Virus im infizierten Patienten verhindern soll. Als Goldstandart sei hier die „HAART“ – Hoch-Aktive-Anti-Retroviral-Therapie genannt. Sie umfasst eine Dreifachtherapie aus verschiedenen ART-Wirkstoffen, die heute schon als einzelne Tablette zu erhalten ist. Wirkstoffe der ART sind unter anderem Inhibitoren der Reversen Transkriptase, HIV-Protease und Integrase, sowie Entry- und Fusions-Inhibitoren. Damit kann die Viruslast bis unter die Nachweisgrenze reduziert werden und es kommt zur Erholung der CD4⁺ Zellpopulation (28). Nachteilig ist jedoch der hohe Kostenfaktor der ART, der in armen Regionen mit hohen Infektionszahlen nicht getragen werden kann. Dadurch wird es kaum möglich sein, allen Infizierten diese Therapieform zukommen zu lassen. Außerdem besteht eine reine Suppression der Infektion, jedoch keine absolute Eradikation des Erregers im Patienten, was eine *Adherence*, also eine lebenslange Einnahme der Medikamente nötig macht. Weiterhin können sich spontan oder durch fehlende Compliance des Patienten Resistenzen gegen einzelne ART Medikamente entwickeln, die ein Wiederaufflammen der Infektion zur Folge haben (28).

Experimentelle Methoden befinden sich teilweise noch weit entfernt vom klinischen Einsatz, bergen hohe Risiken oder Kosten, könnten aber in Zukunft auch zu kurativen Ansätzen führen. Zu ihnen zählen unter anderem Maturations-Inhibitoren (29), die Tre-Rekombinase (Gen-Schere) (30), Monoklonale Antikörper (31), Stammzelltransplantation (32) und die Gentherapie (33).

Am sinnvollsten wäre es jedoch, präventive Maßnahmen zu entwickeln, um eine Infektion mit dem HI-Virus zu verhindern und somit eine lebenslange Therapie von über 30 Millionen Menschen zu vermeiden (34). Dabei spielen Vakzine eine wichtige Rolle, speziell die aktive Immunisierung. Sie bietet länger höhere Antikörper-Titer als passive Impfstoffe und einen ökonomischen Vorteil hinsichtlich der enormen Größe der Bevölkerungsgruppe, die behandelt werden muss. Jedoch gestaltet sich die Entwicklung eines funktionalen Impfstoffes schon seit langem äußerst schwierig. Dies liegt an den besonderen Eigenschaften des HI-Virus und speziell seines Oberflächenproteins Env, das mit starker Glykosylierung und ständigen Fluchtmutationen der körpereigenen Abwehr entgeht (35).

1.2. Reverse Immunisierung

1.2.1. Immunantwort auf HI-Viren

Wird ein Mensch mit einem Virus infiziert, setzt dies normalerweise eine Reihe von Mechanismen in Gang, die zur Erkennung und Bekämpfung des Erregers oder der von ihm befallenen Zellen führen (siehe Abb. 7). Diese Immunantwort kann in humorale und zelluläre Bestandteile eingeteilt werden (36). Bei der humoralen Antwort werden antigene Strukturen direkt an einen passenden B-Lymphozyten-Rezeptor gebunden oder durch antigenpräsentierende Zellen (kurz APCs) zu B-Zellen geleitet. Die so aktivierte B-Zelle bildet Effektorklone, die lösliche Antikörper in die Blutbahn sezernieren. Diese Antikörper können Pathogene opsonieren oder neutralisieren und verhindern so die weitere Kontamination des Wirtskörpers. Die zelluläre Antwort verläuft

über spezielle CD8⁺ T-Lymphozyten (*cluster of differentiation 8 expressing cells*, kurz CD8⁺-Zellen), die zytotoxischen T-Zellen. Diese erkennen bereits infizierte Zellen und bewirken anschließend deren Degeneration. So kann die weitere Produktion von Viruspartikeln gestoppt werden (37). HI-Viren binden über gp120 an das für die Immunantwort wichtige CD4-Protein und infizieren somit den Teil des Wirts, der sie eigentlich bekämpfen sollte (17).

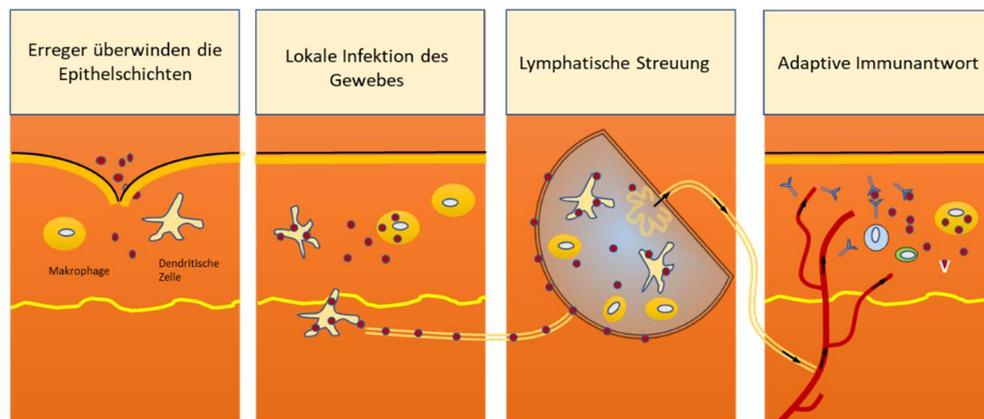


Abbildung 7: Phasischer Ablauf der Immunantwort nach Antigenexposition. Pathogene werden nach Eindringen in den Organismus durch Makrophagen und dendritische Zellen aufgenommen, weitere Abwehrzellen durch Botenstoffe akquiriert. Durch Präsentation von antigenen Strukturen gegenüber B-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung der Keimbzellen im lymphatischen System. Anschließend erfolgt die Pathogen-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort. Modifiziert nach (37)

1.2.2. Impfstoffentwicklung und Klinische Studien mit HIV-Vakzinen

Im Rahmen der Impfstoffentwicklung der letzten 40 Jahre wurden diverse Vakzine entwickelt und zum Teil in klinischen Studien getestet. Rückblickend kann von drei Wellen in der Entwicklung gesprochen werden. Zu Beginn stand die Generierung neutralisierender Antikörper, gefolgt von der Immunaktivierung zytotoxischer T-Lymphozyten und zuletzt dem Hervorrufen verschiedener Immunantworten. Diese drei Wellen der Entwicklung fanden zum Teil überlappend statt, wie Abbildung 8 veranschaulicht (38).

Paradigma	Jahr									
	1986	1990	1994	1998	2002	2006	2010	2014	2018	2022
Induktion neutralisierender Antikörper		■	■	■	■					
Induktion der Zell-vermittelten Immunität			■	■	■	■				
Kombination verschiedener Immunantworten					■	■	■	■	■	→

Abbildung 8: Zeitliche Darstellung der HIV-Vakzin-Entwicklung. Durch die blaue Markierung der einzelnen Wellen wird deren weitläufige Überlappung deutlich. Trotz jahrzehntelanger Forschung an unterschiedlichen Impfstoff-Strategien konnte bis heute kein wirksamer Vakzinkandidat gefunden werden.

Die erste Welle der Entwicklung von HIV-Vakzinen, welche ungefähr von 1988 bis 2003 datiert wird, sah die Induktion neutralisierender Antikörper vorrangig (38). Diese ersten Impfstoffe basierten hauptsächlich auf der Konstruktion der rekombinanten Env-Glykoproteine gp120 oder gp160, welche für die Bindung des HI-Virus an der Zielzelle verantwortlich sind (siehe Abbildung 6). Das erste, 1988 in klinischen Studien getestete Vakzin VaxSyn®, basierte auf einer rekombinierten Form von gp160. Die Induktion bindender Antikörper gelang, neutralisierende Antikörper konnten jedoch nicht erzeugt werden (38). Abbildung 9 zeigt eine Aufstellung von durchgeführten Vakzin-Studien mit der angewandten Wirkstoffzusammensetzung, Probandenkollektiv und deren Effektivität (39).

Die zweite Welle der Impfstoffentwicklung wird von 1995 bis 2007 datiert und konzentriert sich auf die Immunantwort durch zytotoxische T-Lymphozyten. Lebende rekombinante Vektoren, wie Adenovirus- oder Poxvirus-Vektoren wurden entwickelt, ebenso wie DNA-Impfstoffe (38). Die Ergebnisse der klinischen Studie des DNA-Vakzins HVTN 505 (*HIV Vaccine Trial Network*) wurden 2013 publiziert. Die Zusammensetzung bestand aus drei Impfungen: 1. DNA, welche die Polyproteine Gag, Pol und Env des HIV1-Typ B kodiert, 2. DNA die Env der HIV1-Typen A, B und C kodiert sowie 3. einem Adenovirus-5-Vektor-basierten Impfstoffkandidaten der Gag und Pol vom HIV1-Typ B und Env vom HIV1-Typ A, B und C kodiert. HVTN 505 basiert auf einem

Priming-Boost-Schema. Im Jahr 2013 wurde die Klinische Studie eingestellt, da interne Analysen keine Reduktion der Viruslast bei den Probanden erkennen ließen (38,40). Die Prime-Boost-Vakzine HVTN 502 und HVTN 503 enthielten einen rekombinanten Adenovirus Typ 5 (Ad5), welcher die HIV1 Gene *gag*, *pol* und *nef* des Subtypen B enthielt (40,41). Die Ergebnisse von HVTN 503 wurden 2011 publiziert und zeigten keine Effektivität des Vakzins, zudem wurde eine erhöhte Inzidenz an HIV-Infektionen bei den Geimpften festgestellt (42).

Ab 2007 kann die dritte Welle der Impfstoffentwicklung datiert werden, die auf eine Kombination verschiedener Impfreaktionen beruht. Ziel ist es, zwei Wege der Immunantwort zu stimulieren, zum einen die Zell-induzierte Immunantwort als auch die Bildung protektiver Antikörper. In der klinischen Studie RVV144, welche in Thailand von 2003 bis 2009 mit der Teilnahme von über 16.402 Probanden stattfand, wurde eine Prime-Boost-Impfung aus zwei Vakzinen getestet. Die Kombination der Impfstoffe ALVAC® (vCP1521 canarypox vector) und AIDSVAX® B/E (gp120, wie zuvor in VAX003 und VAXX04) kam dabei zur Anwendung. Die Studie konnte eine Effektivität bei der Prävention einer HIV-Infektion von 31,2 % nach 3,5 Jahren erreichen (42). Seit RVV144 konnte keine weitere Studie einen wirksamen Schutz gegen HIV nachweisen. Die HVTN-Studien 705 „Imbokodo“ (Phase IIb) und 706 „Mosaico“ (Phase III) wurden jeweils bei fehlender Wirksamkeit vorzeitig beendet. Die Teilnehmerrekrutierung für die PrEPVacc /PV1 Studie (Phase IIb) wurde im Juni 2023 beendet.

Studie	Zeitraum	Studienländer	Impfstoff	Ergebnis
Vax003 und Vax004	1999-2003	Thailand	Rekombinantes Env (Subtyp B oder B + E) mit Aluminium-Adjuvans (AIDSVAX)	Keine Wirksamkeit
Step Phambili	2004-2007	Amerika, Australien, Südafrika	Ad5 mit Gag, Pol und Nef	Keine Wirksamkeit; mehr Infektionen bei Ad5-Seropositiven; vorzeitiger Studienabbruch
RV144 (Thai trial)	2003-2009	Thailand	ALVAC mit Gag, Pro und Env (Subtyp AE) als Prime-Impfung; ALVAC + AIDSVAX (Subtypen B/E) als Boost-Impfung	60% Wirksamkeit nach 1 Jahr; 31% Wirksamkeit nach 3,5 Jahren; Studienkollektiv: Frauen und Männer mit niedrigem Infektionsrisiko
HVTN 505	2009-2013	USA	DNA mit Gag, Pol, Nef, Env (Subtypen A, B, C) als Prime-Impfung; Ad5 mit Gag, Pol, Env (Subtypen A + B + C) als Boost-Impfung	Keine Wirksamkeit; vorzeitiger Abbruch
HVTN 702	2016-2021	Südafrika	ALVAC mit Gag, Pro, Env (Subtyp C) als Prime-Impfung; ALVAC + rekombinantes Env (Subtyp C) mit MF59-Adjuvans als Boost-Impfung	Keine Wirksamkeit; vorzeitiger Abbruch; Studienkollektiv: heterosexuelle Frauen und Männer
Imbokodo	2017-2021	Südliches Afrika	Ad26 mit Mosaikantigenen + rekombinantes Env (Trimer; Subtyp C) mit Aluminium-Adjuvans als Prime-Impfung; rekombinantes Env als Boost-Impfung	Keine Wirksamkeit; vorzeitiger Abbruch; Studienkollektiv: Frauen
Mosaico	2019-2023	USA, Südamerika, Italien, Spanien	Ad26 mit Mosaikantigenen + rekombinantes Env (Trimer; Subtyp C/Mosaik) mit Aluminium-Adjuvans als Prime-Impfung; rekombinantes Env als Boost-Impfung	Keine Wirksamkeit; vorzeitiger Abbruch; Studienkollektiv: homosexuelle Männer
PrEPVacc seit 2020	seit 2020	Südliches Afrika	Arm A: DNA mit Gag, Pol, Env (Trimer; Subtyp C) + AIDSVAX (Subtypen B/E); Arm B: DNA + rekombinantes Env (Trimer; Subtyp C) mit MPLA-Adjuvans als Prime-Impfung; MVA mit Gag, Pol, Env (Subtyp C) + rekombinantes Env (Trimer; Subtyp C) als Boost-Impfung	Studie läuft; Studienteilnehmer erhalten parallel eine medikamentöse Präexposition prophylaxe (PrEP)

Abbildung 9: Zusammenstellung von HIV-Vakzinen in klinischen Studien (modifiziert nach (39)). Einzig die RV144-Studie konnte eine klinische Wirksamkeit zeigen. Alle anderen Studien mussten vorzeitig abgebrochen werden.

Zusammenfassend ist erkennbar, dass in der Vergangenheit diverse Wege der Impfstoffentwicklung stattfanden und Misserfolge die weitere Fortführung in

eine andere Richtung lenkten. Die große genetische und immunologische Varianz des HI-Virus erschweren dabei die Entwicklung eines effizienten Vakzins. Aktuelle Forschungen der Vakzinentwicklung konzentrieren sich auf breit-zytotoxische Effekte bei CD8⁺-Zellen sowie auf die Generierung breit-neutralisierender Antikörper (*broadly neutralizing antibodies*, kurz bnAbs) (39).

1.2.3. Besondere Herausforderungen der HIV-Vakzinierung

Das bis heute kein wirksamer Impfstoff gegen das HI-Virus gefunden wurde, zeigt wie komplex und schwierig sich die Forschung an diesem Erreger erweist. Verschiedene Bereiche und Mechanismen des Virus und seiner Replikation führen immer wieder dazu, dass möglich Strategien oder Impfstoffkandidaten verworfen werden müssen.

Die auf der Kapsel sitzenden Env-Proteine, die über die Bindung an CD4-Rezeptoren zur Aufnahme in die Wirtszelle dienen, sind die einzigen virusspezifischen Antigene, welche auf dem Viruspartikel präsentiert werden und somit die einzige Möglichkeit für eine Antikörperbindung (16,43). Die körpereigene Abwehr kann diese jedoch nur schwer erkennen, da fast die gesamte Env-Struktur von Zuckerketten überdeckt ist. Dieser Glykanschild gleicht stark den wirtseigenen Zelloberflächen und wird somit nicht als pathogen erkannt. Nur in den Lücken der Glykanschicht können Antikörper effektiv binden. Jedoch wurde festgestellt, dass sich das HI-Virus durch Fluchtmutationen dem Immunsystem entzieht, indem beispielsweise neue Glykane im Env eingefügt werden (44). Das liegt vor allem an der fehlerhaft wirkenden reversen Transkriptase, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 10^{-3} bis 10^{-4} falsch gepaarte Basen in die DNA-Stränge einbaut (45). Auch die RNA-Polymerase, die später tausende RNA-Moleküle für neue Viren transkribiert, arbeitet äußerst fehlerhaft. So kommt es zu einer hohen Variabilität der Env-Proteine, der der Wirtsorganismus mit ständig neuer Antikörperproduktion nicht folgen kann. Jedoch kann davon ausgegangen werden, dass spezifische, für die Infiltration der Wirtszelle notwendige Areale unverändert bleiben

müssen. (17). Eine zu starke Änderung der CD4-Bindungsstelle würde ein Andocken an die Wirtszelle und somit die Ausbreitung des Virus verhindern (46).

Diese, als konservative Epitope bezeichneten Areale, sollten die Fähigkeit haben Antikörper zu induzieren, die Env-Proteine verschiedener HIV-Gruppen zu binden.

1.2.4. Breitneutralisierende Antikörper

Frühe Antikörper der HIV-Infektion binden meist nur an eine Klasse HI-Viren. Auf Grund der hohen Mutationsrate entgeht der Virus der initialen Immunantwort des Körpers, sodass in einer Koevolution zwischen mutierendem Virus und reagierender Immunantwort Antikörper gegen konservative Epitope entstehen. Als „Breitneutralisierer“ werden Anti-HIV-Antikörper bezeichnet, die mehrere Stämme des Virus schon in geringer Konzentration neutralisieren können (47). Erste breitneutralisierende Antikörper (bnAbs), die sich im Laufe einer aktiven Infektion gegen neu entstehende Virusvarianten entwickeln, zeigten vor allem Affinität zur CD4-Bindungsstelle auf gp120-Molekülen (48). In den letzten Jahren konnten immer mehr dieser bnAbs identifiziert (49) und in ersten klinischen Versuchen getestet werden (50).

Eine mögliche Hürde in der Impfstoffentwicklung stellen spezielle Eigenschaften der gefundenen bnAbs dar. Sie weisen eine hohe Rate an somatischen Mutationen des variablen Teils der schweren Ketten auf, besitzen lange HCDR3-Regionen (*heavy chain complementarity-determinant region* = komplementaritätsbestimmende Regionen schwerer Ketten) an den schweren Ketten und eine Autoreaktivität gegen den Wirt. Diese Eigenschaften können eine negative Selektion der B-Zellen in vivo zur Folge haben und somit eine ausreichende Immunantwort verhindern (51).

