
HIV-spezifische DNA-Impfstoffe mit verbessertem Sicherheits- und Wirksamkeitsprofil: Grundlage innovativer Vakzinestrategien

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



vorgelegt von

Kurt Bieler aus Weiden

Mai 2002

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen März 1998 und Mai 2002 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Universität Regensburg durchgeführt.

Promotionsgesuch eingereicht am: 17.05.2002

Die Arbeit wurde angeleitet von PD Dr. Ralf Wagner

Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. R.Schmid
Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. S. Schneuwly
	PD Dr. R.Wagner
	Prof. Dr. A.Kurtz

Die vorliegende Arbeit wurde selbständig, ohne unzulässige Hilfe angefertigt.

.....
Kurt Bieler

Meinen Eltern

ZUSAMMENFASSUNG.....	1
A – EINLEITUNG	4
A.1 URSPRUNG VON HIV	4
A.2 VORKOMMEN DER HIV-1 VARIANTEN	5
A.2.1 <i>Verbreitung</i>	5
A.2.2 <i>Verteilung</i>	5
A.2.3 <i>Bedeutung der epidemischen Situation für die Impfstoffentwicklung</i>	6
A.3 KOMPLEXER AUFBAU UND REGULATION DER LENTIVIREN.....	6
A.3.1 <i>Genomaufbau</i>	6
A.3.2 <i>Replikationszyklus</i>	7
A.3.2.1 Frühe Phase der Replikation	7
A.3.2.1.1 <i>Virusaufnahme und Zelltropismus</i>	7
A.3.2.1.2 <i>Insertion der proviralen DNA in das Wirtsgenom</i>	8
A.3.2.2 Späte Phase der Replikation	8
A.3.2.2.1 <i>Transkriptionelle Regulation</i>	8
A.3.2.2.2 <i>Expression der späten Transkripte</i>	10
A.4 INFektion UND THERAPIE VON HIV	11
A.5 PROBLEME DER HIV-IMPfstOFFENTWICKLUNG	12
A.6 TIERMODELLE	13
A.6.1 <i>Schimpansenmodell</i>	13
A.6.2 <i>SIV-Makakenmodell</i>	14
A.7 ALTE UND NEUE IMPfstOFFKONZEPTE	15
A.7.1 <i>Inaktivierte HIV-Viruspräparationen</i>	15
A.7.2 <i>Attenuierte HI-Viren</i>	16
A.7.3 <i>Rekombinante Antigene als Vakzine</i>	17
A.7.4 <i>Synthetische Peptide</i>	17
A.7.5 <i>Virus-ähnliche Partikel (VLPs)</i>	18
A.7.6 <i>Rekombinante virale und bakterielle Vektorsysteme</i>	19
A.7.6.1 <i>Virale Vektorsysteme</i>	19
A.7.6.2 <i>Bakterielle Vektorsysteme</i>	19
A.7.7 <i>Rekombinante DNA-Vakzine</i>	20
A.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
B - MATERIAL & METHODEN.....	22
B.1 BAKTERIENSTÄMME UND NÄHRMEDIEN.....	22
B.1.1 <i>Bakterienstämme</i>	22
B.1.2 <i>Nährmedien für Bakterien</i>	22
B.2 KLONIERUNGS- UND EXPRESSIONSVEKTOREN.....	22
B.3 GENSYNTHESE.....	23
B.3.1 <i>GCG-Programm</i>	24
B.3.2 <i>Oligonukleotide</i>	24
B.3.3 <i>Stufenweise PCR-Amplifizierung</i>	25
B.3.4 <i>Zielgerichtete in vitro Mutagenese mittels PCR (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg))</i>	25
B.3.5 <i>Herstellung synthetischer Genprodukte am Beispiel des SIV Pr56^{gag}-Gens</i>	25
B.3.6 <i>DNA-Sequenzierung</i>	26

B.4 ZELLINIEN, TRANSFEKTIONEN UND INFEKTIONEN	27
B.4.1 Eukaryontische Zelllinie	27
B.4.2 Calciumphosphat -Transfektionen.....	27
B.4.3 Infektion von transfizierten H1299-Zellen mit Vakzinia-Virus	27
B.5 AUFARBEITUNG DER ZELLEN	28
B.5.1 Qualitative Analyse viraler Proteine in Zellen und Zellkulturüberständen ...	28
B.5.2 Quantifizierung der Pr55 ^{gag} Konzentration im ELISA	30
B.6 TIEREXPERIMENTE.....	31
B.6.1 Experimente im Balb/C Mausmodell	31
B.6.1.1 Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA	31
B.6.1.2 Herstellung von DNA-Goldpartikel für die intradermale Immunisierung mit der „Partikel-gun“	31
B.6.1.3 DNA- Immunisierung	31
B.6.1.3.1 Die intramuskuläre Immunisierung	31
B.6.1.3.2 Intradermale DNA-Immunisierung mittels „Partikel-gun“.....	32
B.6.2 Analyse der immunisierten Balb/C Mäuse.....	32
B.6.2.1 Serumgewinnung.....	32
B.6.2.2 Bestimmung der Gag spezifischen Antikörpertiter	32
B.6.3 Bestimmung der zellulären Immunantwort	33
B.6.3.1 Präparation und Isolierung von Milzzellen immunisierter Versuchstiere	33
B.6.3.2 Durchführung der Stimulierung von Milzzellen und Austestung des Kulturüberstandes.....	33
B.6.4 Nachweis zytotoxischer T-Zellen.....	34
B.6.4.1 Quantifizierung Zytokin-sezernierender Zellen im ELISPOT-Assay	34
Antikörper-Pärchen.....	34
B.6.4.2 Quantifizierung der intrazellulären INF- γ Produktion stimulierter CD8 ⁺ - Lymphozyten im FACS	35
B.6.4.3 Chrom-Freisetzungs-Test	35
B.6.5 Immunisierung von Rhesus Makaken	36
C – ERGEBNISSE	37
C.1 BEDEUTUNG VON CIS-AKTIVEN ELEMENTEN BEI DER EXPRESSION SPÄTER LENTIVIRALER GENE	37
C.1.1 Entwicklung und Konstruktion unterschiedlicher Gag-Reporterkonstrukte .	38
C.1.1.1 Herstellung von Vektoren zur Expression des SIV-Gag Polyproteins ..	38
C.1.1.1.1 Rev-abhängige Pr56 ^{gag} Expressionsvektoren	39
C.1.1.1.2 Rev-unabhängige Pr56 ^{gag} Expressionsvektoren	39
C.1.2 Expression des Pr56gag-Polyproteins in transfizierten humanen H1299- Zellen	40
C.1.2.1 Rev/RRE-abhängige Proteinexpression in transient transfizierten H1299 -Zellen.....	40
C.1.2.2 Rev-unabhängige Pr56 ^{gag} -Expression durch Anfügen des MPMV konstitutiven RNA-Transportelements CTE	42
C.1.2.3 Rev-unabhängige Proteinexpression durch Integration des funktionellen Introns hCMV.....	43
C.1.2.4 Rev-unabhängige Proteinexpression durch Eliminierung cis-aktiver Sequenzelemente im wtgag-kodierenden Leserahmen	43

C.1.3 Überlegungen zur Vektorsicherheit	45
C.1.4 Kurzzusammenfassung (I)	46
C.2 IMMUNOGENITÄT VERSCHIEDENER GAG-DNA VAKZINE-KANDIDATEN IM BALB/C MAUSMODELL	47
C.2.1 Austestung der zu verabreichenden DNA Menge	48
C.2.2 Das Vektorrückgrat hat keinen Einfluß auf die Immunogenität der DNA- Vakzinekonstrukte	49
C.2.3 Austestung unterschiedlicher Rev-unabhängiger Expressionsvektoren	50
C.2.3.1 Bestimmung der Antikörpertiter	51
C.2.3.2 Austestung der Zytokinsekretion spezifisch restimulierter Milzzellen ...	52
C.2.3.3 Immunologische Austestung der DNA von Rev-unabhängigen Vektorkonstrukten in vitro	54
C.2.3.4 Nachweis von zytotoxischen T-Zellen	55
C.2.3.4.1 ELISPOT-Test	55
C.2.3.4.2 Analyse der intrazellulären INF- γ Produktion mittels FACS	56
C.2.3.4.3 Chrom-Freisetzungs-Test	57
C.2.4 Austestung unterschiedlicher Applikationsformen	58
C.2.4.1 Intramuskuläre Immunisierung plus Elektropuls	58
C.2.4.2 Immunisierung mit der „Partikel-gun“	59
C.2.5 Kurzzusammenfassung (II)	61
C.3 ENTWICKLUNG UND AUSTESTUNG VON EXPRESSIONS-KONSTRUKTEN FÜR DAS RHESUS-MAKAKEN-MODELL	62
C.3.1 Entwicklung und Konstruktion verschiedener DNA-Vektoren für Immunogenitäts- und Verträglichkeitsstudien im SHIV-Makakenmodell	62
C.3.2 Austestung der Konstrukte in vitro im Western-Blot	65
C.3.3 Austestung der Konstrukte in vivo im SHIV-Makaken-Modell in unterschiedlichen Studien	66
C.3.3.1 BPRC2-Studie	67
C.3.3.1.1 Auslesen der induzierten Immunantwort	70
C.3.3.1.2 Virusbeladung nach Infektion mit dem pathogenen SHIV 89.6P- Virus	72
C.3.3.1.3 Bestimmung der Anzahl an CD4 ⁺ Zellen im Blut	72
C.3.3.1.4 Kurzzusammenfassung (IIIA)	74
C.3.3.2 DPZ 1-Studie	75
C.3.3.2.1 Proliferation SIV- und HIV-spezifischer T-Helferzellen	77
C.3.3.2.2 Virusbelastung im Blut nach Infektion mit dem pathogenen SHIV 89.6P Virus-Isolat	78
C.3.3.2.3 Bestimmung der Anzahl an CD4 ⁺ Zellen sowie das CD4/CD8 Verhältnis im Blut nach Infektion	79
C.3.3.2.4 Verlauf der T-Helfer-„Memory“-Zellpopulation nach Infektion	81
C.3.3.2.5 Kurzzusammenfassung (IIIB)	82
C.4 ENTWICKLUNG UND HERSTELLUNG VON EXPRESSIONS-KONSTRUKTEN FÜR HUMANE STUDIEN	83
D – DISKUSSION	86
D.1 ANFORDERUNGEN AN EINE ERFOLGVERSPRECHENDE HIV-VAKZINE	86
D.1.1 Immunologische Anforderungen an eine HIV-Vakzine	86

D.1.2 Antigene zur Induktion einer spezifischen Immunantwort.....	87
D.1.3 Mögliche Vektorsysteme zur Induktion einer ZTL-Immunantwort.....	88
D.1.3.1 „Antigen-Delivery-Systeme“	88
D.1.3.2 Modifikation von „nackter“ DNA durch Kombination mit Adjuvantien oder anderen Vektorsystemen	89
D.1.4 Einfluß der Immunisierungsroute auf Immunogenität von DNA-Impfstoffen.....	90
D.1.4.1 Intramuskuläre Immunisierung	90
D.1.4.2 Intradermale Immunisierung.....	91
D.1.4.3 Orale oder nasale Immunisierung.....	92
D.1.5 Anforderungen bezüglich Sicherheit und Qualität einer DNA-Vakzine.....	92
D.1.5.1 Allgemeine Sicherheitsprobleme einer DNA-Vakzine	92
D.1.5.2 HIV-spezifische Sicherheitsprobleme	93
D.1.5.3 Probleme bei der Herstellung und Lagerung einer HIV-Vakzine.....	93
D.2 EXPRESSION RELEVANTER SIV-VAKZINEKANDIDATEN.....	94
D.2.1 Die Rev-abhängige Regulation später RNAs bei SIV entspricht derjenigen von HIV	94
D.2.2 Rev-unabhängige Gag Expression	95
D.2.2.1 Rev-unabhängige Expression durch Integration des konstitutiven Transport-Elements	95
D.2.2.2 Rev-unabhängige Expression durch Integration eines funktionellen Introns	96
D.2.2.3 Rev-unabhängige Expression durch Herstellung synthetischer Konstrukte	96
D.2.3 Die Rev-abhängige Expression ist speziesabhängig.....	97
D.3 AUSTESTUNG DER KONSTRUKTE IM BALB/C MAUSMODELL	97
D.3.1 „Vergleich“ unterschiedlicher Rev-unabhängiger Konstrukte nach intramuskulärer Immunisierung.	98
D.3.2 Modifikation der intramuskulären Immunisierung durch Elektropuls.....	99
D.3.3 Intradermale Immunisierung mit „Partikel-gun“	99
D.4 AUSTESTUNG DER KONSTRUKTE IM SHIV-MAKAKENMODELL.....	100
D.4.1 Vor- und Nachteile des SHIV-Makaken Modells.....	100
D.4.2 BPRC-2-Studie	101
D.4.3 DPZ-1-Studie.....	102
D.5 AUSBLICK	103
E - ABKÜRZUNGEN.....	105
F - LITERATURVERZECHNIS	108
F.1 VERWENDETE LITERATUR	108
F.2 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	121
F.3 PATENTANMELDUNG	122
F.4 EIGENE VORTRÄGE.....	122
G - DANKSAGUNG.....	123
H - ANHANG.....	124

ZUSAMMENFASSUNG

Der effiziente Einsatz von DNA-Impfstoffen zur Prävention von AIDS wird gegenwärtig durch Sicherheitsmängel sowie eine geringe Immunogenität und Wirksamkeit der derzeit verwendeten Vektoren zur Expression der HIV-1 Strukturproteine limitiert.

Die Expression lentiviraler Gene wie z.B. die des SIV gruppenspezifischen Antigens Gag unterliegt einer strengen Regulation durch das komplexe Zusammenspiel cis- und transaktiver Elemente. Vorrangiges Ziel war es, anhand unterschiedlicher SIV-gag DNA Reporterkonstrukte die komplexe lentivirale Regulation zu verstehen und sie im Hinblick einer SIV-gag spezifischen DNA-Vakzine zu umgehen. In humanen Zelllinien wurde der Einfluß von cis- und trans-ständigen Elementen wie AU-reichen, inhibitorischen Repressorsequenzen (INS), die Verwendung eines konstitutiven RNA-Transport-Elements (CTE) sowie eines funktionellen Introns auf die zeitlich regulierte Rev/RRE-abhängige Genexpression des gruppenspezifischen Antigens SIV-gag sowie deren Sicherheitsrelevanz untersucht.

Der Austausch des natürlichen viralen Rev/RRE-Systems gegen ein konstitutives RNA-Transport-Element (CTE) resultiert nur in Anwesenheit des 5' nicht translatierten Bereichs (NTR), einschließlich der Verpackungssequenz ψ , in einer hohen Rev-unabhängigen Gag-Expression. Demhingegen führt das Einfügen eines funktionellen Introns an den 5'-Bereich des wtgag-Gens zu einer Gag-Expression, unabhängig von Rev/RRE und dem 5'-NTR- Bereich. Die repressiven Elemente (INS) innerhalb der natürlichen Leserahmen von gag wurden durch Anpassung der Kodonwahl an hoch-exprimierte Säugergene, durch Veränderung der Primär- und Sekundärstruktur der RNA, eliminiert. Die so optimierten RNAs wurden, unabhängig von Rev/RRE oder des 5'-NTR, zu sehr hohen Mengen transkribiert und konstitutiv aus dem Zellkern exportiert.

Die immunologische Bewertung der unterschiedlichen DNA-gag-Vakzinekandidaten sowie die Austestung unterschiedlicher Applikationsformen erfolgte zunächst im Balb/C-Mausmodell. Die stärkste Immunstimulation wurde durch intramuskuläre Immunisierung mit der - auch unter dem Sicherheitsaspekt attraktivsten - syngag Vakzine erzielt und äußerte sich in einer signifikanten T-Helfer-1 (TH-1)-vermittelten Immunantwort. Diese war charakterisiert durch hohe Titer spezifischer IgG2a-Antikörper, eine signifikante IFN- γ -Sekretion und einer starken ZTL-Antwort. Die beiden anderen Rev-unabhängigen Expressionsvektoren induzierten demgegenüber lediglich eine um mehrere Zehnerpotenzen verminderte Pr56^{gag}-spezifische TH-1-Immunantwort. Im Gegensatz zur humoralen Immunantwort ließ sich die zelluläre Immunantwort des optimierten syngag Konstruktes noch dosisabhängig steigern.

Um für Anwendungen in Primaten die DNA Menge zu reduzieren, wurden *in vivo* Elektroporation sowie die Applikation Partikel-assoziiierter DNA mittels „Partikel-gun“ untersucht. Während die Verabreichung von Elektropulsen nach der *intramuskulären* Immunisierung im Wesentlichen eine signifikante Steigerung der humoralen Immunantwort ergab, resultierte die intradermale Verabreichung der Gag-spezifischen DNA Vakzine in einer, nach gegenwärtigem Kenntnisstand unerwünschten Verlagerung des Zytokinprofils (TH1–TH2) bei gleichzeitig reduzierten humoralen und zellulären Immun-

parametern.

Die Austestung im murinem System gab erste Anhaltspunkte bezüglich Effektivität und Immunogenität kodonoptimierter DNA-Vakzinekandidaten. Das entscheidende Kriterium für weiterführende humane Studien erfordert jedoch zwingend die Testung unterschiedlicher kodonoptimierter DNA-Vektoren (SIV_{mac239} syngag, SIV_{mac239} syngag-pol, 89.6P synenv 120; 140; 160 und HIV_{IIIB} syntat) im derzeit relevantesten Tiermodell, dem SHIV-Makakenmodell. Die DNA-Impfstoffkandidaten wurden in Kombination mit rekombinanten viralen Vektoren, hier modifizierte Vakziniaviren (MVA; modified vaccinia ankara) im *Prime-Boost*-Verfahren in zwei unabhängigen Studien bezüglich ihrer Wirksamkeit sowie möglicher Risiken mit einer pathogenen SIV/HIV Viruschimären (SHIV 89.6P) bewertet.

In der Studie BPRC 2 wurde zusätzlich der Einfluß von Adjuvantien (Gruppe2 mit IL-12 u. IL-18; Gruppe3 nur mit IL-12; Gruppe4 ohne IL-12 u. IL-18) beurteilt. Ein vollständiger Schutz, der sich durch Eliminierung des Virus ausgezeichnet hätte, konnte in keiner der untersuchten Gruppen nach *intravenösem Challenge* (BPRC 2-Studie) erzielt werden. Dennoch wurde die initiale Viruslast in allen drei Gruppen, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, deutlich reduziert und ein früherer und niedrigerer „Set Point“ erzielt. Der Benefit der Immunisierung wurde besonders im Verlauf der CD4-Zellzahl nach Infektion deutlich. Durch die spezifische Immunisierung konnte die Reduktion dieser wichtigen Zellen des Immunsystems durch das hoch pathogene Virus SHIV_{89.6P} verhindert werden. Die Verabreichung von Zytokinen wie IL-12 und IL-18 sollte das Immunsystem in Richtung TH1 *primen*. Dies erwies sich aber als „zweischneidiges Schwert“. Zwar zeigten die Gruppen, denen Interleukine verabreicht wurden, eine erhöhte Induktion von ZTLs und T-Helferzellen, diese waren aber möglicherweise auf eine breite und unspezifische T-Zell Aktivierung zurückzuführen. Da das Virus nach Infektion nur in aktivierten T-Zellen repliziert, werden aufgrund der unspezifischen T-Zell Aktivierung initial mehr Zielzellen in diesen Gruppen infiziert und somit der positive Effekt während der Immunisierung aufgehoben.

In der DPZ 1-Studie sollte die Wirksamkeit der kodonoptimierten DNA-Vakzinekandidaten bezüglich eines *rektalen Challenge* sowie der Verwendung unterschiedlicher Immunisierungsrouten (*intramuskulär/intradermal versus nasa*) analysiert werden. Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle Affen trotz *rektaler* Infektion mit SHIV_{89.6P} infiziert wurden, und in der Gruppe E (2. MVA-Immunisierung *nasa*) drei von vier Tieren vollständig geschützt waren. Im Vergleich dazu war nur ein Tier der Gruppe D (2. MVA-Immunisierung *im./id.*) vollständig geschützt. In beiden Gruppen war die initiale Viruslast im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich reduziert. Durch die spezifische Immunisierung konnte sowohl in Gruppe D als auch in Gruppe E die Reduktion der CD4-Gesamtpopulation als auch die für den langanhaltenden Schutz so notwendigen T-„Memory“-Zellen des Immunsystems durch das Virus SHIV_{89.6P} verhindert werden.

Diese beiden Versuchsreihen im Rhesus-Makakenmodell haben uns einen vielversprechenden Ansatz für weiterführende humane Studien geliefert. Analog den kodonoptimierten DNA-Vektoren für die Primaten-Studien wurden im Rahmen dieser Arbeit DNA-Vektoren entwickelt, die auf einem endemisch vorkommenden HIV Primärisolat basierten. Der für die humanen Studien unter GMP-Bedingungen (GMP: good manufacturing practice) fertiggestellte „Batch“ an DNA-Vektoren wird aktuell zur Kontrolle

auf Effektivität und Immunogenität im Balb/C-Mausmodell getestet. Gegen Ende dieses Jahres starten die ersten klinischen Studien in Amsterdam und Lausanne an freiwilligen, ausschließlich HIV-negativen Probanden, die keinerlei Risiko für eine HIV Infektion aufweisen sollten. In diesen Studien wird die Verträglichkeit sowie die zu verabreichende Menge an DNA-Vektoren immunologisch analysiert. In weiterführenden Studien werden diese neuartigen Vektoren europaweit in unterschiedlichen „*Prime-Boost*“-Verfahren, in Kombination mit rekombinantem Protein oder attenuierten Vaccinia-Vektoren (MVA oder NYVAC), immunologisch getestet.

A – EINLEITUNG

Seit der Entdeckung der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) in den achtziger Jahren breitet sich trotz umfassender Aufklärungskampagnen und intensiver wissenschaftlicher Anstrengungen die AIDS-Pandemie mit unverminderter Geschwindigkeit aus. Nach vorsichtigen Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind im Jahr 2002 mindestens 40 Millionen Menschen in mehr als 150 Ländern mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) infiziert. Die Länder der „Dritten Welt“ sind hierbei mit mehr als 95% der Infizierten besonders stark betroffen (Quelle: WHO 2001).

Bei dem humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) handelt es sich um ein komplexes Retrovirus. Die Taxonomische Gruppe der Retroviridae umfaßt Oncoviren (Typ-A, B, C, D), T-Zell Leukämieviren (HTLV-1 und 2), Spumaviren sowie Lentiviren, zu denen u.a. die humanen Immundefizienzviren HIV-1 und HIV-2, als auch die Affen- und Katzen-Immundefizienzviren (SIV und FIV) zählen.

A.1 Ursprung von HIV

Übertragung auf den Menschen

Eine Hypothese geht von der Übertragung von SIV im Affen auf den Menschen im Zusammenhang mit der Polioschutzimpfung in Afrika aus. Die Kultivierung des inaktivierten Poliovirus erfolgte in Nierenzellen von grünen Meereskatzen die möglicherweise mit SIV infiziert waren. 1992 konnte auch in einer ganz frühen afrikanischen Poliovakzine SIV nachgewiesen werden. Durch eine *intravenöse* Verabreichung eines kontaminierten Impfstoffes könnte somit eine Übertragung auf den Menschen erfolgt sein (Elswood et al., 1994).

Wahrscheinlicher ist jedoch, daß der Ursprung von HIV-1 auf einen Wirtswechsel von in Schimpansen prävalenten HIV/SIV Varianten (HIV_{CPZ}/SIV_{CPZ}) zum Menschen zurückzuführen ist. Dieser Wirtswechsel vollzog sich höchstwahrscheinlich durch die Bejagung und den Verzehr bestimmter, in Zentral- und Ost-Afrika endemischer Schimpansenarten (Gao et al., 1999; Sharp et al., 1999).

Die Pandemie könnte dann durch mehrmaliges Benutzen von Spritzen bei Impfungen oder Antibiotikagaben eingeleitet worden sein. Die allgemeine Urbarmachung des afrikanischen Kontinents und gesteigerte Mobilität der Menschen haben im Folgenden zur Verbreitung des Erregers beigetragen.

Etwa zur gleichen Zeit ist eine weitere Pandemie in Westafrika durch HIV-2 ausgelöst worden. Hier ist man sich sicher, daß eine Speziesübertragung von in Mangabey-Affen vorkommenden Viren auf den Menschen stattgefunden hat (Desrosiers, 1990; Gao et al., 1992; Nathanson et al., 1993).

Die natürliche Region der Mangabey-Affen, die Wälder Westafrikas, ist fast identisch mit der Region, in der die Infektion mit HIV-2 endemisch ist.

A.2 Vorkommen der HIV-1 Varianten

Die erworbene Immunschwäche AIDS hat sich in nur 22 Jahren, seit sie erstmals durch das *Center for Disease Control* 1980 dokumentiert wurde, zu einer der größten globalen Pandemien des 20. Jahrhunderts entwickelt.

A.2.1 Verbreitung

Obwohl HIV zuerst nur bei an AIDS erkrankten homosexuellen Männern in den Vereinigten Staaten identifiziert wurde, ist es heute in vielen anderen Gruppen wie Drogenabhängigen (*intravenös*), Blutern, Empfängern von Blutkonserven, Sexualpartnern von HIV-infizierten Personen und auch in Kindern von AIDS-kranken Müttern verbreitet. Was mit fünf dokumentierten Fällen begann, erhöhte sich in den folgenden Jahren exponentiell. Zwischen 1980 und 1985 schätzte man 70 000 Fälle von AIDS weltweit, von 1986 bis 1988 hatte die Zahl auf 300 000 zugenommen, und 1992 waren es bereits 612 000 Fälle.