Trotzdem gelten breitneutralisierende Antikörper und ihre entsprechenden Epitope als Dreh- und Angelpunkt in der Entwicklung eines HIV-Vakzinkandidaten (52). Ziel ist es, einen Impfstoff herzustellen, der die Produktion von bnAbs induziert und somit vor der Infektion durch verschiedene

Subtypen schützt (53). Hierfür kann die Methodik der reversen Vakzinierung genutzt werden, bei der zum Beispiel anhand des Pathogen-Genoms und computergestützter Analysen (in silico) mögliche neue Antigene gefunden werden. Ein Vakzin wird entwickelt, das optimale Bindungseigenschaften zu den bekannten bnABs besitzt und somit ein HI-Virus-Epitop möglichst genau abbildet. Je höher die Bindungsaffinität des Vakzins zu den bnABs ist, desto besser sollte die Neutralisierungsbreite des induzierten Anti-HIV-Antikörpers über die konservativen Epitope mehrerer Subtypen sein (54,55). Ein mögliches neues Testverfahren zur genaueren Affinitätsquantifizierung könnte die in dieser Arbeit eingesetzte Microscale-Thermophorese (MST) sein. Sie ermöglicht es, Partikel in Lösung zu testen und vermeidet so haftungsbedingte Konformationsänderungen durch zum Beispiel Titerplatten. Zudem könnte als Medium humanes Serum verwendet werden, das der Reaktionsumgebung in vivo entspricht und Interaktionen des Vakzins oder der bnABs mit Serumeiweißen aufzeigt. Somit könnten Impf-Studien mit in vitro falsch positiven, aber unwirksamen Vakzinkandidaten vermieden werden.

1.2.5. Virus Like Particles als Vektoren

In verschiedenen Studien wurde die Induktion breitneutralisierender Antikörper mittels löslicher Proteine, oberflächenbesetzten Nanopartikeln oder virusähnlicher Partikel (Virus Like Particles, VLPs) versucht (56). Letztere bestehen aus virusgroßen Abknospungen eukaryotischer Zellen, die keinerlei genetisches Material des Virus beinhalten. Wird eukaryontischen Zellen mittels Transfektion *gag*-Plasmid zugeführt, sorgt das transkribierte Gag-Protein für die Abknospung „leerer“ Virushüllen ohne einliegendes genetisches Material des HI-Virus. VLPs sind somit im Wirt nicht vermehrungsfähig, besitzen aber eine ähnliche Oberfläche und gleiche physikalische Eigenschaften wie das echte Virus, was sie zu einem vielversprechenden Impfstoff-Kandidaten macht (57). In dieser Arbeit wurde pcDNA3.1(+)_TeeGag1 (*t-cell epitope enriched Gag 1*, im Folgenden vereinfacht *gag*) zur transienten Transfektion immortalisierter 293F-Zellen genutzt, welches in vorrangegangenen Studien die Expression von Wildtyp-ähnlichen Gag-VLPs ermöglicht hatte (58)

1.3. Microscale Thermophorese zur Affinitätsbestimmung von Ag-Ak-Bindungen

1.3.1. Microscale Thermophorese als neuer Weg der Affinitätsbestimmung

Die Neutralisation von Viren oder antigenträgenden Partikeln durch Antikörper kann durch verschiedenste Methoden, zum Beispiel den *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA), quantifiziert werden. Eine noch in der Entwicklung steckende Methode ist die Microscale-Thermophorese (MST). Bei dieser wird mittels eines Lasers ein temporärer Temperaturgradient in einer Kapillare erzeugt. Die zu messenden Partikel bewegen sich anhand von Größe, Ladung und Hydrathülle unterschiedlich schnell entlang des Temperaturgradienten. Die Geschwindigkeit der Molekülbewegung ist dabei linear abhängig zum Temperaturgradienten. Somit sollte es möglich sein, die unterschiedliche Affinität verschiedener Antigene und Antikörper genauer zu trennen. (siehe Abbildung 10) (59). Die Microscale Thermophorese bietet einen schnellen, aber auch flexiblen Aufbau der Assays bei gleichzeitig geringem Probeneinsatz und einem Affinitätsbereich von pM bis mM (60,61). Messungen finden in Lösung statt, wodurch keine Bindung an Oberflächen notwendig wird und somit keine Beeinträchtigungen der zu messenden Moleküle zu erwarten sind. Fällungs- oder Aggregationseffekte können durch integrierte Qualitätskontrollen erkannt werden. Ein weiterer Vorteil ist die freie Wahl des Puffers, wodurch auch Ag-Ak-Affinitätsmessungen im Serum möglich wären. (62,63). Eine Messung der Ag-Ak-Affinität potenzieller Vakzine im natürlichen Umfeld könnte mit Hilfe dieser Methodik stattfinden und mögliche Interaktionen mit Plasmaproteinen aufzeigen. (64).

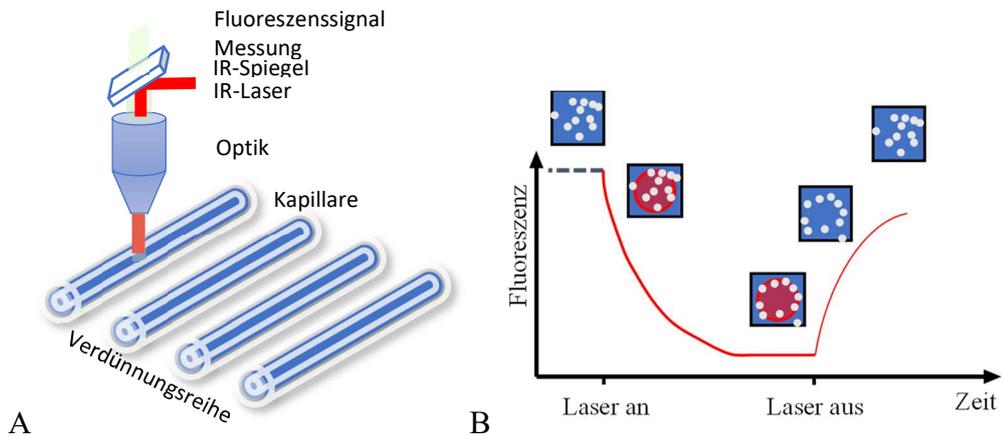


Abbildung 10: Methodik der Microscale Thermophoresis. Modifiziert nach (61); A) Mittels Infrarot-Laser wird in den Kapillaren ein punktueller Temperaturgradient erzeugt; B) Partikel verschieben sich entsprechend ihrer physikochemischen Eigenschaften im Temperaturgradienten

1.3.2. Env/V3-Chimären-Modellsystem als Vergleichsbasis zwischen ELISA und MST

Gorny et al. beschrieben 1993 den monoklonalen Anti-HIV Antikörper 447-52D und dessen Bindungsaffinität an verschiedene Env-Varianten (65). Die Varianten MN, HXB2, CDC42, RF und SF33 wurden von Bruun et al. aufgegriffen, um einen FACS-basierten Assay (*fluorescence activated cell sorting* = fluoreszenzgesteuerte Zellsortierung) zur Selektion von möglichen HIV1-Vakzin-Kandidaten zu etablieren (66). Diese Env-Varianten wurden auf Grund ihrer bereits bekannten differentiellen Bindungsaffinität zu 447-52D zur Etablierung und Skalierung der Messung mittels Microscale-Thermophoresis ausgewählt. Um den Einfluss der Env-Varianten auf das zu bindende Epitop zu beschränken und die Verfälschung der Ergebnisse durch andere Proteinstrukturen zu vermeiden, wurden nur die V3-Loops der jeweiligen Env-Varianten in ein neutrales HIV1-Subtyp-C-96ZM651-Env-Gerüst kloniert, welches 447-52D nicht bindet (66). Die so entstandenen HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3-Chimären (im Weiteren kurz Env/V3-Chimären) der Env-Varianten MN (HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3_{MN}, im Weiteren kurz Env/V3_{MN}), HXB2 (HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3_{HXB2}, im Weiteren kurz Env/V3_{HXB2}), CDC42 (HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3_{CDC42}, im Weiteren kurz Env/V3_{CDC42}), RF (HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3_{RF}, im Weiteren

kurz Env/V3_{RF}), SF33 (HIV1-Subtyp-C-96zm651-Env/V3_{SF33}, im Weiteren kurz Env/V3_{SF33}), wurden mittels Ko-Transfektion von gag zur Herstellung von gp145-Env/V3-Chimären-Trimer-Gag-VLPs (im Weiteren kurz Env/V3-VLPs) genutzt. In vorherigen Versuchen durch Zimmer et al. konnte bereits gezeigt werden, dass einfache, lösliche gp120 Monomere und komplexere, lösliche gp140 Trimere der o. g. Env/V3-Chimären in MST und ELISA vergleichbare Bindungsaffinitäten zeigten (67).

1.3.3. Zielsetzung

Durch das vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes „KMU Innovativ“ konnte die vorliegende Promotionsarbeit entstehen. Das primäre Ziel des Forschungsvorhabens war es, das Analysespektrum der MST über verschiedene Oligomerisierungs-Niveaus hinweg weiterzuentwickeln und zu erweitern, um Rezeptor-Ligand Interaktionen quantitativ und qualitativ zu charakterisieren und zu verstehen (siehe Abb. 11). Im Rahmen des geplanten Vorhabens soll das technische Potential der evaluierten MST-Technologie vollständig erfasst werden, basierend auf einem Set bereits charakterisierter Varianten des HIV-Hüllproteins und eines ausgesuchten Sets an Modellantikörpern. Dafür wurden die bekannten V3-Loop Varianten HXB2, SF33, MN, CDC42 und RF als gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS) eines HIV1-Subtyp-C-Isolats (96zm651) genutzt. Das Antikörper-Panel bestand aus den rekombinanten monoklonalen Antikörpern 2F5, 5F3, 4E10, 10E8 und 447-52D, bezogen von der Firma Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH. Zunächst wurde der Einfluss des Oligomerisierungs-Grades (gp120 Monomer versus gp140 Trimer) und des umgebenden Mediums (Puffer versus humanes Serum oder Lysat) auf die Messung mittels MST, sowie Referenztechnologien (ELISA, SPR), analysiert und in ein standardisiertes Messverfahren überführt. Anschließend wurden anhand des Modellsystems Rezeptor-Ligand Wechselwirkungen auf Viruspartikeln und kompletten Zellen charakterisiert und hinsichtlich der Aussagekraft mit existierenden Techniken (FACS, ITC) verglichen.

Diese Dissertation umfasst die Herstellung Trimer-besetzter Env/V3-VLPs und untersucht die Möglichkeit die Messung der Ag-Ak-Affinität dieser Env/V3-VLPs gegenüber dem mAb 447-52D in der MST. Dabei werden die Methoden der Affinitätsbestimmung von löslichen Monomeren und Trimeren eines bereits charakterisierten Env/V3-Chimären-Modellsystems auf Virus-Like-Particles (VLPs) skaliert und mit der Referenztechnologie ELISA kontrolliert.

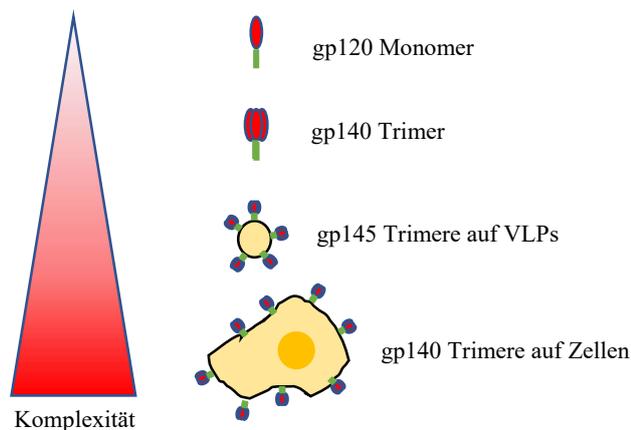


Abbildung 11: Komplexieren des Analysespektrums innerhalb der MST-Etablierung und -Erweiterung der Oligomerisierung zur Affinitätsbestimmung von Ag-Ak-Bindungen, gp120 Monomere bilden die einfachsten, zellpräsentierte gp140 Trimere die komplexesten Moleküle.

Zusätzlich wird im Rahmen des Forschungsprojekts auch der State-Of-The-Art *Env*-Vertreter BG505 SOSIP. zur Erweiterung einer PLA-Nanopartikel Testreihe auf VLPs exprimiert. BG505 SOSIP. zeichnet sich durch eine kovalente und daher deutlich stabilere Verbindung der gp120 und gp41 Moleküle mittels Disulfidbrücke aus. Es konnte gezeigt werden, dass BG505 SOSIP. ebenfalls mehrere breitneutralisierende Antikörper mit hoher Affinität binden konnte (68). Für die weitere Impfstoffentwicklung sind solche stabilen gp140 Trimere von hohem Interesse, da über mehrere Messsysteme, Lösungsmittel und Puffer hinweg die Messdaten vergleichbarer wären und dem nativen Virus ähnliche Strukturen eher bnABs induzieren als gp120 Monomere (69).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Lösungen und Puffer

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Lösungen und Puffer

2 x-Lämmli-Puffer	125 mM Tris; 2 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 1 mM EDTA; 10 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
5 x-Lämmli-Puffer	312,5 mM Tris; 5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 2,5 mM EDTA; 25 % (v/v) Glycerin, 0,005 % (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8
Blocking-Lsg. für ELISA	1 x PBS; 5 % Magermilchpulver;
Blocking-Lsg. für Western-Blot	1 x TBS; 5 % Magermilchpulver;
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium + 4,5 g/l D-Glucose + L-Glutamine + Pyruvate
FreeStyle™ 293	FreeStyle™ 293 + GlutaMAX™
LB Medium	1 % NaCl; 1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; pH 7,5
PBS	10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 140 mM NaCl; 2,7 mM KCl
PEI	PEI-Stocklösung 1:40 mit PEI-Puffer verdünnen; pH 7,5
PEI-Puffer	25 mM HEPES, 150 mM NaCl
Pen/Strep	10000 IE Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml
Protease-Puffer für HIV1 Protease	0,1 M Natriumacetat, 1 M NaCl, 4 mM EDTA, 5 mM DTT, 0,1 % TritonX-100, pH 5,0
Sammelgel (5 % für ein SDS-Gel)	0,33 ml 30 % Acrylamid; 0,4 ml Sammelgel-Puffer; 0,4 ml 0,5 % SDS; 0,86 ml Wasser; 1,7 μ l Temed; 10 μ l APS (10 %)
Sammelgel-Puffer für SDS-Gel	0,625 M Tris-HCl; pH 6,8
SDS-Laufpuffer	6,25 M Tris; 1,92 M Glycin; 1 % SDS (1:10 - Verdünnung)
TBS	150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7.4
Trenngel (12,5% für ein SDS-Gel)	1,25 ml 30 % Acrylamid; 1,2 ml Trenngel-Puffer; 1,2 ml 0,5 % SDS; 2,1 ml Wasser; 5 μ l Temed; 31 μ l APS (10 %)
Trenngelpuffer für SDS-Gel	1,88 M Tris-HCl; pH 8,8
Wasch-Lsg. für ELISA	1 x PBS; 0,05 % Tween 20

Wasch-Lsg. für Western-Blot	1 x TBS; 0,3 % Tween 20
Western-Transfer-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycine, 10% Methanol

2.1.2. Kits

Tabelle 2: Übersicht verwendeter Kits

QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mega Kit	QIAGEN

2.1.3. Vektoren

Tabelle 3: Übersicht über verwendete Vektoren

pQL13_96zm651_gp145 _V3_SF33_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pQL13_96zm651_gp145 _V3_RF_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pQL13_96zm651_gp145 _V3_CDC42_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pQL13_96zm651_gp145 _V3_HXB2_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pQL13_96zm651_gp145 _V3_MN_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pQL13_96zm651_gp145 _V3_BG505_SOSIP_REKS	HIV-1 <i>C-clade</i> Isolat (96zm651), gp140 mit mutierter Schnittstelle (REKS), Austausch des V3-loops	AG Wagner
pcDNA3.1(+)_TeeGag1	HIV-1 <i>B-clade</i> HXB2 T-cell-epitope- enriched Gag, HXB2 Gag mit Austausch von 28 Aminosäuren	AG Wagner

2.1.4. Zellen

Für die Transformation der DNA-Vektoren wurden chemisch kompetente Bakterien vom Typ DH5 α E. coli und DH10B E. coli verwendet.

Tabelle 4: Übersicht verwendeter chemisch Kompetenter Escherichia coli Stämme

DH5α – E. coli	fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ 80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17
DH10B – E. coli	Δ (ara-leu) 7697 adaD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrr-hsdBC)

Als Expressionsmedium für die ausgewählten *Env*-Varianten wurden Freestyle TM 293F Suspensionszellen (humane Ad5/SV40 (T) – transformierte Nierenepithelzellen (ATCC)) verwendet.

2.1.5. Antikörper

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper

2F5	Rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1 gp41 Epitop ELDKWA	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
5F3	Rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1 gp41 Epitop QNQQEKNE	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
4E10	Rekombinanter humaner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1 gp41 Epitop NWFDIT	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
10E8	humaner monoklonaler Antikörper gegen die HIV-1 MPER-Region	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
CB 13/5	muriner monoklonaler Antikörper gegen das HIV-1 gp41 Epitop ELDKWA	AG Wagner
Polyclonal rabbit anti human ab	leporider polyklonaler Antikörper gegen humane γ -Ketten	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH

Polyclonal rabbit anti mouse ab	leporider polyklonaler Antikörper gegen murine γ -Ketten	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
mmAb M01	muriner monoklonaler Antikörper gegen das HIV p24 Epitop GATPQDLNNTML	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
37G12	muriner monoklonaler Antikörper gegen das HIV p24/ p55 Epitop	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH
Streptavidin-HRP	Kovalent an Streptavidin gebundene Meerrettich-Peroxidase	Roche Diagnostics GmbH
447-52D	Humaner monoklonaler Antikörper gegen das Epitop KRIHIGPGRAF des V3-loop von HIV-1 gp120, Isotyp IgG3 (λ)	Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH

2.1.6. Geräte

Tabelle 6: Übersicht verwendeter Geräte

ChemoStar	Intas
Hydroflex ELISA-Plate-Washer	TECAN
Model 680 Mikroplate Reader	Bio-Rad
Nanodrop	Thermo Scientific
Opt L 90 K	Beckman Coulter

2.1.7. Software

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Software

CLC Main Workbench	QIAGEN, Version 7.5
Prism	GraphPad, Version 5.01/8.4.2
FIJI ImageJ	FIJI, Version 1.48(70)

2.1.8. Verbrauchsmaterial und Chemikalien

Sämtliches Verbrauchsmaterial stammt von SARSTEDT, Eppendorf, Merck Millipore und DB Falcon. Verwendete Chemikalien stammen von Carl Roth, Sigma-Aldrich, Prolabo und Heirler. Die Zusammensetzungen verwendeter Pufferlösungen und Zellkulturmedien sind in 2.1.1 aufgelistet.

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Transformation chemisch kompetenter Zellen

Für die Transformation der Plasmid-DNA wurden die in 2.1.5 aufgelisteten *E. coli* Stämme verwendet. Bei den ausschließlich als Re-Trafo angesetzten Varianten wurde je 1 µl der Plasmid-DNA in ein auf Eis aufgetautes 100 µl Aliquot gerührt und für 20 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42 °C, um die DNA in die Bakterien ein zu bringen, gefolgt von zwei Minuten Kühlung auf Eis. Danach wurden 500 µl LB-Medium zum Ansatz gegeben und dieser für 15 Minuten bei 37 °C auf geringster Stufe geschüttelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 3000 g wurden 500 µl Überstand entfernt und der Bodensatz resuspendiert.

Nachfolgend wurden 50 µl auf einen LB_{AMP}-Agar (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) pipettiert, mit einer Einwegöse ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C angezüchtet.

2.2.1.2. Anzucht transformierter *E. coli*

Von den transformierten Stämmen erfolgte nach eintägiger Inkubation die Entnahme einer einzelnen Kolonie und Anlage einer Vorkultur. Dafür wurde die Kultur acht Stunden in 5 ml LB_{AMP} (100 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C und 220 rpm geschüttelt. Anschließend konnte die Vorkultur in 250 ml LB_{AMP} (100 µg/ml Ampicillin) für eine Maxi- bzw. 1000ml LB_{AMP} (100 µg/ml Ampicillin) für eine Mega-Präparation gegeben und erneut bei 220 rpm und 37 °C für 12 Stunden geschüttelt werden.

2.2.2. Zellkultur Techniken

Alle Arbeiten in der Zellkultur fanden unter sterilen Bedingungen in einer Class II Laminar Flow Sterilbank statt.

2.2.2.1. Kultivierung von 293F-Suspensionszellen

Die für die Produktion der Virus-Like-Particles (VLP) verwendeten 293F-Suspensionszellen wurden in 300 ml Freestyle™ Expression Medium (Life Technology) angezüchtet, welches 0,5 % Penicillin und Streptomycin (P/S) enthielt. Die Zellsuspensionen kultivierten in 1 l Polycarbonat Erlenmeyerkolben bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 rpm. Die Zellzahl wurde zwischen 10⁵ Zellen/ml und 2 x 10⁶ Zellen/ml gehalten, um ein optimales Wachstum und eine Verdopplung innerhalb von 24 Stunden zu gewährleisten.

2.2.2.2. Transiente Transfektion der 293F-Suspensionszellen

Für die transiente Transfektion der einzelnen Env/V3-Chimären wurde eine Zellzahl von 10⁶ Zellen/ml eingestellt. Dies geschah durch das Splitten des Ansatzes am Vortag auf 5 x 10⁵ Zellen/ml. Die Zellzahl konnte vor den jeweiligen Arbeitsschritten unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung festgestellt werden.

Zunächst erfolgte ein Mediumswechsel, bei dem die Ansätze fünf Minuten bei 300 g zentrifugierten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit Freestyle™ 293 Expression Medium ohne Antibiotikazusätze schonend resuspendiert und direkt wieder inkubiert. Als Transfektionsansatz wurden zunächst 300 µg DNA und 1,5 ml Polyethylenimin (PEI) in jeweils 6,5 ml Dulbeccos' Modified Eagle Medium (DMEM) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Mix setzte sich aus 200µg *gag*-DNA und 100µg *env*-DNA der jeweiligen Env/V3-Chimäre zusammen. Für die Env/V3_{BG505} SOSIP. mit BG505 SOSIP.-V3-Loop wurde zusätzlich 33µg Furin-DNA transfiziert, um eine ausreichende Prozessierung in den Zellen sicher zu stellen. Anschließend konnten DNA- und PEI-Mix zusammengeführt und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach wurde der Transfektionsansatz zu den 293F-Suspensionszellen gegeben und für sechs Stunden bei 37 °C, 8% CO₂ und 90 rpm inkubiert. Für den folgenden Mediumswechsel wurden die Zellen erneut für fünf Minuten bei 100 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Freestyle™ 293

Expression Medium mit 0,5 % P/S schonend resuspendiert. Für die Expression der VLP wurden die transformierten Zellen 48 Stunden bei 37 °C, 8 % CO₂ und 90 rpm geschüttelt (71,72).

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung der durch Transformation chemisch resistenter E. coli gewonnenen DNA-Plasmide erfolgte mittels QIAGEN Plasmid Maxi-Kit (QIAGEN) und QIAGEN Plasmid Mega-Kit (QIAGEN). Es wurde streng nach Hersteller-Protokoll gearbeitet und anschließend am Nanodrop bei $\lambda = 260$ nm quantifiziert.

2.2.4. Methoden zur VLP-Gewinnung und Aufreinigung

2.2.4.1. Ernten der VLPs aus dem Zellkulturmedium

Die Zellkulturansätze der jeweiligen Env/V3-Chimären-VLPs wurden zunächst in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei 4 °C und 3000g 15 Minuten lang vorzentrifugiert, um die Zellen als Bodensatz abzutrennen. Anschließend wurden 32 ml Überstand in ein 38,5 ml Ultrazentrifugen Röhrchen (UZ-Röhrchen) der Firma Beckman Coulter überführt und mit fünf Milliliter einer PBS ohne Lösung unterschichtet, die 30 % Saccharose enthielt. Die jeweiligen Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C mit entsprechend vorgekühlten Lösungen. Die sechs UZ-Röhrchen der Env/V3-Chimären-VLPs wurden sofort für zwei Stunden bei 4 °C und 99.000 g zentrifugiert. Danach wurde der gesamte Überstand aus den Röhrchen vorsichtig mittels einer Pasteur-Pipette abgesaugt und das Pellet mit 400 μ l PBS ohne bei 4 °C über Nacht resuspendiert (73,74).

2.2.4.2. Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten

Die resuspendierten Env/V3-Chimären-VLPs wurden des Weiteren über einem Saccharose-Gradienten aufgereinigt. Dazu wurde in 13,5 ml UZ-Röhrchen der Firma Beckman Coulter ein Gradient pipettiert, der pro Phase 2ml einer 10 – 50 % Saccharose Lösung enthielt. Die einzelnen Phasen unterschieden sich um jeweils 10 % (siehe Abbildung 13). Die gesamten 2,4 ml Env/V3-Chimären-VLP-Suspension wurden vorsichtig aufgetragen und wiederum sofort für 2,5 Stunden bei 4 °C und 99.000 g zentrifugiert. Anschließend wurden 23 -24 Fraktionen a 550 µl abgetragen und jeweils in 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert. Alle Cups wurden auf Eis inkubiert, während 10 µl jeder Fraktion mit 2,5 µl 5-fach Lämmli-Puffer aufgeköcht und anschließend mittels Elektrophorese auf einem 12,5 % Acrylamidgel aufgetrennt wurden. Nach Anfärben der Gele mit Coomassie-Blue Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser, wurden 500 µl der Fraktionen mit den stärksten 55 kDa Banden gepoolt. Dazu wurde ein 38,5 ml UZ-Röhrchen mit den entsprechenden Fraktionen auf 35 ml mit PBSohne aufgefüllt. Dies diente einerseits zum Zusammenführen der Env/V3-Chimären-VLPs, andererseits zum Auswaschen der Saccharose (74).

Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 99.000 g für zwei Stunden wurde der Überstand mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und das Pellet mit 400 µl einer 15 % Trehalose enthaltenden PBSohne-Lösung über Nacht bei 4 °C schonend resuspendiert. Am nächsten Tag erfolgte die Aliquotierung der Suspension in 10 µl Volumen in PCR-Cups und die dauerhafte Aufbewahrung bei -80 °C (75).

2.2.5. Proteinbiochemische Methoden

2.2.5.1. Bestimmung der Gag-Menge mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Definierte Mengen Bovines Serum Albumin (BSA) wurden für fünf Minuten bei 95 °C mit Mercaptoethanol-haltigem Reduktionspuffer gekocht und anschließend auf ein 12,5 %-iges Natriumdodcylsulfat-Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Standardmengen wurden 1.25 – 0,078 µg/µl BSA in

zweifachen Verdünnungsschritten hergestellt und jeweils 1 µl aufgetragen. Die Env/V3-Chimären-VLP-Suspensionsproben wurden ebenfalls mit reduzierendem Puffer behandelt und aufgekocht. Pro Probe wurden 3 µl verwendet. Anschließend wurde für zehn Minuten mit Coomassie-Blue Färbelösung gefärbt und mit Wasser entfärbt. Die Gele wurden gescannt und mit dem Programm FIJI ImageJ ausgewertet. Dabei kam die „Area under the Curve“ Methode zum Einsatz, bei der suprabasale Extinktionswerte mit den eingesetzten BSA Mengen verknüpft wurden. Die so entstandene Standardgerade wurde zur Berechnung der Proben verwendet.

2.2.5.2. Bestimmung der Gag-Menge mittels ELISA und p24-Standard

Der p24 Quantifizierungs-ELISA wurde in 96-WELL NUNC Platten durchgeführt. Pro Well wurden zunächst mit 250ng M01-Antikörper, in 100 µl 0,1 M NaCO₃ über Nacht bei 4 °C gecoatet. Der p24-Standard wurde als zweifache Verdünnungsreihe hergestellt und enthielt zwischen 0,25 und 0,004 ng pro Well. Die Env/V3-Chimären-VLP-Suspensionsproben wurden zunächst 1:50 in HIV-1 Protease Puffer mit 0,1 % TritonX-100 verdünnt und für 30 Minuten lysiert. Danach wurde HIV-Protease zugegeben und das freigewordene p55 (teeGag1) für 30 Minuten prozessiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt und die Protease inaktiviert (20 Minuten bei 53 °C inkubiert) (76). Es wurden Verdünnungen in PBS mit 1 % BSA von 1:1000 bis 1:100000 angefertigt und jeweils 100 µl Probe und Standard pro Well für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl des Antikörpers 37G12, 1:10000 in PBS mit 1 % BSA verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur, gefolgt von einer Inkubation mit 100 µl 1:10000 in PBS mit 1 % BSA verdünntem Streptavidin-HRP für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Zur Detektion wurden die Wells mit 100 µl TMB-Entwickler-Lösung für 90 Sekunden inkubiert und mit 50 µl 0,1 M H₂SO₄ gestoppt. Zwischen allen Inkubationsschritten erfolgte eine Reinigung der Wells mit dem TECAN-Hydroflex ELISA-Plate-Washer, bei der PBS mit 0,5 % Tween zum Einsatz kam. Die Extinktionsmessung erfolgte am ELISA-Plate-Reader bei 450nm Wellenlänge.

2.2.5.3. Bestimmung der Env-Menge mittels Slot-Blot

Als Standard wurde lösliches gp140 Trimer der 96zm651/V3_{HXB2}-Chimäre gewählt und zwischen 7 und 0,06 ng pro Slot verwendet. Von den Env/V3-Chimären-VLP-Proben wurden zwischen 0,25 und 2 µl eingesetzt. Die einzelnen Verdünnungen wurden mittels einer Vakuumpumpe auf eine 0,45 µm porige Nitrozellulose-Membran gesaugt und anschließend über Nacht bei 4 °C mit 5 % Magermilchpulver in TBS geblockt. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion über den gp41-Antikörper-Mix (10E8, 2F5, 4E10, 5F3) und anschließend Maus-Anti-Menschen Antikörper. ECL-Entwicklerlösung wurde für drei Minuten bei Raumtemperatur angeboten und die Membran danach im INTAS ChemoStar gemessen. Über Area-under-the-Curve Methode wurde eine Standardgerade erstellt und zur Berechnung der Probenmenge genutzt.

3. Ergebnisse

3.1. Produktion und Charakterisierung der Env/V3-Chimären-VLPs aus HEK293F Zellen

3.1.1. Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten

Die mit Env/V3-Chimären env und teeGag1 gag ko-transfizierten Zellen wurden zunächst für 5 Minuten bei 4 °C und 3000 U/min in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und der VLP-enthaltende Überstand durch Ultrazentrifugation auf einem 30 % Saccharose Kissen von Zelldebris getrennt. Dafür wurde der Überstand in einem UZ-Röhrchen überführt und mit 30 %iger Saccharose unterlegt. Daraufhin erfolgte die Pelletierung bei 28.000 Umdrehungen pro Minute (U/min, entspricht ca. 99.000 g) und 4 °C für 2 Stunden. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das VLP-Pallet bei 4 °C in 500 µl PBS/ohne über Nacht schonend resuspendiert. Anschließend erfolgte eine dichteabhängige Auftrennung über einen 10 % – 50 % Saccharose-Gradienten (siehe Abbildung 12). Die anschließend nacheinander entnommenen 550µl Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie Färbung auf ihren p55 Gehalt analysiert und die Fraktionen mit den stärksten Banden vereinigt.

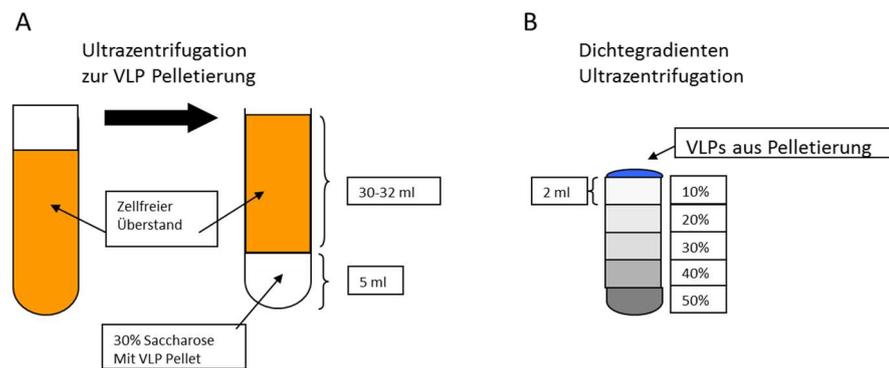


Abbildung 12 Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten. A) Schematische Abbildung der VLP-Aufreinigung über einem 30 %-igem Saccharose-Kissen mittels Ultrazentrifugation bei 4 °C und 99.000 g für 2 Stunden. B) Dichtegradient der Saccharose-Lösungen. Es wurden ein Dichtegradient aus 2 ml Saccharose-Lösungen, die sich jeweils um 10 % unterscheiden, hergestellt und das, in 400 µl PBS/ohne resuspendierte VLP-Pellet, bei 4 °C und 99.000 g für 2,5 Stunden zentrifugiert.

Retrospektiv wurden Übersichts-Western Blots angefertigt, um ein gleichzeitiges Vorhandensein von Env/V3-Chimären und Gag festzustellen. Dafür wurde die Blots horizontal geteilt und die gp145 Banden durch einen gp41-Antikörper-Mix (2F5, 5F3, 4E10, 10E8), die p55 Bande durch einen Anti-Gag-Antikörper (cb13/5) detektiert. Es zeigten sich bei allen ko-transfizierten Konstrukten auch ko-lokalisierte Signale von Gag und Env in den Fraktionen waren, die vorher zur Weiterverarbeitung vereinigt wurden. Es wurden Kontrollpartikel angefertigt, die nur mit Env/V3_{SF33} bzw. Gag (teeGag1) transfiziert, ebenfalls über Western Blot analysiert. In der mit Env/V3_{SF33} transfizierten Kontrolle zeigte sich kein Signal in der p55-Bande und lediglich ein schwaches Signal in der gp145-Bande über mehrere Fraktionen hinweg. Dies ist vermutlich durch Exosomen zu erklären, die in Dichte und Größe mit den VLPs übereinstimmen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Signale der p55-Bande auf Gag zurückzuführen sind.

Bei den nur mit Gag transfizierten Zellen zeigen sich starke p55-Banden, jedoch keine Signale auf Höhe der gp145-Banden. Somit ist davon auszugehen, dass die Signale auf der gp145-Bande auf die jeweiligen Env/V3-Chimären zurückzuführen sind. Ein Auszug der Western-Blots ist in Abbildung 13 A –

13 C zu finden. Außerdem wurden von allen Fraktionen mittels Wiegen der leeren und gefüllten Eppendorf-Cups die Dichte bestimmt. Es zeigte sich, dass alle relevanten Fraktionen zwischen 1,11 und 1,18 g/cm³ lagen (siehe Abbildung 13 D). Diese Werte liegen im Einklang mit bereits publizierten Daten (58).