Ende 2001 wurde die Zahl der infizierten Menschen von der *World Health Organization* (WHO) auf über 40 Millionen geschätzt und täglich werden ca. 16 000 Menschen weltweit neu infiziert. Der Großteil der betroffenen HIV-positiven Personen (mehr als 95%) leben in den sogenannten „Entwicklungsländern“ mit unzureichender medizinischer und materieller Versorgung.

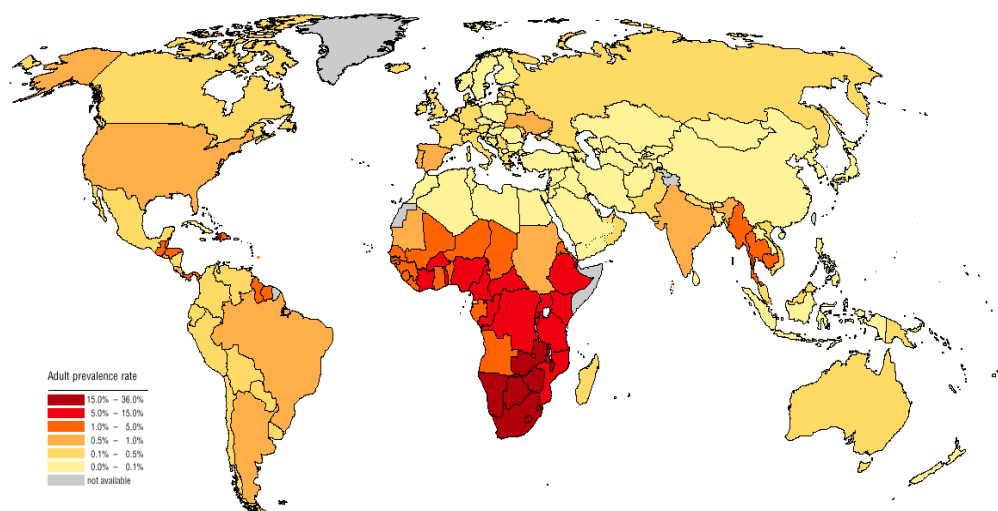


Abbildung A 1: Weltweite Verteilung von HIV- infizierten Personen (Abbildung der WHO)

A.2.2 Verteilung

Mittlerweile kennt man mindestens zwei Typen des HI-Virus, deren Genome zu etwa 40 Prozent übereinstimmen: (i) HIV-1 (mit zehn Subtypen: A bis I und zusätzlich O), welches global vertreten ist und (ii) HIV-2, das in West-Afrika endemisch und inzwi-

schen auch in Indien verbreitet ist. Das Spektrum an Virusvarianten wird, wie neuerdings offensichtlich wurde, zusätzlich durch das Auftreten von sogenannten Mosaikviren erweitert. In Regionen, in denen mehrere Virusvarianten koizirkulieren, kann es durch die gleichzeitige Infektion einer Zelle mit unterschiedlichen Subtypen zum Auftreten dieser chimären Viren kommen (Carr et al., 1996; Robertson et al., 1995; Su et al., 2000).

In Afrika werden vor allem die HIV-1 Subtypen A, D und C am häufigsten isoliert. Subtyp C löst weltweit die meisten Infektionen aus. In West-Europa, Amerika und Australien hingegen treten gehäuft B-Typ Varianten auf (McCutchan et al., 1996)

In den letzten Jahren ist ein drastischer Anstieg von Neuinfektionen im osteuropäischen als auch im südostasiatischen Raum zu bemerken.

A.2.3 Bedeutung der epidemischen Situation für die Impfstoffentwicklung

Derzeit ist davon auszugehen, daß die Entwicklung eines wenigstens partiell schützenden HIV Impfstoffes die einzige Möglichkeit darstellt, existierende Infektionsketten wirkungsvoll zu unterbrechen. Dabei gilt es, nicht nur die Sicherheit und die Immunogenität eines Impfstoffes zu optimieren, sondern auch die epidemiologische Verbreitung verschiedener HIV-Subklassen zu analysieren, u.a. um Impfstoffe, sofern notwendig, an die regionale epidemiologische Situation anzupassen.

Aus diesem Grund wird in unserer Arbeitsgruppe in einem von der EU geförderten Projekt seit 1994 bis heute ausführlich die molekular-epidemiologische Situation in einem potentiellen Testgebiet in China analysiert.

Die am häufigsten vorkommenden HIV-1 Subtypen in China sind B und C (ca. 84%). Subtyp E tritt nur in ungefähr 10% der HIV-Infizierten auf. Ausgehend von den durchgeführten Analysen konnte festgestellt werden, daß die Epidemie in China ihren Anfang an der Südwestgrenze des Landes hatte. Subtyp B verbreitete sich in China ausgehend von Myanmar, Subtyp E stammt von den angrenzenden Nachbarstaaten und Subtyp C aus Indien. In der Folge wurden in unserer Arbeitsgruppe mehr als 100 Primärisolate analysiert, um ein repräsentatives C-Typ-Virus zu identifizieren (Graf et al., 1998). Sequenzanalysen zeigten, daß es sich bei dem repräsentativen Virusisolat (97CN54) um ein Mosaikvirus aus C- und B-Typ Virus handelt (Su et al., 2000). Dieses für den Süden von China typische Isolat ist auch Ausgangspunkt unserer Arbeitsgruppe gewesen, um einen an eine präzise definierte Region angepaßten Impfstoffkandidaten zu entwickeln. Ein mindestens genauso wichtiges Augenmerk muß bei der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes neben der Epidemiologie, auch auf die komplexe Biologie und Funktionalität des Virus gelegt werden.

A.3 Komplexer Aufbau und Regulation der Lentiviren

A.3.1 Genomaufbau

Das ~9,2kBp lange provirale Genom besteht aus zwei identischen, einzelsträngigen RNA-Molekülen und wird von zwei terminalen Wiederholungssequenzen (LTR) flankiert. Diese *long terminal repeats* (LTR) beinhalten eine Reihe von cis-aktiven Elementen, unter anderem Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren (wie

NF- κ B und Sp1) oder virale Transaktivatoren (TAR-Sequenz). Darüber hinaus beinhalten diese Regionen wichtige Elemente für die Initiation der Reversen Transkription, die Integration und ein Polyadenylierungssignal zum Anfügen des Poly(A)-Schwanzes an die viralen Transkripte (Brown et al., 1991). Das unprozessierte genomische Primärtranskript besitzt an seinem 5' Ende eine Verpackungssequenz (Ψ), mit der es als genomische RNA im Viruskapsid verankert werden kann. Diese Ψ -Sequenz umfaßt im wesentlichen eine 5' vom Gag-Leserahmen gelegene nicht-translatierte Region (NTR), die sich auch noch bis in die kodierende Region des Gag-Leserahmens erstreckt (Clever et al., 1995). Des weiteren scheinen auch verpackungsaktive Sequenzen im Pol- und Env-Leserahmen zu existieren (Parolin et al., 1994; Richardson et al., 1993). Diese Sequenzen stellen auch ein mögliches Sicherheitsrisiko bei der Entwicklung eines Impfstoffes auf Nukleinsäure-Basis dar.

Während früher Infektionsstadien wird das komplex organisierte RNA-Genom durch die virale Reverse Transkriptase in ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül umgeschrieben. Die Anordnung der teilweise überlappenden, offenen Leserahmen mit Angabe der kodierten Gene ist in Abbildung A2 für HIV-1 und SIV_{mac239} dargestellt.

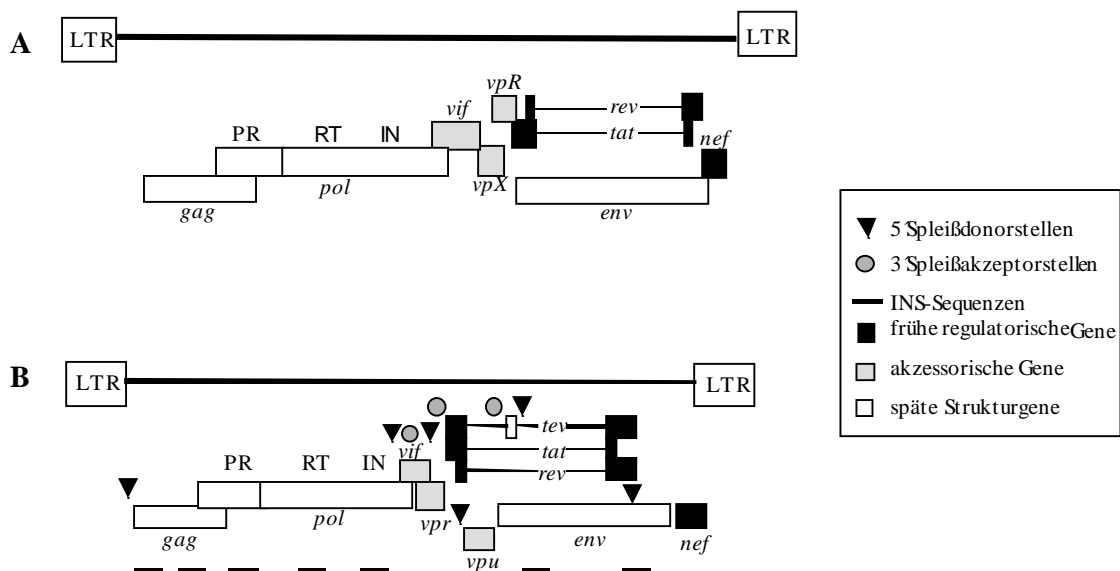


Abbildung A 2: Schematische Übersicht über die Leserahmen des HIV-1 und SIV_{mac239} Genoms. Die ungefähren Positionen der 5'-(schwarze Dreiecke) und 3'-(Kreise) Spleißstellen im HIV-1 Genom sind angegeben (Purcell et al., 1993; Schwartz et al., 1990; Schwartz et al., 1991). **INS:** inhibitory negative sequences, **RRE:** rev-responsive element, **TAR:** tat-activating region, **Gag:** gruppenspezifisches Antigen, **Pol:** Polymerase, **IN:** Integrase, **RT:** Reverse Transkriptase, **tat:** Transaktivator der Transkription, **rev:** Regulator der Expression viraler Proteine, **nef:** negativer Faktor der Replikation, **tev:** Tat-Rev-Fusionsprodukt, **vif:** viraler Infektiositätsfaktor, **vpr:** virales Protein R, **vpu:** virales Protein U, **vpx:** virales Protein X, **LTR:** long terminal repeat.

A.3.2 Replikationszyklus

A.3.2.1 Frühe Phase der Replikation

A.3.2.1.1 Virusaufnahme und Zelltropismus

Die frühe Phase der Replikation beginnt mit der Adsorption reifer, infektiöser HI-Viren an die Zielzellen (T-Helfer-Zellen, Makrophagen / Monozyten, Langerhanszellen). Die

Interaktion des externen Hüllproteins (env) Gp120 mit der amino-terminalen D1-Domäne des CD4-Rezeptors auf der Oberfläche der Wirtszellen bewirkt eine konformationelle Umlagerung im Gp120. Diese Umlagerung hat zur Folge, daß die dritte variable Domäne (V3-Domäne) von Gp120 nun frei zugänglich für eine weitere Gruppe von Zelloberflächenproteinen, den Chemokinrezeptoren, ist. Diese spezifische Bindung der V3-Domäne ist ausschlaggebend für den Zelltropismus von HIV. So erkennt die V3-Domäne makrophagotroper Viren den Chemokinrezeptor CCR5 (Deng et al., 1996), während T-Zell-trope Viren an CXCR4 (Feng et al., 1996) als Korezeptor binden können. Davon abweichend wurden auch Virusvarianten beschrieben wie z.B. das Isolat 89.6, die beide Chemokinrezeptoren erkennen können. Die Bindung an den Korezeptor induziert eine weitere Umlagerung, diesmal im Gp41 welche die Fusion mit der Wirtszellmembran einleitet (Weissenhorn et al., 1997). Durch die Fusion der Wirtszellmembran mit der Virushülle wird das Viruskapsid in das Zytoplasma freigesetzt (Perez et al., 1992).

A.3.2.1.2 Insertion der proviralen DNA in das Wirtsgenom

Im Zytoplasma wird das diploide RNA-Genom durch die Reverse Transkriptase in ein doppelsträngiges DNA-Intermediat umgeschrieben, wobei eine Lysin-tRNA als Starter-nukleotid fungiert. Bei dem komplexen Vorgang der Reversen Transkription, bei welchem es zu mehrfachen Matrizenwechseln kommt, werden die flankierenden LTR - Fragmente vervollständigt. Im Gegensatz zu einfacheren Retroviren wird dieses DNA-Intermediat im Komplex mit dem p17 Matrixprotein, der Integrase, der Reversen Transkriptase sowie Vpr, aktiv als Präintegrationskomplex in den Zellkern transportiert (Bukrinsky et al., 1992; Heinzinger et al., 1994). Die dadurch erworbene Fähigkeit zur Infektion ruhender Zellpopulationen, wie die der T-Helfer-Gedächtniszellen, erlaubt eine Erweiterung des Wirtszellspektrums sowie die Möglichkeit der Latenz in ruhenden Zellen.

Die Insertion der proviralen DNA ins Wirtsgenom erfolgt anschließend mit Hilfe der viralen Integrase. Das nun als Provirus mit kompletten LTRs vorliegende Genom dient als Matrice zur Transkription der viralen Gene unter der Kontrolle des 5'-LTR-Promotors.

A.3.2.2 Späte Phase der Replikation

Die späte Phase des viralen Zyklus beginnt mit der Synthese ungespleißter und gespleißter mRNA-Transkripte, die aus dem Zellkern zur Translation transportiert werden.

A.3.2.2.1 Transkriptionelle Regulation

Lentiviren besitzen nur eine Promotorregion, die innerhalb des 5' LTRs lokalisiert ist und die Transkription des ~9kB langen genomischen Primärtranskriptes kontrolliert. Obwohl die retrovirale Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II in Verbindung mit zellulären Initiationsfaktoren (wie z.B. NF-κB, AP1 und Sp1) erfolgt, verwendet HIV-1, wie einige andere Lentiviren auch (SIV, HIV-2), zudem einen eigenen Transaktivator: das Tat Protein. Dieses wird in der späten Phase der Replikation aus einer mehrfach gespleißten mRNA gebildet und bindet als Aktivator der Transkription an eine RNA-Zielstruktur („*tat recognition site*“ TAR) am 3' Ende des

5' LTRs. In Abwesenheit des nur 14kDa großen Proteins werden fast ausschließlich sehr kurze Transkripte gebildet. Die Bindung von Tat an TAR ist somit essentiell für die effektive Transkription des HIV-1 Genoms (Jones et al., 1994). Tat erhöht bei diesem Prozeß die Prozessivität der RNA-Polymerase II und stabilisiert die Elongation. Die Termination der Transkription sowie die Polyadenylierung erfolgen durch cis-ständige Elemente innerhalb des 3' LTRs.

Durch alternative Spleißereignisse sowie weitere, auf RNA-Ebene stattfindenden Regulationsmechanismen, werden unterschiedliche Gene aus nur einem ~9kB großen Primärtranskript generiert. So werden im Verlauf der Virusreplikation durch multiple Spleißereignisse mehr als 30 verschiedene mRNAs gebildet (Hsu et al., 1985). Diese viralen Transkripte können aufgrund ihrer Größe in 3 Klassen aufgeteilt werden: ~9kB ungespleißte (gag, pol), ~4kB einfach gespleißte (env, vif, vpr, vpu) und ~2kB mehrfach gespleißte (rev, tat, nef) RNAs.

- *Zeitliche Regulation der Transkription*

Die ersten Transkripte, welche den Zellkern verlassen sind ausschließlich mehrfach gespleißte 2kB mRNAs (rev, tat, nef). Erst zeitlich verzögert treten auch die einfach (4kB) und ungespleißten (9kB) Transkripte sowie ihre Genprodukte Gag, Pol und Env auf. Bei Infektionsstudien mit Rev-negativen Virus-Mutanten konnten die unvollständig gespleißten Transkripte, sowie die entsprechenden späten Strukturproteine (Gag, Env) und Enzyme (Pol) nie im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die einfach und ungespleißten Transkripte akkumulieren im Kern, wo sie zum Teil degradiert werden. Ausführliche Studien zu diesem Thema wurden auch in unserer Arbeitsgruppe von Marcus Graf im Rahmen seiner Promotion durchgeführt (Graf et al., 2000). Wie wir aus diesen Studien sehen, ist Rev essentiell an der zeitlich regulierten Expression der viralen Gene beteiligt.

- *Rev*

Rev ist ein ~18kDa großes Phosphoprotein und verfügt über ein Kernlokalisierungssignal NLS (*nuclear localisation signal*), über welches es in den Kern der Wirtszelle transportiert wird (Henderson et al., 1997). Im Kern bindet dann Rev an seine RNA-Zielstruktur dem *Rev-responsive-element* (RRE) (Emerman et al., 1989). Diese 351 Nukleotide (Nt) lange Region ist innerhalb des Env-Leserahmens lokalisiert und damit Bestandteil aller einfach und ungespleißten Transkripte. Flankierend neben dem NLS liegt eine bislang ungenau charakterisierte Multimerisierungsdomäne. Über diese werden durch kooperative Protein-Protein und RNA-Protein Wechselwirkungen bis zu acht weitere Rev-Moleküle gebunden. Anschließend wird dieser Ribonukleoprotein- (RNP)-Komplex über die Interaktion mit zellulären Faktoren aus dem Zellkern exportiert. Dazu ist eine C-terminal gelegene Leucin-reiche Sequenz notwendig, die als Kernexportsequenz NES (*nuclear export sequence*) die nukleäre Translokation des Rev-Proteins unter Verwendung zellulärer Mechanismen vermittelt. Bei dem 116 Aminosäure langen Rev handelt es sich also um ein *Kernshuttle*-Protein, welches in der Lage ist, zwischen Kern und Zytoplasma hin und her zu wandern. Dabei transportiert Rev über die spezifische Wechselwirkung mit seiner Zielsequenz (RRE) und durch Interaktion mit zellulären Faktoren (siehe Abbildung A3) ungespleißte und einfachgespleißte mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma (Übersicht: (Pollard et al., 1998)).

Nach der Translation der frühen mehrfach gespleißten Rev-mRNA wird das *Kern-shuttle-Protein* durch Bindung seiner Arginin-reichen NLS-Domäne an Importin- β (Henderson et al., 1997) direkt in den Nukleus transportiert.

Der Kernexport ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs erfolgt nach Bindung von Rev an RRE mit Hilfe von CRM1 (bzw. sein humanes Homolog Exportin1), welches nicht nur an das NES von Rev, sondern auch an RanGTP binden kann. Danach interagiert CRM1 mit dem Kernporenkomplex und unter Hydrolyse des GTPs wird der Rev/RRE/CRM1/RanGTP-Komplex durch die Kernporen des Nukleus geschleust. Anschließend dissoziiert dieser Ribonukleinkomplex im Zytoplasma, und die späten Transkripte gag, pol und env stehen nun der zellulären Translationsmaschinerie zur Verfügung.

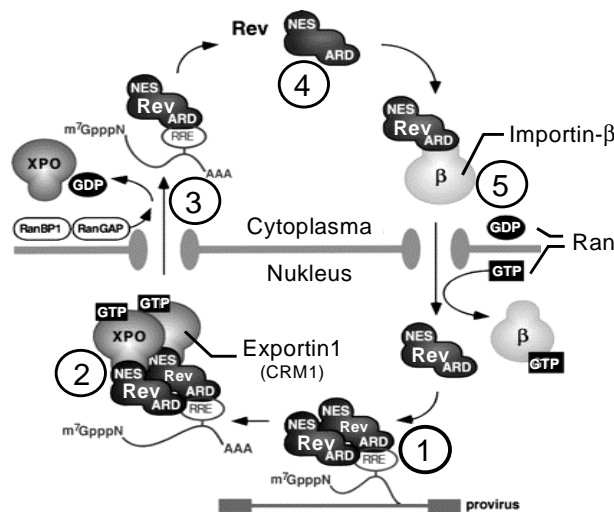


Abbildung A 3: Kerntransport-Zyklus und Interaktionspartner von Rev. (1) Rev bindet im Kern mit seiner Arginin-reichen Domäne (ARD) an RRE und oligomerisiert. (2) Rev bindet mit seiner Kernexportsequenz (NES) an Exportin 1 (CRM1) und dieses an RanGTP. (3) Der Rev/RRE/CRM1/RanGTP-Komplex wird durch Interaktion mit dem Kernporenkomplex exportiert. (4) RanGTP wird zu RanGDP hydrolysiert und der Ribonukleoproteinkomplex wird aufgelöst. (5) Rev bindet mit seiner ARD an Importin- β und wird in den Kern transportiert. Darstellung modifiziert nach (Pollard et al., 1998).

A.3.2.2.2 Expression der späten Transkripte

- Gag- und Gag-Pol Vorläufer

Die meisten Genprodukte werden von ihrer eigenen mRNA translatiert. Lediglich der virale Pol-Leserahmen wird von derselben genomischen mRNA abgelesen wie das Gag-Gen. So wird Pol infolge eines -1 ribosomalen Rastersprungs am Übergang der beiden Leserahmen ($p6^{\text{gag}}$ und $p6^*$) an der sogenannten „slippery-site“ als GagPol-Polypeptid $\text{Pr160}^{\text{gagpol}}$ abgelesen (Jacks et al., 1988). Dieses GagPol Polypeptid wird in einem Mengenverhältnis von etwa 5% zum Gag-Protein gebildet. Dieser statistische Leserastersprung sichert das Verhältnis von Gag zu Gag-Pol, was Voraussetzung für eine funktionelle Virusmorphogenese ist. Für den zielgerichteten Transport der Polypeptide zur Zytoplasmamembran ist zum einen eine basische Sequenzfolge (Freed et al., 1995a) als auch die Myristylierung (Bryant et al., 1990; Freed et al., 1994) im Matrixanteil des 55kDa (Pr55) gag Vorläufers notwendig.

- *Glykoprotein Gp160*

Das Glykoprotein Gp160 wird an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) synthetisiert, im Lumen des ER glycosyliert und durch den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche transportiert (Dewar et al., 1989; Willey et al., 1992). Im trans-Golgi-Kompartiment wird Gp160 durch eine zelluläre Furin-Protease in den externen (Gp120) und den transmembranen (Gp41) Proteinanteil gespalten (Dewar et al., 1989). Die nicht kovalent verbundenen Spaltprodukte lagern sich zu trimeren oder tetrameren Komplexen in der Zellmembran zusammen. Der gerichtete Einbau in HIV-Partikel wird durch Interaktionen des zytoplasmatischen Anteils des Gp41 mit Bereichen des Matrixproteins in den Gag und Gag-Pol Vorläufern bestimmt (Dorfman et al., 1994; Freed et al., 1995b; Yu et al., 1992).

- *Virusfreisetzung und Virusreifung*

Die Knospung von HI-Viren wird durch die Kondensation von Gag und Gag-Pol Vorläufern an der Zellmembran eingeleitet. Die anschließende Abschnürung der Vesikel beendet die Freisetzung unreifer Viren (Gelderblom, 1991). Das Gag Vorläuferprotein alleine beinhaltet alle Informationen, die zur Ausbildung einer partikulären Struktur notwendig sind (Gheysen et al., 1989; Wagner, 1991; Wagner et al., 1992). Jedoch ist für die Reifung der aus den infizierten Zellen abknospenden Viruspartikel die proteolytische Aktivität der HIV PR notwendig. Erst nach Spaltung der Polyproteine Gag und Pol in die viralen Strukturkomponenten und Enzyme sind die Nachkommenviren wieder infektiös.

A.4 Infektion und Therapie von HIV

Heute besteht kein Zweifel mehr daran, daß die erworbene Immunschwächeerkrankung AIDS auf eine Infektion mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) zurückzuführen ist (Blattner et al., 1988). Bei der primären Infektion mit HIV kommt es zur Ausbreitung des Virus im lymphatischen Gewebe. Diese erste Phase der akuten Infektion ist durch eine sehr hohe Virämie (Viruslast) und somit auch eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit der Übertragung des Virus charakterisiert. Innerhalb weniger Wochen erfolgt, bedingt durch die Immunantwort des Patienten, eine partielle Kontrolle der HIV-Replikation. Mit abnehmender Virämie stellt sich eine von Patient zu Patient unterschiedlich hohe Viruslast ein. Die Höhe der Viruslast in dieser Phase der Infektion (detektierbar durch die quantitative Bestimmung der HIV-RNA Kopien) ist ein maßgeblicher Parameter für den weiteren zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Patienten, bei denen die HIV-RNA Kopienzahl unter 10 000 Genkopien/ml Blut liegen, haben eine deutlich längere Überlebenschance, als Patienten mit höheren Titern. Obwohl in dieser Phase (klinische Latenzphase) meist keinerlei Beschwerden vorhanden sind, werden täglich vorwiegend in $CD4^+$ -Lymphozyten (99%) etwa 10^9 Virionen produziert und durch das Immunsystem wieder eliminiert. Gleichzeitig werden aber auch, durch den zytopathischen Effekt der Infektion an sich oder Eliminierung infizierter Zellen durch das Immunsystem, etwa 5×10^8 – 1×10^9 $CD4^+$ Zellen pro Tag zerstört. Die Anzahl der zerstörten $CD4^+$ Zellen entspricht in etwa der Zahl an Zellen, die der Körper pro Tag neu herstellen kann. Insgesamt führt dieser beinahe „steady state“ Zustand in der Regel zu einem langsamen aber stetigen Abfall der T-

Helferzellen im Blut, der sich meist über viele Jahre hinziehen kann. Das Verhältnis von CD4⁺-Zellen zu CD8⁺-Zellen (Suppressor- zu zytotoxischen T-Zellen: normalerweise CD4⁺:CD8⁺>1) dreht sich im Verlauf der Infektion um. Sinkt die Zahl der CD4⁺-Zellen unter eine kritische Schwelle von etwa 200/μl Blut, kommt es zum gehäuftem Auftreten von AIDS-typischen opportunistischen Infektionen, die auf einen nahen Zusammenbruch des Immunsystems hindeuten (Levy, 1993; Rinaldo et al., 1995).

In den letzten Jahren wurden deutliche Fortschritte in der Entwicklung und Anwendung neuer Therapeutika erzielt. Durch die gleichzeitige Verabreichung unterschiedlicher Wirkstoffe zur Hemmung der viralen Enzyme Reverse Transkriptase (z.B. AZT (Zidovudin) sowie nicht-nukleosidische Inhibitoren) und Protease (z.B. Invirase® (Saquinavir) oder Norvir® (Ritonavir)) konnte die Viruslast bei vielen Patienten zwar unter die Nachweisgrenze von 50 Viren pro ml Blut gesenkt, jedoch nicht endgültig eliminiert werden. In vielen Patienten konnten nach Absetzen der Therapie innerhalb von wenigen Wochen wieder hohe Virustiter im Blut nachgewiesen werden (Chun et al., 1997; Neumann et al., 1999). Neben lymphoiden Zellen werden auch frühzeitig langlebige Makrophagen und Gliazellen des ZNS von der Infektion erfaßt. Diese Zellen spielen in der Dynamik der HIV-Infektion keine so große Rolle wie CD4⁺-Lymphozyten, allerdings sind sie therapeutisch schwerer erreichbar und bereiten deshalb Probleme bei der Eliminierung des Virus. Studien von Saag und Kilby gehen davon aus, daß ein Patient im Durchschnitt 60 Jahre therapiert werden müßte, um HIV vollständig aus dem Körper zu entfernen (Saag et al., 1999). Dies zeigt deutlich, daß durch die heutzutage verwendeten Kombinationsmedikamente eine Behandlung der Infektion, aber keine Heilung möglich ist. Durch die gleichzeitige Verabreichung von mindestens drei bzw. vier verschiedene Medikamente wird das Auftreten resistenter Viren infolge des hohen Selektionsdrucks zur Zeit noch reduziert. Doch langfristig gesehen stellt die Resistenzbildung der Viren als auch die schlechte Verträglichkeit einiger Präparate ein großes Problem für die Therapie dar. Zudem sind die derzeit verwendeten Therapeutika sehr kostenintensiv (ca. 15 000 € pro Patient und Jahr) und somit für den Einsatz in den Entwicklungsländern, dem Zentrum der Pandemie, nicht geeignet.

Aus den oben genannten Gründen wird deutlich, daß die Entwicklung eines therapeutisch und/oder prophylaktisch wirksamen und gleichzeitig kostengünstigen Impfstoffes, trotz Fortschritte in der Therapie, unverzichtbar ist.

A.5 Probleme der HIV-Impfstoffentwicklung

Trotz vielversprechender Fortschritte in der Erforschung des humanen Immundefizienzvirus steht ein präventiv oder therapeutisch wirksamer Impfstoff nach wie vor nicht zur Verfügung.

Die Ursachen hierfür sind vielfältig und liegen neben der hohen Variabilität vor allem in der Biologie sowie der komplexen Pathogenese des HI-Virus begründet.

Die Fähigkeit des Virus sich dem Zugriff des Immunsystems, zum Beispiel durch Integration in das Genom der Wirtszelle zu entziehen, oder die Möglichkeit einer zellgebundenen Übertragung des Virus, sowie die hohe Vermehrungsrate von HIV und die damit verknüpfte Zerstörung CD4-positiver Immunzellen sind einige der Virus-assoziierten Eigenschaften, welche die Entwicklung einer HIV-Vakzine deutlich erschweren.

Neben einem direkten zytopathischen Effekt bewirkt HIV aufgrund weitreichender De-regulationen des Immunsystems ein Fortschreiten der Immunpathogenese. So ist das HI-Virus durch Glykoprotein (Gp)120/anti-Gp120-Immunkomplexe für das Auslösen von Apoptose in T-Helferzellen (TH) verantwortlich (Ameisen et al., 1991). Auch führt die Infektion mit HIV während des Krankheitsverlaufs zur selektiven Depletion definierter T-Zellsubpopulationen (Imberti et al., 1991) sowie zur Verschiebung des Zytokinmusters von einem TH0/1- zu einem TH2-dominanten Phänotyp (Clerici et al., 1993; Maggi et al., 1994). Die damit verbundene Immunsuppression ist wesentlich für die im Verlauf der Erkrankung auftretenden opportunistischen Infektionen, Malignome und Neuralgien verantwortlich, die letztendlich bei 95% der HIV-Infizierten zum Tode führen.

Ein anderes Problem der HIV-Infektion besteht darin, daß im Laufe der Infektion eine hohe Anzahl von Virusvarianten gebildet werden. Ausschlaggebend dafür ist zum einem die virale Reverse Transkriptase, welche die virale RNA in provirale DNA umschreibt, als auch die zelluläre RNA-Polymerase. Beide Enzyme besitzen im Gegensatz zur DNA-Polymerase keinen *proof-reading* Mechanismus. Man geht davon aus, daß sich in einem unbehandelten infizierten Menschen 10^{9-10} Viruspartikel pro Tag bilden und es bei jedem Replikationszyklus statistisch zu einem nicht konservativen Austausch kommt (Ho et al., 1995).

Arbeiten von Perelson haben gezeigt, daß ein Replikationszyklus *in vivo*, d.h. von der Freisetzung von Viruspartikeln, Infektion neuer Zellen und Freisetzung einer neuen Generation von Partikeln im Durchschnitt nur 2,6 Tage beträgt (Perelson et al., 1996; Perelson et al., 1997). Dies macht deutlich, daß sich in kürzester Zeit eine Vielzahl an Varianten und Quasi-Spezies entwickeln kann, die das Potential haben, der aktuellen Immunantwort zu entkommen. Des weiteren ist bekannt, wie am Beispiel des Isolats 97CN54 beschrieben (siehe A2.2), daß auch genomischen Rekombinationen unter verschiedenen HIV-Subtypen stattfinden können.

A.6 Tiermodelle

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung eines HIV-Impfstoffes besteht darin, daß HIV nur im Menschen pathogen ist und somit kein adäquates Tiermodell vorhanden ist, in dem die erzielten Daten eins zu eins auf den Menschen übertragen werden könnten.

A.6.1 Schimpansenmodell

Die hohe Artspezifität von HIV erfordert den Einsatz von Versuchstieren, die mit dem Menschen phylogenetisch möglichst nahe verwandt sind und somit ein ähnliches Immunsystem wie der Mensch besitzen. Arbeiten von Bontrop et al. konnten zeigen, daß Schimpansen eine mit dem Menschen vergleichbare funktionelle Ausstattung mit wichtigen Effektoren des Immunsystems besitzen (Bontrop et al., 1995). Ein entscheidender Nachteil resultiert aus der Tatsache, daß Schimpansen, trotz Etablierung einer schwachen persistierenden Infektion in der Regel keine der Immunschwäche AIDS vergleichbaren Krankheitssymptome entwickeln (Fultz et al., 1991).

Bislang wurden Schimpansen überwiegend zur Austestung von HIV-Impfstoffkandidaten im Vorfeld klinischer Studien eingesetzt. Eine schützende Immunantwort gegen homologe (Berman et al., 1990; Bruck et al., 1994; Fultz et al., 1992; Girard et

al., 1991), sowie heterologe Virusisolate (Girard *et al.*, 1995) konnte in mehreren Fällen durch Verabreichung unterschiedlicher Präparationen des HIV-Hüllproteins induziert werden. Doch ist bei all diesen Studien zu berücksichtigen, daß die Viruslast bei einer Infektion mit HIV im Schimpansenmodell, im Vergleich zum Menschen, deutlich geringer ist und somit die natürliche Situation im humanen System nicht widerspiegeln kann. Weitere Nachteile des Schimpansenmodells sind die hohen Kosten, die damit verbundene geringe Anzahl an Versuchstieren, sowie ethische Bedenken beim Einsatz von hohen Primaten als Versuchstiere.

Frühe Berichte, daß Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) empfänglich für eine HIV-Infektion seien, konnten nicht für ein breites Spektrum an HIV-1-Isolaten bestätigt werden (Agy *et al.*, 1992).

A.6.2 SIV-Makakenmodell

Die Infektion von Makaken mit dem Simian immunodeficiency virus (SIV) ist weltweit das am ehesten zu vertretende Modell, in welchem die Pathogenese und der Schutz vor einer lentiviralen Infektion studiert werden kann (Gardner *et al.*, 1995; Stott *et al.*, 1995). Viele Isolate des Affenimmunodefizienzvirus (SIV), dem nächsten Verwandten des humanen Immunodefizienzvirus (HIV), verursachen in Makaken eine fulminante Infektion, die im Verlauf eines Jahres zum Ausbruch der Immunschwäche SAIDS (Simian AIDS) führt. Dieses Tiermodell bietet somit die Möglichkeit, sowohl präventive, als auch immuntherapeutische Strategien zu überprüfen, deren Ziele von der Induktion einer sterilen Immunantwort, bis hin zu einer Verlängerung der symptomfreien Phase reichen können.

Wegen der eingeschränkten Übertragbarkeit der immunologischen Charakteristika zwischen HIV-1 und SIV wurden in den letzten Jahren Primatenmodelle entwickelt, welche auf chimären SIV/HIV-Immunodefizienzviren (SHIV) basieren.

Bei den ersten dieser Chimären handelte es sich von SIV_{mac239} abgeleiteten Viren mit unterschiedlichen Kombinationen des Hüllproteins und regulatorischer Gene des HIV-1(HXBc2) Genoms wie Tat, Rev, Vpu und Nef (Allan *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1992). Diese Hybridviren erwiesen sich nach Transfektion in Zelllinien als infektiös und konnten auf peripheren Blutlymphozyten von Rhesusaffen kultiviert werden. In Makaken wurde jedoch nur eine transiente Replikation dieser chimären Viren bei niedrigen Virustitern beobachtet. Zudem entwickeln die Tiere keine AIDS-ähnlichen Krankheitssymptome.

So konnte durch die Impfung der Tiere I) mit rekombinantem Hüllprotein in Kombination mit experimentellen Adjuvantien, II) durch sequentielle Verabreichung einer DNA- und Hüllprotein-Vakzine oder III) durch Injektion rekombinanter HI-Virus ähnlicher Partikel ein kompletter Schutz vor SHIV-Infektion oder zumindest eine beschleunigte Eliminierung des Virus aus der Zirkulation gezeigt werden (Letvin *et al.*, 1997).

Durch Klonierung des env-Gens als auch der akzessorischen Gene tat, vpu und rev des HI-Virus 89.6, welches sowohl lympho- als auch makrophagotrop ist (Collman *et al.*, 1992) in das SIV_{mac239} Isolat, entstand das chimäre Virus SHIV89.6. Dieses Virus replizierte zwar *in vitro* in Affen PBLs (*periver blood lymphocytes*) schwächer, zeigte aber bei der Primärinfektion von Affen höhere Virustiter als die Vergleichschimäre SHIV-HXBc2 (Reimann *et al.*, 1996a). Außerdem zeigten SHIV89.6 infizierte Affen

eine Inversion im Verhältnis der CD4/CD8-Zellen, die typisch für eine initiale Virusinfektion ist.

Wenig später wurde nach zweimaligem *in vivo* Passagieren des SHIV89.6 eine Variante gefunden (SHIV89.6P), welche neben der Reduktion der CD4⁺-Zellen auch AIDS ähnliche opportunistische Erkrankungen in Makaken induzierte (Reimann et al., 1996b). Dieses SHIV89.6P Virus mit seinem Env aus einem Patientenisolat bildet somit die optimale Ausgangsbasis als *Challengevirus* für die Evaluation von HIV-Vakzinen und kann die genetischen Einflüsse der HIV-1 Pathogenese erklären helfen.

Das Isolat 89.6P war auch Ausgangspunkt unserer Arbeit für die Entwicklung von Impfstoffkandidaten, die dann im SHIV-Makakenmodell auf Funktionalität und Wirkung getestet wurden. Jedoch ist bei der Verwendung des SHIV-Makakenmodells zu berücksichtigen, daß SIV genetisch unterschiedlich zu HIV-1 ist und somit nur Tendenzen aufgezeigt werden, die klinische Impfstudien mit HIV nicht ersetzen können.

A.7 Alte und neue Impfstoffkonzepte

Die ersten Impfstoffstrategien gegen HIV waren diejenigen, welche sich auch bei anderen viralen Erregern als erfolgversprechend erwiesen: Inaktivierte Viren, lebend attenuierte Viren und rekombinantes virales Protein.

Wie von anderen Impfstoffen bekannt war, kann durch die exogene Verabreichung der Antigene auf der Basis klassischer Totimpfstoffe, rekombinante Antigene, synthetische Peptide und inaktivierte Viruspräparationen, eine T-Helfer zellabhängige humorale Immunantwort erzeugt werden.

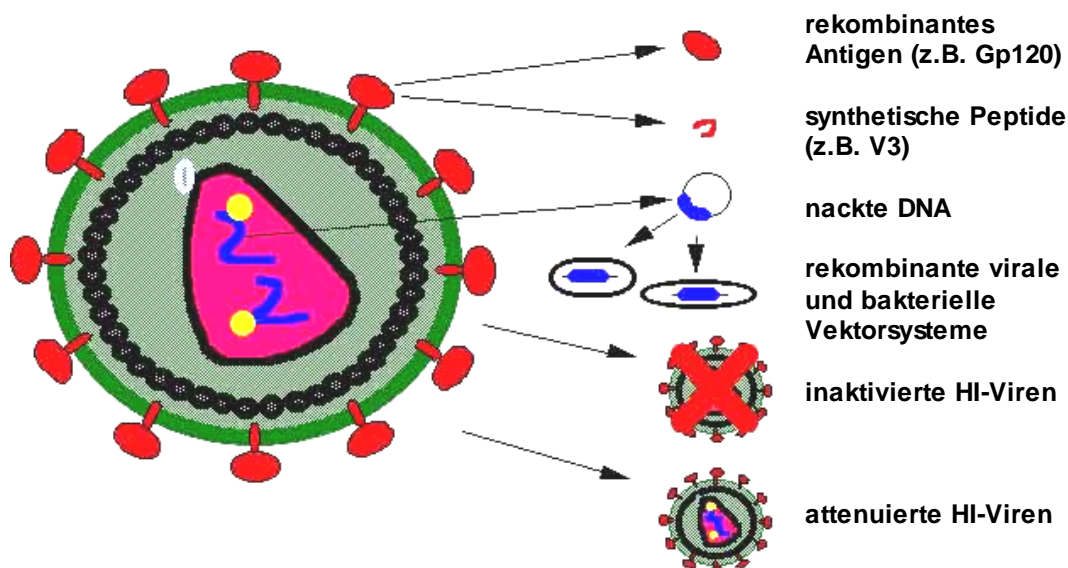


Abbildung A 4: Überblick möglicher HIV-Impfstoffstrategien (modifizierte Abbildung vom NIH)

A.7.1 Inaktivierte HIV-Viruspräparationen

Problematisch ist der Einsatz von Totimpfstoffen, da eine vollständige Inaktivierung (z. B. durch Lösungsmittel, Detergentien, Chemikalien (Formaldehyd, Methylengrün) oder thermische Behandlung) der Viren gewährleistet sein muß, ohne jedoch die Immunogenität des Antigens zu verlieren. Da auch die virale Nukleinsäure *per se* in vielen

Fällen infektiös ist und es zur Bildung von Nachkommenviren bzw. Rekombinationen bei einer Neuinfektion kommen kann, müssen zur Zerstörung der Infektiosität Methoden eingesetzt werden, die auch zum Abbau der viralen Nukleinsäure führen. Ein Beispiel für eine solche Vakzine ist das immunogen *Remune* (Richieri et al., 1998). Ein HI-Viruspartikel dem die Oberflächenproteine entfernt wurden und Mutationen auf RNA Ebene eingefügt wurden. Doch dieser Ansatz ist aufgrund der hohen Risiken bei der Herstellung sowie einer geringen Immunogenität nicht sehr vielversprechend (Kahn, 2000; Levine et al., 1996). Bei anderen Krankheiten wie Polio, Influenza oder Mumps hingegen werden inaktivierte Viren heute schon als Totimpfstoffe eingesetzt.

A.7.2 Attenuierte HI-Viren

Attenuierte Viren ähneln den krankheitserzeugenden Erregern in Bezug auf Aufbau, Proteinzusammensetzung und Infektionsverhalten. Sie unterscheiden sich jedoch im Hinblick auf das Virulenzverhalten. Im Vergleich zum Wildtypvirus verursachen sie damit meist eine begrenzte oder abgeschwächte Infektion. Die Proteine, welche in ihrem Verlauf gebildet werden, sind im Idealfall identisch mit denen der virulenten Virusstämme oder ähneln ihnen zumindest sehr stark. Durch die Synthese viraler Polypeptide während der abgeschwächten Infektion in den Zellen und Entstehung viraler Partikel, wird die Bildung von neutralisierenden Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen (ZTL) induziert. Die Immunantwort ist daher geeignet, einen langanhaltenden, kompetenten Schutz vor der Infektion mit dem jeweiligen pathogenen Erreger aufzubauen.

Schon 1992 wurde von attenuierten SI-Viren berichtet (nef-Gen mutierten), die Schutz vor Infektion mit pathogenem SIV zeigten (Daniel et al., 1992). Doch dieser vielversprechende Ansatz erwies sich in den folgenden Jahren als zu risikoreich für die Anwendung im Menschen. Es konnte gezeigt werden, daß sich die attenuierten Δ nef Viren im Laufe der Zeit rekonstituieren konnten und pathogene Viren entstanden. Diese Beobachtung konnte sowohl in neugeborenen Affen als auch in langzeit-infizierten erwachsenen Tieren beobachtet werden (Baba et al., 1995; Baba et al., 1999).

Ähnliche attenuierte HI-Viren (Δ nef und Δ U3 LTR) wurden auch in Langzeitüberlebenden (LTNP) aus der „Sydney Blood Bank Cohort“ isoliert (Deacon et al., 1995). Die „Sydney Blood Bank Cohort“ beinhaltet eine Gruppe von Patienten, die sich durch stabile CD4 Zellzahlen aber nachweisbarer Viruslast über sehr lange Zeit auszeichneten. Die in dieser Patientengruppe auftretenden Virusvarianten sind zwar abgeschwächt, aber nicht wie lange Zeit angenommen, apathogen. Nach 10 bis 14 Jahren der Infektion sind bei drei Patienten die CD4-Zellzahlen gesunken und die Viruslast dramatisch angestiegen (Learmont et al., 1999). Zu einem Ausbruch von AIDS ist es jedoch noch nicht gekommen.

Ein anderer Ansatzpunkt auf diesem Gebiet ist die Entwicklung eines replikationsdefekten HI-Virus, pseudotypisiert mit dem *vesicular stomatitis virus G*-Oberflächenprotein (VSV-G). Ein solches pseudotypisiertes HI-Virus hat den Vorteil, daß es eine Vielzahl von Zellen infiziert und nur einen Replikationszyklus durchläuft (Tung et al., 1998).

Ein Einsatz von attenuierten retroviralen Lebendimpfstoffen im Menschen ist aber beim

heutigen Forschungsstand mehr als fraglich. Zum einen besteht die Gefahr, daß persistierende attenuierte Viren zu pathogenen Varianten revertieren können, zum anderen die potentielle Möglichkeit besitzen, in das Genom des Wirtsorganismus zu integrieren und hierbei in Einzelfällen Tumore auszulösen. Da zum heutigen Zeitpunkt zu viele Fragen und Sicherheitsrisiken bezüglich möglicher Rekombinationsereignisse oder anderer Langzeitfolgen bestehen, wird dieser Ansatzpunkt für eine HI-Vakzine aktuell nicht im Menschen ausgetestet.

Der allgemeine Einsatz von attenuierten Viren bei anderen Krankheiten ist sehr vielversprechend. So haben hauptsächlich attenuierte Viren zur Ausrottung der Pocken und zur starken Eindämmung von Masern- und Poliovirusinfektionen in den letzten Jahren beigetragen.

A.7.3 Rekombinante Antigene als Vakzine

Für die Entwicklung von Vakzinen, die ausschließlich auf ausgewählten Protein-komponenten des Erregers beruhen, ist ein detailliertes Wissen über die immunologisch wichtigen Komponenten eines Erregers grundlegende Voraussetzung. Ist bekannt, gegen welches virale Protein (z. B. Oberflächenproteine) eine schützende Immunantwort induziert wird, kann dieses Polypeptid in einem eukaryontischen Expressionssystem synthetisiert, gereinigt und anschließend zusammen mit einem Adjuvans appliziert werden. So konnte ein sicherer und effizienter Hepatitis-B-Impfstoff auf der Basis des rekombinant in Hefezellen produzierten, Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigens (HBsAg) entwickelt werden. Der erzielte Impfschutz korreliert hierbei mit der Induktion Virus-neutralisierender Antikörper. Deshalb wurde dieses Konzept zunächst auch zur Produktion eines HIV-Impfstoffes aufgegriffen. Dazu wurde das HIV-Hüllprotein Gp160 und dessen Spaltprodukt Gp120 in Bakterien, Hefe, Säugerzellen und mittels rekombinanter Bakuloviren bzw. Vakziniaviren produziert und in verschiedenen Tiermodellen ausgetestet. Die rekombinanten Antigene erwiesen sich hierbei als gut verträglich und immunogen. In kombinierter Verabreichung mit Adjuvantien wie Aluminium-Hydroxid (Alum), Desoxycholat (DOC) oder inkomplettem Freundschens Adjuvans (IFA) konnte eine T-Zellproliferation und die Induktion neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden. Studien mit freiwilligen Impfprobanden waren dagegen entmutigend. Es konnten nur geringe Serumtiter isolatspezifischer neutralisierender Antikörper induziert werden, die transient nach erfolgter Immunisierung nachweisbar waren. Gegenüber primären HIV-Isolaten zeigten diese Seren jedoch keine neutralisierende Wirkung (Cohen, 1993; Mascola et al., 1996). Bei Teilnehmern an einer rekombinanten Gp120-Studie, die sich später mit HIV infiziert haben konnte kein positiver Effekt bezüglich der Infektion oder dem klinischen Verlauf der Infektion aufgrund der Verabreichung von rekombinantem Gp120 beobachtet werden (Ball et al., 1998). Neuere Ansätze versuchen Env Immunogene zu verwenden, die sich näher an der nativen und oligomeren Struktur des Oberproteins befinden (oligomeres Gp140 (Earl et al., 2001); durch di-sulfid Brücken stabilisiertes oder an Rezeptoren gekoppeltes oligomeres Gp120 (Farzan et al., 1998; Kwong et al., 1998)).

A.7.4 Synthetische Peptide

Peptidimpfstoffe bestehen aus synthetischen Peptiden mit einer Länge von 15 bis 30 Aminosäuren. Der Vorteil dieser Impfstoffes besteht in dem völligen Ausschluß eines

Kontaminationsrisikos, sowie der selektiven Verwendung immunologisch bedeutsamer und gut charakterisierter Epitope, wie von Aminosäuresequenzen, T-Helfer oder ZTL-Epitopen (Bolognesi, 1989; Palker et al., 1989). Durch Verabreichung von Peptiden konnte die Bildung isolatspezifisch neutralisierender Antikörper induziert werden, die gegen lineare Aminosäuresequenzen gerichtet sind. Das Hauptproblem der Verwendung synthetischer Peptide liegt in der geringen Immunogenität. Durch kombinierte Verabreichung von Adjuvantien oder Quervernetzung der synthetischen Peptide zu verzweigten Multiepitop-Peptiden konnte die Antikörperantwort aber gesteigert werden (Ria et al., 1990; Tripathy et al., 1992).

A.7.5 Virus-ähnliche Partikel (VLPs)

Polyvalente Proteinaggregate stellen hochimmunogene Antigene mit Adjuvanteneigenschaften dar. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß durch partikuläre Strukturen im Vergleich zu nichtaggregierten Proteinen eine wesentlich effizientere Induktion von spezifischen Antikörpern und CD4⁺ T-Helferzellen erzeugt wurde (Milich et al., 1985; Milich et al., 1986). Auch können CD8⁺ zytotoxische T-Zellen induziert werden (Harris et al., 1992; Layton et al., 1993; Schirmbeck et al., 1994a). Aufgrund ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften wurden diese partikulären Strukturen auch als Basiskomponenten zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffkandidaten in Betracht gezogen. So konnten z. B. Domänen der HIV-1 Leserahmen Gag (p24 CA), Env, Pol sowie die HIV-Proteine Tat, Rev, Nef und Vif carboxyterminal an das p1-Protein von Hefe-TyA Partikel fusioniert werden, ohne die partikelbildenden Eigenschaften dieses Proteins zu beeinträchtigen (Kingsman, 1988; Adams, 1987; Malim, 1987). In unterschiedlichen Kleintiermodellen und Primaten konnte gezeigt werden, daß durch Verabreichung dieser chimären Partikel eine effiziente B- und T-Zell-Antwort gegen die Trägerkomponente und die integrierten HIV-Epitope induziert werden kann (Layton et al., 1993; Michel et al., 1990; Schlienger et al., 1992).