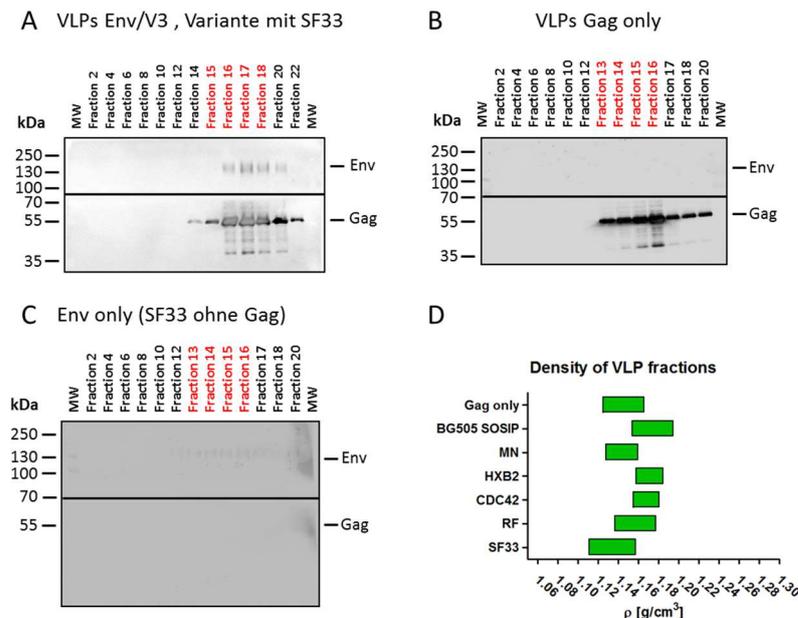


Abbildung 13: Ergebnis einer VLP-Aufreinigung über Dichtegradienten-Ultrazentrifugation; A) Fraktionen der VLPs, bei denen eine Env/V3_{SF33} und Gag ko-transfiziert wurden; B und C zeigen die Fraktionen der Negativkontrollen bei denen nur Gag bzw. Env/V3_{SF33} transfiziert wurde. Der Nachweis der Env/V3-Chimären (obere Hälfte des Blots) und Gag (untere Hälfte des Blots) erfolgte mittels spezifischer Antikörper (siehe 3.1.1). Die für weitere Experimente vereinigten Fraktionen sind rot markiert. D) Analyse der Dichte der vereinigten VLP-Fraktionen. Alle relevanten Fraktionen liegen zwischen 1,11 – 1,18 g/cm³.

3.1.2. Bestimmung der Gag-Menge

3.1.2.1. Gag-Quantifizierung über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Als erstes wurde eine Gag-Bestimmung mittels eines BSA-Standards durchgeführt. Dazu wurden definierte Mengen an BSA und Env/V3-Chimären-VLP-Suspension auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der anschließenden Färbung mit Coomassie Blue Färbelösung zeigten sich entsprechend starke Banden in den BSA-Bahnen, die mit dem Programm FIJI ImageJ und der „Area under the curve“-Analyse zu einer

Standard-Geraden verarbeitet wurden. Anschließend wurden die p55-Banden der einzelnen Konstrukte vermessen und deren Gag-Menge bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 14 A gezeigt.

3.1.2.2. Gag-Quantifizierung über p24 ELISA

Für die Bestimmung der Gag Mengen über ELISA wurde kommerzielles p24 als Standard gewählt und eine Verdünnungsreihe erstellt. Die Env/V3-Chimären-VLPs wurden zunächst mit TritonX-100 lysiert und anschließend mit HIV1-Protease prozessiert, um p24 aus p55 abzuspalten. Die Detektion erfolgte über Inkubation mit Anti-p24-Antikörper 37G12 und Streptavidin-gebundener Peroxidase. Die Signale der p24-Standard Verdünnungsreihe wurden zu einer Standardgeraden verrechnet und die Konstrukte per Faktor bestimmt. Die ermittelten Konzentrationen sind in Abbildung 14 B gezeigt.

3.1.2.3. Vergleich der Gag Quantifizierung

Der Vergleich der beiden Quantifizierungsmethoden zeigt eine gleiche Verteilung der Gag-Mengen. Diese unterscheiden sich in der Höhe der Konzentrationen, korrelieren jedoch direkt miteinander. Da die Quantifizierung über p24 ELISA wesentlich spezifischer ist, wurden für die weiteren Experimente eingesetzte Volumina anhand der ELISA-bestimmten Konzentrationen berechnet.

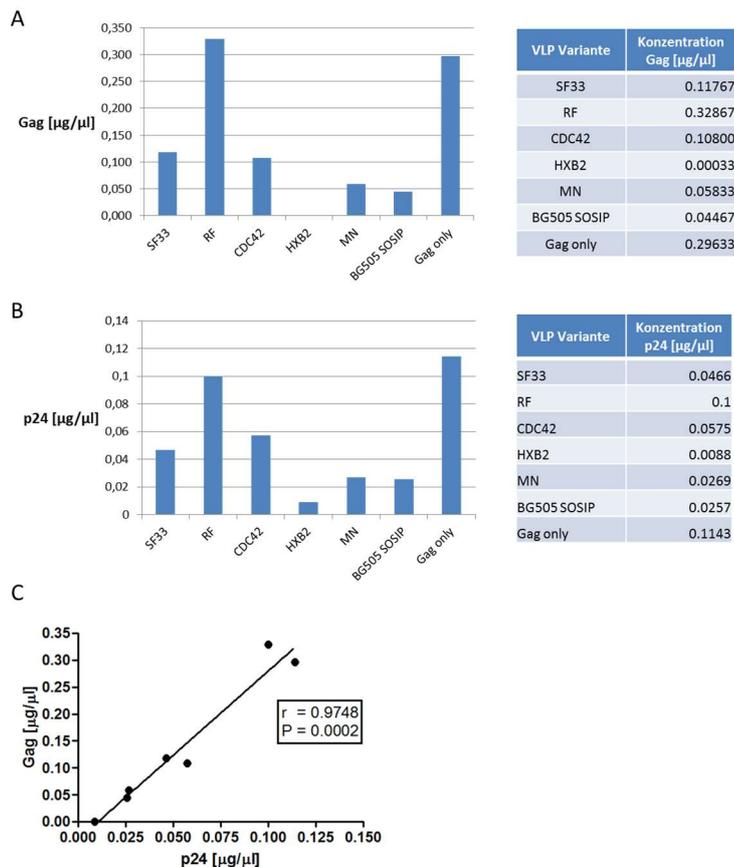


Abbildung 14: Quantifizierung der Env/V3-Chimären-VLPs über SDS-PAGE und p24-ELISA. A) In einer FIJI ImageJ Analyse wurde die Bandenintensitäten des BSA-Standards für die Generierung einer Standardgeraden herangezogen, über welche die Gag-Menge in den Env/V3-Chimären-VLPs ermittelt wurde; B) Für die ELISA-Quantifizierung wurde eine Standardgerade mittels p24-Standard erstellt und die Messergebnisse der prozessierten Env/V3-Chimären-VLPs per Faktor berechnet ; C) zeigt eine mit GraphPad Prism erstellte Korrelationsanalyse, bei der die p24-Werte aus dem p24-ELISA mit den Gag-Werten aus den p55-Banden der SDS-PAGE Titration korreliert wurden.

3.1.3. Bestimmung der Env Menge

3.1.3.1. Env Quantifizierung mittels Slot-Blot-Methode

Im nächsten Schritt wurde überprüft, wieviel Env in den jeweiligen Env/V3-Chimären-VLPs enthalten ist. Die Quantifizierung der Env-Menge erfolgte über eine Slot Blot Titration. Im Slot Blot wurden definierte Mengen eines Standardproteins (lösliches gp140 Trimer, Env/V3_{HXB2}) und Proben der Env/V3-Chimären-VLPs eingesetzt. Der Nachweis von Env erfolgte mittels gp41-spezifischer Antikörper (10E8, 2F5, 4E10, 5F3). In einer FIJI ImageJ

Analyse wurden die Bandenintensitäten des Standards für die Generierung einer Standardgeraden herangezogen. Über diese wurde die Env-Menge in den Env/V3-Chimären-VLPs ermittelt (siehe Abbildung 15). Es zeigt sich, dass alle Env/V3-Chimären, außer Env/V3_{HXB2}, im gleichen Wertebereich liegen.

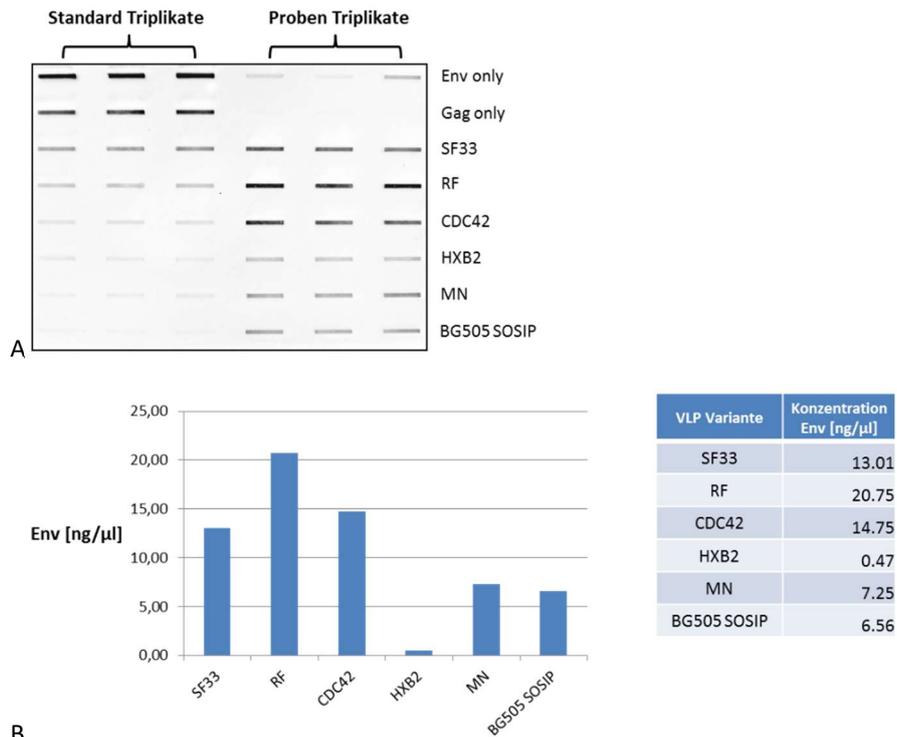


Abbildung 15: Slot-Blot Titration zur Quantifizierung der Env Menge auf den Env/V3-Chimären-VLPs. A) Slot-Blot mit Standard- und Proben triplikaten. Als Standard wurde lösliches gp140-Env/V3_{HXB2}-Trimer in unterschiedlichen Verdünnungsstufen verwendet; B) zeigt die semiquantitativ berechnete Env Menge, die in den Env/V3-Chimären-VLPs ermittelt wurde.

3.1.4. Korrelation der Env Mengen mit den Gag Mengen aus SDS-PAGE und p24-ELISA

Die Bestimmung der Env-Mengen in den einzelnen Env/V3-Chimären-VLPs zeigt das gleiche Verteilungsmuster, welches schon bei der Gag-Bestimmung beobachtet wurde. Um dies zu verifizieren, wurden Slot-Blots generiert, in denen gleiche Mengen Gag für alle Env/V3-Chimären-VLPs eingesetzt wurden. Für die SDS-PAGE bestimmten Konzentrationen wurden 200 ng Gag eingesetzt, für die p24-ELISA bestimmten Konzentrationen 50 ng Gag.

Anschließend wurden die Bandenintensitäten der Env/V3-Chimären-VLPs mit FIJI ImageJ berechnet und verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Werte von Gag mit denen von Env korrelieren. Es wurde für beide Gag-Bestimmungsmethoden ein $r > 0,9$ erzielt. P liegt mit 0,001 für den p24-ELISA bzw. 0,01 für die SDS-Page im plausiblen Bereich. Die Env/V3-Chimären-VLPs scheinen also gleiche Mengen an Env auf ihren VLPs zu besitzen (siehe Abbildung 16).

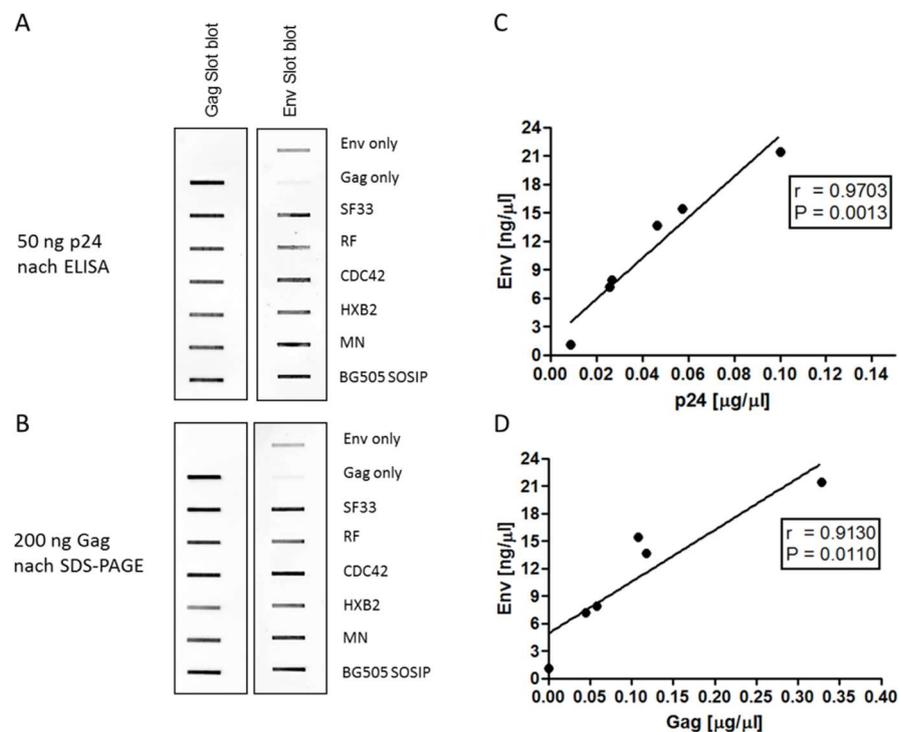


Abbildung 16: Korrelation zwischen Gag-Menge und Env-Menge auf VLPs. Gezeigt sind Slot-Blots, bei denen gleiche Mengen der Env/V3-Chimären-VLPs geladen wurden; A: 50 ng Gag nach p24 Quantifizierung, B: 200 ng Gag nach SDS-PAGE Quantifizierung. Mittels spezifischer Antikörper wurden Gag (links) und Env (rechts) nachgewiesen. C und D zeigen mit GraphPad Prism erstellte Korrelationsanalysen bei der die Gag-Mengen aus dem p24-ELISA bzw. Gag-Mengen aus der SDS-Titration mit den Env-Mengen aus der Slot-Blot Titration korreliert wurden.

3.1.5. Berechnung der Env/V3-Chimären-Trimer-Anzahl der VLP-Oberfläche

Durch die errechneten Werte der Env- und Gag-Konzentration konnte nun auch die theoretische Anzahl an Env/V3-Chimären-Trimeren pro VLP semiquantitativ berechnet werden.

Aus verschiedenen Quellen ist bekannt, dass die Anzahl an Gag-Molekülen stark mit der Größe der VLPs korreliert. Anhand von EM Bildern aus einer Arbeit von Meier et al. (58), konnte für das hier eingesetzte teeGag1 eine VLP-Größe von ca. 100 nm und eine Gag-Molekülzahl von 2100 angenommen werden. Das Molekulargewicht der einzelnen Env/V3-Chimären wurde eingesetzt, um die Anzahl an Trimeren pro μ l Suspension zu errechnen. Ebenso erfolgte die Berechnung der Anzahl an Gag-Molekülen pro μ l Suspension und die daraus resultierende VLP-Menge. Somit ergaben sich ähnliche Trimer/VLP-Zahlen, die alle in einem physiologisch plausiblen Bereich liegen (siehe Abbildung 17).

VLP Variante	Trimere/VLP
SF33	139
RF	108
CDC42	128
HXB2	52
MN	132
BG505_SOSIP.	126

A

B

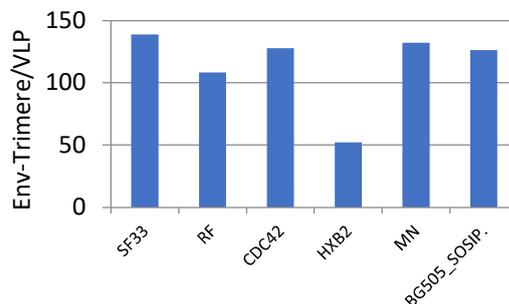


Abbildung 17: Env-Trimer-Anzahl auf den hergestellten Env/V3-Chimären-VLPs. A: Zeigt die Anzahl von Env-Trimeren pro VLP berechnet aus dem Verhältnis von Gag und Env Molekülen, unter der Annahme, dass ein VLP aus 2100 teeGag1-Molekülen besteht. B: Das Säulendiagramm veranschaulicht, dass alle Env/V3-Chimären-VLPs, außer Env/V3_{HXB2}, eine ähnliche Trimer-Anzahl pro VLP besitzen.

3.2. Antigen-Antikörper-Affinitätsmessung der Env/V3-Chimären-VLPs gegen mAb 447-52D

3.2.1. Quantifizierung mittels ELISA

Durchgeführt wurde ein direkter ELISA, bei dem ein zugeführter enzymatisch-markierter Antikörper an das Antigen bindet und infolgedessen die Umsetzung

eines Substrates in ein farblich messbares Produkt stattfindet. Die Antigen-Antikörper-Affinitätsmessung der Env/V3-Chimären-VLPs gegen mAb 447-52D erfolgt im ersten Teil der Versuchsreihe. Um eine Vergleichbarkeit bei der Quantifizierung der Env/V3-Chimären-VLPs durch die MST-Messung zu ermöglichen, wird das bereits etablierte labordiagnostische Verfahren des ELISA der MST gegenübergestellt. Zur Determinierung der k_D -Werte der Bindungsaffinität des Antikörpers 447-52D wurden die einzelnen Env/V3-Chimären-VLPs so in PBS verdünnt, dass 25 ng Env in 50 μ l bei 4 °C über Nacht auf 96-Well NUNC MaxiSorp gecoatet wurden. Nach dem Blocken mit 5 % Magermilchpulver in PBS erfolgte die Inkubation mit 50 μ l mAb 447-52D in absteigender Molarität vom 1000 – 0,001 nM für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur Detektion wurde Maus-Anti-human-IgG-Antikörper gekoppelte HRP genutzt. Die Entwicklung erfolgte über vier Minuten mit TMB-Entwicklerlösung, abgestoppt durch 0,1 M H_2SO_4 . Die Messung erfolgte bei einer Absorption von 450 nm am ELISA plate reader (siehe Abbildung 18).