Ein großer Nachteil dieser Impfstoffstrategie ist allerdings, daß eine Präsentation komplexer Proteinstrukturen wie des nativen Gp120-Hüllprotein auf diesen Partikeln nicht möglich ist. Weiter kann die heterologe Trägerkomponente selbst nicht zur Induktion einer HIV-spezifischen Immunantwort beitragen. Vielmehr wird durch die Immunisierung mit derartigen hochimmunogenen, partikulären Antigenen oftmals eine effiziente Immunantwort gegen die Trägerkomponente entwickelt, die eine mehrmalige Verwendung des Trägerpartikels zur Induktion einer schützenden Immunantwort gegen integrierte Fremdproteine erschwert.

Unsere Arbeitsgruppe konnte im Balb/C Maus-Modell zeigen, daß exogen verabreichte, replikationsinkompetente Pr55^{gag}-VLPs, in denen kleine Fremdproteine durch Integration in ausgewählte Regionen des Pr55^{gag}-Polyproteins eingebaut wurden, effiziente Stimulatoren der zellvermittelten Immunantwort darstellen (Deml et al., 1997a; Deml et al., 1997b; Wagner et al., 1993; Wagner et al., 1994; Wagner et al., 1996a).

Auch in Makaken konnte mit diesen VLPs eine effiziente Antikörperantwort gegen das Pr55^{gag}-Polyprotein induziert werden, allerdings besaßen die Immunseren dieser Tiere keine virusneutralisierenden Eigenschaften. Diese chimären Pr55^{gag}-Lipoproteinpartikel stellen damit hochimmunogene Antigene dar, die wichtige und zum Teil hochkonservierte T-Helfer Epitope und, durch die Integration des Fremdproteins, auch

ZTL-Epitope beinhalten (Wagner et al., 1996a). Mit einem anderen Typ von VLPs, bei denen komplexe Proteine (z. B. HIV-Hüllprotein Gp160 in kompletter nativer Form) über eine heterologe Transmembrandomäne stabil auf der Oberfläche der Pr55^{gag}-Polyproteins verankert wurden, konnte unsere Arbeitsgruppe eine humorale Immunantwort mit virusneutralisierenden Eigenschaften in Makaken nach Immunisierung nachweisen (Notka et al., 1999a; Notka et al., 1999b).

A.7.6 Rekombinante virale und bakterielle Vektorsysteme

A.7.6.1 Virale Vektorsysteme

Rekombinante Viren stellen eine Variante von Lebendimpfungen dar. Hierbei werden Impfviren, die ihre pathogene Eigenschaft verloren haben – meist Poxviren (NYVAC, ALVAC, fowlpox, canarypox und **M**odified **V**accinia virus **A**nkara (MVA)) – mit gentechnologischen Methoden so verändert, daß sie außer für ihre eigenen zur Infektion und Replikation nötigen Genprodukte auch für die anderer Viren codieren.

Diese für das Vacciniavirus unspezifischen Fremdgene werden nach der Inokulation im Verlauf der Infektion im Organismus zusammen mit den anderen Genen exprimiert. Mit diesem System konnte in einer Reihe von Tiermodellen ein Impfschutz gegen virale Infektionen hervorgerufen werden (Moss et al., 1984; Paoletti et al., 1984; Smith et al., 1983a; Wiktor et al., 1984; Wiktor et al., 1992). Viele dieser Vaccinia-Vektoren wurden bezüglich ihrer Adjuvanzeigenschaften, Produktion von ko-stimulatorischen Zytokinen als auch auf ihre Fähigkeit Antigen zu präsentieren getestet (Ramirez et al., 2000). Dabei konnte in Tiermodellen eine starke humorale und zellvermittelte Immunantwort induziert werden.

Auch die Effektivität von HIV- bzw. SIV-Gene expremierenden, rekombinanten adeno-viralen Vektoren wurde bereits im Rhesus-Makaken (Buge et al., 1997; Buge et al., 1999) und Schimpansenmodell (Lubeck et al., 1994) getestet. Bei diesen Studien konnte eine erhöhte humorale und zellvermittelte Immunantwort induziert werden, doch konnte im Makakenmodell nur partieller Schutz induziert werden. Eine aktuelle Studie im Balb/C Mausmodell zeigte, daß eine einmalige Injektion eines adenoviralen Vektors der HIV-1 env, tat und rev exprimiert, ausreicht um hohe Titer an IgG, IgA und ZTLs zu induzieren (Xin et al., 2001).

Auch Alphaviren werden als viraler Vektor verwendet, um HIV Antigene zu exprimieren. Hierzu gehört das *Semliki Forest Virus* (Berglund et al., 1997; Liljestrom et al., 1991; Mossman et al., 1996; Paul et al., 1993), das *Venezuelan equine encephalitis Virus* (Caley et al., 1999; Davis et al., 2000) und das von Chiron bevorzugte *Sindbis virus* (Hariharan et al., 1998).

Ein weiterer Vorteil der rekombinanten Lebendviren ist, daß sie effektive Stimulatoren des immunologischen Gedächtnisses sind. Auch viele Jahre nach Immunisierung konnten noch antigenspezifische CD4⁺- und CD8⁺-Gedächtniszellen *in vivo* nachgewiesen werden (Demkowicz et al., 1996).

A.7.6.2 Bakterielle Vektorsysteme

Nicht nur virale sondern auch bakterielle Vektorsysteme werden verwendet, um retro-virale Antigene zu exprimieren. Erste Studien zeigen bei diesen Vektorsystemen neben der humoralen und zellvermittelten, eine erhöhte mukosale Immunantwort

(Smaglik, 2000; Velin et al., 1998). Dies gilt sowohl für die Vektoren *Salmonella typhimurium* (Burnett et al., 2000; Steger et al., 1997) als auch für *Streptococcus gordonii* (Di Fabio et al., 1998; Oggioni et al., 1999). Zu den neuesten bakteriellen Vektorsystemen gehören die hyperattenuierten *Listeria monocytogenes* Stämme, die schon vielversprechende Immunantworten im Mausmodell zeigten (Friedman et al., 2000; Rayevskaya et al., 2001).

Doch ob die induzierten Immunantworten ausreichenden Schutz vor einer mukosalen HIV Infektion liefern, müssen erst noch Studien im Primatenmodell zeigen.

Attenuierte Lebendimpfstoffe haben nicht nur Vorteile sondern weisen auch Gefahren auf. So können Komplikationen bei bereits HIV-infizierten oder immunsuprimierten Personen, die mit attenuierten Vektoren immunisiert wurden, auftreten. Studien haben gezeigt, daß es zu heftigen lokalen Reaktionen sowie einer generalisierten Virusausbreitung kommen kann, die im schlimmsten Fall auch zum Tod führt. (Picard et al., 1991; Redfield et al., 1987).

A.7.7 Rekombinante DNA-Vakzine

Die Immunisierung mit „nackter“ DNA bietet die Möglichkeit, sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort zu induzieren (Ulmer et al., 1993). Insbesondere das Vorkommen von unmethylierten CpG-Dinukleotiden in einem besonderen Basenkontext (CpG-Motiv) innerhalb bakterieller DNA bewirkt eine direkte Stimulation von B-, T- und natürlichen Killerzellen (Ballas et al., 1996; Krieg et al., 1995; Stacey et al., 1996) und trägt aufgrund der freigesetzten Zytokine (IL-6, IL-12 und INF- γ) zur gesteigerten Immunogenität der DNA-Vakzine bei (Klinman et al., 1996). Darüber hinaus wird die DNA je nach Applikationsform von Muskel- oder Epithelzellen aufgenommen und die Plasmid-kodierten Gensequenzen exprimiert (Hengge et al., 1996; Sato et al., 1996; Wolff et al., 1990). In Mäusen zeigte sich darauf hin eine lebenslange Persistenz und Expression der Fremd-DNA, ohne daß eine Replikation oder Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Wirtszelle erfolgte (Fynan et al., 1993a; Tang et al., 1992; Wolff et al., 1991). Ausgehend von der DNA-Vakzinierung mit dem Influenza-Nukleoprotein, die in Mäusen einen heterologen Schutz vor einer Influenza-Virus-Infektion vermittelte (Ulmer et al., 1993), wurde in unterschiedlichsten Kleintiermodellen ebenfalls eine protektive Immunität gegen eine Vielzahl viraler und bakterieller Pathogene erzielt (Manickan et al., 1995; Philippotts et al., 1996; Sedegah et al., 1994; Tascon et al., 1996). In Mäusen konnte darüber hinaus mit Hilfe der DNA-Immunisierung eine effiziente humorale und zellvermittelte Immunantwort gegen das HIV-1 Hüllprotein Gp160 (Wang et al., 1993) und Gp120 (Fuller et al., 1994; Lu et al., 1995) induziert werden.

Vielversprechende Ergebnisse wurden auch im Rhesusmakakenmodell erzielt. Nach Immunisierung mit modifiziertem HIV env in einem „DNA-Prime/DNA plus Protein-Boost“-Verfahren und Belastung mit pathogenem, chimärem SHIV entwickelten die Makaken eine sterile Immunität (Letvin et al., 1997). In einer Immunisierungsstudie an Schimpansen konnte nach DNA-Immunisierung Schutz gegen die Belastung mit einem heterologen HIV-Isolat, der gleichen Klasse, beobachtet werden (Boyer et al., 1997a). Die DNA-Immunisierung stellt somit einen innovativen Ansatz zur Entwicklung eines HIV-Vakzinekandidaten dar. Vorallem in den letzten Jahren wurde das Potential der

DNA-Immunisierung zum *Primen* der spezifischen Immunantwort erkannt und in einer Reihe von Ansätzen ausgetestet (siehe auch D.4.).

Im Idealfall sollte ein HIV-Impfstoffkandidat eine breite kreuzreaktive und starke Immunantwort generieren, die vor allem ZTLs, T-Helferzellen als auch wenn möglich neutralisierende IgG und mukosale IgA Antikörper beinhaltet.

A.8 Zielsetzung der Arbeit

Schon früh beschäftigte sich unsere Arbeitsgruppe mit den Möglichkeiten, Risiken und Limitationen einer DNA-Vakzine im Hinblick auf die Entwicklung eines effizienten und sicheren HIV-Impfstoffes. Ein limitierender Faktor bei der Entwicklung von HIV-DNA-Impfstoffen war die komplexe Regulation der lentiviralen Genexpression. Grundlegende Erkenntnisse zur Regulation der lentiviralen Genexpression wurden im Rahmen der Promotion von Marcus Graf für HIV, als auch in der vorliegenden Arbeit für SIV erzielt und dienten als Grundlage zur Entwicklung hocheffizienter und sicherer DNA-Vektoren. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Plasmid-Vektoren entwickelt, welche die komplexe virale Regulation umgehen konnten. In weiterführenden Mausstudien sollten im Anschluß unterschiedliche potentielle Vektorkonstrukte und Applikationsformen bezüglich ihrer Immunogenität getestet werden. Die hieraus resultierenden Erkenntnisse für das gruppenspezifische Antigen Gag von SIV_{mac239} waren Ausgangspunkt für die Entwicklung einer Vielzahl neuartiger DNA-Impfstoffkandidaten, die zur Austestung in präklinischen Studien auf das Rhesus Makaken-Modell adaptiert wurden. Die neu entwickelten DNA-Vektoren sollten anschließend, in Kombination mit Adjuvantien und anderen Antigen exprimierenden Vektoren, in einer Reihe von Primatenstudien bezüglich Wirksamkeit und Verträglichkeit getestet werden. Parallel dazu sollten auch DNA-Vektoren basierend auf dem Primärisolat CN-54 (Su et al., 2000) entwickelt werden, die im Rahmen eines europäischen Forschungsverbundes (EUROVAC) umfassend in klinischen Phase I Studien getestet werden.

B - MATERIAL & METHODEN

B.1 Bakterienstämme und Nährmedien

B.1.1 Bakterienstämme

Die Klonierungsarbeiten wurden ausschließlich in den *Escherichia coli* (*E. coli*) K12-Bakterienstämmen DH5 α (Hanahan, 1983), GM2163 (New England Biolabs, Frankfurt) oder SCS110 (STRATAGENE, Heidelberg) durchgeführt.

Der *E. coli* K12-Abkömmling DH5 α wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen bezogen. Er weist als wichtigstes Merkmal eine Deletion im 5'-Bereich des chromosomalen lacZ-Gens auf. Durch Komplementierung mit einem Plasmid kodierenden lacZ- α -Peptid erhält die verkürzte β -Galactosidase ihre Aktivität zurück. Dies ermöglicht die Selektion von Transformanten und positiven Rekombinanten mit Hilfe der Weiß-Blau-Selektion. Desweiteren weist dieser Stamm einen recA1-Genotyp auf, so daß er über eine verringerte Rekombinationshäufigkeit verfügt.

Die Bakterienstämme GM2163 (New England Biolabs, Frankfurt) und SCS110 (Stratagene, Heidelberg) unterscheiden sich von DH5 α im Wesentlichen durch ihre Defizienz in der dam- und dcm-Methylierung. Um dam- bzw. dcm-sensitive Restriktionseendonukleasen, wie z.B. PflMI oder BsaBI nutzen zu können, wurden im Einzelfall die entsprechenden Plasmide entweder direkt in diese Vektoren kloniert oder in diese Stämme umtransformiert.

DH5 α : F- (ϕ 80dlacZ Δ M15) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 ($r_k^- m_k^+$)supl Δ (lacZYA-argF) U169

GM2163: F- dam-13::Tn9 dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22 xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsc-78 supE44 McrA- McrB-

SCS110: rpsL (str^r), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ (lac-proAB), [F' traD36, proAB, lacI^qZ Δ M15]

B.1.2 Nährmedien für Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte sowohl in Flüssig- als auch auf Plattenkulturen in sterilem Luria Bertani (LB)-Medium (90mM NaCl, 1% Bacto-Trypton (Difco, Hamburg), 0,5% Hefeextrakt (Difco, Hamburg), pH7,3). Der Zusatz von Ampizillin (Amp) in einer Endkonzentration von 100 μ g/ml Medium (LB_{Amp}-Medium) ermöglicht die negative Selektion der transformierten Bakterien.

B.2 Klonierungs- und Expressionsvektoren

Klonierungsvektor

pCR-Script™ SK(+)-Plasmid (Amp^r): Dieser kommerziell erhältliche Klonierungsvektor der Firma STRATAGENE, Heidelberg (2.961 Basenpaare (Bp)) wurde aus dem pBluescript®SK(+)-Phagemid durch die Einführung einer SrfI-Schnittstelle in den Polylinker (MCS: *multiple cloning site*) generiert (GenBank® database: Accession #

U46017).

Der Polylinker befindet sich innerhalb des *lacZ'*(α -Peptid) und wird von dem T3- und T7-Promotor flankiert. Das partielle *lacZ'*-Gen unter Kontrolle des induzierbaren *lac*-Promotors erlaubt eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Plasmide mittels α -Komplementation. Das Ampizillin-Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion positiver Transformanten.

Expressionsvektoren

pcDNA3.1(+)-Expressionsplasmid: Der Polylinker des vom pUC19 abgeleiteten eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) (5.446 Bp) der Firma INVITROGEN, Leek wird von dem Promotor T7 und Sp6 flankiert. Die Transkription integrierter Gensequenzen erfolgt unter Kontrolle des hCMV (humanen Cytomegalovirus)-*immediate-early* Promotors. Die Transkripte werden mit Hilfe des Vektor-eigenen Polyadenylierungssignals BGHpolyA (*bovine growth hormone polyA*) polyadenyliert. Innerhalb des Polylinkers befindet sich zudem ATG als Translationsstartpunkt, so daß Gensequenzen integriert werden können, die selbst kein Startcodon besitzen. Der Vektor enthält zusätzlich Resistenzgene: Ampizillin für die Selektion in prokaryontischen, sowie Neomycin für die Selektion in transfizierten, eukaryontischen Zellen.

pND-Expressionsplasmid: In diesem von pND.G14 abgeleiteten Expressionsplasmid (4.287 Bp) wurde zwischen der Sall- und XbaI-Restriktionsschnittstelle der Polylinker (5' TCGACGGTACCCGGAATTCGCCCTCGAGT 3') eingesetzt. Das integrierte Fremdgen befindet sich dadurch in 3'-Richtung des kompletten hCMV-Introns und unter Kontrolle des hCMV-Promotors. Für die Selektion in *E.coli* enthält der Vektor zusätzlich ein Ampizillin-Gen. Das Expressionsplasmid pND.G14 wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Heeney, Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

pCsRevsg25-GFP-Expressionsplasmid: Dieser von pUC19 abgeleitete Expressionsvektor (6601 Bp) wurde uns von Uwe Junker von der Firma NORVATIS, Paolo Alto, USA, zur Verfügung gestellt und ermöglicht die Expression eines GFP-HIV-1-Rev-Fusionsproteins (47 kDa; GFP: *green fluorescence protein*) ebenfalls unter der Kontrolle eines hCMV-Promotors. Wie pcDNA3.1(+) besitzt auch dieser Vektor ein Ampizillin- und ein Neomycin-Resistenz-Gen.

Proviruskonstrukte

pBS-SIV239-5' und pBS-SIV239-3'nef-open: Diese beiden Proviruskonstrukte enthalten zusammen das komplette Genom des Affenimmundefizienzvirus SIV_{mac}239, das aus Sicherheitsgründen auf zwei getrennten Plasmiden subkloniert wurde. Beide Plasmide wurden unserer Arbeitsgruppe freundlicherweise von Prof. Klaus Überla, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Universität Leipzig, zur Verfügung gestellt.

B.3 Gensynthese

Im Rahmen dieser Promotion wurde eine Vielzahl von synthetischen Genen mit unterschiedlichen Verwendungszweck hergestellt.

SIV_{mac}239 syngag: zur Beantwortung grundlegender Fragen der Transkription und Translation retroviraler Genprodukte, sowie zur Austestung ihrer Immunogenität im Balb/C Mausmodell.

Das synthetische Konstrukt **SIV_{mac}239 syngagpol**, sowie unterschiedlich lange env Konstrukte (**HIV-89.6Psynenv120/140/160**) und das **HIV syntat** wurden als DNA-Impfstoffkonstrukte im SHIV-Makakenmodell verwendet.

Auch wurde **SIV_{mac}239 syngagpol** als mögliches Verpackungskonstrukt für Gentherapieansätze getestet (Wagner et al., 2000).

Im Rahmen eines EU-Verbundes wurden synthetische DNA- Ausgangskonstrukte für eine humane Anwendung in China entwickelt (**C54 syngagpolnef, C54synenv120/140/140TM/160**).

Aufgrund der Fülle an synthetischen Konstrukten wird an dieser Stelle die Gensynthese exemplarisch am Konstrukt **SIV_{mac}239 syngag** näher beschrieben.

B.3.1 GCG-Programm

Die komplette Sequenz des Affenimmundefizienzvirus (SIV_{mac}239) ist in der GCG-Datenbank (GENETICS COMPUTER GROUP; GenBank® *database*: Accession #M33262) verfügbar. Mit dem Software-Paket des GCGs wurde an einem *Indy Graphics* Computer, ausgehend von der Aminosäuresequenz eines viralen Proteins und unter Verwendung der Kodonwahl hochexpremierter Säugetiergene, die entsprechende, synthetische Nukleinsäuresequenz des Protein-kodierenden Gens entworfen. Singuläre Restriktionsschnittstellen im offenen Leserahmen der synthetischen Gensequenz wurden ebenfalls unter Zuhilfenahme des Programms ermittelt oder gegebenenfalls als stille Mutationen eingefügt.

Die zur Konstruktion des synthetischen viralen Gens notwendige Matrix (Kodonwahl) und die synthetische Nukleinsäuresequenzen sind im Anhang aufgeführt.

B.3.2 Oligonukleotide

Unter Verwendung der im GCG-Programm ermittelten synthetischen Gensequenz wurden die zwischen 30Bp und 80Bp langen Oligonukleotide mit GC-reichen Enden entworfen. Dabei wurden jedoch lange GC-Folgen innerhalb der Sequenz vermieden. Die Einführung singulärer Schnittstellen in den offenen Leserahmen des viralen Gens erlaubt dessen Unterteilung in subgenomische Fragmente mit einer Größe zwischen 200Bp und 400Bp.

Die Synthese der subgenomischen Fragmente erfolgte mit Hilfe einer stufenweisen PCR-Amplifizierung aus drei bis vier Oligonukleotidpaaren, die am 3' Ende in einem bis zu 20Bp umfassenden Bereich zueinander komplementär sind. Die externen Oligonukleotide jedes Subfragments besitzen in den 5' Überhängen neben den singulären Schnittstellen noch weitere Restriktionsschnittstellen für die Subklonierung der subgenomischen Fragmente in geeignete Vektoren. Die für die Herstellung synthetischer Gene benötigten Oligonukleotide, ebenso wie die Oligonukleotide für die *in vitro* Mutagenese, waren HPLC (*high pressure liquid chromatography*) gereinigt. Die Sequenzieroligonukleotide dagegen waren lediglich entsalzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden im lyophilisierten Zustand von den Firmen METABION und MWG bezogen.

B.3.3 Stufenweise PCR-Amplifizierung

Für die Generierung jedes subgenomischen Fragments wurden zwischen drei und vier Oligonukleotidpaare benötigt.

Ausgehend von dem internen Oligonukleotidpaar, das an den 3' Enden miteinander hybridisiert, wurden in der ersten PCR-Reaktion die einzelsträngigen Bereiche in 5'-3'-Richtung aufgefüllt und dadurch eine doppelsträngige DNA-Matrize generiert. Diese Matrize wurde schließlich in weiteren, aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen unter Verwendung weiterer, sich überlappender Oligonukleotidpaare mit 5' Überhängen sukzessive, von innen nach außen, zum subgenomischen Fragment verlängert.

Die stufenweise Amplifizierung der Fragmente erfolgte mit Hilfe der TaqPlus™-Precision-DNA-Polymerase (STRATAGENE, Heidelberg). Die Verwendung einer Mischung aus Pfu- und Taq-DNA-Polymerase in einem Ansatz verbindet dabei den Vorteil einer niedrigen Fehlerrate (3'-5' Exonuklease-Aktivität) mit dem einer hohen Prozessivität, für eine effiziente und fehlerfreie Amplifizierung. Die PCR-Reaktionen wurden ausgehend von Oligonukleotidpaaren oder linearen PCR-Produkten in einem 30µl Ansatz (5U TaqPlus™-Precision-Polymerase, 0,25mM dNTP-Mix, 3pmol 3' Oligonukleotid, 3pmol 5' Oligonukleotid, 1x TaqPlus Precision buffer (20mM Tris/HCl pH 8,8, 2mM MgSO₄, 10mM KCl, 10mM (NH₄)₂SO₄), 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) durchgeführt.

B.3.4 Zielgerichtete *in vitro* Mutagenese mittels PCR (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg))

Diese Methode eignet sich zum Einfügen oder Entfernen von Punktmutationen in definierte Bereiche doppelsträngiger Plasmid-DNA. Mit Hilfe zweier komplementärer, 30Bp bis 45Bp langer Oligonukleotidprimern mit GC-reichen Enden, die in ihrer Sequenz den gewünschten Austausch enthalten, wird in einer PCR-Reaktion *dam*-methylierte Plasmid-DNA als Matrize verwendet und durch die Pfu-DNA-Polymerase (3'-5' Exonuklease-Aktivität) amplifiziert. Die Entfernung der methylierten Ausgangs-DNA wird durch die Zugabe von 10U des Restriktionsenzym DpnI gewährleistet. DpnI erkennt spezifisch die Sequenz 5'-G^{m6}ATC-3' und spaltet sie endonukleolytisch. Die mutierte, zirkuläre, nicht-methylierte und noch unligierte dsDNA wird nach der Transformation von *E. coli* durch die bakterielle DNA-Ligase kovalent geschlossen.

Dieses Verfahren ist u.a. zur Beseitigung von Restriktionsschnittstellen innerhalb der viralen Gensequenz als auch zur Generierung von Punktmutationen verwendet worden.

Laut Herstellerangaben wird die PCR-vermittelte, ortsgerichtete Mutagenese ausgehend von 25 bis 50ng Ziel-DNA in einem 50µl Ansatz (2,5U Pfu-DNA-Polymerase, 0,25mM dNTP-Mix, 125ng *sense*-Primer, 125ng *antisense*-Primer, 1 x Reaction buffer) unter Standardbedingungen durchgeführt.

B.3.5 Herstellung synthetischer Genprodukte am Beispiel des SIV Pr56^{gag}-Gens

Innerhalb der SIV_{mac}239 Gensequenz (Datenbank: GENETICS COMPUTER GROUP;

GenBank® Nr. M33262) finden sich gehäuft Kodons, die an der dritten Position bevorzugt Adenin- oder Thymidinreste besitzen und sich dadurch deutlich von denen in Säugetiergenen unterscheiden. Um die postulierten AU-reichen inhibitorischen Sequenzen innerhalb des SIV_{mac}239 gag-Leserahmens zu eliminieren, wurde unter Verwendung der Kodonwahl hochexprimierter Säugetiergene im GCG-Programm eine vollständig synthetische Pr56^{gag}-kodierende Sequenz syngag konstruiert, ohne dabei die Aminosäuresequenz des Pr56^{gag}-Polyproteins zu verändern. Auf diese Weise konnte der ursprüngliche AU-Gehalt von 54% in der wtgag-Gensequenz schließlich auf 37% innerhalb des syngag-Leserahmens reduziert werden. Die Anzahl der im murinen System bekannten immunstimulatorischen CpG-Motive erhöhte sich gleichzeitig von 1 auf 3.