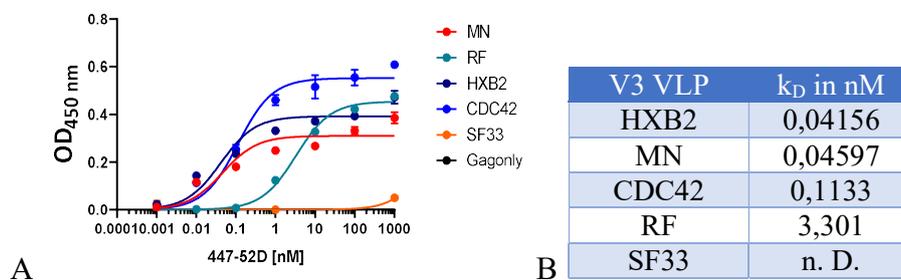


Abbildung 18: Ag-AK-Affinitäts-ELISA der Env/V3-Chimären-VLPs gegen mAb 447-52D. A) mAb 447-52D wurde in absteigender Molarität von 1000 mM bis 0,001 mM angeboten. Anschließend wurde Maus-Anti-human-IgG-Antikörper gekoppelte HRP angeboten und mittels TMB-Entwicklerlösung ein Signal produziert und bei 450 nm gemessen. Die Auswertung der Messwerte und die k_D -Berechnung erfolgte durch GraphPad Prism B) Ranking der k_D -Werte in absteigender Reihenfolge. Env/V3_{HXB2} weist den geringsten k_D -Wert gegenüber mAb 447-52D, gefolgt von Env/V3_{MN}, Env/V3_{CDC42} und Env/V3_{RF}. Für Env/V3_{SF33} konnten kein valider k_D -Wert bestimmt werden.

3.2.2. Quantifizierung mittels Microscale-Thermophorese

Die für diese Arbeit hergestellten Env/V3-Chimären-VLPs gleichen, durch die Abspaltung mittels Gag aus eukaryonten Zellen, der nativen Virusoberfläche in Aufbau und Konfiguration. Um eine möglichst genaue Aussage über die Bindungseigenschaften der Env/V3-Chimären-VLPs zum eingesetzten mAb 447-52D zu treffen, die auch prädiktive Schlüsse auf die Entstehung von bnABs *in vivo* zulässt, müssen die Messumgebung und eingesetzten Materialien möglichst physiologisch gewählt werden. Durch den mehrschichtigen Aufbau der VLPs könnte es bei Bindung an die feste Phase, zum Beispiel eines Wells für die ELISA-Messung, zur Veränderung des komplexen VLP-Aufbaus und somit auch der Env-Konfiguration kommen. Wie bereits in Punkt 1.3.1. erwähnt, findet die Messung mittels MST in Lösung statt und nicht durch vorherige Bindung an eine Trägeroberfläche. Dies hat den Vorteil, dass eventuelle Konformitätsänderungen der bnABs-Zielstrukturen vermieden werden können. Zudem können die Messungen in Puffern oder Serum stattfinden, um mögliche Interaktionen der VLPs mit Plasmaproteinen zu erkennen.

Die Messung der Ag-Ak-Affinität zwischen den hergestellten Env/V3-Chimären-VLPs und dem mAb 447-52D erfolgte durch die 2bind molecular interactions GmbH. Dafür wurden die Env/V3-Chimären-VLPs mit dem Fluoreszenz-Farbstoff DY-647p1 gelabelt und der mAb 447-52D titriert. Durch die Wahl des Antikörpers als Titrant konnte eine genauere Quantifizierung der eingesetzten Bindungspartner erreicht werden als durch Titration der semiquantitativ gemessenen VLP-Mengen. Es erfolgten Messungen in reinem HBS-EP Puffer und einer Mischung aus 50 % HBS-EP Puffer und 50 % humanem Serum. Die LED-Stärke des Infrarot-Lasers betrug 2-20 % bei Messung im HBS-EP Puffer und 10-20 % im HBS-EP/Humanserum Mix. 447-52D wurde im HBS-EP Puffer von 55 pM bis 1803 nM titriert, im HBS-EP Puffer/Humanserum Mix von 27 pM bis 900 nM.

Im Versuchsaufbau wurde zunächst für fünf Sekunden das Fluoreszenz-Signal in einem definierten Beobachtungsareal gemessen, bevor der Laser aktiviert wurde. Mit Aktivierung des IR-Lasers kommt es zu einer abrupten Signalverminderung der Fluoreszenz-Messung, dem sogenannten *Temperature-Jump* (T-Jump). Dieser ist durch die herabgesetzte Quantenemission des Fluoreszenz-Farbstoffes infolge der Temperaturveränderung zu erklären. Anschließend kommt es durch den aufgebauten Temperaturgradienten zur forcierten Abwanderung der Moleküle aus dem Beobachtungsfenster. Nach 30 Sekunden und Erreichen eines stabilen Fluoreszenz-Signals wurde der Laser deaktiviert und es kam zur spontanen Rückdiffusion, einer T-Jump Umkehr und somit dem erneuten Signalanstieg.

4. Diskussion

4.1. Herstellung und Quantifizierung der Env/V3-Chimären beladenen Gag-VLPs

Diese Arbeit bewegt sich im Rahmen der Etablierung der Ag-Ak-Affinitätsbestimmung mittels Microscale Thermophorese und der Auslotung möglicher Messgrenzen dieses Systems. Im Zuge dessen wurde in vorherigen Versuchsreihen die Antigenstruktur von einfachen, löslichen gp120 Monomeren über lösliche gp140 Trimere zu komplexeren, partikelgebundenen VLPs skaliert. Dazu diente, wie in 1.3.2. beschrieben, eine bereits durch Gorny et al. charakterisierte Env-Modelreihe und eine Gruppe monoklonaler Antikörper mit bekannter Affinität zu den eingesetzten Env-Varianten.

Es gelang durch die transiente Transfektion von HEK 293F Zellen Virus-Like-Particles herzustellen, bei denen sowohl Env (Env/V3-Chimären), als auch Gag (teeGag1) nachgewiesen werden konnten. Die Aufreinigung der VLPs über ein Saccharose-Kissen und -Gradienten wurde durchgeführt, um zellrestfreie VLP-Suspensionen zu erzeugen. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, das Exosomen, die in Größe und Dichte den Env/V3-Chimären-VLPs entsprechen, ebenfalls in den vereinigten Fraktionen enthalten sind. Dafür sprechen geringe Signale bei den Western Blots zum Env-Nachweis ohne Gag-Transfektion.

Durch die Vereinigung der mittels SDS-Page bestimmten, relevanten Fraktionen, konnten die Env/V3-Chimären-VLPs mit dem stärksten Gag-Nachweis zur weiteren Testung verwendet werden. Ein Einschluss der Env/V3-Chimären beladenen Exosomen sollte somit keine Relevanz besitzen.

Die Ausbeute an geernteten Env/V3-Chimären-VLPs zeigte unterschiedliche Mengen zwischen den Env/V3-Chimären. Dies könnte zum einen an Qualitätsschwankungen in der eingesetzten DNA liegen, andererseits auch den HEK-293F Kulturen geschuldet sein, die als anspruchsvolle, empfindliche Lebendkultur nicht immer gleich auf transiente Transfektion reagieren. Es wurden jedoch für alle Env/V3-Chimären ausreichende Mengen VLPs gewonnen, die nach ihrer Charakterisierung vergleichbare Mengen an Gag und Env/V3-Chimären pro VLP enthielten. Vor allem bei Env/V3_{HXB2} zeigte sich, trotz mehrfacher wiederholter Transfektion und Herstellung der Env/V3-Chimären-Gag-VLPs, eine niedrige Anzahl an aufgereinigten VLPs in den vereinigten Fraktionen. Ob diese spezielle Chimäre sich weniger für die VLP-Expression in Säugerzellen eignet, muss durch zukünftige Experimente noch abgeklärt werden.

4.2. Env/V3-Trimer-Oberflächenexpression der produzierten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs

Native HI-Viren präsentieren auf ihrer Oberfläche durchschnittlich 7-14 Env-Trimere (77). Durch semiquantitative Berechnung der Env/V3-Chimären-Konzentration und Gag-Konzentration pro μl Env/V3-VLP-Suspension konnte die Anzahl der Env/V3-Trimere pro VLP bestimmt werden. Die semiquantitative Berechnung der Trimer-Anzahl von Env/V3-Chimären pro Virus-Like-Partikel ergab durchschnittlich 130 Trimere/VLP. Diese Anzahl liegt in einem plausiblen Bereich hinsichtlich einer besseren Expression der eingesetzten gp145 Env/V3-Chimären gegenüber nativen gp160 Molekülen (78). Auch hier stach Env/V3_{HXB2} wieder durch eine erniedrigte Expression hervor, wie die deutlich unterschiedlichen Werte in der Berechnung zeigen. Für alle Env/V3-Chimären wurden ausreichend Trimer-besetzte VLP produziert,

um eine valide Messung sowohl im ELISA als auch in der MST zu erreichen. Insgesamt ergab sich eine direkte Korrelation zwischen Env und Gag Menge der Env/V3-Chimären-VLPs mit einem r von 0,91. Es konnte gezeigt werden, dass die hergestellten Env/V3-Chimären-VLPs untereinander in Bezug auf Größe und Env-Beladung vergleichbar sind. Somit konnten für die weiteren Messungen geeignete VLPs hergestellt und für die Analyse im MST genutzt werden.

4.3. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp120 Monomeren und gp140 Trimeren im ELISA

Zur Etablierung und Erweiterung des Analysespektrums der MST wurden die Reaktionspartner der Ag-Ak-Affinitätsbestimmung aufsteigend oligomerisiert (67,79). Nach einfachen gp120 Monomeren und komplexeren gp140 Trimeren der hier eingesetzten Env/V3-Chimären, erfolgte nun die Messung von Gag-VLP-präsentierten gp145 Env/V3-Trimeren. Zum Vergleich wurde die Affinität der Env/V3-Chimären-VLPs zum mAb 447-52D mittels ELISA bestimmt. Dafür erfolgte das Coating der VLP in PBS auf 96-Well NUNC MaxiSorp Platten. Als Referenzmenge der jeweiligen Env/V3-Chimären-VLPs wurden 25 ng Env entsprechend der vorher bestimmten Slot-Blot-Titration gewählt. Die Wahl von mAb 447-52D als Titrant ermöglichte eine genauere Quantifizierung der eingesetzten Bindungspartner als durch Titration der semiquantitativ gemessenen VLP-Mengen. Die extrapolierten K_D -Werte zeigen die beste Bindung an die Env/V3-Chimären Env/V3_{MN}> Env/V3_{HXB2}> Env/V3_{CDC42} und eine schlechtere Bindung an Env/V3_{RF}. Env/V3_{SF33} und die Negativkontrolle mit leeren Gag-VLPs zeigten keine Bindung an 447-52D. Somit können die unterschiedlichen Werte auf die jeweiligen Env/V3-Chimären zurückgeführt werden. Insgesamt zeigte Env/V3_{CDC42} das stärkste Messsignal, gefolgt von Env/V3_{RF}, Env/V3_{HXB2} und Env/V3_{MN}.

Die gemessenen K_D -Werte des VLP-ELISA sind mit den Ergebnissen der vorherigen Versuchsreihen vergleichbar. Bei den löslichen gp120 Monomeren der eingesetzten Env/V3-Chimären zeigte sich die Affinitätsreihenfolge

Env/V3_{MN}> Env/V3_{HXB2}> Env/V3_{CDC42} mit fehlender oder nur unzureichender Bindung zu Env/V3_{SF33} und Env/V3_{RF}. Anschließend erfolgte die Messung von löslichen gp140 Trimeren durch Zimmerer et al. Die Messung der löslichen gp140 Trimere der Env/V3-Chimären ergab insgesamt k_D -Werte in gleicher Größenordnung zu den k_D -Werten der Env/V3-Chimären-VLPs und ebenfalls die gleiche Affinitätsreihenfolgen. Insgesamt zeigte sich über die Skalierungsreihe hinweg eine stetige Verbesserung der k_D -Werte, zunächst von gp120 Monomeren zu gp140 Trimeren und nun erneut bei den VLP präsentierten gp145 Env/V3-Trimeren. Dies könnte der zunehmenden Komplexität und damit einhergehenden Stabilisierung des präsentierten Antigens geschuldet sein. Außerdem kann gesagt werden, dass VLPs, neben den gp145 Trimeren, zusätzliche zelluläre Bestandteile und Oberflächenproteine der Wirtszellmembran besitzen, die eine Markierung mit dem eingesetzten Fluoreszenzfarbstoff erleichtern.

4.4. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp140-besetzten Zellen

Eine durch Bruun et al. durchgeführte Versuchsreihe zur Antikörper-basierten fluoreszenzgesteuerten Zellsortierung (fluorescence-activated cell sorting, FACS) von gp145 Env/V3-Trimeren präsentierenden Säugerzellen nutzte ebenfalls die hier verwendeten Env/V3-Chimären (66). MN-, HXB2-, CDC42-, RF- und SF33-V3-Schleifen wurden im HIV C-Subtyp 96ZM651 V3-Loop substituiert und mittels pQL13-Plasmiden in FlpInTM T-RExTM 293F Zellen transferiert. Die so entstanden stabilen HEK 293F Zelllinien wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Bindungsaffinität zu mAb 447-52D getestet. Die berechneten k_D -Werte der einzelnen Zellreihen gleichen der zuvor beschriebenen Reihenfolge der gp120 Monomere und gp140 Trimere. Env/V3_{MN} zeigte die deutlich beste Affinität, gefolgt von Env/V3_{HXB2} und Env/V3_{CDC42}. Env/V3_{RF} zeigte nur eine schwache und Env/V3_{SF33} keine Bindung zu 447-52D. Die einheitlichen Messergebnisse zeigen eine Vergleichbarkeit zwischen den löslichen Env/V3-Monomeren bzw. -Trimeren, membrangebundenen Env/V3-Chimären auf Säugerzellen und VLPs. Somit

kann davon ausgegangen werden, dass die Env/V3-Chimären-VLPs sich zur weiteren Messung im MST eignen.

Tabelle 8: Übersicht über die k_D -Werte der eingesetzten Env/V3-Chimären über unterschiedliche Komplexitätsniveaus gegenüber dem mAb 447-52D im ELISA und FACS (Zell-präsentierte gp145 Trimere)

<i>Env/V3-Chimäre</i>	V3-Varianten	gp120 Monomere	gp140 Trimere	VLP-präsentierte gp145 Trimere	Zell-präsentierte gp145 Trimere
<i>Env/V3_{MN}</i>	0,6	0,63	0,4	0,046	0,9
<i>Env/V3_{HXB2}</i>	24	1,6	0,5	0,042	2
<i>Env/V3_{CDC42}</i>	5	2,2	1	0,113	3
<i>Env/V3_{RF}</i>	0,9	NA	74	3,301	7
<i>Env/V3_{SF33}</i>	NA	NA	NA	NA	NA

k_D in mM

4.5. Vergleichbarkeit der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs mit gp120 Monomeren und gp140 Trimeren in der MST

Die produzierten und aufgereinigten Env/V3-Chimären-VLPs wurden durch die 2bind molecular interactions GmbH gegen den mAb 447-52D mittels Microscale Thermophorese gemessen. Es konnten, entsprechend der ebenfalls im MST gemessenen gp120 Env/V3-Monomere und gp140 Env/V3-Trimere, ein konsistentes Affinitätsranking gezeigt werden. Env/V3_{MN} hatte über alle Ag-Komplexitäts-Stufen, von Monomer bis hin zum membrangebundenen Trimer, die besten Bindungseigenschaften zu mAb 447-52D, gefolgt von Env/V3_{CDC42} und Env/V3_{HXB2}. Env/V3_{RF} konnte lediglich für lösliche gp140 Trimere ausreichende Messwerte liefern, um einen k_D -Wert berechnen zu können. Als lösliches gp120 Monomer und membrangebundenes gp145 Trimer auf VLPs konnte Env/V3_{RF} lediglich, wie Env/V3_{SF33}, nur schwache, bis keine Bindung an mAb 447-52D nachgewiesen werden.

4.6. Messung der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs in der MST mit HBS-Puffer und humanem Serum

Um eine möglichst ideale Messumgebung zu kreieren, die der physiologischen Umgebung *in vivo* gleicht, wurden die Env/V3-Chimären ebenfalls in humanem Serum gemessen. So sollten mögliche Interaktionen zwischen einem potenziellen Vakzinierungskandidaten und den Antikörpern des Impflings in die Affinitätsmessung mit einbezogen werden. Die Messung erfolgte, wie zuvor beschrieben, in HBS-EP oder als Mix mit 50 % HBS-EP und 50 % humanem Serum. Versuchsreihen in 100% humanem Serum konnten auf Grund eines zu hohen Hintergrundsignals nicht ausgewertet werden. Zudem zeigte sich in den MST-Messungen von gp120 Env/V3-Monomeren und gp140 Env/V3-Trimeren ein signifikanter Unterschied in den k_D -Werten zwischen den Messungen in reinem HBS-EP und HBS-EP/Serum-Mix, mit reduzierten k_D -Werten in Anwesenheit von humanem Serum. Die Env/V3-Chimären-Gag-VLPs zeigten hingegen keinen wesentlichen Unterschied in den berechneten k_D -Werten zwischen HBS-EP und HBS-EP/Serum-Mix. Dies könnte einerseits an einer Stabilisierung der gp145 Env/V3-Trimere durch die Einbettung in die VLP-Membran liegen, andererseits aber auch an einer stärkeren Beeinflussung der löslichen Env/V3-Chimären durch humane Serumproteine, zum Beispiel. Proteinasen.

Insgesamt zeigten sich während der Skalierung der Antigenstruktur von einfachen löslichen gp120 Monomeren, über komplexere lösliche gp140 Trimere bis hin zu membrangebundenen gp145 Trimeren auf VLPs und HEK 293F Zellen, gleiche Verteilungsmuster und Wertebereiche der k_D -Werte im AG-AK-Affinitätsranking der Env/V3-Chimären-VLPs zum mAb 447-52D. Dabei wurden auch leere Gag-VLPs als Negativkontrolle getestet, die keine Messsignale verursachten. Somit können die unterschiedlichen Werte auf die eingesetzten Env/V3-Chimären zurückgeführt werden.