Herstellung der Subfragmente

Ausgehend von der synthetischen Nukleinsäuresequenz syngag wurden mit Hilfe des GCG-Programms die singulären Restriktionsschnittstellen BstXI (nt 139), XmaIII (nt 414), PstI (nt 673), NdeI (nt 914), ApaI (nt 1.247) und NspI (nt 1.445) als stille Mutationen eingeführt. Dadurch konnte der komplette syngag-Leserahmen in sieben 151-358 Bp-lange Subfragmente (synA-G) unterteilt werden, welche die Bereiche zwischen den Restriktionsstellen KpnI/BstXI (synA: 159 Bp), BstXI/XmaIII (synB: 298 Bp), XmaIII/PstI (synC: 284 Bp), PstI/NdeI (synD: 266 Bp), NdeI/ApaI (synE: 358 Bp), ApaI/NspI (synF: 224 Bp) und NspI/SacI (synG: 151 Bp) umfassen. Die flankierenden Regionen der Subfragmente enthielten zudem die Restriktionsschnittstellen KpnI und SacI am 5'-Ende bzw. 3'-Ende für die spätere Subklonierung in den pCR-Script™-Vektor.

Durch die Erweiterung des syngag-Leserahmens in 5' Richtung des Startkodons ATG um die 9 Basen umfassende, nicht-translatierte, optimierte Kozak-Sequenz (5'-GCCGCCAGC-3') sollte eine höhere Translationseffizienz der syngag-Expressionsvarianten in Säugerzellen gewährleistet werden (Kozak, 1987). Das zusätzliche, 3'-gelegene Stopkodon UAA garantiert darüber hinaus den korrekten Translationsstop bei der Synthese des Pr56^{gag}-Polyproteins.

Weitere Restriktionsschnittstellen für KpnI (nt 7), EcoRI (nt 13), BglII (nt 1.564), XhoI (nt 1.570) und SacI (nt 1.576) in den nicht-translatierten Bereichen des synthetischen Gens wurden für nachfolgende Klonierungsschritte bzw. für die spätere Integration der RRE-Region eingefügt.

Unter Verwendung der im GCG-Programm ermittelten synthetischen Gensequenz von syngag wurden für jedes Subfragment 4-8, 40-68-mere Oligonukleotide entworfen. Dabei wurden jedoch lange G- bzw. C-Folgen innerhalb der Sequenz vermieden, um die Ausbildung von intramolekularen Sekundärstrukturen oder Oligonukleotid-Dimeren zu verhindern. Die Synthese der Subfragmente synA-G erfolgte in 2 bis 4 aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen und unter den unter B.3.3 beschriebenen PCR-Bedingungen (alle Sequenzen der hergestellten Konstrukte befinden sich im Anhang).

B.3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzanalyse der jeweiligen Plasmid-DNA erfolgte durch automatisierte, nicht-radioaktive Fluoreszenzsequenzierung, die auf der Basis der Dideoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) beruht.

Je Ansatz wurden in einem Endvolumen von 12µl 500ng DNA mit 6pmol des entsprechenden Oligonukleotids versetzt. Die Sequenzierreaktion erfolgte unter Zuhilfenahme des PRISM[®] Ready Reaction DyeDeoxy[®] Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die DNA-Fragmente wurden über ein denaturierendes 7%iges Harnstoff-Polyacrylamidgel im 377A-DNA-Sequenzierapparat (Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und mit Hilfe des SeqEd[®]-Programms (Version 1.03, Applied Biosystems) auf einem Apple-Macintosh-Computer ausgewertet.

B.4 Zelllinien, Transfektionen und Infektionen

B.4.1 Eukaryontische Zelllinie

Sämtliche Zellkulturprodukte wurden von *Life Technologies* (Karlsruhe) bezogen. Alle Säugerzelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die humane Lungenkarzinomzelllinie **H1299**, die murine **C2C12** C2-Muskelzelllinie, sowie die Ad5 immortalisierte humane Nierenzellkarzinomzelllinie **293T** wurden in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem fötalem Rinderserum, Penizillin (100U/ml) und Streptomycin (100µg/ml) gezogen. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1 : 10 subkultiviert.

B.4.2 Calciumphosphat -Transfektionen

$1,5 \times 10^6$ Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser: 100mm) ausgesät und 24h später durch Calciumphosphat Kopräzipitation (Graham und Eb, 1973) mit 30µg Reporterplasmid und 15µg pc-Rev bzw. 15µg pcDNA 3.1-Vektor transfiziert. Zur Transfektion von Zellen im 6-well Format (Durchmesser: 35mm) wurden jeweils nur $3,0 \times 10^5$ Zellen pro well ausgesät und mit einem Drittel der DNA Menge, wie für die Petrischalen angegeben, transfiziert. Zellen und Kulturüberstände wurden 48h bzw. 72h nach der Transfektion geerntet. Für die Experimente mit Saquinavir wurden die Zellen 24h vor der Transfektion mit 100µM des Proteaseninhibitors behandelt und bei gleicher Konzentration bis zur Ernte weiterkultiviert.

B.4.3 Infektion von transfizierten H1299-Zellen mit Vakzinia-Virus

Ein hochtitriger Stock an rekombinanten vTF7-3 Vakziniaviren wurde uns freundlicherweise von Dr. Christian Probst (Lübeck) zur Verfügung gestellt. Nach vTF7-3 Infektion von permissiven Säugerzellen stellen diese im Zuge der viralen Genexpression rekombinant die T7-Polymerase her.

Am Vortag der Infektion wurden 3×10^5 Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät und für 24h kultiviert. Für die Transfektion wurden nach Angaben des Herstellers 9µl Lipofectin-Liposom (Gibco Life-Technologies, Eggenstein) zusammen mit 500ng Plasmid-DNA bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert und in 1ml FKS-freien DMEM-Medium auf die Zellen gegeben. Nach 3h wurden die Zellen mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und mit einer m.o.i. (*multiplicity of infection*) von 10 des T7-Polymerase-rekombinanten vTF7-3 Vaccinia-Stamms infiziert. Nach 30min. wurden

die Zellen erneut gewaschen, das Kulturmedium gewechselt, und für weitere 24h inkubiert.

B.5 Aufarbeitung der Zellen

Zellernte

Der Überstand der transfizierten Zellen wurde abgenommen, durch Zentrifugation (10min. bei 300 x g) von abgelösten Zellen getrennt, sterilfiltriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (10mM Na₂HPO₄, 1,8mM KH₂PO₄, 137mM NaCl, 2,7mM KCl) gewaschen dann mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt und für 10min. bei 300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Lyse-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100 (w/v)) für 30min. auf Eis gestellt. Unlösliche Bestandteile des Zelllysates wurden 30min. bei 10 000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde ebenfalls bis zur weiteren Verwendung bei -20°C weggefroren.

Anreicherung von Lipoproteinpartikeln über Saccharosekissen

Die aus dem Überstand transfizierter Zellen freigesetzten Pr56^{gag}-Lipoproteinpartikel wurden durch Sedimentation durch ein 20%-iges Saccharose-Kissen (2,5h bei 28 000 rpm in einem SV-40 Rotor, Kontron) angereichert. Das so erhaltene Pellet wurde vollständig in 30µl 2-fach SDS-Probenpuffer (125mM Tris pH 6,8, 2% 2-β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau) aufgenommen und nach Denaturierung der Proteine bei 95°C ebenfalls zur Lagerung bei -20°C weggefroren.

B.5.1 Qualitative Analyse viraler Proteine in Zellen und Zellkulturüberständen

Die Gesamtproteinmenge transfizierter und lysierter Zellen wurde quantitativ mit dem *BioRad Protein Assay* (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Das Reagenz dieses Testsystems unterliegt nach Bindung an Proteine einer Farbänderung, die sich photometrisch in einer Absorptionzunahme bei 595nm äußert. Aus dem Vergleich der gemessenen optischen Dichte (OD) mit den Werten einer BSA-Eichkurve läßt sich die Proteing Gesamtmenge der transfizierten Zellen annähernd bestimmen. Pro Ansatz wurden 50µg Gesamtprotein mit 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95°C denaturiert und auf ein 10-15%-iges SDS/Polyacrylamidgel aufgetragen. Vom Überstand der transfizierten Zellen wurde in der Regel die Hälfte des konzentrierten Überstandes einer Transfektion auf ein Gel aufgetragen. Die unterschiedliche Prozentigkeit des Gels beruht auf dem Nachweis von unterschiedlich großen Proteinen. So wurden die verschiedenen Env-Konstrukte im Gegensatz zu den Gag-Konstrukten in einem niederprozentigem Gel aufgetrennt.

Bei der **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese** (SDS-PAGE) werden Proteine in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei lagert sich das negativ-geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen so, daß alle Proteine annähernd ihrer Größe entsprechend zur Anode wandern können. Nach Laemmli (Laemmli, 1970) werden die Probenproteine unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems (Fling et al., 1986) zunächst in einem niederprozen-

tigen Sammelgel konzentriert, von welchem alle Polypeptide gemeinsam in das eigentliche Trenngel übergehen.

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Trenngel auf Nitrocellulose (*Millipore Immobilon NC pure*, Millipore, Bedford) erfolgte in einer Fast-Blot „semidry“-Apparatur (Biometra, Göttingen) mit dem BioRad-Transferpuffer (150mM Glycin, 25mM Tris pH 8,3, 10% Methanol) nach Angabe des Herstellers für 20 bis 60min. bei einer Stromstärke von 5mA/cm². Die denaturierten Proteine wandern, entsprechend ihrer nach SDS-Behandlung negativen Ladung, in Richtung Anode und werden auf der Nitrocellulose immobilisiert. Zur Überprüfung des erfolgten Proteintransfers und zur Markierung der Molekulargewichtsstandards (Low- und High-Marker, Sigma, Deisenhofen) wurden die Proteine reversibel mit Ponceaurot S-Lösung (Sambrook et al., 1989) angefärbt und anschließend durch Waschen mit TTBS-Puffer (*tween-tris buffered saline*: 150mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7,5, 20mM Tween 20) wieder entfärbt.

Nomenklatur der Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Beschreibung des Antikörpers
Primäre Antikörper		
SIV _{mac239} Anti-p27/56 (3F7)	1:500	monoklonaler p27 AK (Maus) (Inracel, London)
HIV _{IIIB} Anti-p24/55 (13-5)	1:500	Beide Antikörper sind monoklonale p24/55 AK (Maus)
Anti-p24/55 (16-4-2)	1:2000	(Wolf et al., 1990)
Patientenserum (HIV) # 5335	1:500	Polyklonal (Mensch) Kreuzreaktiv zum Isolat 89.6P
Patientenserum (HIV) # C54 China	1:500	Polyklonal (Mensch) Pool aus C-Typ Seren aus China
Anti-Rev	1:500	monoklonaler HIV-1 Rev AK (Maus) (Inracel, London)
Sekundäre Antikörper		
HRP-anti-Mensch	1:2000	Anti-Human AK, HRP-konjugiert (Dako, Hamburg)
HRP-anti-Maus	1:2000	Anti-MausAK, HRP-konjugiert (Kaninchen) (Dako, Hamburg)
AP-anti-Mensch	1:2000	Anti-Human AK, AP-konjugiert (Dako, Hamburg)
AP-anti-Maus	1:2000	Anti-Maus AK, AP-konjugiert (Kaninchen) (BioRad, München)

Tabelle B 1: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper und Seren

Der Nachweis spezifischer, rekombinanter und immobilisierter Proteine beruht auf der spezifischen Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Die chemische Reaktion durch das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) bzw. Meerrettich-Peroxidase (HRP) führt schließlich zu einer Anfärbung des Proteins.

Die Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrocellulose nach dem Proteintransfer erfolgte für mindestens 1h bei Raumtemperatur mit einer 5% -igen Magermilch-TBS-(*tris buffered saline*: 150mM NaCl, 10mM Tris/HCl pH 7,5) Lösung. Danach wurde der Filter kurz mit TBS gewaschen, bevor er über Nacht mit der entsprechenden Verdünnung des primären Antikörpers inkubiert, wiederum mit TBS gewaschen und anschließend mindestens 2h mit dem AP-gekoppelten Antikörper geschüttelt wurde. Nach mehreren Waschschritten mit TTBS bzw. TBS folgte die Färbung des Filters mit den chromogenen Substraten der alkalischen Phosphatase (68µl NBT, 70µl BCIP in 20ml AP-Puffer: 100mM NaCl, 50mM MgCl₂, 100mM Tris bzw. Meerrettich-Peroxidase (50mM Tris/HCl pH7,5, 1 Spatelspitze 3,3'-Diaminobenzidin, 30µl 30% H₂O₂, auf 50ml mit H₂O_{bid.}). Die Färbereaktionen wurden jeweils durch Waschen des Filters mit H₂O_{bid.} abgestoppt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und die zum spezifischen Nachweis der immobilisierten Proteine jeweils eingesetzten Verdünnungen (in TBS) sind in der Tabelle B 1 zusammengefaßt.

B.5.2 Quantifizierung der Pr55^{gag} Konzentration im ELISA

Da ein geeigneter Pr56^{gag} capture-ELISA für SIV nicht zur Verfügung stand, konnten quantitative Aussagen zur Expression nur für die analogen HIV-Konstrukte bestimmt werden. Um die Menge an HIV-1 Pr55^{gag} oder p24^{CA} im Kulturmedium oder in den Zellysaten zu quantifizieren, wurden diese in unterschiedlichen Verdünnungen in den capture ELISA Formaten vermessen. Kulturmedien wurden vor der Messung mit Triton X-100 versetzt (Endkonz. 0,5%) und 30min. bei Raumtemperatur inkubiert.

Die p24 capture-ELISA Antikörper wurden uns freundlicherweise von PD Dr. Matthias Niedrig (RKI, Berlin) zur Verfügung gestellt. 96-well MaxiSorp ELISA Platten (Nunc, Wiesbaden) wurden bei 4°C und über Nacht mit 100µl einer 1:170 Verdünnung des p24^{CA}-spezifischen monoklonalen 11-G-7 Antikörpers in 100mM Carbonatpuffer (pH 9,5) inkubiert. Die Platten wurden 6x mit 300µl Waschpuffer (0,1% Tween 20, 300mM NaCl, 10mM Na₂HPO₄, 1,5mM NaH₂PO₄) gewaschen. Die unterschiedlichen Verdünnungen der Proben wurden mit einem Verdünnungspuffer (Waschpuffer mit 0,5% BSA (w/v)) hergestellt und 100µl pro well aufgetragen. Zudem wurde eine 100µl pro well einer 1:600 Verdünnung (in Verdünnungspuffer) eines zweiten mit *horse-radish-peroxidase* (HRP) konjugierten p24^{CA} spezifischen Antikörpers (10-E-7) zu den Proben gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 6-maligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Antikörperkonjugate mit einer OPD-Lösung (Abbott, Wiesbaden) angefärbt und die Absorption bei 495nm mit einem ELISA-Lesegerät vermessen. Die Konzentration an Pr55^{gag} wurde mit Hilfe einer Kalibrierungskurve unter Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen von gereinigten Pr55^{gag} errechnet.

Gereinigtes, durch rekombinante Bakuloviren in Insektenzellen produziertes Pr55^{gag} wurde von Dr. Ludwig Deml (IMMH, Regensburg) zur Verfügung gestellt.

B.6 Tierexperimente

B.6.1 Experimente im Balb/C Mausmodell

Weibliche Balb/C Mäuse (H-2^{dL}) (Charles River, Sulzfeld) wurden unter besonderen, pathogenfreien Bedingungen gehalten und im Alter von sechs bis zwölf Wochen mit unterschiedlichen Mengen an Plasmid DNA *intramuskulär* oder *intradermal* mit einer „Partikel-gun“ immunisiert.

B.6.1.1 Herstellung endotoxin-freier Plasmid-DNA

Um Kontaminationen durch immunstimulatorische, bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) zu vermeiden, wurden die Plasmid-DNAs, sowohl für die Maus-, als auch für die anschließenden Affenstudien, mit Hilfe des „Endotoxin-free DNA preparations“-Kits nach Angaben des Herstellers (Quiagen, Hilden) präpariert und in sterilem PBS (ohne Ca²⁺- und Mg²⁺- Ionen) aufgenommen. Der Endotoxin-Gehalt der DNA Präparation wurde mit Hilfe des „Limulus Amebocyte“-Assays QCL-1000[®] (Biowhittaker, Walkersville, USA) bestimmt. Für die Immunisierungsstudien wurden nur DNA-Präparationen verwendet, deren Endotoxin-Gehalt < 1EU/ml war, was einem LPS-Anteil kleiner als 1ng entspricht.

B.6.1.2 Herstellung von DNA-Goldpartikel für die intradermale Immunisierung mit der „Partikel-gun“

25mg Goldpartikel (Durchmesser 1µm) wurden in einem Eppendorfgefäß eingewogen, mit 100µl 50mM Spermidin (Sigma, Aldrich) gemischt, kurz mit Ultraschall behandelt und 50µg DNA-Lösung (endotoxin-frei) dazugegeben. Unter leichtem Vortexen wurde anschließend 100µl einer 1M CaCl₂-Lösung tropfenweise hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (Rt) wurde das Gemisch abzentrifugiert, die Goldpartikel dreimal mit frischem 100%-igem Ethanol gewaschen, anschließend in 0,05mg PVP/ml Ethanol gelöst und in einem Endvolumen von 3ml quantitativ in 50ml Polypropylen-Röhrchen (Greiner) überführt. Unter Vortexen wurden sie in vorher mittels Stickstoff getrocknete Teflonschläuche transferiert; diese wurden anschließend in eine „Tubing Prep Station“ (BioRad, München) eingebracht. Nach fünfminütigem Absetzen der Partikel wurde die Flüssigkeit vorsichtig aus dem Schlauch abgezogen. Die Schläuche wurden anschließend 10min. mittels durchströmenden Stickstoffs getrocknet. Die Lagerung erfolgte in einem Exikator bei Rt.

B.6.1.3 DNA- Immunisierung

B.6.1.3.1 Die intramuskuläre Immunisierung

Vor der Immunisierung wurden die Mäuse mit Metofane[®] (Janssen GmbH, Neuss) durch Inhalation betäubt und anschließend an beiden Hinterbeinen rasiert. In jeden *Tibialis anterior* Muskel wurden 50µl, d.h. der halbe Ansatz an Plasmid-DNA, gelöst in PBS, injiziert. Zur Verabreichung von Elektropulsen wurde ein modifiziertes Elektroporationsgerät (Hybaid) verwendet. Die Elektroden wurden in einem Abstand von 0,2cm um die *intramuskuläre* Einstichstelle gelegt. Anschließend wurden im Abstand

von 50ms fünf Impulse bei einer Spannung von 100Volt beiden Muskeln verabreicht und weitere fünf Impulse nach Drehen der Elektroden um 90°.

B.6.1.3.2 Intradermale DNA-Immunisierung mittels „Partikel-gun“

Die zu immunisierenden Mäuse wurden am Bauch rasiert, mit 70%-igem Ethanol desinfiziert und anschließend mit einer „Partikel-gun“ (Accel[®], BioRad laboratories, Hercules, CA) beschossen. Die „Partikel-gun“ wurde uns freundlicherweise von Dr. Schirmbeck (Institut für Mikrobiologie und Immunologie, Ulm) zur Verfügung gestellt. Die Verabreichung von 0,5mg Goldpartikel, bei einem Heliumdruck von 400psi pro Schuß, entsprach einer Menge von ca. 1µg Plasmid-DNA.

Als Kontrollgruppen wurden zum einen nichtimmunisierte Tiere als auch mit „Leer“-Vektor immunisierte Tiere verwendet. Im Abstand von drei Wochen wurden die durchgeführten Grundimmunisierungen zweimal wiederholt („Booster-Immunisierungen“).

B.6.2 Analyse der immunisierten Balb/C Mäuse

B.6.2.1 Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurden den immunisierten Mäusen jeweils eine Woche nach Grund- bzw. Auffrischungsimmunisierung Blut durch Anritzen der Schwanzvene entnommen. Die Blutentnahme wird durch vorheriges Erwärmen (3-5min.) der Mäuse mittels einer Rotlichtlampe erleichtert. Zur Gewinnung des Serums wurde das Vollblut eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend eine Stunde auf 4°C abgekühlt. Der Blutkuchen wurde 10min. bei 10 000x g in der Tischzentrifuge (EPPENDORF, Hamburg) pelletiert, vorsichtig das Serum abgenommen und für 30min. bei 56°C inaktiviert. Bis zur Austestung der Proben wurden sie bei -20°C gelagert.

B.6.2.2 Bestimmung der Gag spezifischen Antikörpertiter

Zur Bestimmung der Gag-spezifischen Ig Antikörper-Titer wurden mitteladsorbierende 96-well Platten (Nunc, Wiesbaden) über Nacht (4°C) mit je 100ng PrepCell[®]-gereinigtem 56kDa SIV-Gag Protein, für die SIV Konstrukte bzw. 55kDa HIV-gag für die HIV Konstrukte in 100µl 0,2M Karbonatpuffer (150mM NaCl, 100mM Na-Carbonat pH 9,5) gelöst und beschichtet (Endkonzentration von 1µg/ml). Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal gewaschen (PBS/0,05% Tween20) und mit 200µl Blockierungslösung (PBS/10%FKS) für 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 100µl einer bestimmten Serumverdünnung (Verdünnungspuffer: PBS, 2% Tween 20, 3% FKS) beschichtet, und die Platte für zwei Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Nach diesen zwei Stunden wurden die Seren ausgeschüttet, die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100µl eines in Verdünnungspuffer verdünnten (1:2 000) anti-Maus Ig-HRP Antikörpers (Dako, Hamburg) beschichtet. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte die Gesamtmenge an spezifischen Gag Antikörpern in den immunisierten Mäusen detektiert werden. Neben der Bestimmung der absoluten Gag Ig Antikörpertiter wurden parallel die Isotypen, IgG1 und IgG2a bestimmt. Anhand der Verhältnisse einzelner AK-Isotypen zueinander können im murinem System eindeutige Zuordnungen der CD4⁺ T-Zell vermittelten Immunantwort in Richtung TH1 (IgG1 < IgG2a) bzw. TH2 (IgG1 > IgG2a) getroffen werden. Für die Isotypenbestimmung werden die Platten mit 100µl einer im Verdünnungspuffer verdünnten (1:2 000) IgG1-HRP bzw. IgG2a-HRP (beide

Antikörper sind von BD, Heidelberg) Antikörperlösung beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Platten siebenmal gewaschen, ausgeklopft und die Färbereaktion durch die Zugabe des Enzymsubstrats o-Phenylendiamin nach Angaben des Herstellers (ABBOTT LABORATORIES, Wiesbaden) durchgeführt. Die Reaktion wurde nach 5 bis 30min. durch die Zugabe von 100µl 1N H₂SO₄ pro Napf abgestoppt. Die Absorption der im positiven Fall gelb/orange-farbigen Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 492nm (Referenzwellenlänge 620nm) in einem ELISA Reader der Firma SLT LABINSTRUMENTS Deutschland GmbH bestimmt. Serumverdünnungen wurden als positiv gewertet, wenn sie den 2,5-fachen OD-Wert eines parallel gemessenen Serum eines nicht immunisierten Versuchstieres, bei gleicher Serumsverdünnung überschritten haben.

B.6.3 Bestimmung der zellulären Immunantwort

B.6.3.1 Präparation und Isolierung von Milzzellen immunisierter Versuchstiere

Eine Woche nach der zweiten *Booster*-Immunisierung wurden die Versuchstiere durch CO₂-Begasung getötet und die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Milzen einer Immunisierungsgruppe, meist 5-6 Tiere wurden vereinigt und in 10ml Medium überführt. Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen unter möglichst sterilen Bedingungen in kleine Stücke geschnitten und mit Hilfe eines Stempels vorsichtig zerrieben. Anschließend wurden die Zellen durch ein Nygonsieb (FALCON, Heidelberg) gegeben, welches noch zweimal mit je 5ml Medium gewaschen wurde. Die Milzzellsuspension wurde danach bei Raumtemperatur und 300x g 5min. in einer Tischzentrifuge pelletiert und der Mediumüberstand verworfen. Zur Entfernung der Erythrozyten wurden die Zellen in 20ml Lysepuffer (150mM NH₄Cl, 1mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7,2) 5min. bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Das anschließende dreimalige Waschen in 50ml PBS/5% FKS diente der Entfernung des freigesetzten Hämoglobins. Nach den Waschschrinen wurden die Milzzellen in 20ml RPMI-Medium mit 5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin aufgenommen und die Lebendzellzahl durch Anfärbung mit Tryphanblau (0,4% Tryphanblau/PBS) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank gehalten. Auf diese Weise wurden je nach Größe der Milz bis zu 10⁸ Zellen gewonnen. Die isolierte Zellpopulation besteht zu 60-70% aus B-Lymphozyten, ungefähr 15-20% CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen sowie 10% Monozyten/Makrophagen und dendritischer Zellen. Die restlichen Zellpopulationen sind neutrophile Granulozyten, NK-Zellen und Fibroblasten.

B.6.3.2 Durchführung der Stimulierung von Milzzellen und Austestung des Kulturüberstandes

Für die Restimulierung von Milzzellen aus *in vivo* geprimten Mäusen mit Proteinen wurde den Mäusen fünf Tage nach der zweiten *Booster*-Immunisierung die Milz entnommen, deren Zellen kultiviert und stimuliert.

Die Stimulierung von Milzzellen mit Plasmid DNA wurde dagegen mit *Splenocyten* aus vier bis sechs Wochen alten, *ungeprimten* Mäusen durchgeführt.

Die Stimulation von *geprimten* 2x 10⁶ Milzzellen (4x 10⁶ Z/ml) in RPMI-Vollmedium erfolgte in 24-well Zellkulturgefäßen (Costar, Corning NY, USA) mit 500µl VLPs (Konz. 0,5-1µg/ml) oder Peptiden (Konz. 10µM, 10µg/ml) für 48 Stunden. Vor der

Verwendung der VLPs wurden diese mindestens einer halbstündigen UV-Bestrahlung ausgesetzt. Nach 48h wurde 1ml vom Überstand der restimulierten Milzzellen abgenommen, durch Zentrifugation (600x g, 10min., 4°C) von Zellen und Zelltrümmern befreit und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C weggefroren.

Die Stimulation von ungeprimten Milzzellen erfolgte in ähnlicher Weise wie oben beschrieben, nur wurden für diesen Versuch unterschiedliche Konstrukte an endotoxin-freier DNA den Milzzellen verabreicht, um Unterschiede in der Immunogenität der unterschiedlichen Konstrukte *per se* zu erkennen.

Die Bestimmung der verschiedenen Zytokine (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, TNF- α) im Überstand von *in vitro* restimulierten Splenozyten wurde mit Hilfe kommerzieller Zytokin-ELISAs (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Proben wurden dabei unverdünnt bei Restimulation mit Peptid oder DNA bzw. in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 bei Restimulation mit VLPs eingesetzt.

B.6.4 Nachweis zytotoxischer T-Zellen

B.6.4.1 Quantifizierung Zytokin-sezernierender Zellen im ELISPOT-Assay

Zur Bestimmung der Anzahl Zytokin-sezernierender Zellen nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit spezifischen *Recall*-Antigenen wurde zunächst die mit Nitrocellulose beschichtete 96-well Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100 μ l eines 5-10 μ g/ml in PBS verdünnten Anti-Zytokin Antikörpers (C, „capture“) (BD, Heidelberg) ÜN (4°C) inkubiert. Nach mehrmaligem sterilem Waschen (4x) mit PBS/10% FKS wurde die Platte 1h bei 37°C mit 200 μ l PBS/10% FKS blockiert. Anschließend wurden je 100 μ l einer entsprechenden Verdünnung der Splenozyten (1x 10⁵-1x 10⁶ Zellen pro Ansatz) und je 100 μ l der stimulierenden Reagenz (10 μ M Peptid (2 μ g), 0,5-1 μ g rekombinantes Protein, PMA (0,1 μ g/ml), Ionomycin (1 μ g/ml) (Sigma, Deisenhofen) zugegeben und in der Regel 24h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Nach der *in vitro* Restimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges Waschen (6x) mit Waschpuffer (PBS/0,05% Tween20) lysiert. Anschließend wurden je 100 μ l einer auf 1 μ g/ml in Verdünnungspuffer (PBS/10% FKS/0,05% Tween20) verdünnten Lösung des sekundären, biotinylierten Zytokin-Antikörpers (D, „detection“) (BD, Heidelberg) zugegeben und weitere 2h bei Rt inkubiert. Die Platte wurde gewaschen (10x) und die Antikörper-Antigen Komplexe durch Zugabe eines 1:5 000 in Verdünnungspuffer verdünnten Streptavidin-AP Konjugats (Roche, Mannheim) detektiert. Nach einer Inkubation von 30min. (Rt) wurde die Platte wiederum gewaschen (10x). Anschließend wurde die Platte mit 50 μ l AP-Färbelösung nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim) 15-30min. inkubiert und die *Spots* (SFC; „spot forming cell“) nach wiederholtem Waschen mit Wasser und Trocknung (ÜN, Rt) mit Hilfe eines automatisierten ELISPOT-Lesegerätes (BioSys) ausgezählt.

Zytokin	Antikörper-Pärchen		Klon	Konzentration	Verdünnung
IFN- γ	anti-Maus IFN- γ	C	R4-6A2	1mg/ml	1:100-1:200
	Biotin-anti-Maus IFN- γ	D	XMG1.2	0.5mg/ml	1:50-1:100

B.6.4.2 Quantifizierung der intrazellulären INF- γ Produktion stimulierter CD8⁺-Lymphozyten im FACS

Die Milzen wurden wie unter B.6.3.1 beschrieben den Tieren entnommen und *in vitro* auf 2×10^7 Zellen pro ml mit RPMI eingestellt. 100 μ l der Milzzellsuspension wurde pro well einer 96-well-Flachbodenplatte pipettiert. Als Negativkontrolle wurde den Milzzellen nur 100 μ l RPMI und 0,2 μ l Blockierungslösung BFA (Brefeldin A, Sigma #B-6542) zugegeben. Zur spezifischen Stimulation wurde zusätzlich entweder VLPs (1 μ g) oder spezifisches Peptid (A9I, 0,2 μ l) gegeben. Das Peptid A9I ist als murine p24 ZTL-Epitop, des Haplotyps H-2^d (Balb/C) beschrieben worden (Nakamura *et al.*, 1997; Selby *et al.*, 1997). Als Positiv-Kontrolle und unspezifisches Aktivierungsantigen wurde je 0,1 μ l PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma #P 8139) und Iono (Ionomycin, Sigma, # I 0634) verwendet. Anschließend wurde der Ansatz für sechs Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen vorsichtig für 5min. bei 1 200 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 200 μ l FACS-Puffer (PBS_{ohne}; 1% FKS; 1mg/ml NaN₃) werden die Zellen in 96-well-Rundbodenplatten transferiert. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von 1 μ l CD16/32 Antikörper (CD16/32- α -mouse; Pharmingen #01241A) in 100 μ l FACS-Puffer. Die Inkubationsdauer beträgt mindestens 10min. bei 4°C. Ohne einen weiteren Waschschrift erfolgte anschließend die Oberflächenfärbung. Pro well wurden 10 μ l einer 1:20 Antikörperversdünnung von CD4-FITC (CD4-FITC - α -mouse; Pharmingen #01064D) und/oder CD8-APC (CD8a-APC- α -mouse; Pharmingen #01049A) zugeben und für 25min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer-II (PBS_{ohne}; 1mg/ml NaN₃) wurden 250 μ l pro well Cytofix/Cytoperm (4% PFA, 1% Saponin; Pharmingen #2090KZ) zugegeben und die Zellen für 20min. im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach weiterem Waschen 2x 200 μ l Perm/Wash (PBS, 0,1% Saponin; Pharmingen #2091KZ) erfolgte die intrazelluläre Färbung mit IFN γ -PE- α -mouse (Pharmingen, #18115A). Pro well wurden 100 μ l Perm/Wash Puffer vorgelegt und 10 μ l einer 1:20 Verdünnung dieses Antikörpers zugegeben und für 25min. auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach anschließenden Waschen mit Perm/Wash wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Das anschließende Auslesen erfolgte am FACS-Calibur von Pharmingen. Zuerst wird die Population von Lymphozyten bestimmt und anschließend mit Hilfe der Oberflächenmarker auf CD4 und CD8 positive Zellen *gated*. Mindestens 30 000 dieser CD8⁺ Zellen werden aufgenommen und auf INF- γ Produktion gemessen.

B.6.4.3 Chrom-Freisetzungstest

Jeweils 3×10^7 Splenozyten wurden entweder mit 1×10^6 (30:1) bzw. 6×10^6 (5:1) murinen (H-2^d) A-20 Stimulatorzellen in 10ml Kulturmedium mit 10% Rattenfaktor oder 15U/ml rIL-2 (Roche, Mannheim) für fünf Tage in aufrecht stehenden 25cm²-Kulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) *in vitro* restimuliert. Die dafür benötigte Anzahl an A20-Zellen (5×10^6 /ml) wurde zuvor 1h (37°C, 5%CO₂) mit 10 μ M des Peptids A9I (AMQMLKETI) oder V3-Peptid (RGPGRAFVTI) beladen und anschließend nach dreimaligem Waschen (PBS/1%FKS) mittels eines Gammastrahlers mit 20 000rad (200Gy, ~2 200 sec.) bestrahlt, um weitere Zellteilungen zu blockieren. Nach der 5-tägigen Inkubation wurde die Lebendzellzahl der Ansätze bestimmt, die Zellen pelletiert (300x g, 25°C, 5min.) und in frischem Kulturmedium aufgenommen (1×10^7

Z/ml).

Zur Bestimmung der Antigen-spezifischen Zytotoxizität der angereicherten CD8⁺ T-Lymphozyten wurden zunächst in 100µl unterschiedliche Zellzahlen ($1 \times 10^6/5 \times 10^5/2,5 \times 10^5/1,25 \times 10^5$ Zellen) in Triplets in 96-well Rundboden-Kulturplatten (BD, Heidelberg) vorgelegt (**Effektorzellen, E**). Anschließend wurden je 1×10^4 mit Peptid *gepulste*, und mit 51-Na-Chromat markierte, murine (H-2^d) P815 Zellen (**Zielzellen; „target cells“, T**) in 100µl (1×10^5 Z/ml) zugegeben und drei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurde die Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen der Effektorzellen und Zielzellen bestimmt (E:T z.B. 100:1/ 50:1/25:1/12.5:1).

Zuvor wurden je 1×10^7 P815 Zielzellen eine Stunde mit 10µM Peptid beladen (P815/+) und anschließend in 300µl FKS mit 250µCi ⁵¹NaOCr₂ (5mCi/ml; Amersham, Braunschweig) für 1,5 Stunden bei 37°C markiert. Nach Entfernen der nicht eingebauten, radioaktiven Chrom-Verbindungen durch mehrmaliges Waschen mit PBS/2% FKS wurden die Zielzellen in Kulturmedium resuspendiert ausgezählt, die Konzentration auf 1×10^5 Z/ml eingestellt und je 100µl 1:1 zu einer bestimmten Konzentration an Effektorzellen dazugegeben und wie beschrieben inkubiert. Darüber hinaus wurde die spontane Freisetzung (1×10^4 Zellen/100µl Medium) bzw. die maximale Freisetzung (1×10^4 Zellen/100µl 5% Triton-X100) von elementarem ⁵¹Cr aus den P815-Zielzellen bestimmt. Nach der Inkubation wurden die Zellen in einer Plattenzentrifuge abzentrifugiert (300x g, 3min.) und je 50µl des Überstands in 96-well LumaPlateTM-Platten (Packard, Meriden, USA) überführt. Nachdem die Platten über Nacht getrocknet wurden, wurde die Konzentration an ⁵¹Cr in einem Festphasen-γ-Szintillationsmeßgerät (Packard, Meriden, USA) bestimmt. Die spezifische Lyse [%] eines definierten E:T Verhältnisses als Maß für die ZTL-Reaktivität gegen ein spezifisches Peptid wurde nach der Formel: $100 \times (\text{gemessene } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung}) / (\text{maximale } ^{51}\text{Cr Freisetzung} - \text{spontane } ^{51}\text{Cr Freisetzung})$ berechnet.

B.6.5 Immunisierung von Rhesus Makaken

Die im Rahmen dieser Promotion entwickelten Vektoren wurden in unterschiedlichen Primatenstudien verwendet. Eine noch laufende Studie findet in Zusammenarbeit mit Dr. Christiane Stahl-Hennig am Deutschen Primaten Zentrum (DPZ) in Göttingen statt. Andere Studien wurden und werden am BPRC („Biomedical Primate Research Centre“) unter Leitung von Prof. Jonathan Heeney durchgeführt.

C – ERGEBNISSE

Die effiziente Expression später Genprodukte bei Lentiviren unterliegt einer komplexen Regulation der Transkription des RNA-Export und benötigt transaktive virale Proteine wie Tat und Rev. Die anti-Repressor Funktion von Tat kann durch Verwendung von zellulären- oder viralen Promotoren umgangen werden. Die Expression der späten Gene (Gag, Pol und Env) hingegen ist abhängig von der Anwesenheit des transaktiven RNA-*shuttle*-Proteins Rev.

Ein Ziel dieser Arbeit war es zunächst, nähere Einblicke in die molekularen Mechanismen der viralen Genexpression lentiviraler Transkripte am Beispiel des gruppenspezifischen Antigens zu erlangen. Basierend auf diesen Erkenntnissen sollten Plasmid-Vektoren entwickelt werden, welche die komplexe virale Regulation umgehen können. In weiterführenden Mausstudien sollten im Anschluß verschiedene Vektor-konstrukte und Applikationsformen bezüglich ihrer Immunogenität getestet werden. Die hieraus resultierenden Erkenntnisse waren Ausgangspunkt für die Entwicklung neuartiger HIV-Impfstoffkandidaten. Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit für die Präklinik auf das Rhesus Makaken-Modell adaptiert und getestet um daraus notwendige Erkenntnisse für weiterreichende Klinische Phase I Studien zu erhalten. Letztere werden im Rahmen eines europäischen Forschungsverbundes (EUROVAC) in Amsterdam und Lausanne durchgeführt und sollen im vierten Quartal dieses Jahres beginnen.

Ein weiteres Einsatzgebiet von synthetischen Genen war die Verbesserung des Sicherheitsprofil lentiviraler Vektoren für die Gentherapie (Wagner et al., 2000). Dieser Ansatzpunkt wird im Ausblick unter D. 5 vorgestellt.

C.1 Bedeutung von cis-aktiven Elementen bei der Expression später lentiviraler Gene

Das Rev/RRE System

Die Expression des gruppenspezifischen Antigens unterliegt einer strengen Regulation durch das komplexe Zusammenspiel cis- und transaktiver Elemente (Chang et al., 1989; Laspia et al., 1989; Rosen et al., 1990) und kann nur mit Hilfe des Rev-Proteins und vermittelt durch RRE (*Rev-responsive element*) effizient exprimiert werden (Cullen, 1992). Neben inhibitorischen, AU-reichen INS-Elementen innerhalb der kodierenden RNA (Cochrane et al., 1991; Emerman et al., 1989; Nasioulas et al., 1994; Rosen et al., 1988; Schwartz et al., 1992a) und dem RRE sind noch weitere cis-aktive Elemente in den nicht-translatierten Regionen an der Expression von Strukturproteinen beteiligt. So ist bekannt, daß eine funktionelle 5'-Hauptspieß-donorstelle sowie die Bindung des Ribonukleoproteins U1-snRNP für eine hohe Expression des HIV-1 Hüllproteins Env notwendig ist (Hammariskjold et al., 1994; Lu et al., 1990).

Rev/RRE-unabhängige Expression später HIV Genprodukte

Darüber hinaus können alternative, aber funktionsanaloge cis-aktive Elemente in den flankierenden Bereichen eine Rev-unabhängige Expression vermitteln. In diesem Zusammenhang konnten bereits mehrere Arbeitsgruppen zeigen, daß das konstitutive RNA-Transportelement (CTE) einfacher Retroviren in der Lage ist, das Rev/RRE-Regulationssystem von HIV-1 und SIV effektiv zu ersetzen (Bray et al., 1994; Indraccolo et al., 1998; Rizvi et al., 1996a). Die 219 Basen umfassende CTE-Sequenz des Affen Mason-Pfizer D-Typ Retrovirus (MPMV) besteht aus zwei ~70 Nukleotid-langen, palindromischen, direkten Sequenzwiederholungen, die eine konservierte RNA-Sekundärstruktur ausbilden (Ernst et al., 1997; Tabernero et al., 1996). Entscheidend für die Funktionalität des CTE innerhalb des SIV Genoms ist jedoch seine Position in unmittelbarer Nähe des Polyadenylierungssignals (Rizvi et al., 1996b; Rizvi et al., 1997).

Alternativ wurde am Beispiel des Hüllproteins von HIV-1 eine Rev-unabhängige Expression durch die Insertion eines kompletten Introns 5'-seitig des env-Leserahmens beschrieben (Hammariskjold et al., 1994).

C.1.1 Entwicklung und Konstruktion unterschiedlicher Gag-Reporterkonstrukte

Die virale, ungespleißte, genomische RNA kodiert für das gruppenspezifische Antigen (Gag) Pr55^{gag} bei HIV-1 bzw. Pr56^{gag} bei SIV_{mac239} und wird im Verlauf der Replikation als spätes Strukturprotein Rev-abhängig exprimiert. Basierend auf dem Gag-Leserahmen des HIV-1 proviralen Konstruktes HX10 (Genbank Nr. K03455) bzw. der SIV_{mac239} Konstrukte (Genbank Nr. M33262) wurden verschiedene Reporterkonstrukte hergestellt, mit deren Hilfe der Einfluß und das Zusammenwirken der oben aufgeführten cis-aktiven Elemente (SD, RRE, INS, CTE und Intron) auf die Rev-Abhängigkeit später viraler Gene untersucht werden sollte.

Weiterführende Fragestellungen bezüglich der Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen (ZTLs) im Mausmodell wurden aufgrund des Fehlens geeigneter muriner ZTL Epitope in den von SIV abgeleiteten Konstrukten anhand der zum Teil schon verfügbaren HIV-Vektoren (Graf et al., 2000) untersucht.

Da ein wesentliches Ziel dieser Arbeit die Entwicklung und Austestung eines Impfstoffkandidaten im Rhesus Makaken-Modell war, wurden analoge Expressionskonstrukte auch basierend auf dem Affenimmundefizienz Virus SIV_{mac239} hergestellt.

C.1.1.1 Herstellung von Vektoren zur Expression des SIV-Gag Polyproteins

Zur Generierung der SIV_{mac239} Wildtyp-(Wt) gag-Expressionsvektoren wurde die kodierende gag-Sequenz 5' vom Startkodon mit der Kozak-Sequenz (5'-GAGTGGGAG-3') versehen und als ein 1.574 Bp-langes Fragment mittels PCR aus dem proviralen Vektor pBS-SIV239-5' amplifiziert. Desweiteren wurde die gag-Sequenz zusammen mit dem 116 Bp langen 5'-nicht-translatierten-Bereich (NTR) als ein 1.669 Bp-langes Fragment amplifiziert. Diese Region beinhaltet den hocheffizienten Hauptspleißdonor (SD), der Teil jedes SIV Transkripts ist und für alle viralen Spleißvorgänge verwendet wird. Mit Hilfe der eingefügten Restriktionsschnittstellen KpnI/EcoRI am 5'-Ende und BamHI/XhoI am 3'-Ende konnten die Amplifikate über KpnI/XhoI in den pCR-Script™-Vektor subkloniert werden (pc-NTR-wtgag, pc-wtgag).

Die BamHI-Restriktionsschnittstelle innerhalb der wtgag-Sequenz von pc-NTR-wtgag und pc-wtgag wurde durch den Austausch eines Cytosins gegen ein Thymidin durch gerichtete Mutagenese gezielt zerstört. Die Zerstörung der Restriktionsschnittstelle war notwendig, um die eingebrachte BamHI-Schnittstelle in der gag-flankierenden Region für die Integration cis-aktiver Elemente zu verwenden.

C.1.1.1.1 Rev-abhängige Pr56^{gag} Expressionsvektoren

Die Rev-Funktion setzt eine spezifische Interaktion mit dem cis-ständigen RRE („*Rev-responsive-element*“)-RNA-Element voraus (Kjems et al., 1991; Malim et al., 1990). Für die Untersuchung der Rev-abhängigen Expression des Pr56^{gag}-Proteins wurde das cis-aktive RRE-Element 3' an die Pr56^{gag}-kodierende Region fusioniert. Das RRE-Element von SIV_{mac}239 befindet sich innerhalb des env-Leserahmens (Le et al., 1990). Das insgesamt 877 Bp-lange RRE-Fragment wurde aus pBS-SIV239-3'-nef-open amplifiziert und ungerichtet in den pCR-Script™-Vektor subkloniert. Nach Einfügen einer BamHI/Bgl II-Klonierungsschnittstelle wurde das RRE-Fragment 3' des gag-Leserahmens kloniert (pc-wtgag-RRE, pc-NTR-wtgag-RRE, pc-syngag-RRE und pc-NTRsyngag-RRE).

C.1.1.1.2 Rev-unabhängige Pr56^{gag} Expressionsvektoren

Eine aus Gründen der Vektorsicherheit und Effizienz attraktive, Rev-unabhängige Pr56^{gag}-Expression des wtgag-Gens sollte zum einen (i) durch die Fusion des konstitutiven Transportelements MPMV CTE 3' an den gag-Leserahmen, (ii) durch Verwendung eines funktionellen Introns im 5' Bereich des Expressionskonstruktes sowie (iii) durch die Inaktivierung potentiell inhibitorischer AT-reicher Sequenzmotive erzielt und vergleichend analysiert werden.

Transportelement MPMV CTE.

Mit Hilfe der PCR wurde ein 325 Bp umfassendes CTE-Fragment aus dem pben4-Plasmid (Uwe Junker, Norvatis) herausamplifiziert und über die flankierenden Restriktionsschnittstellen BamHI- bzw. XhoI in den Klonierungsvektor pCR-Script™ (pc-CTE) subkloniert. Die gerichtete Integration der CTE-Region erfolgte über BamHI/XhoI 3' der Pr56^{gag}-kodierenden wtgag-Sequenzen (pc-wtgag-CTE und pc-NTR-wtgag-CTE).

Intron-haltiger Expressionsvektor.

Alternativ wurden die gag-Konstrukte in den Intron-haltigen Expressionsvektor pND (Jonathan Heeney, Rijswijk) über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/XhoI kloniert (Intron-wtgag, Intron-syngag). Die Gag-kodierende Region befindet sich somit am 3'-Ende des funktionellen Introns hCMV unter der Kontrolle des hCMV-Promotors.

Kodonoptimierung und Eliminierung von inhibitorischen, AT-reichen Sequenzmotiven

Eine weitere Möglichkeit eine Rev-unabhängige SIV-Gag Expression zu erzielen besteht darin, den Wildtyp gag-Kodongebrauch von SIV, an den von hochexpremierenden Säugetiergenen anzupassen. Basierend auf der Wildtyp Gag-Sequenz wurde ein synthetisches Gen konstruiert, welches für das Pr56^{gag}-Polyprotein kodiert, jedoch eine Kodonwahl aufweist, wie sie in hoch exprimierenden Säugern zu finden ist (siehe Tabelle C-1). Dies erlaubte, bislang ungenau charakterisierte, cis-

ständige Repressor- (CRS) bzw. Inhibitorsequenzen (INS) innerhalb des Gens zu eliminieren, ohne genauere Kenntnisse über die Beschaffenheit dieser Elemente zu besitzen. In Tabelle C-1 ist die bevorzugte Kodonwahl des SIV Gag-Gens im Vergleich mit derjenigen von hochexpmierenden Säugergenen angegeben.

Amino-säure	Säuger Kodon	SIV-Kodon	Amino-säure	Säuger Kodon	SIV-Kodon
<i>Ala</i>	GCC	GCA	<i>Leu</i>	CTG	TTA
<i>Arg</i>	AGG	AGA	<i>Lys</i>	AAG	AAA
<i>Asn</i>	AAC	AAT	<i>Met</i>	ATG	ATG
<i>Asp</i>	GAC	GAC	<i>Phe</i>	TTC	TTT
<i>Cys</i>	TGC	TGT	<i>Pro</i>	CCC	CCA
<i>Gln</i>	CAG	CAA	<i>Ser</i>	TCC	AGC
<i>Glu</i>	GAG	GAA	<i>Thr</i>	ACC	ACA
<i>Gly</i>	GGC	GGA	<i>Trp</i>	TGG	TGG
<i>His</i>	CAC	CAT	<i>Tyr</i>	TAC	TAT
<i>Ile</i>	ATC	ATA	<i>Val</i>	GTG	GTA

Tabelle C 1: Direkter Vergleich der Kodonwahl hochexpmierender Säugergene mit der des SIV_{mac239} Gag-Gens SIV Kodons: Bevorzugte Kodonwahl der SIV_{mac239} Gag, Pol oder Env Gene; Säuger Kodon: Bevorzugte Kodonwahl hochexpmierender Säugergene. Nukleotidpositionen, die sich von den SIV Kodons unterscheidenden, sind **fett** gedruckt.

Innerhalb der gag-Gensequenz finden sich gehäuft Kodons, die an der dritten Position bevorzugt Adenin- oder Thymidinreste besitzen und sich dadurch deutlich von den in Säugetiergenen bevorzugt verwendeten Kodons unterscheiden. Um die postulierten AT-reichen INS-Sequenzen innerhalb des SIV_{mac239} gag-Leserahmens zu inaktivieren, wurde unter Verwendung der Kodonwahl hochexpmierter Säugetiergene im GCG-Programm eine vollständig synthetische Pr56^{gag}-kodierende Sequenz (syngag) konstruiert, ohne dabei die Aminosäuresequenz des Pr56^{gag}-Polyproteins zu verändern. Die Herstellung und Klonierung der Subfragmente von pc-syngag ist unter B 3.5 näher beschrieben.

Durch die Erweiterung des syngag-Leserahmens in 5'-Richtung des Startkodons ATG um die 9 Basen umfassende, nicht-translatierte, optimierte Kozak-Sequenz (5'-GCCGCCAGC-3') sollte eine höhere Translationseffizienz der syngag-Expressionsvarianten in Säugerzellen gewährleistet werden (Kozak, 1987).

C.1.2 Expression des Pr56gag-Polyproteins in transfizierten humanen H1299-Zellen

Um die Bedeutung der unterschiedlichen cis-aktiven Sequenzen bei der Expression der späten lentiviralen Genprodukte zu evaluieren, wurden Säugerzellen mit den unterschiedlichen gag-Konstrukten transfiziert und hinsichtlich ihrer Pr56^{gag}-Produktionsraten untersucht.