Zusammenfassend konnte bei der Messung der Env/V3-Chimären-Gag-VLPs in der MST ebenfalls das vorbekannte Affinitätsranking mit der besten

Bindung an Env/V3_{MN}, gefolgt von Env/V3_{CDC42}/ Env/V3_{HXB2} sowie keiner Bindung an Env/V3_{RF} und Env/V3_{SF33}, nachgewiesen werden. Dies galt sowohl für lösliche gp120 Monomere und gp140 Trimere, als auch für auf VLPs membrangebundene gp145 Env/V3-Trimere sowohl in Pufferlösung als auch in 50 % humanem Serum. Für Env/V3_{RF} konnte lediglich bei gp140 Trimeren in HBS-Puffer ein k_D -Wert bestimmt werden. Die Konsistenz der erreichten Ergebnisse validiert die Einsatzmöglichkeit der MST als Instrument in der Forschung nach einem geeigneten Vakzinierungskandidaten unter Bedingungen, die der physiologischen Umgebung ähnlich sind. Dies eröffnet der immunbiologischen Bestimmung von VLPs als Erfolg versprechenden Vakzinkandidaten neue Möglichkeiten

Tabelle 9: Übersicht über die k_D -Werte der eingesetzten Env/V3-Chimären über unterschiedliche Komplexitätsniveaus gegenüber dem mAb 447-52D in MST mit HBS-EP bzw. HBS-Serum-Mix (HBS-EP mit 50 % humanem Serum)

<i>Env/V3-Chimäre</i>	gp120 Monomere		gp140 Trimere		VLP-präsentierte gp145 Trimere	
	HBS-EP	50% Serum	HBS-EP	50% Serum	HBS-EP	50% Serum
<i>Env/V3_{MN}</i>	0,14	0,8	0,0025	0,21	1,5	5,7
<i>Env/V3_{HXB2}</i>	3,4	75	0,020	0,23	8,7	6,7
<i>Env/V3_{CDC42}</i>	1,6	25	0,070	0,42	2,1	11
<i>Env/V3_{RF}</i>	NA	NA	0,62	NA	NA	NA
<i>Env/V3_{SF33}</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA

k_D in nM

4.7. Die Wahl von VLPs als mögliche Vakzin-Kandidaten

Auf Grund mehrerer physikalischer und physiologischer Eigenschaften sind VLPs Gegenstand intensiver Forschung als mögliche Vakzinkandidaten (80). Der Vorteil von VLPs liegt nicht nur im physiologisch gleichen Aufbau zum nativen Viruspartikel und dessen Größe, wodurch sie den Partikeln entsprechen, mit denen unsere Immunabwehr evolutionsbiologisch gelernt hat

umzugehen (81). VLPs besitzen kein zur Reproduktion des Virus nötiges genetisches Material und können somit keine Neuinfektion auslösen, was sie zu einer sicheren Alternative lebend-attenuierter Pathogene als Impfstoff macht. (82,83)

Sie bieten außerdem eine höhere Anzahl an oberflächenpräsentierten Antigenen als native HIV-Viruspartikel, die nur zwischen 7 und 14 Env-Trimere besitzen (77). Dies führt nicht nur zu mehr verwertbaren Antigenen pro inkorporiertem Partikel, mit einer nachweislich höheren Neutralisationsrate im Serum (84) und dem schnelleren Erreichen der nötigen Reizschwelle für zum Auslösen einer T-Zell Antwort (85), sondern auch zu einer stärkeren Einbindung von Cross-Link B-Zell Rezeptoren. Es erhöht die „avidity“ des Vakzins, die summierte Stärke aller Bindungen des Antigens an die B-Zellen und der dadurch zusätzlich ausgelösten Reaktionen im Keimzentrum, der stärkeren Unterstützung durch folliculäre dendritische Zellen und T-Helferzellen. Dies führt zu einem breiteren Ak-Spektrum und einer längeren humoralen Immunantwort. (86,87). Ebenfalls positiv ist die intrastrukturelle Helferfunktion von Gag, welches eine T-Helfer-Zellen vermittelte CTL-Aktivierung bedingt (88). Somit wird das menschliche Immunsystem auf mehreren Wegen zur Produktion von Antikörpern angeregt.

Auch die zelluläre Immunantwort kann durch VLPs unterschiedlich rekrutiert werden. Einerseits können inkorporierte VLPs über endosomalen Abbau und den major histocompatibility complex II (MHC II) CD4+ T-Zellen präsentiert werden und somit B-Zellen und Makrophagen aktivieren (89–91). Andererseits können rezeptorassoziiert aufgenommene VLP-Bestandteile über Proteasomen und das endoplasmatische Retikulum (ER) prozessiert und über MHC I den CD8+ T-Zellen präsentiert werden. Es konnte bereits durch Peretti et al. gezeigt werden, dass solche „therapeutischen VLPs“ gezielt mit infizierten Zellen verschmolzen und anschließend zur Zerstörung dieser führten (92).

Somit nehmen Virus like Particles für die Herstellung eines HIV-Vakzins eine vielversprechende Stellung zwischen lebend-attenuierten, aber für HIV oft als zu unsicher geltenden Impfstoffen und weniger immunogenen Virusuntereinheiten ein (93). Diese Untereinheiten können auf Grund ihrer Aufspaltung instabil werden oder an den Schnittstellen Neo-Epitope bilden und dadurch nichtneutralisierende Ak induzieren.

4.8. Eignung der hergestellten Env/V3-Chimären-Gag-VLPs als Vakzinkandidat

Die hier eingesetzten Env/V3-Gag-VLPs besitzen, wie in 4.7. genannt, mehrere positive Eigenschaften zur Induktion einer relevanten Immunantwort, jedoch gibt es im Bereich der Ag-besetzten Nanopartikel weitere geeignete Präsentationssysteme. Neben Gag-assoziierten VLPs, die den Vorteil der MHC II Präsentation von Gag-Peptiden besitzen, werden weitere vielversprechende Partikel als Vakzinkandidaten beforscht. Hierzu gehören vor allem andere, prokaryotische VLPs aus Salmonella- oder Lactobacillus-Stämmen. Diesen fehlen jedoch im Vergleich zu den eukaryontischen VLPs aus beispielsweise Hefen, Pflanzen-, Insekten- oder Tierzellen die Eigenschaften umhüllte VLPs zu produzieren oder nach Translation der Virusproteine Modifikationen vorzunehmen (94). Eukaryontische VLPs können deutlich komplexere Strukturen beinhalten, sind aber in puncto Kosten, Geschwindigkeit und Ausbeute unterlegen (95). Einzig hefegenerierte VLPs sind ähnlich effizient herstellbar, jedoch nicht immer für komplexere VLPs geeignet. So konnte durch Morikawa et al. gezeigt werden, dass *Saccharomyces cerevisiae* im Fall von HIV-2 die Polymerisation von Gag-Proteinen nicht gelang und ein fehlendes Abknospen der VLPs zur Folge hatte (96).

Ebenfalls zu erwähnen sind Nanopartikel aus mehrfach gefalteten Polymeren, die meist selbstverbindend symmetrische Aggregate bilden. Ferritin, Polyactid (PLA), Lumazin-Synthase oder Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase E2 (PDHE2) sind einige Vertreter für die, durch Aufbringen von Env gp120 Monomeren oder gp140 Trimeren, die Induktion erhöhter Env-spezifischer Ak-

Titer festgestellt werden konnte (80,97–100). Der Vorteil dieser Partikel ist die fehlende biologische Anfälligkeit lebender Präsentationssysteme und die günstigeren Kosten (95).

5. Schlussfolgerung

Die in dieser Arbeit charakterisierten VLPs sind durch Transfektion von HEK 293F Zellen mit *teeGag1* und Env/V3-Chimären in einem *gag-env* Verhältnis 2:1 hergestellt wurden. Die so entstandenen VLPs präsentierten auf ihrer Oberfläche jeweils eine Env/V3-Chimäre eines HIV1-Subtyp-C-96ZM651 Envelope-Proteins mit ersetzter V3-Loop-Region durch eine bereits charakterisierte Env-Modelreihe (MN, HXB2, CDC42, RF, SF33) als membrangebundenes gp145 Trimer. Mittels ELISA, Slot Blot und SDS-PAGE semiquantitativ bestimmte Mengen an Env/V3-Chimären und Gag ließen Rückschlüsse auf eine ausreichende Menge an oberflächlich präsentierten Env-Trimeren pro VLP zu, um die Ag-Ak-Affinitätsmessungen in der MST und vergleichend im ELISA zu gewährleisten. Dafür wurde ein Ak-Panel gewählt, dessen Bindungseigenschaften zu den eingesetzten Env-V3-Konstrukten bereits bekannt und zum Testzeitpunkt verfügbar war. Die konsistenten Ergebnisse der vorherigen Versuchsreihen mit löslichen gp120 Monomeren und löslichen gp140 Trimeren in der MST und ELISA ließen sich für die Env/V3-Chimären-VLPs ebenfalls nachweisen.

Die Wahl des Ak-Panels und der bereits beschriebenen V3-Konstrukte diente der systematischen Etablierung und Erweiterung der Microscale Thermophorese. Die MST ermöglicht die Messung der Ag-AK-Affinität in Lösung mittels eines Temperaturgradienten und der durch Molekülgröße, Ladung und Hydrathülle beeinflussten Bewegung des getesteten Partikels. Somit kann durch Veränderung nur einer dieser Eigenschaften durch eine AG-AK-Bindung davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in den Messwerten eine Aussage über die Affinität der Bindung zulassen. Da die Messung in Lösung stattfindet, kann eine physiologischähnlichere Umgebung bei Einsatz von Serum als Lösungsmittel erzeugt werden, als es bei der

Bindung an eine feste Phase, zum Beispiel im ELISA, möglich ist. Um diese unbekannt Annahme zu validieren, wurden die zuvor beschriebenen und somit bekannten Ag-Ak-Affinitäten zwischen den Env-Varianten und 447-52D gewählt. Eine Induktion breitneutralisierender Antikörper ist anhand der getesteten Env/V3-Chimären nicht möglich.

Dennoch ist zu beachten, dass hier nur jeweils ein Epitop einer Env-Region betrachtet wurde. Um die Reaktion und Eigenschaften von VLPs weiter spezifizieren zu können und sie später als mögliches Präsentationssystem eines Vakzinkandidats zu nutzen, muss noch eingehender die Oberflächenpräsentation von Env und dessen Konformationsänderungen betrachtet werden. Damit könnten stabile, konservative Epitope präsentierende Vakzinkandidaten gefunden werden, um einen wirksamen Schutz vor der Infektion mit HI-Viren zu finden.

6. Ausblick

Durch die Etablierung der MST und der Skalierung der Rezeptor-Liganden-Affinitätsbestimmung, antigenpräsentierende VLPs in Lösung sowie in physiologisch ähnlichen Verhältnissen zu testen, können nun auch entsprechend komplette Zellen eingeschlossen werden. Der nächste Schritt beinhaltet die Messung gp140 Env/V3-Trimer besetzter humaner Zellen in Puffer und humanem Serum mittels MST und Referenz-Messsystemen (FACS, SPR). Nach vollständiger Auslotung der Messbarkeit von Ag-Ak-Bindungsaffinitäten in der MST, könnte die Nutzung zur Charakterisierung potenzieller Vakzinkandidaten genutzt werden.

Die in den letzten Jahren über reverse Vakzinierung und Hochdurchsatz-Kultivierung von B-Zelllinien HIV-infizierter Patienten entdeckten und beschriebenen bnAbs und deren potenziellen Bindungsstellen (gp41-MPER, V2-Glykane, V3-Glykane, HCDR3-Region der CD4 Bindungsstelle (CD4bs)) bedürfen weiterhin eingehender Charakterisierung und Einordnung als mögliche Impfstoffe. Ebenso ist die Strategie zur Induktion breitneutralisierender Antikörper weiterhin Gegenstand der aktuellen

Forschung. Nicht zuletzt, da die zweite der letzten drei großen HIV-Impfstoff-Studien, die HVTN 706 Phase III Studie „Mosaico“, im Januar 2023 wegen Unwirksamkeit gestoppt wurde. Die Auswahl der bestmöglichen Qualität und Reihenfolge möglicher Vakzinkandidaten und deren eventuell eingesetzter Booster stellt weiterhin ein weltweites Probleme dar (101–103). Die MST könnte somit für die in 4.7. genannten Forschungsfelder als geeignete Messtechnologie zur Ag-Ak-Affinitätsbestimmung genutzt werden, um durch Messung in humanem Serum stabilere Vakzinkandidaten zu finden und validere Messergebnisse zu generieren.

7. Abstract

Almost forty years after the first description of the human immunodeficiency virus (HIV) and its worldwide spread, it has still not been possible to develop a preventive or curative therapy. Great hope lies in the research of broadly neutralizing antibodies (bnABs), which, induced by a vaccine, can protect against several HIV subtypes. Due to the unique pathogenesis and structural characteristics of HIV biology, as well as complex biology underlying the generation of bnABs, vaccine development is still proving extremely challenging. To better characterize the binding affinity between antibody and viral antigen, a measurement environment as physiological as possible is needed. One possible new method is microscale thermophoresis (MST), in which particles and their properties can be measured in solution. This work focuses on the validation of microscale thermophoresis as platform for both the assessment of bnABs in a “natural” context as well as the characterization of Envelope-proteine (Env) based vaccine candidates, using such bnABs as analytical tools and MST as analytical method. To this end, eukaryotic virus like particles (VLPs) populated with trimers of each gp145-Env/V3 chimera of an HIV1 clade C 96ZM651 construct were prepared. The gp145-Env/V3-trimer-VLPs prepared by transfection of HEK-293F cells with env and gag plasmid DNA were then comparatively tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and MST against the mAb 447-52D as a model bnAB. It was shown that the VLPs used were comparable to each other in size and Env loading and exhibited similar binding properties against 447-52D in ELISA and MST, which were observed in previous experiments with soluble gp120 monomers and gp140 trimers. Thus, it can be assumed that MST can be used as analytical method for the characterisation of potential new vaccine candidates in the nanoparticle field. Further experiments will have to show whether MST is also suitable for measurement with other nanoparticles used as vaccine candidates, e.g. ferritin, polylactic acid (PLA) or Dihydrolipolylyl transacetylase (DLAT) based nanoparticles.

8. Zusammenfassung

Fast vierzig Jahre nach der Erstbeschreibung des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und seiner weltweiten Verbreitung ist es noch immer nicht gelungen eine präventive oder kurative Therapie zu entwickeln. Große Hoffnung liegt in der Erforschung von breitneutralisierenden Antikörpern (bnABs), die, durch ein Vakzin induziert, gegen mehrere HIV-Subtypen schützen können. Aufgrund der einzigartigen Pathogenese und der strukturellen Merkmale der HIV-Biologie sowie der komplexen Biologie, die der Bildung von bnABs zugrunde liegt, erweist sich die Entwicklung von Impfstoffen noch immer als äußerst schwierig. Zur besseren Charakterisierung der Bindungsaffinität zwischen Antikörper und Virusantigen bedarf es einer möglichst physiologischen Messumgebung. Eine mögliche neue Methode ist die Microscale Thermophorese (MST), bei der Partikel und deren Eigenschaften in Lösung vermessen werden können. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Validierung der MST als Plattform, sowohl für die Bewertung von bnABs in einem "natürlichen" Kontext als auch für die Charakterisierung von Envelope-Protein (Env)-basierten Impfstoffkandidaten, wobei solche bnABs als Analyseinstrumente und die MST als Analysemethode verwendet werden. Dazu wurden eukaryontische virusähnliche Partikel (VLPs), besetzt mit Trimeren jeweils einer gp145-Env/V3-Chimäre eines HIV1-Subtyp-C-96ZM651-Konstruktes, hergestellt. Die durch Transfektion von HEK-293F Zellen mit env- und gag-Plasmid DNA hergestellten gp145-Env/V3-Trimer-VLPs wurden anschließend vergleichend im Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und der MST gegen den mAb 447-52D als Modell-bnAb getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten VLPs untereinander in Größe und Env-Beladung vergleichbar waren und ähnliche Bindungseigenschaften gegen 447-52D im ELISA und MST zeigten, die schon in vorherigen Versuchen mit löslichen gp120 Monomeren und gp140 Trimeren beobachtet wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die MST als Analysemethode für die Charakterisierung potenzieller neuer Impfstoffkandidaten im Bereich der Nanopartikel verwendet werden kann. In weiteren Versuchen muss gezeigt werden, ob sich die MST auch für die

Messung mit anderen als Vakzinkandidaten eingesetzten Nanopartikeln, z. Bsp. Ferritin-, Polylactid- (PLA) oder Dihydrolipoamid-S-Acetyltransferase-Molekülen (PDHE2) eignet.

9. References

1. Merson MH, O'Malley J, Serwadda D, Apisuk C. The history and challenge of HIV prevention. *Lancet*. 2008;372(9637):475–88. doi:10.1016/S0140-6736(08)60884-3 Cited in: PubMed; PMID 18687461.
2. Montaner JSG, Hogg R, Wood E, Kerr T, Tyndall M, Levy AR, Harrigan PR. The case for expanding access to highly active antiretroviral therapy to curb the growth of the HIV epidemic. *Lancet*. 2006;368(9534):531–6. doi:10.1016/S0140-6736(06)69162-9 Cited in: PubMed; PMID 16890841.
3. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y.)*. 1983;220(4599):868–71. doi:10.1126/science.6189183 Cited in: PubMed; PMID 6189183.
4. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*. 2014;384(9939):258–71. doi:10.1016/S0140-6736(14)60164-1
5. Ensoli B, Cafaro A, Monini P, Marcotullio S, Ensoli F. Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Front Immunol*. 2014;5417. doi:10.3389/fimmu.2014.00417 Cited in: PubMed; PMID 25250026.
6. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011;1(1):a006841. doi:10.1101/cshperspect.a006841 Cited in: PubMed; PMID 22229120.
7. Chakrabarti L, Guyader M, Alizon M, Daniel MD, Desrosiers RC, Tiollais P, Sonigo P. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature*. 1987;328(6130):543–7. doi:10.1038/328543a0 Cited in: PubMed; PMID 3649576.
8. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 1990;345(6273):356–9. doi:10.1038/345356a0 Cited in: PubMed; PMID 2188136.