C.1.2.1 Rev/RRE-abhängige Proteinexpression in transient transfizierten H1299 - Zellen

Zum grundlegenden Verständnis der Expression von HIV-1 und SIV Strukturproteine sollen die minimalen Voraussetzungen einer Rev-abhängigen Regulation untersucht werden. Neben den postulierten INS-Sequenzen scheinen noch weitere cis-aktive Ele-

mente, insbesondere ineffizient genutzte Spleißstellen, an der Rev-abhängigen Expression später SIV oder HIV Gene beteiligt zu sein. Um den Einfluß der 5'-Spleißdonorstelle innerhalb des 5'-NTR-Bereichs auf die Rev-abhängige Expression der Pr56^{gag}-kodierenden wtgag-Gensequenzen zu evaluieren, wurden INS-haltige wtgag-Expressionsplasmide mit oder ohne 5'-NTR-Bereich in H1299-Zellen transient transfiziert. Die Rev-Abhängigkeit sollte durch Kotransfektion mit dem HIV-1 Rev-Expressionsplasmid untersucht werden. HIV Rev ist strukturhomolog und funktionsanalog zu SIV Rev und somit in der Lage an das SIV RRE-Element zu binden (Malim *et al.*, 1989). Nach der Transfektion und Ernte der H1299-Zellen konnte das Pr56^{gag}-Polyprotein in den Zelllysaten durch eine Western-Blot Analyse mit Hilfe des SIV p27-spezifischen Antikörpers detektiert werden. Wie in der nachfolgenden Abbildung zu sehen ist, war nach Transfektion mit wtgag keine Expression von Pr56^{gag} nachweisbar. Eine Erhöhung der Expressionsrate konnte auch nicht durch Kotransfektion von Rev erzielt werden. Im Gegensatz dazu resultiert das Anfügen des 5'-NTR-Bereiches (NTR-wtgag, NTR-wtgag-RRE) zu einer Proteinsynthese sogar in Abwesenheit von Rev. Die Fusion des RRE-Elements an den gag-Leserahmen zusammen mit dem 5'-NTR-Bereich bewirkte eine 2-3-fache Steigerung der Pr56^{gag}-Expression nach Kotransfektion von Rev. Aus diesem Ergebnis kann daher geschlossen werden, daß für eine hohe und Rev-abhängige Expression von Pr56^{gag} das RRE-Element und der 5'-NTR-Bereich einschließlich des 5'-SD benötigt wird.

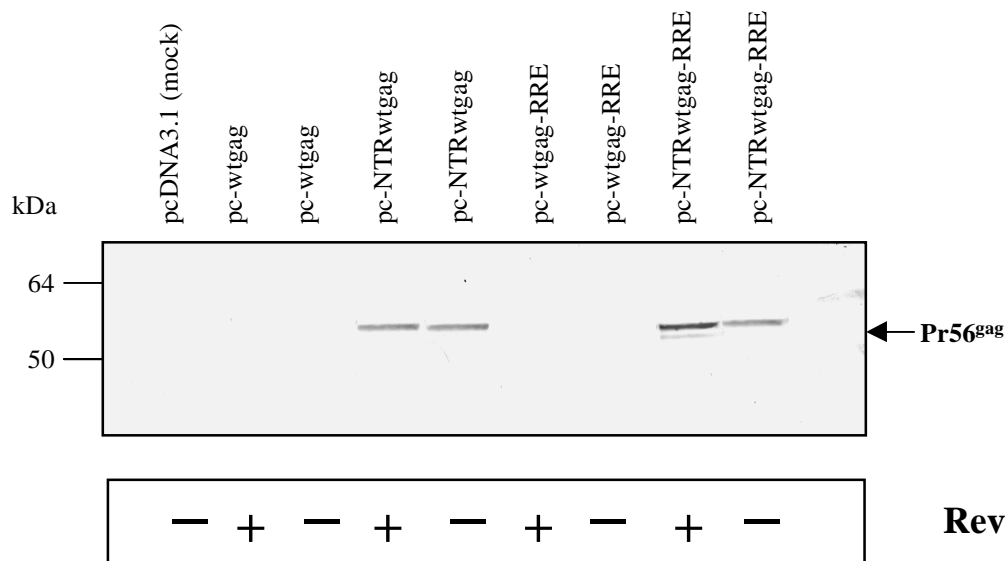


Abbildung C 1: Western-Blot Analyse der Rev-abhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins in transfizierten H1299-Zellen. 2×10^5 Zellen wurden mit $15 \mu\text{g}$ der wtgag-Expressionsplasmide (bei Kotransfektion von pc-Rev mit jeweils $7,5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA) mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3.1-transfizierte H1299-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung der Zelllysate über ein denaturierendes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das Pr56^{gag}-Polyprotein mit Hilfe des p27-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus im Immunoblot detektiert. Der Molekulargewichtsstandard ist links angezeigt, spezifisch nachgewiesenes Pr56^{gag}-Polyprotein mit einem Pfeil markiert.

C.1.2.2 Rev-unabhängige Pr56^{gag}-Expression durch Anfügen des MPMV konstitutiven RNA-Transportelements CTE

Zur Steigerung der Vektorsicherheit und Effizienz sollte durch Hinzufügen unterschiedlicher cis-aktiver Elemente die Möglichkeit einer Rev-unabhängigen Expression untersucht werden. Um zu bestimmen, in welchem Umfang das MPMV konstitutive Transport-Element in der Lage ist, das Rev/RRE-System zu ersetzen, wurde die freigesetzte Menge an Pr56^{gag} nach Transfektion von H1299-Zellen mit den CTE-Expressionskonstrukten wtgag-CTE und NTR-wtgag-CTE mit der Expression des Kontrollplasmids wtgag verglichen.

Analog zu den Ergebnissen in C.1.2.1 zeigte sich auch hier, daß die Pr56^{gag}-Expressionsrate von wtgag durch die Fusion des konstitutiven Transport-Elements an den gag-Leserahmen nicht gesteigert werden konnte. Demgegenüber konnte durch die Anwesenheit des 5'-NTR-Bereichs eine hohe Pr56^{gag}-Expression erzielt werden (siehe Abb. C2). Die Kotransfektion von transaktivem Rev hatte bei allen angegebenen gag-Konstrukten keinen Einfluß auf die quantitative Pr56^{gag}-Expression (Daten nicht gezeigt).

Das CTE ist demzufolge in der Lage, die Rev/RRE-Regulation effektiv zu ersetzen. Analog dem Rev/RRE-System ist eine hohe Pr56^{gag}-Expression allerdings nur in Anwesenheit von 5'-NTR zu beobachten.

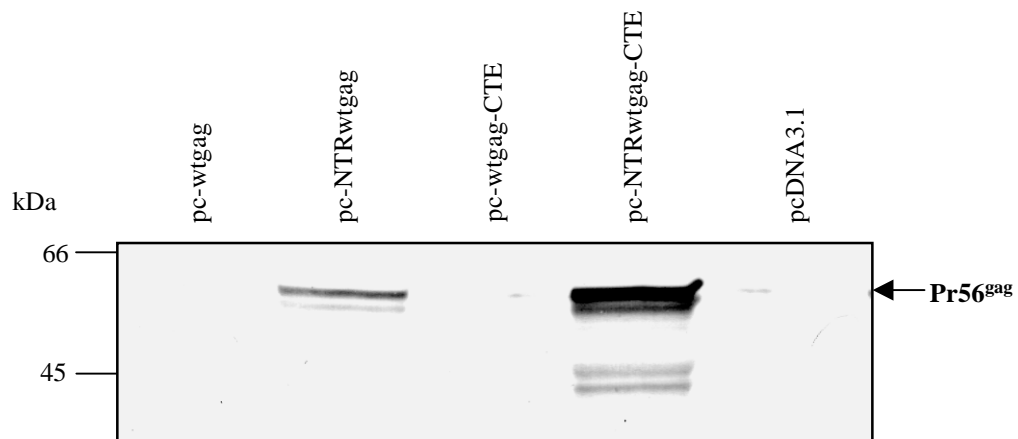


Abbildung C 2: Western-Blot Analyse der Rev-unabhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polypeptids in transfizierten H1299-Zellen aufgrund von cis-aktivem CTE. 2×10^5 Zellen wurden mit 15 µg der wtgag-Expressionsplasmide mittels CaHPO₄-Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3.1-transfizierte H1299-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung der Zellsate über ein denaturierendes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das Pr56^{gag}-Polypeptid mit Hilfe des p27-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus im Immunoblot nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben, spezifisches Pr56^{gag}-Polypeptid rechts mit einem Pfeil markiert.

C.1.2.3 Rev-unabhängige Proteinexpression durch Integration des funktionellen Introns hCMV

Um den Einfluß des aktiven Introns hCMV auf die Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins zu untersuchen, wurde 5´-seitig des wtgag-kodierenden Bereiches ein vollständiges Intron inseriert. Die transiente Transfektion der H1299-Zellen erfolgte mit den Intron-haltigen gag-DNA-pND-Expressionvektoren jeweils in An- und Abwesenheit des ko-transfizierten Rev-Expressionskonstruktes.

Wie der nachfolgenden Abbildung (siehe Abb. C3) zu entnehmen ist, konnte durch die Integration des Introns hCMV 5´ des gag-Leserahmens eine hohe Pr56^{gag}-Expression nach Transfektion von wtgag erzielt werden. Diese erwies sich weder als abhängig vom Rev/RRE-System, noch von dem 5´nichttranslatierten Bereich. Vielmehr resultierte das Anfügen des 5´SD in deutlich verringerten Expressionsraten. Lediglich bei den wtgag-Konstrukten mit dem cis-aktiven CTE hatte der 5´-NTR keinen inhibierenden Einfluß auf die Expression. Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Insertion des funktionellen Introns hCMV eine hohe Pr56^{gag}-Expression des INS-haltigen wtgag-Konstrukts erlaubt, ohne daß dazu weitere cis-aktive Elemente, wie RRE und die 5´-Spleißdonorstelle, notwendig wären.

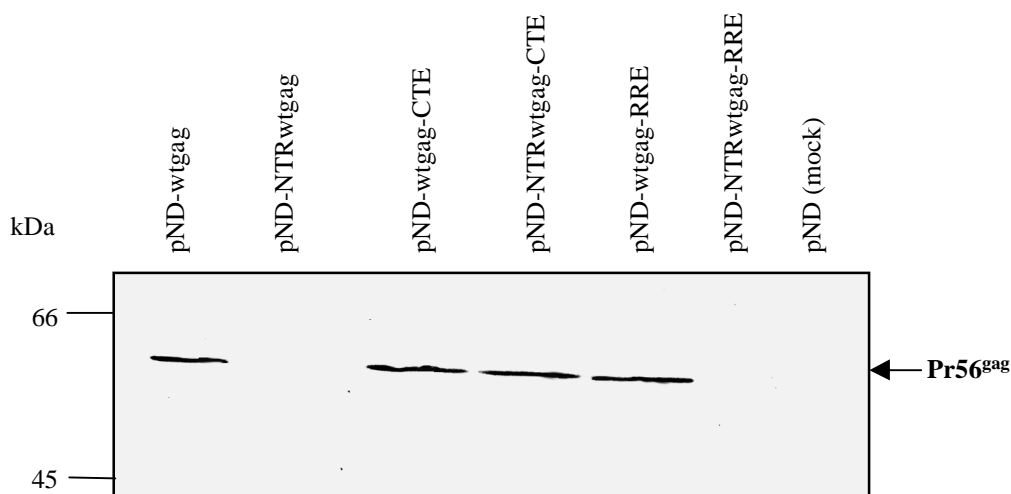


Abbildung C 3: Western-Blot Analyse der Rev-unabhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins in transfizierten H1299-Zellen nach Integration des Introns hCMV. 2×10^5 Zellen wurden mit $15\mu\text{g}$ der wtgag-Expressionsplasmide mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3.1-transfizierte H1299-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung der Zellysate über ein denaturierendes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das Pr56^{gag}-Polyprotein mit Hilfe des p27-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus im Immunoblot nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben, spezifisches Pr56^{gag}-Polyprotein rechts mit einem Pfeil markiert.

C.1.2.4 Rev-unabhängige Proteinexpression durch Eliminierung cis-aktiver Sequenzelemente im wtgag-kodierenden Leserahmen

Die niedrigen Expressionsraten ausgehend von lentiviralen Strukturgenen basieren höchstwahrscheinlich auf dem ungewöhnlich hohen AT-Gehalt der Nukleinsäure-

sequenzen bzw. auf dem Vorkommen cis-aktiver inhibitorischer Sequenzen. Bereits 1996 zeigten Haas und Kollegen, daß eine massiv erhöhte Expression des env-kodierten HIV-Hüllproteins, durch Anpassung des HIV-1 env-Gens an die Kodonwahl hochexprimierter Säugetiergene erzielt werden kann (Haas et al., 1996). Basierend auf diesen Arbeiten entwickelte unsere Arbeitsgruppe die Hypothese, daß durch Anpassung der Kodonwahl destabilisierende Sequenzen innerhalb der synthetisierten RNA eliminiert werden könnten.

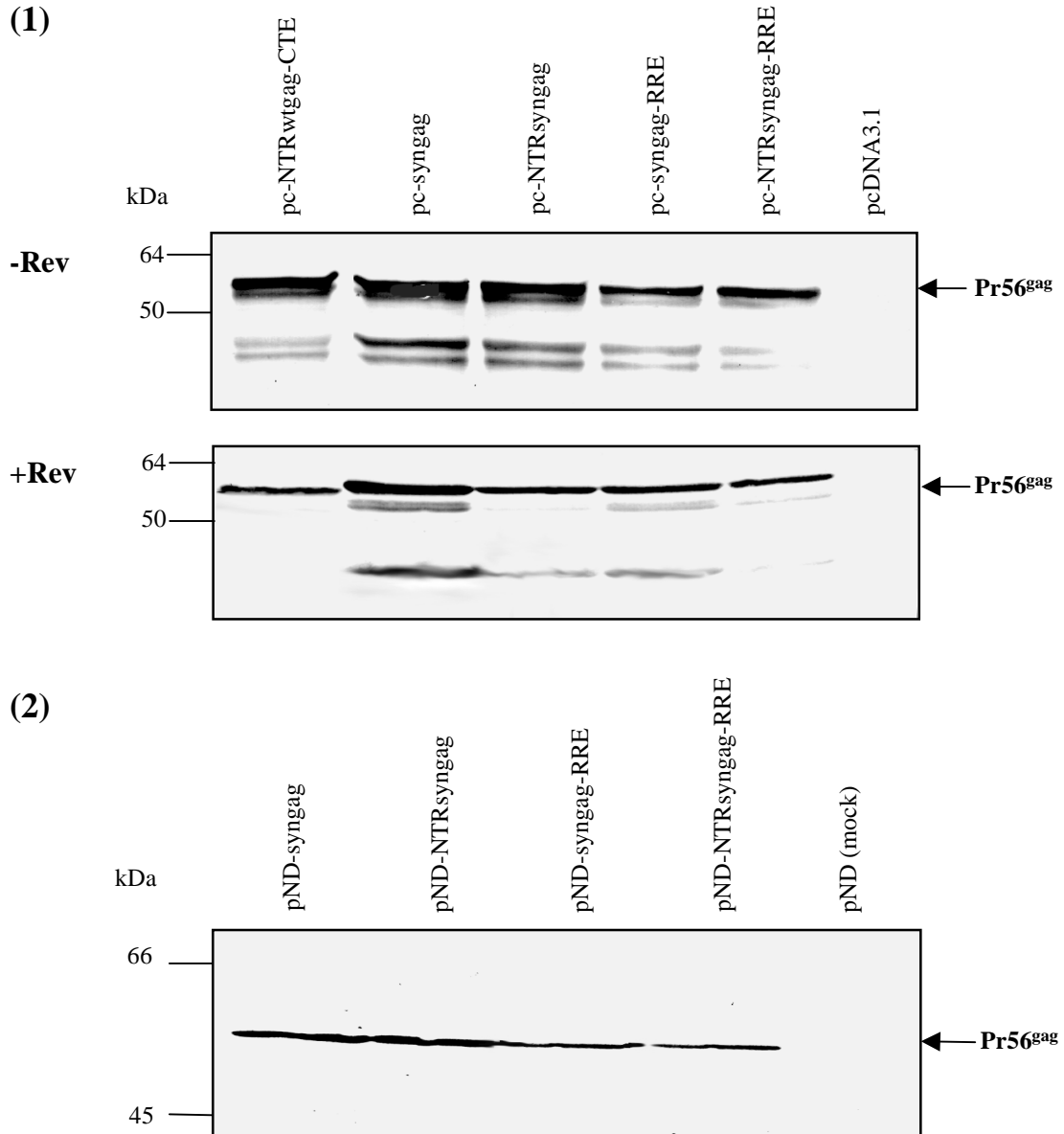


Abbildung C 4: Western-Blot Analyse der Rev-unabhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins in transfizierten H1299-Zellen aufgrund veränderter Kodonwahl. (1) syngag-pCDNA3.1-Expressions-konstrukte und (2) syngag-pND-Expressionskonstrukte. 2×10^5 Zellen wurden mit $15 \mu\text{g}$ der wtgag-Expressionsplasmide (bei Kotretransfektion von pc-Rev mit jeweils $7,5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA) mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3.1 bzw. pND-mock-Plasmid transfizierte H1299-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung der Zellysate über ein denaturierendes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das Pr56^{gag}-Polyprotein mit Hilfe des p27-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus im Immunoblot nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben, spezifisches Pr56^{gag}-Polyprotein rechts mit einem Pfeil markiert.

Der Einfluß der veränderten Kodonwahl innerhalb des SIV-gag-Leserahmens auf die Expression von Pr56^{gag} in Säugerzellen, wurde nach Transfektion von H1299-Zellen mit den unterschiedlichen syngag-Konstrukten in Western-Blot Analysen ermittelt. Wie der Abbildung C4 entnommen werden kann, resultierte die Humanisierung des Kodongebrauchs unabhängig von flankierenden cis-aktiven Sequenzen in einer hohen und Rev-unabhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins. Eine signifikante Änderung der erzielten Expressionsraten konnten weder nach Einführung der RRE-Region noch durch die 5'-NTR-Region beobachtet werden. Die Expressionsraten nach Transfektion der syngag-Konstrukte mit funktionellem Intron waren mit denen der syngag-Konstrukte ohne Intron vergleichbar. Die Fusion des 5'-NTR-Bereichs 5' des gag-Leserahmens hatte keinen Einfluß auf die Expressionsraten von syngag. Eine leichte Reduzierung der Pr56^{gag}-Expression konnte dagegen nach Hinzufügen der RRE-Region beobachtet werden.

Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, daß die Humanisierung des gag-Leserahmens die Expression des Polyproteins von den bekannten cis-aktiven Sequenzen und dem Rev/RRE Systems entkoppelt.

C.1.3 Überlegungen zur Vektorsicherheit

Vergleicht man nun die untersuchten Konstrukte bezüglich ihrer Sicherheit als möglichen Impfstoff-Kandidaten, so stellt man fest, daß sie sich bezüglich einiger Sicherheitsaspekte deutlich unterscheiden.

Die nachgestellte Wildtyp-Situation (pcNTR-wtgag-RRE +Rev) benötigt zum einen ein trans-aktives Protein (Rev), sowie den nicht translatierten Bereich, der einen Großteil der Verpackungssequenz ψ beinhaltet, um eine effiziente Expression des Strukturproteins zu gewährleisten.

Bei dem pc-NTR-wtgagCTE Konstrukt kann eine gesteigerte Expression unabhängig eines trans-aktiven Proteins erzielt werden. Der NTR-Bereich mit der enthaltenen Verpackungssequenz wird jedoch noch immer benötigt.

Das intronhaltige Konstrukt pND-wtgag hingegen kann sowohl auf das trans-aktive Protein als auch auf den nicht translatierten Bereich verzichten. Dabei bleiben die Expressionsraten unter denen des NTR-wtgag-CTE oder des pc-syngag Expressionskonstruktes zurück.

Bei allen oben aufgelisteten Konstrukten besteht das potentielle Risiko der Rekombination bei einer Verwendung als therapeutischer Impfstoff. Lediglich das pc-syngag Konstrukt umgeht dieses Problem, indem die Homologie auf Nukleinsäure-Ebene nach Adaptation an die Kodonwahl in Säugetiergenen auf ~ 66% gegenüber der Wildtypsequenz reduziert wurde. Ein weiterer Punkt, der die Verwendung synthetischer Konstrukte favorisiert, ist die deutlich erhöhte und zum Teil vereinfachte Expression. In der nachfolgenden Abbildung C5 sind die oben aufgeführten Sicherheitsaspekte sowie die Effizienz der Konstrukte vergleichend graphisch dargestellt.

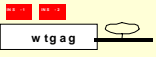



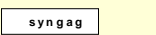
		RRE/REV	NTR	wt-Sequenz	Expression
	wt gag RRE	-	+	+	-
	NTR wt gag RRE	+	+	+	++
	NTR wt gag CTE	-	+	+	+
	pND wt gag	-	-	+	+
	syngag	-	-	-	+++

Abbildung C 5: Graphischer Überblick unterschiedlicher Rev-unabhängiger und abhängiger gag-Konstrukte sowie Aussagen bezüglich Expression und Sicherheit der unterschiedlichen Vektoren. RRE (Rev responsiv element), NTR (nicht translaterter Bereich), SD (Spleißdonor)

C.1.4 Kurzzusammenfassung (I)

In Hinblick auf die Etablierung einer sicheren und gleichfalls effizienten SIV-DNA-Vakzine sollten im Rahmen dieser Arbeit grundlegende Mechanismen der Rev-abhängigen Regulation lentiviraler Strukturproteine in einfachen, relevanten Gag-Reporter-konstrukten untersucht werden. In diesem Kontext sollten weitere Aufschlüsse über das Zusammenwirken der beteiligten cis-aktiven Elemente (5'-NTR, RRE, INS) gewonnen werden. Durch das Hinzufügen der CTE-Region oder eines funktionellen Introns an die nicht-translatierten Bereiche des gag-Leserahmens und durch die Eliminierung der INS-Sequenzen mit Hilfe einer synthetischen gag-Gensequenz sollte darüber hinaus die Rev-Abhängigkeit überwunden und eine hohe Expression in Säugerzellen erzielt werden. Der Vergleich der unterschiedlichen Pr56^{gag}-Expressions-konstrukte in Zellkultur-Experimenten lieferte folgendes Ergebnis:

- Die Expressionsraten der wtgag-Konstrukte mit 5'-NTR sind um ein Vielfaches höher als die der wtgag-Konstrukte ohne 5'-NTR.
- Für eine hohe und Rev-abhängige Pr56^{gag}-Expression INS-haltiger gag-Transkripte sind der 5'-NTR-Bereich sowie die RRE-Region notwendig.
- Eine Rev-unabhängige Expression von Pr56^{gag} in Säugerzellen kann zunächst auf drei unterschiedliche Arten erzielt werden:
 1. durch Fusion des konstitutiven RNA-Transportelements MPMV CTE 3'-seitig an den gag-Leserahmen.
 2. durch Integration des funktionellen Introns hCMV am 5'-Ende des gag-Leserahmens oder
 3. durch Modifizierung inhibitorischer INS-Sequenzen innerhalb des gag-Leserahmens durch Adaption der gag-Kodonwahl an die hochexprimierender Säugetiergene.

Zusammenfassend zeigt sich, daß die hohe Pr56^{gag}-Expression der INS-haltigen Expressionskonstrukte nicht nur von einem effizienten Transportsystem (Rev/RRE

bzw. CTE), sondern auch von dem 5'-NTR-Bereich abhängt. Die Modifizierung der INS-Elemente bewirkt darüber hinaus eine hohe und gleichzeitig Rev-unabhängige Pr56^{gag}-Expression des synthetischen gag-Konstrukts.

In der nachfolgenden Abbildung C6 sind die Expressionsraten der drei Rev-unabhängigen Konstrukte (pc-syngag; pND-wtgag; pc-NTR-wtgag-CTE) im Vergleich zur Rev-abhängigen Wildtyp-Situation (pc-NTR-wtgag-RRE +Rev) dargestellt.

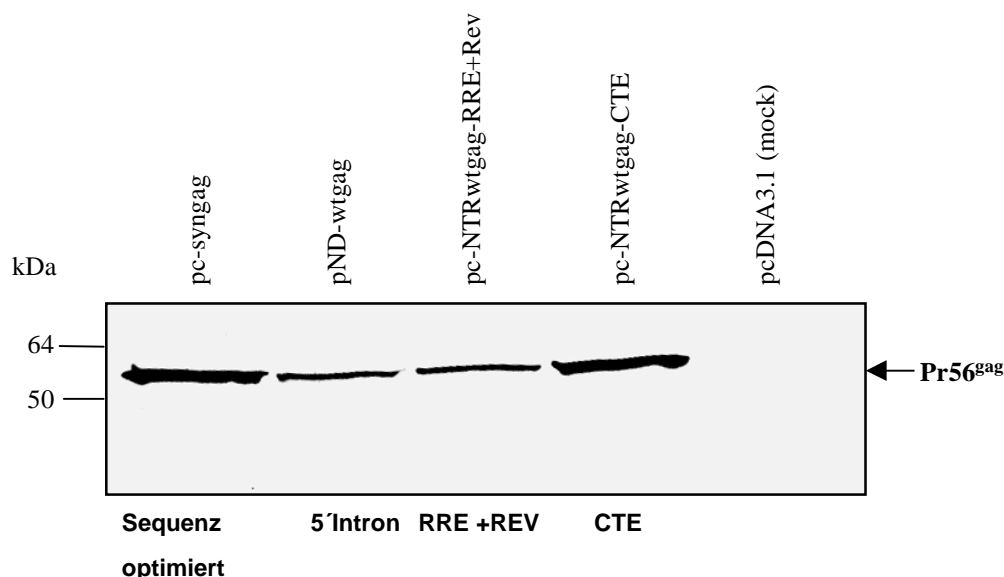


Abbildung C 6: Vergleichende Western-Blot Analyse zur Rev-unabhängigen Expression des Pr56^{gag}-Polyproteins in transfizierten H1299-Zellen. 2×10^5 Zellen wurden mit $15 \mu\text{g}$ der wtgag-Expressionsplasmide (bei Kotransfektion von pc-Rev mit jeweils $7,5 \mu\text{g}$ Plasmid-DNA) mittels CaHPO_4 -Präzipitation transfiziert. Als Negativkontrolle dienten pcDNA3.1-transfizierte H1299-Zellen. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion geerntet. Nach Auftrennung der Zellsate über ein denaturierendes 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel wurde das Pr56^{gag}-Polyprotein mit Hilfe des p27-spezifischen, monoklonalen Antikörpers aus der Maus im Immunoblot nachgewiesen. Der Molekulargewichtsstandard ist links angegeben, spezifisches Pr56^{gag}-Polyprotein rechts mit einem Pfeil markiert.