9. Hahn BH, Shaw GM, Cock KM de, Sharp PM. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science (New York, N.Y.)*. 2000;287(5453):607–14. doi:10.1126/science.287.5453.607 Cited in: PubMed; PMID 10649986.
10. UNAIDS. UNAIDS DATA 2022 [Internet] [cited 2023 Mar 10]. Available from: https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/data-book-2022_en.pdf
11. World Health Organisation (WHO). hiv_all_2016.png (PNG-Grafik, 2340 × 1652 Pixel) [Internet]. 2022 [updated 2022 Apr 1; cited 2023 Mar 10]. Available from: https://www.who.int/images/default-source/maps/hiv_all_2016.png
12. World Health Organization (WHO). WHO methods and data sources for country-level causes of death 2000-2019: Global Health Estimates Technical Paper WHO/DDI/DNA/GHE/2020.3 [Internet] [cited 2023 May 8]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/gho-documents/global-health-estimates/ghe2019_cod_methods.pdf
13. Kim J, Vasani S, Kim JH, Ake JA. Current approaches to HIV vaccine development: a narrative review. *Journal of the International AIDS Society*. 2021;24 Suppl 7(Suppl 7):e25793. doi:10.1002/jia2.25793 Cited in: PubMed; PMID 34806296.
14. Trovato M, D'Apice L, Prisco A, Berardinis P de. HIV Vaccination: A Roadmap among Advancements and Concerns. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4). doi:10.3390/ijms19041241 Cited in: PubMed; PMID 29671786.
15. Gray GE, Laher F, Doherty T, Abdool Karim S, Hammer S, Mascola J, Beyrer C, Corey L. Which New Health Technologies Do We Need to Achieve an End to HIV/AIDS? *PLoS Biol*. 2016;14(3):e1002372. doi:10.1371/journal.pbio.1002372 Cited in: PubMed; PMID 26933962.
16. Ng'uni T, Chasara C, Ndhlovu ZM. Major Scientific Hurdles in HIV Vaccine Development: Historical Perspective and Future Directions. *Front Immunol*. 2020;11590780. doi:10.3389/fimmu.2020.590780 Cited in: PubMed; PMID 33193428.
17. Modrow S, Truyen U, Schätzl H. *Molekulare Virologie*. 4th ed. Berlin: Springer Spektrum; 2022. 841 p.
18. Khare R. *Guide to clinical and diagnostic virology*. Washington, DC: ASM Press; 2019. 311 p.

19. Coffin JM, Hughes SH, Varmus H, editors. *Retroviruses*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1997. ISBN-10: 0-87969-571-4. eng.
20. Hans R. Gelderblom. Andrea Schnartendorff/RKI. HIV-1 (Retroviren), Transmissions-Elektronenmikroskopie, Ultradünnschnitt: EM_10_19517_HIV-1_JPG.jpg [Internet] [cited 2023 Jul 6]. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/NRZ/EM/Aufnahmen/EM_Tab_HIVAIDS.html
21. Ding P, Kharytonchyk S, Kuo N, Cannistraci E, Flores H, Chaudhary R, Sarkar M, Dong X, Telesnitsky A, Summers MF. 5'-Cap sequestration is an essential determinant of HIV-1 genome packaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(37). doi:10.1073/pnas.2112475118 Cited in: PubMed; PMID 34493679.
22. Deeks SG, Overbaugh J, Phillips A, Buchbinder S. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;115035. doi:10.1038/nrdp.2015.35 Cited in: PubMed; PMID 27188527.
23. Rossi E, Meuser ME, Cunanan CJ, Cocklin S. Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. *Life (Basel)*. 2021;11(2). doi:10.3390/life11020100 Cited in: PubMed; PMID 33572761.
24. Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):279–90. doi:10.1038/nrmicro2747 Cited in: PubMed; PMID 22421880.
25. Robert Koch-Institut. RKI - RKI-Ratgeber - HIV-Infektion/AIDS [Internet] [cited 2023 Mar 13]. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HIV_AIDS.html
26. Anwar KP, Malik A, Subhan KH. Profile of candidiasis in HIV infected patients. *Iran J Microbiol*. 2012;4(4):204–9. Cited in: PubMed; PMID 23205253.
27. Lawn SD, Harries AD, Williams BG, Chaisson RE, Losina E, Cock KM de, Wood R. Antiretroviral therapy and the control of HIV-associated tuberculosis. Will ART do it? *Int J Tuberc Lung Dis*. 2011;15(5):571–81. doi:10.5588/ijtld.10.0483 Cited in: PubMed; PMID 21756508.

28. Deutsche AIDS-Gesellschaft e.V. (DAIG) et al. Deutsch-Österreichische S2K-Leitlinien zur antiretroviralen Therapie der HIV-1-Infektion [Internet] [cited 2023 May 20]. Available from: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/055-001>
29. Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C, Castillo A, Zoumplis D, Martin DE, Orenstein JM, Allaway GP, Freed EO, Wild CT. PA-457: a potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13555–60. doi:10.1073/pnas.2234683100 Cited in: PubMed; PMID 14573704.
30. Sarkar I, Hauber I, Hauber J, Buchholz F. HIV-1 proviral DNA excision using an evolved recombinase. *Science (New York, N.Y.)*. 2007;316(5833):1912–5. doi:10.1126/science.1141453 Cited in: PubMed; PMID 17600219.
31. Barouch DH, Whitney JB, Moldt B, Klein F, Oliveira TY, Liu J, Stephenson KE, Chang H-W, Shekhar K, Gupta S, Nkolola JP, Seaman MS, Smith KM, Borducchi EN, Cabral C, Smith JY, Blackmore S, Sanisetty S, Perry JR, Beck M, Lewis MG, Rinaldi W, Chakraborty AK, Poignard P, Nussenzweig MC, Burton DR. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature*. 2013;503(7475):224–8. doi:10.1038/nature12744 Cited in: PubMed; PMID 24172905.
32. Henrich TJ, Hu Z, Li JZ, Sciaranghella G, Busch MP, Keating SM, Gallien S, Lin NH, Giguel FF, Lavoie L, Ho VT, Armand P, Soiffer RJ, Sagar M, Lacasce AS, Kuritzkes DR. Long-term reduction in peripheral blood HIV type 1 reservoirs following reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *J Infect Dis*. 2013;207(11):1694–702. doi:10.1093/infdis/jit086 Cited in: PubMed; PMID 23460751.
33. Tebas P, Stein D, Tang WW, Frank I, Wang SQ, Lee G, Spratt SK, Surosky RT, Giedlin MA, Nichol G, Holmes MC, Gregory PD, Ando DG, Kalos M, Collman RG, Binder-Scholl G, Plesa G, Hwang W-T, Levine BL, June CH. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370(10):901–10. doi:10.1056/NEJMoa1300662 Cited in: PubMed; PMID 24597865.

34. Moretti S, Cafaro A, Tripiciano A, Picconi O, Buttò S, Ensoli F, Sgadari C, Monini P, Ensoli B. HIV therapeutic vaccines aimed at intensifying combination antiretroviral therapy. *Expert Rev Vaccines*. 2020;19(1):71–84. doi:10.1080/14760584.2020.1712199 Cited in: PubMed; PMID 31957513.
35. Liu Y, Cao W, Sun M, Li T. Broadly neutralizing antibodies for HIV-1: efficacies, challenges and opportunities. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):194–206. doi:10.1080/22221751.2020.1713707 Cited in: PubMed; PMID 31985356.
36. Held A, Sadava D, Markl J, Jarosch B, Hillis DM, Heller HC, Seidler L, Hacker SD, Niehaus-Osterloh M, Sixt E. *Purves Biologie*. 10th ed. Markl J, editor. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin / Heidelberg; 2019. 2141 p. Available from: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1588446> ger.
37. Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. New York, London: GS Garland Science Taylor & Francis Group; 2016. 904 p. eng.
38. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*. 2013;31(35):3502–18. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.018 Cited in: PubMed; PMID 23707164.
39. Wagner R, Asbach B. Wann kommt endlich eine Impfung gegen HIV? [When will there finally be a vaccine against HIV?]. *MMW Fortschr Med*. 2022;164(Suppl 2):30–3. ger. doi:10.1007/s15006-022-1022-9 Cited in: PubMed; PMID 35731486.
40. Excler J-L, Robb ML, Kim JH. HIV-1 vaccines: challenges and new perspectives. *Hum Vaccin Immunother*. 2014;10(6):1734–46. doi:10.4161/hv.28462 Cited in: PubMed; PMID 24637946.
41. Gray GE, Moodie Z, Metch B, Gilbert PB, Bekker L-G, Churchyard G, Nchabeleng M, Mlisana K, Laher F, Roux S, Mngadi K, Innes C, Mathebula M, Allen M, McElrath MJ, Robertson M, Kublin J, Corey L. Recombinant adenovirus type 5 HIV gag/pol/nef vaccine in South Africa: unblinded, long-term follow-up of the phase 2b HVTN 503/Phambili study. *Lancet Infect Dis*. 2014;14(5):388–96. doi:10.1016/S1473-3099(14)70020-9 Cited in: PubMed; PMID 24560541.
42. Hsu DC, O'Connell RJ. Progress in HIV vaccine development. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(5):1018–30. doi:10.1080/21645515.2016.1276138 Cited in: PubMed; PMID 28281871.

43. Wibmer CK, Moore PL, Morris L. HIV broadly neutralizing antibody targets. *Curr Opin HIV AIDS*. 2015;10(3):135–43. doi:10.1097/COH.000000000000153 Cited in: PubMed; PMID 25760932.
44. Richman DD, Little SJ, Smith DM, Wrin T, Petropoulos C, Wong JK. HIV evolution and escape. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. 2004;115:289–303. Cited in: PubMed; PMID 17060974.
45. Preston B, Poiesz B, Loeb L. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science*. 1988;242(4882):1168–71. doi:10.1126/science.2460924
46. Edwards TG, Hoffman TL, Baribaud F, Wyss S, LaBranche CC, Romano J, Adkinson J, Sharron M, Hoxie JA, Doms RW. Relationships between CD4 Independence, Neutralization Sensitivity, and Exposure of a CD4-Induced Epitope in a Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Protein. *J Virol*. 2001;75(11):5230–9. doi:10.1128/JVI.75.11.5230-5239.2001 Cited in: PubMed; PMID 11333905.
47. Mouquet H. Antibody B cell responses in HIV-1 infection. *Trends Immunol*. 2014;35(11):549–61. doi:10.1016/j.it.2014.08.007 Cited in: PubMed; PMID 25240985.
48. Thali M, Olshevsky U, Furman C, Gabuzda D, Posner M, Sodroski J. Characterization of a discontinuous human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitope recognized by a broadly reactive neutralizing human monoclonal antibody. *J Virol*. 1991;65(11):6188–93. doi:10.1128/JVI.65.11.6188-6193.1991 Cited in: PubMed; PMID 1717717.
49. Eroshkin AM, LeBlanc A, Weekes D, Post K, Li Z, Rajput A, Butera ST, Burton DR, Godzik A. bNAber: database of broadly neutralizing HIV antibodies. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D1133-9. doi:10.1093/nar/gkt1083 Cited in: PubMed; PMID 24214957.
50. Caskey M, Klein F, Lorenzi JCC, Seaman MS, West AP JR, Buckley N, Kremer G, Nogueira L, Braunschweig M, Scheid JF, Horwitz JA, Shimeliovich I, Ben-Avraham S, Witmer-Pack M, Platten M, Lehmann C, Burke LA, Hawthorne T, Gorelick RJ, Walker BD, Keler T, Gulick RM, Fatkenheuer G, Schlesinger SJ, Nussenzweig MC. Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody

- 3BNC117. *Nature*. 2015;522(7557):487–91. doi:10.1038/nature14411 Cited in: PubMed; PMID 25855300.
51. Yu L, Guan Y. Immunologic Basis for Long HCDR3s in Broadly Neutralizing Antibodies Against HIV-1. *Front Immunol*. 2014;5:250. doi:10.3389/fimmu.2014.00250 Cited in: PubMed; PMID 24917864.
52. Klein F, Mouquet H, Dosenovic P, Scheid JF, Scharf L, Nussenzweig MC. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science (New York, N.Y.)*. 2013;341(6151):1199–204. doi:10.1126/science.1241144 Cited in: PubMed; PMID 24031012.
53. Burton DR, Ahmed R, Barouch DH, Butera ST, Crotty S, Godzik A, Kaufmann DE, McElrath MJ, Nussenzweig MC, Pulendran B, Scanlan CN, Schief WR, Silvestri G, Streeck H, Walker BD, Walker LM, Ward AB, Wilson IA, Wyatt R. A Blueprint for HIV Vaccine Discovery. *Cell Host Microbe*. 2012;12(4):396–407. doi:10.1016/j.chom.2012.09.008 Cited in: PubMed; PMID 23084910.
54. Moxon R, Reche PA, Rappuoli R. Editorial: Reverse Vaccinology. *Front Immunol*. 2019;10:2776. doi:10.3389/fimmu.2019.02776 Cited in: PubMed; PMID 31849959.
55. Viatte S, Alves PM, Romero P. Reverse immunology approach for the identification of CD8 T-cell-defined antigens: advantages and hurdles. *Immunol Cell Biol*. 2006;84(3):318–30. doi:10.1111/j.1440-1711.2006.01447.x Cited in: PubMed; PMID 16681829.
56. Klimas N, Koneru AO, Fletcher MA. Overview of HIV. *Psychosom Med*. 2008;70(5):523–30. doi:10.1097/PSY.0b013e31817ae69f Cited in: PubMed; PMID 18541903.
57. Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods*. 2006;40(1):60–5. doi:10.1016/j.ymeth.2006.07.018 Cited in: PubMed; PMID 16997714.
58. Meier JP. CD8+ T cell epitope-enriched HIV-1-Gag antigens with preserved structure and function: Universität Regensburg; 2017.
59. Wienken CJ, Baaske P, Rothbauer U, Braun D, Duhr S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun*. 2010;1:100. doi:10.1038/ncomms1093 Cited in: PubMed; PMID 20981028.

60. Entzian C, Schubert T. Studying small molecule-aptamer interactions using MicroScale Thermophoresis (MST). *Methods*. 2016;9727–34. doi:10.1016/j.ymeth.2015.08.023 Cited in: PubMed; PMID 26334574.
61. Zillner K, Jerabek-Willemsen M, Duhr S, Braun D, Längst G, Baaske P. Microscale thermophoresis as a sensitive method to quantify protein: nucleic acid interactions in solution. *Methods Mol Biol*. 2012;815241–52. doi:10.1007/978-1-61779-424-7_18 Cited in: PubMed; PMID 22130996.
62. Jerabek-Willemsen M, André T, Wanner R, Roth HM, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*. 2014;1077101–13. doi:10.1016/j.molstruc.2014.03.009
63. Magnez R, Bailly C, Thuru X. Microscale Thermophoresis as a Tool to Study Protein Interactions and Their Implication in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022;23(14). doi:10.3390/ijms23147672 Cited in: PubMed; PMID 35887019.
64. Seidel SAI, Dijkman PM, Lea WA, van den Bogaart G, Jerabek-Willemsen M, Lazic A, Joseph JS, Srinivasan P, Baaske P, Simeonov A, Katritch I, Melo FA, Ladbury JE, Schreiber G, Watts A, Braun D, Duhr S. Microscale thermophoresis quantifies biomolecular interactions under previously challenging conditions. *Methods*. 2013;59(3):301–15. doi:10.1016/j.ymeth.2012.12.005 Cited in: PubMed; PMID 23270813.
65. Gorny MK, Xu JY, Karwowska S, Buchbinder A, Zolla-Pazner S. Repertoire of neutralizing human monoclonal antibodies specific for the V3 domain of HIV-1 gp120. *J Immunol*. 1993;150(2):635–43. Cited in: PubMed; PMID 7678279.
66. Bruun T-H, Mühlbauer K, Benen T, Kliche A, Wagner R. A mammalian cell based FACS-panning platform for the selection of HIV-1 envelopes for vaccine development. *PLoS One*. 2014;9(10):e109196. doi:10.1371/journal.pone.0109196 Cited in: PubMed; PMID 25279768.
67. Zimmer B. Methods for development and characterization of HIV-1 envelope immunogens: Universität Regensburg; 2020.
68. Sanders RW, Derking R, Cupo A, Julien J-P, Yasmeen A, Val N de, Kim HJ, Blattner C, La Peña AT de, Korzun J, Golabek M, Los Reyes K de, Ketas TJ, van

- Gils MJ, King CR, Wilson IA, Ward AB, Klasse PJ, Moore JP. A next-generation cleaved, soluble HIV-1 Env trimer, BG505 SOSIP.664 gp140, expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies. *PLoS Pathog.* 2013;9(9):e1003618. doi:10.1371/journal.ppat.1003618 Cited in: PubMed; PMID 24068931.
69. Burton DR, Desrosiers RC, Doms RW, Koff WC, Kwong PD, Moore JP, Nabel GJ, Sodroski J, Wilson IA, Wyatt RT. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol.* 2004;5(3):233–6. doi:10.1038/ni0304-233 Cited in: PubMed; PMID 14985706.
70. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676–82. doi:10.1038/nmeth.2019 Cited in: PubMed; PMID 22743772.
71. Cervera L, Gutierrez-Granados S, Martinez M, Blanco J, Godia F, Segura MM. Generation of HIV-1 Gag VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cell cultures using an optimized animal-derived component free medium. *J Biotechnol.* 2013;166(4):152–65. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.05.001 Cited in: PubMed; PMID 23688724.
72. Garcia LC. Strategies for improving production levels of HIV-1 VLPs by transient transfection of HEK 293 suspension cultures using an optimized animal-derived component free medium [Internet] [cited 2016 Oct 16]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.05.001>
73. WAGNER R, Deml L, Schirmbeck R, Niedrig M, Reimann J, WOLF H. Construction, expression, and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology.* 1996;220(1):128–40. doi:10.1006/viro.1996.0293 Cited in: PubMed; PMID 8659105.
74. BUONAGURO L, Buonaguro FM, Tornesello ML, MANTAS D, Beth-Giraldo E, WAGNER R, MICHELSON S, Prevost MC, WOLF H, GIRALDO G. High efficient production of Pr55(gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A.

- Antiviral Research. 2001;49(1):35–47. doi:10.1016/s0166-3542(00)00136-4 Cited in: PubMed; PMID 11166859.
75. Lynch A, Meyers AE, Williamson A-L, Rybicki EP. Stability studies of HIV-1 Pr55gag virus-like particles made in insect cells after storage in various formulation media. *Virology journal*. 2012;9:210. doi:10.1186/1743-422X-9-210 Cited in: PubMed; PMID 22988963.
 76. Könnnyű B, Sadiq SK, Turányi T, Hírmondó R, Müller B, Kräusslich H-G, Coveney PV, Müller V. Gag-Pol processing during HIV-1 virion maturation: a systems biology approach. *PLoS Comput Biol*. 2013;9(6):e1003103. doi:10.1371/journal.pcbi.1003103 Cited in: PubMed; PMID 23754941.
 77. Chertova E, Bess JW, Crise BJ, Sowder II RC, Schaden TM, Hilburn JM, Hoxie JA, Benveniste RE, Lifson JD, Henderson LE, Arthur LO. Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J Virol*. 2002;76(11):5315–25. doi:10.1128/jvi.76.11.5315-5325.2002 Cited in: PubMed; PMID 11991960.
 78. Brouwer PJM, Sanders RW. Presentation of HIV-1 envelope glycoprotein trimers on diverse nanoparticle platforms. *Curr Opin HIV AIDS*. 2019;14(4):302–8. doi:10.1097/COH.0000000000000549 Cited in: PubMed; PMID 30994503.
 79. Graßmann VR. Development and application of high-throughput screening methods to generate novel HIV-1 envelope immunogens: Universität Regensburg; 2018.
 80. Jardine JG, Ota T, Sok D, Pauthner M, Kulp DW, Kalyuzhniy O, Skog PD, Thinnis TC, Bhullar D, Briney B, Menis S, Jones M, Kubitz M, Spencer S, Adachi Y, Burton DR, Schief WR, Nemazee D. HIV-1 VACCINES. Priming a broadly neutralizing antibody response to HIV-1 using a germline-targeting immunogen. *Science*. 2015;349(6244):156–61. doi:10.1126/science.aac5894 Cited in: PubMed; PMID 26089355.
 81. Bachmann MF, Jennings GT. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(11):787–96. doi:10.1038/nri2868 Cited in: PubMed; PMID 20948547.

82. Ludwig C, Wagner R. Virus-like particles-universal molecular toolboxes. *Curr Opin Biotechnol.* 2007;18(6):537–45. doi:10.1016/j.copbio.2007.10.013 Cited in: PubMed; PMID 18083549.
83. Naskalska A, Pyrc K. Virus Like Particles as Immunogens and Universal Nanocarriers. *Pol J Microbiol.* 2015;64(1):3–13. Cited in: PubMed; PMID 26094310.
84. Vzorov AN, Wang L, Chen J, Wang B-Z, Compans RW. Effects of modification of the HIV-1 Env cytoplasmic tail on immunogenicity of VLP vaccines. *Virology.* 2016;489:141–50. doi:10.1016/j.virol.2015.09.015 Cited in: PubMed; PMID 26761396.
85. Neefjes J, Jongma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(12):823–36. doi:10.1038/nri3084 Cited in: PubMed; PMID 22076556.
86. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity.* 2016;45(3):471–82. doi:10.1016/j.immuni.2016.09.001 Cited in: PubMed; PMID 27653600.
87. Frietze KM, Peabody DS, Chackerian B. Engineering virus-like particles as vaccine platforms. *Curr Opin Virol.* 2016;18:4–9. doi:10.1016/j.coviro.2016.03.001 Cited in: PubMed; PMID 27039982.
88. Williamson A-L, Rybicki EP. Justification for the inclusion of Gag in HIV vaccine candidates. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(5):585–98. doi:10.1586/14760584.2016.1129904 Cited in: PubMed; PMID 26645951.
89. Nabi G, Storcksdieck Genannt Bonsmann M, Tenbusch M, Gardt O, Barouch DH, Temchura V, Überla K. GagPol-specific CD4⁺ T-cells increase the antibody response to Env by intrastructural help. *Retrovirology.* 2013;10:117. doi:10.1186/1742-4690-10-117 Cited in: PubMed; PMID 24156704.
90. Storcksdieck Genannt Bonsmann M, Niezold T, Hannaman D, Überla K, Tenbusch M. The improved antibody response against HIV-1 after a vaccination based on intrastructural help is complemented by functional CD8⁺ T cell responses. *Vaccine.* 2016;34(15):1744–51. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.059 Cited in: PubMed; PMID 26945099.

91. Storcksdieck Genannt Bonsmann M, Niezold T, Temchura V, Pissani F, Ehrhardt K, Brown EP, Osei-Owusu NY, Hannaman D, Hengel H, Ackerman ME, Streeck H, Nabi G, Tenbusch M, Überla K. Enhancing the Quality of Antibodies to HIV-1 Envelope by GagPol-Specific Th Cells. *J Immunol.* 2015;195(10):4861–72. doi:10.4049/jimmunol.1501377 Cited in: PubMed; PMID 26466954.
92. Peretti S, Schiavoni I, Pugliese K, Federico M. Selective elimination of HIV-1-infected cells by Env-directed, HIV-1-based virus-like particles. *Virology.* 2006;345(1):115–26. doi:10.1016/j.virol.2005.09.054 Cited in: PubMed; PMID 16271741.
93. Montefiori DC, Karnasuta C, Huang Y, Ahmed H, Gilbert P, Souza MS de, McLinden R, Tovanabutra S, Laurence-Chenine A, Sanders-Buell E, Moody MA, Bonsignori M, Ochsenbauer C, Kappes J, Tang H, Greene K, Gao H, LaBranche CC, Andrews C, Polonis VR, Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Self SG, Berman PW, Francis D, Sinangil F, Lee C, Tartaglia J, Robb ML, Haynes BF, Michael NL, Kim JH. Magnitude and breadth of the neutralizing antibody response in the RV144 and Vax003 HIV-1 vaccine efficacy trials. *J Infect Dis.* 2012;206(3):431–41. doi:10.1093/infdis/jis367 Cited in: PubMed; PMID 22634875.
94. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5:172. doi:10.3389/fmicb.2014.00172 Cited in: PubMed; PMID 24860555.
95. Deng F. Advances and challenges in enveloped virus-like particle (VLP)-based vaccines. *J Immunological Sci.* 2018;2(2):36–41. doi:10.29245/2578-3009/2018/2.1118
96. Morikawa Y, Goto T, Yasuoka D, Momose F, Matano T. Defect of human immunodeficiency virus type 2 Gag assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Virol.* 2007;81(18):9911–21. doi:10.1128/JVI.00027-07 Cited in: PubMed; PMID 17609278.
97. Sliepen K, Ozorowski G, Burger JA, van Montfort T, Stunnenberg M, LaBranche C, Montefiori DC, Moore JP, Ward AB, Sanders RW. Presenting native-like HIV-1 envelope trimers on ferritin nanoparticles improves their immunogenicity.

- Retrovirology. 2015;1282. doi:10.1186/s12977-015-0210-4 Cited in: PubMed; PMID 26410741.
98. Jardine J, Julien J-P, Menis S, Ota T, Kalyuzhniy O, McGuire A, Sok D, Huang P-S, MacPherson S, Jones M, Nieuwma T, Mathison J, Baker D, Ward AB, Burton DR, Stamatatos L, Nemazee D, Wilson IA, Schief WR. Rational HIV immunogen design to target specific germline B cell receptors. *Science*. 2013;340(6133):711–6. doi:10.1126/science.1234150 Cited in: PubMed; PMID 23539181.
 99. He L, Val N de, Morris CD, Vora N, Thinnes TC, Kong L, Azadnia P, Sok D, Zhou B, Burton DR, Wilson IA, Nemazee D, Ward AB, Zhu J. Presenting native-like trimeric HIV-1 antigens with self-assembling nanoparticles. *Nat Commun*. 2016;712041. doi:10.1038/ncomms12041 Cited in: PubMed; PMID 27349934.
 100. Kong L, He L, Val N de, Vora N, Morris CD, Azadnia P, Sok D, Zhou B, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Zhu J. Uncleaved prefusion-optimized gp140 trimers derived from analysis of HIV-1 envelope metastability. *Nat Commun*. 2016;712040. doi:10.1038/ncomms12040 Cited in: PubMed; PMID 27349805.
 101. Xu Z, Walker S, Wise MC, Chokkalingam N, Purwar M, Moore A, Tello-Ruiz E, Wu Y, Majumdar S, Konrath KM, Kulkarni A, Tursi NJ, Zaidi FI, Reuschel EL, Patel I, Obeirne A, Du J, Schultheis K, Gites L, Smith T, Mendoza J, Broderick KE, Humeau L, Pallesen J, Weiner DB, Kulp DW. Induction of tier-2 neutralizing antibodies in mice with a DNA-encoded HIV envelope native like trimer. *Nat Commun*. 2022;13(1):695. doi:10.1038/s41467-022-28363-z Cited in: PubMed; PMID 35121758.
 102. Haynes BF, Wiehe K, Borrow P, Saunders KO, Korber B, Wagh K, McMichael AJ, Kelsoe G, Hahn BH, Alt F, Shaw GM. Strategies for HIV-1 vaccines that induce broadly neutralizing antibodies. *Nat Rev Immunol*. 2023;23(3):142–58. doi:10.1038/s41577-022-00753-w Cited in: PubMed; PMID 35962033.
 103. Tarrés-Freixas F, Aguilar-Gurrieri C, La Rodríguez de Concepción ML, Urrea V, Trinité B, Ortiz R, Pradenas E, Blanco P, Marfil S, Molinos-Albert LM, Barajas A, Pons-Grífols A, Ávila-Nieto C, Varela I, Cervera L, Gutiérrez-Granados S, Segura MM, Gòdia F, Clotet B, Carrillo J, Blanco J. An engineered HIV-1 Gag-based VLP displaying high antigen density induces strong antibody-dependent functional

immune responses. NPJ Vaccines. 2023;8(1):51. doi:10.1038/s41541-023-00648-4
Cited in: PubMed; PMID 37024469.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Infektionen laut Schätzungen der WHO im Jahr 2016.....	2 -
Abbildung 2: Einteilung des HI-Virus in die Familie der Retroviren.....	3 -
Abbildung 3: Schematische Darstellung der HIV-Genotypen.....	4 -
Abbildung 4: Aufbau des HI-Virus.....	5 -
Abbildung 5: Schematischer Aufbau eines Retroviren RNA-Genoms.....	6 -
Abbildung 6: Schematische Darstellung des HIV-Lebenszyklus.....	7 -
Abbildung 7: Phasischer Ablauf der Immunantwort nach Antigenexposition.....	10 -
Abbildung 8: Zeitliche Darstellung der HIV-Vakzin-Entwicklung.....	11 -
Abbildung 9: Zusammenstellung von HIV-Vakzinen in klinischen Studien.....	13 -
Abbildung 10: Methodik der Microscale Thermophorese.....	18 -
Abbildung 11: Komplexieren des Analysespektrums innerhalb der MST-Etablierung und Erweiterung der Oligomerisierung zur Affinitätsbestimmung von Ag-Ak- Bindungen.....	20 -
Abbildung 12 Aufreinigung der VLPs mittels Saccharose-Gradienten.....	31 -
Abbildung 13: Ergebnis einer VLP-Aufreinigung über Dichtegradienten- Ultrazentrifugation.....	32 -
Abbildung 14: Quantifizierung der Env/V3-Chimären-VLPs über SDS-PAGE und p24- ELISA.....	34 -
Abbildung 15: Slot-Blot Titration zur Quantifizierung der Env Menge auf den Env/V3- Chimären-VLPs.....	35 -
Abbildung 16: Korrelation zwischen Gag-Menge und Env-Menge auf VLPs.....	36 -
Abbildung 17: Env-Trimer-Anzahl auf den hergestellten Env/V3-Chimären-VLPs.....	37 -
Abbildung 18: Ag-AK-Affinitäts-ELISA der Env/V3-Chimären-VLPs gegen mAb 447- 52D.....	38 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über verwendete Lösungen und Puffer	- 21 -
Tabelle 2: Übersicht verwendeter Kits	- 22 -
Tabelle 3: Übersicht über verwendete Vektoren	- 22 -
Tabelle 4: Übersicht verwendeter chemisch kompetenter Escherichia coli Stämme	- 23 -
Tabelle 5: Übersicht über verwendete Antikörper	- 23 -
Tabelle 6: Übersicht verwendeter Geräte	- 24 -
Tabelle 7: Übersicht über verwendete Software	- 24 -
Tabelle 8: Übersicht über die K_D -Werte der eingesetzten Env/V3-Chimären über unterschiedliche Komplexitätsniveaus gegenüber dem mAb 447-52D im ELISA und FACS (Zell-präsentierte gp145 Trimere)	- 44 -
Tabelle 9: Übersicht über die K_D -Werte der eingesetzten Env/V3-Chimären über unterschiedliche Komplexitätsniveaus gegenüber dem mAb 447-52D in MST mit HBS-EP bzw. HBS-Serum-Mix (HBS-EP mit 50 % humanem Serum) ..	- 46 -

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	IgG	Immunoglobuline G
APC	Antigen presenting cells	ITC	Isothermal titration calorimetry
ART	<i>Antiretrovirale Therapie</i> , Antiretroviral therapy	k_D	Equilibrium dissociation constant
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung	LB	Lysogeny broth
bNAbs	Breitneutralisierende Antikörper	mAb	Monoclonal Antibody
BSA	Bovines Serum Albumin	MST	Microscale Thermophorese
CCR5	C-C chemokine receptor type 5	p17	Protein 17
CD4	Cluster of differentiation 4	p24	Protein 24
CD4bs	CD4 binding site	p55	Protein 55
cDNA	Complementary DNA	PAGE	Polyacrylamidgel für die Electrophorese
CTL	Cytotoxic T-lymphocyte	PBS	Phosphate-buffered saline
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
E. coli	Escherichia Coli	PEI	Polyethyleneimine
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
EM	Elektronenmikroskopie	Pol	Polymerase-reverse Transkriptase
Env	Envelope Glykoprotein	RNA	Ribonucleic acid
ER	Endoplasmatische Retikulum	rpm	rounds per minute
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	SDS	Sodium dodecyl sulfate, Sodium dodecyl sulfate
Gag	Group-specific antigen	SIV	Simianen Immundefizienz Virus
gp120	Envelope-Glykoprotein 120	SPR	Surface plasmon resonance
gp160	Envelope Glykoprotein 160	TBS	Tris buffered saline
gp41	Envelope-Glykoprotein 41	UNAIDS	Unites Nations Programme on HIV/AIDS
HAART	highly active anti-retroviral therapy	VLPs	Virus Like Particles
HCDR3	Heavy chain complementarity- determining region 3		
HEK	Human Embryonic Kidney		
HIV	Humanes Immundefizienz Virus		

Danksagung

Zu Beginn möchte ich Herrn Professor Wagner für die besondere Betreuung und Begutachtung dieser Doktorarbeit danken. Die stete Unterstützung und Anleitung, ob in theoretischen oder praktischen Fragen haben diese Arbeit erst möglich gemacht. Auch im Hinblick darauf, dass, nach längerer Bearbeitungszeit, geprägt durch familiäre Höhen und Tiefen und nicht zuletzt die Pandemie, weiterhin die Vollendung der Doktorarbeit ermöglicht wurde. Vielen Dank auch an Herrn Prof. Bernd Salzberger, diese wissenschaftliche Arbeit gemeinsam mit Prof. Wagner über die Ziellinie zu führen.

Mein großer Dank geht an Dr. Benjamin Zimmer, der mir nicht nur tagtäglich im Labor mit Rat und Tat zur Seite stand, sondern auch mit seinem Wissen und seinen Ideen beim Verfassen dieser Arbeit half. Ebenso möchte ich Dr. David Peterhoff für die Anleitung zur Ausarbeitung dieser Arbeit danken. Technische und praktische Hürden der Doktorarbeit konnte durch eure Hilfe schnell gelöst werden.

An dieser Stelle möchte ich mich auch nochmal bei dem ganzen Team der Arbeitsgruppe Wagner bedanken. Anja, Christina, Helene, Iris, Andi, Jogi, Richie, Tom und das ganze Team der Ag Wagner, die Zeit mit euch war sehr lehrreich und es hat unheimlich viel Freude gemacht mit euch zusammen zu arbeiten. Durch euch wurden auch lange Tage im Labor zu angenehmen Stunden. Vielen Dank für eure seelische und moralische Unterstützung.

Ich danke auch meiner Familie, speziell meiner wunderbaren Ehefrau Claudia. Ohne deine Unterstützung, mir unermüdlich den Rücken bei der Betreuung unserer Kinder und als Arzt freizuhalten, wäre diese Doktorarbeit niemals zum Abschluss gekommen.

Ich möchte auch meiner Familie danken. Meinen Eltern und Geschwistern, die mich stets unterstützen und bestärkten, das Medizinstudium erfolgreich zu beenden.

Zu guter Letzt möchte ich diese Arbeit meinem Vater Wolfgang widmen, der leider sehr unerwartet während der laborpraktischen Bearbeitung verstarb und die Beendigung meines Medizinstudiums und meiner Doktorarbeit nicht mehr miterleben konnte. Du hast mit deiner ruhigen und verständnisvollen Art dazu beigetragen, dass ich meinen Weg im Leben selbstständig finden konnte. Dein Wissen und deine Fürsorge haben in mir den Antrieb geweckt, selbst wissenschaftlich tätig zu werden. Hiermit löse ich unser letztes Versprechen ein, Medizinstudium und Doktorarbeit weiterhin ernst zu nehmen.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, 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. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den

Tobias Fischer