C.2 Immunogenität verschiedener Gag-DNA Vakzine-kandidaten im Balb/C Mausmodell

Schon frühere Arbeiten deuteten darauf hin, daß DNA-Immunisierung eine vielversprechende Methode zur effizienten Verabreichung spezifischer Antigene ist. Diese Immunisierungsform erlaubt neben der Induktion einer humoralen Immunantwort auch die Aktivierung MHC-I-restringierter zytolytischer T-Zellen (ZTLs) (Ulmer et al., 1993). Gerade die zellvermittelte Immunität spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der retroviralen Virusreplikation und scheint für eine Limitierung der initialen Virämie verantwortlich zu sein (Koup et al., 1994a; Koup et al., 1994b; Safrit et al., 1994). Darüber hinaus verhärteten sich die Hinweise, daß das Verschieben des Zytokinmusters von einer TH0/1-(IL-2, INF- γ) zu einem TH2 dominanten Zytokinmuster (IL-5, IL-10) maßgeblich am Fortschreiten der Immunpathogenese bei einer HIV-Infektion verantwortlich ist (Clerici et al., 1993; Clerici et al., 1994). Desweiteren konnte gezeigt

werden, daß ZTLs hochkonservierte, für die Vermehrung des Virus notwendigen Epitope erkennen und somit vermutlich eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle einer HIV-Replikation spielen (Wagner et al., 1999). Auf der Grundlage dieser Beobachtungen, sollte ein effizienter DNA-Vakzine-Kandidat in der Lage sein, mit Hilfe der TH0/1-vermittelten Effektorfunktionen wesentlich zur Induktion einer starken und ZTL-spezifischen Immunantwort beizutragen.

C.2.1 Austestung der zu verabreichenden DNA Menge

In der ersten Studie wurden je drei sechs bis zwölf Wochen alte weibliche Balb/C Mäuse mit unterschiedlicher Menge (1, 10, 30, 80 und 160µg) an pc-syngag DNA *intramuskulär* (anterior tibialis) immunisiert. Als Negativkontrollen wurden Balb/C Mäuse verwendet, die entweder unterschiedliche Mengen an wtgag DNA oder den Expressionsvektor (pcDNA3.1+) ohne Insert erhielten oder nicht immunisiert wurden. Nach drei und sechs Wochen erfolgte eine *Booster*-Immunisierung mit der gleichen, initial verabreichten DNA-Menge. Jeweils eine Woche nach der Auffrischungsimpfung wurden Blutproben entnommen und auf Antikörperisotypen hin analysiert. Die SIV-Gag spezifischen Antikörpertiter wurden durch Endpunkt-titrierungen der Seren im ELISA (siehe B.6.2.2) ausgewertet. Die dokumentierten Titer geben die Endpunkttiter der Seren an, welche mindestens eine 2,5 mal höhere optische Dichte im ELISA hatten als vergleichbare Seren von nicht immunisierten Mäusen.

Mit Hilfe der Kontrollen konnten wir einerseits die Immunogenität des Vektors (pcDNA3.1) *per se* als auch die Immunogenität der Insertsequenz (wtgag) testen. Desweiteren erhielten wir Aufschluß über die notwendige Menge der zu verabreichenden DNA Menge, sowie die Bedeutung einer zweiten *Booster*-Immunisierung. Die Immunisierung mit dem pc-syngag Expressionsplasmid führte bereits nach der ersten Auffrischungsimpfung zu einer starken TH1 gerichteten Immunantwort mit hohen gag spezifischen IgG-2a Antikörpertitern. Nach Immunisierung mit 80 bzw. 160µg DNA waren alle drei immunisierten Mäuse dieser Gruppen bereits eine Woche nach der ersten Auffrischungsimpfung positiv. Eine deutliche Steigerung durch die zweite Auffrischungsimpfung konnte nur bei den Gruppen bis 30µg beobachtet werden. In keiner der verwendeten Kontrollgruppen konnten nennenswerte Gag-spezifische Antikörpertiter beobachtet werden. Von den mit 80 bzw. 160µg DNA immunisierten Mäusen wurden drei Monate nach der letzten Immunisierung erneut Blut entnommen und auf Gag-spezifische Antikörper hin untersucht. In beiden Gruppen waren die Antikörpertiter nur geringfügig kleiner als nach dem zweiten *Boost*. Somit ist die durch die syngag-Konstrukte induzierte humorale Immunantwort auch über einen längeren Zeitraum konstant.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß durch die *intramuskuläre* Immunisierung von syngag bei Dosismengen über 30µg bereits nach der ersten Auffrischungsimpfung hohe TH1 gerichtete Titer induziert wurden. Die induzierte, lang anhaltende humorale Immunantwort erreicht mit verabreichten 80µg syngag-DNA ihr Maximum und wird weder durch Erhöhung der Dosismenge noch durch einen weiteren *Boost* signifikant gesteigert.

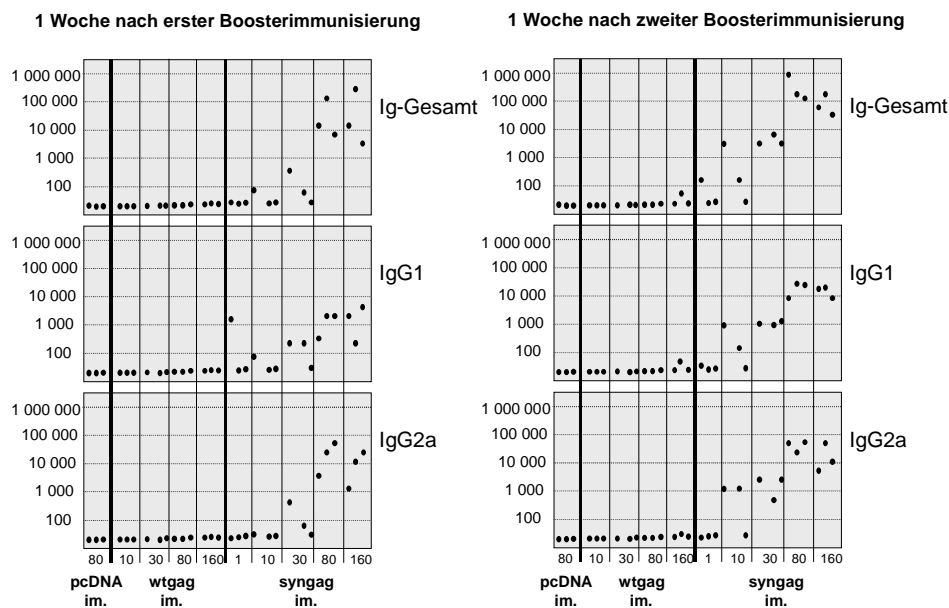


Abbildung C 7: Humorale Immunantwort nach im. (tibialis anterior) Immunisierung von Balb/C-Mäusen mit 1, 10, 30, 80 und 160 µg Plasmid DNA (1) pcDNA3.1. (mock), (2) pc-wtgag, (3) pc-syngag. Die Seren wurden 1 Woche nach der ersten (1.Boost) und 1 Woche nach der zweiten Auffrischimpfung entnommen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie der AK Isotypen, IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurden mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer \log_{10}) bestimmt.

C.2.2 Das Vektorrückgrat hat keinen Einfluß auf die Immunogenität der DNA-Vakzinekonstrukte

In einer weiteren Studie wurde vergleichend der Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Stratagene) mit dem uns freundlicherweise von Prof. Heeny zur Verfügung gestellten pND-Vektor hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Immunogenität der Vakzine-kandidaten analysiert. Wie schon unter C.1.1.1.2 beschrieben, enthält der pND-Vektor 5' seitig des kodierenden Bereiches ein zusätzliches Intron. Vergleichende Expressionsanalysen (siehe C.1.2.3) zwischen syngag und wtgag im pND-Vektor haben gezeigt, daß beide Konstrukte Rev-unabhängig funktionieren. Dabei zeigte jedoch syngag konstant eine deutlich erhöhte Expression. Wobei die An- oder Abwesenheit eines 5' gelegenen Introns auf die Expression des syngag Konstruktes keinen Einfluß zeigte (Daten nicht gezeigt). Da sich aus dem vorherigen Experiment eine *intramuskuläre* Verabreichung von 80 µg DNA als am geeignetsten erwies, wurden jeweils fünf Mäuse pro Gruppe mit 80 µg Plasmid (pcDNA, pND, pcDNA-wtgag, pND-wtgag, pcDNA-syngag und pND-syngag) immunisiert und nach drei und sechs Wochen mit der selben Menge an DNA *geboostert*. Die SIV Gag-spezifischen Antikörpertiter wurden durch Endpunkttitrierungen der Seren im ELISA wie unter C.2.1 ausgewertet. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung (C 8) dargestellt.

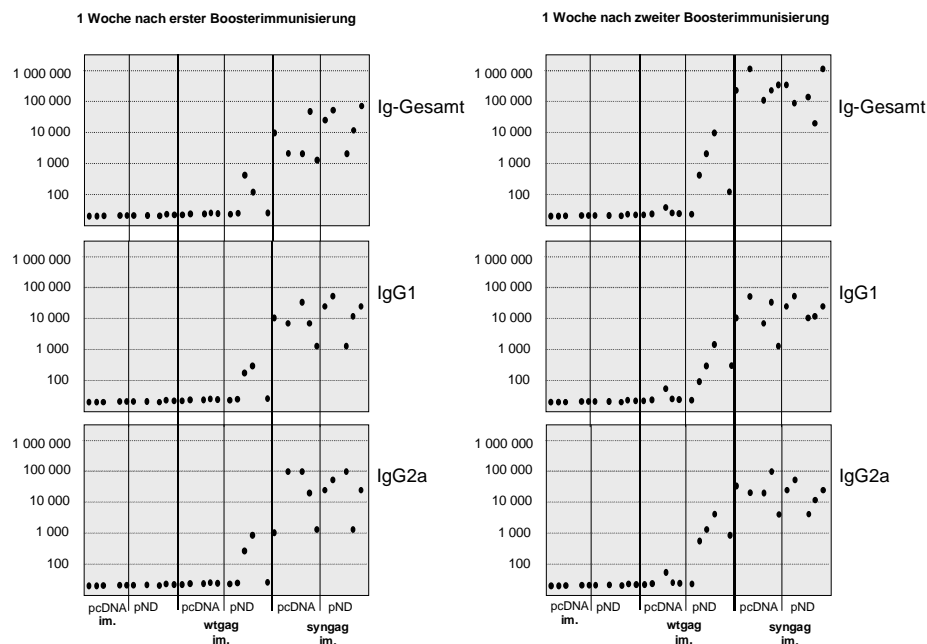


Abbildung C 8: Humorale Immunantwort nach im. (tibialis anterior) Immunisierung von Balb/C-Mäusen mit 80µg Plasmid-DNA. Austestung unterschiedlicher Vektoren (1) pcDNA3.1. (2) pND-Vektor. Die Seren wurden eine Woche nach der ersten (1.Boost) und eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung entnommen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie der AK Isotypen, IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurde mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer \log_{10}) bestimmt.

Folgende Ergebnisse sind festzuhalten:

Beide Leervektoren (pcDNA und pND) sind *per se* nicht immunogen und verhalten sich bezüglich der Immunogenität des kodonoptimierten syngag-Expressionsvektors absolut vergleichbar. Beide Vektoren unterstützen die Induktion einer typischen TH1-Immunantwort ($\text{IgG2a} \geq \text{IgG1}$) mit sehr hohen Antikörpertitern bei allen immunisierten Mäusen bereits eine Woche nach der ersten Auffrischungsimpfung. Diese Daten belegen, daß ein zusätzliches Einfügen eines funktionellen Introns im Falle der syngag-basierten DNA-Vakzine deren Immunogenität nicht fördert und somit nicht erforderlich ist. Anders hingegen verhält es sich beim Wildtyp-Gag-Konstrukt:

Nur in Anwesenheit eines funktionellen Introns wird - korrelierend mit den bereits dokumentierten Expressionsdaten - eine schwache TH1-gerichtete Immunantwort induziert, welche durch die zweite Auffrischungsimpfung zudem leicht gesteigert werden kann. Diese Immunantwort ist auf Antikörperebene um mindestens zwei bis drei Zehnerpotenzen geringer, als die durch die syngag Konstrukte induzierte Immunantwort. Auch entwickelten in dieser Gruppe nicht alle immunisierten Mäuse – 2/5 nach der ersten Auffrischungsimpfung und 4/5 nach der zweiten - eine spezifische Immunantwort.

C.2.3 Austestung unterschiedlicher Rev-unabhängiger Expressionsvektoren

Wie schon aus den Expressionsdaten unter C.1.2.2 – 4 ersichtlich ist, gibt es drei unterschiedliche Möglichkeiten die Expression des gag-Gens unabhängig von Rev zu

gestalten. In der folgenden Versuchsreihe wurden diese drei Konstrukte bezüglich ihrer humoralen und zellulären Immunantwort analysiert. Die deutlich geringere Immunantwort des pND-wt Konstruktes im vorangegangenen Experiment sollte, wenn sie nur auf der verringerten Expression beruhte, durch Verabreichung einer höheren DNA-Menge möglicherweise kompensiert werden. Auch das NTR-wtgag-CTE Konstrukt erreicht nicht die Expressionsmenge *in vitro* wie das syngag-Konstrukt (siehe C.1.3). Aus diesem Grund wurden jeweils fünf Mäuse pro Gruppe mit 80µg und weitere fünf mit 160µg DNA *intramuskulär* immunisiert. Als Negativkontrollen wurden fünf Mäuse nicht, fünf mit pcDNA-Vektor (80µg) und fünf mit pcDNA-wtgag (80µg) immunisiert. Da die Austestung der zellulären Immunantwort aufgrund der nicht bekannten ZTL-Epitope für SIV Konstrukte im Balb/C Mausmodell nicht möglich war, wurden für die Austestung der unterschiedlichen Rev-unabhängigen Konstrukte adäquate HIV-gag-Konstrukte verwendet.

C.2.3.1 Bestimmung der Antikörpertiter

Die Immunisierung und das Auslesen der Antikörpertiter erfolgte wie in den vorangegangenen Versuchen. In der nachfolgenden Abbildung sind die mit 160µg DNA immunisierten Mäuse rot markiert.

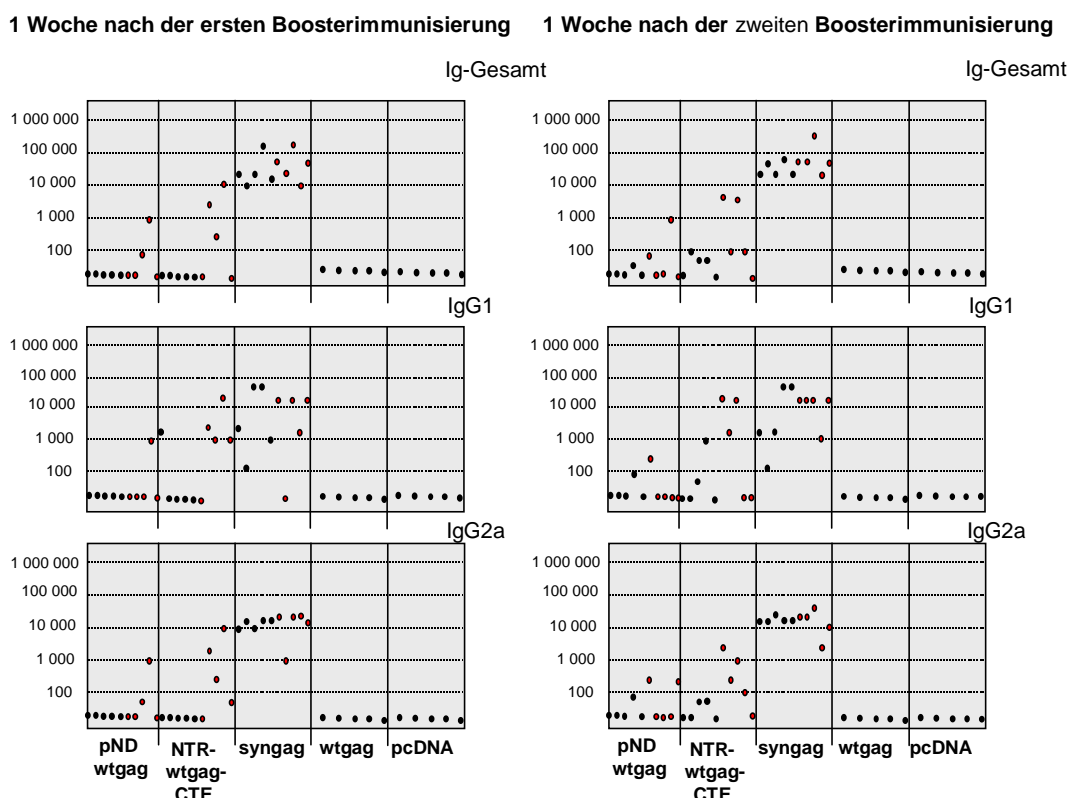


Abbildung C 9: Humorale Immunantwort nach im. (tibialis anterior) Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit 80µg Plasmid DNA (1) pND-wtgag, (2) NTR-wtgag-CTE, (3) syngag, (4) wtgag und (5) pcDNA3.1. Die Seren wurden 1 Woche nach der ersten (1.Boost) und 1 Woche nach der zweiten Auffrischimpfung entnommen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie der AK Isotypen, IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurde mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer \log_{10}) bestimmt. Schwarz (mit 80µg Plasmid-DNA immunisiert); Rot (mit 160µg Plasmid-DNA immunisiert).

Analog zu den früheren Versuchen entwickelten alle zehn mit syngag (80 bzw. 160µg) Plasmid-DNA immunisierten Mäuse bereits nach der ersten Auffrischungsimpfung hohe AK-Titer. Nach der zweiten Auffrischungsimpfung lagen die Gag-spezifische Ig-Gesamtiter zwischen 1:20 000 und maximal 1:400 000.

Bei den mit NTR-wtgag-CTE Plasmid immunisierten Mäusen hatten nur 7/10 Gag-spezifische Ig-Gesamtiter die auch deutlich geringer als der mit syngag immunisierten Mäuse ausfielen. Sie lagen zwischen 1:80 und 1:8 000. Außerdem war auffallend, daß die Tiere, welche mit der höheren DNA-Menge immunisiert wurden, eine frühere und stärkere Immunantwort aufwiesen. Auch konnte durch eine weitere Verabreichung von Plasmid-DNA nach drei Wochen, vor allem in der Gruppe, welche nur mit 80µg immunisiert wurden, die Immunantwort gesteigert werden. So waren nach der ersten Auffrischung keine Antikörper in dieser Gruppe nachweisbar, jedoch nach einer weiteren Immunisierung in 3/5 Fällen. Wenn eine gag-spezifische Immunantwort mit dem NTR-wtgag-CTE Konstrukt ausgelöst wird, ist sie ebenso wie bei syngag immunisierten Tieren TH1 polarisiert.

Noch schlechter fielen in dieser Studie die induzierten Antikörpertiter bei den pND-wtgag immunisierten Mäusen aus. Nur 3/10 Tieren entwickelten Antikörpertiter von 1:40 bis 1: 1 000. Die erhöhte DNA-Menge bewirkt zwar, daß 2/5 Tieren schon nach vier Wochen Antikörper bilden, aber durch eine weiterer Verabreichung von Plasmid-DNA konnte bei diesem Konstrukt keine Steigerung der Immunantwort erzielt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Expressionskonstrukte verwendet werden müssen, deren Expression sich über einen bestimmten Basisschwellenwert bei der Grundimmunisierung befinden muß, um eine effiziente humorale Immunantwort zu induzieren.

C.2.3.2 Austestung der Zytokinsekretion spezifisch restimulierter Milzzellen

Eine Woche nach der zweiten Auffrischungsimpfimmunisierung wurden die Versuchstiere durch CO₂-Begasung getötet und die Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen. Die Milzen jeder Immunisierungsgruppe a fünf Tiere wurden vereinigt und, wie unter B.6.3.1 beschrieben, aufgearbeitet. Ein Teil der Splenozyten wurde mit HIV-virusähnlichen Partikeln (VLPs) oder Peptiden (A9I, V3-Peptid) restimuliert. Der andere Teil wurde verwendet, um spezifische zytotoxische T-Zellen im ELISPOT, FACS- oder Chrom-Freisetzungstest nachzuweisen (siehe C2.3.4). Da jedes Zytokin von einer bestimmten Zellpopulation produziert wird, gibt die Zusammensetzung des Zytokinmusters nach *in vitro* Restimulation Aufschluß über die, durch die Immunisierung induzierten Effektoren des zellulären Immunsystems. Differenzierte TH1-Zellen zum Beispiel sezernieren große Mengen an IFN-γ und IL-2 nach Restimulation, wohingegen differenzierte TH2 -Zellen vor allem IL-5 und IL-10 sowie geringe Mengen an IL-6 freisetzen. IFN-γ wird aber nicht nur von T-Helferzellen sezerniert, sondern auch von aktivierten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) und unspezifisch von NK-Zellen. Aktivierte B-Zellen und Antigen-präsentierende Zellen (APZ) können auch IL-6 und IL-12 freisetzen. Neben IL-6 und IL-12 können APZs noch TNF-α sezernieren.

Die Bestimmung der verschiedenen Zytokine (IFN-γ, IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, TNF-α) im Überstand von *in vitro* antigenspezifisch restimulierten Splenozyten wurde mit Hilfe kommerzieller Zytokin-ELISAs (BD, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers durchgeführt und gibt einen Mischwert aus fünf immunisierten Mäusen wieder. Die Proben

wurden dabei unverdünnt bei Restimulation mit Peptid (spezifisch A9I und unspezifisch V3-Peptid) oder in einer Verdünnung von 1:10 und 1:100 bei Restimulierung mit VLPs eingesetzt und 36 Stunden inkubiert. Das Peptid A9I beinhaltet im Gegensatz zu den VLPs nur ein definiertes ZTL-Epitop und enthält keine weiteren T-Helfer-Epitope.

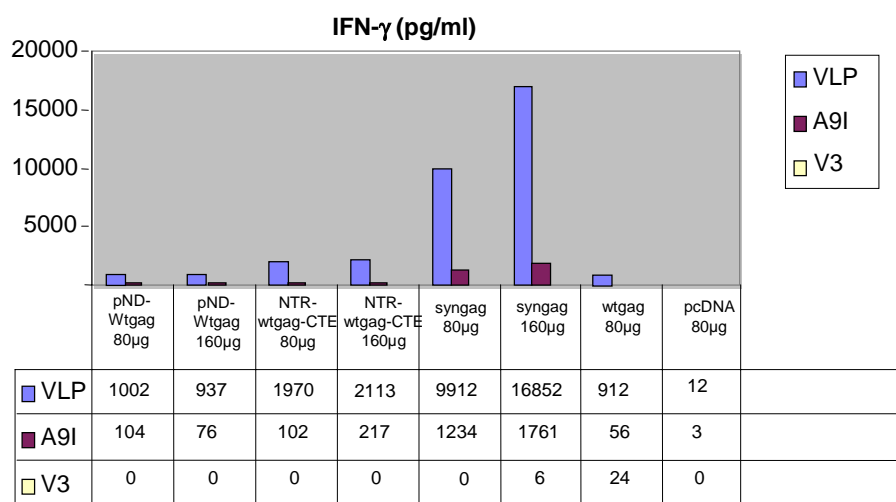


Abbildung C 10: Quantifizierung der Sekretion von IFN- γ nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten (48h) mit VLPs (1μg) und den ZTL-spezifischen Peptiden A9I und V3 (10μM). Freigesetzte Menge an Zytokin ist in pg/ml angegeben.

Nach Stimulation mit Gag Protein oder spezifischen (A9I), nicht jedoch mit unspezifischen (V3) Peptid ist eine hohe IFN- γ Freisetzung beim syngag-Plasmid (pcDNA-syngag) zu beobachten, was wiederum ein Indiz für eine TH1-gerichtete Immunantwort ist. Die Verabreichung von höheren DNA Mengen spiegelt sich in einer um 60-70%-igen Steigerung der IFN- γ Sekretion wieder. Das NTR-wtgag-CTE Plasmid, restimuliert mit Gag-Protein oder Peptid, zeigt auch bei beiden Immunisierungsdosen IFN- γ -Freisetzungen über dem des Kontrollkonstrukts wtgag (pcDNA-wtgag). Jedoch lagen die erzielten Werte um den Faktor 10 niedriger als diejenigen des vergleichbaren syngag Plasmides. Für das pND-wtgag Konstrukt konnte nur bei Restimulation mit Peptid eine leicht erhöhte IFN- γ Freisetzung beobachtet werden.

Bei allen immunisierten Gruppen wurden signifikante Konzentrationen an freigesetztem IL-6 und IL-12 beobachtet, jedoch keine über den Basislevel befindliche IL-4-, IL-5- oder TNF- α -Freisetzung. Im Gegensatz zur IFN- γ Sekretion ist die Freisetzung an IL-12 und IL-6 bei der NTR-wtgag-CTE-Gruppe mindestens vergleichbar mit der syngag-Gruppe. In der pND-wtgag-Gruppe werden deutlich erhöhte IL-12 Mengen, bezogen auf die Kontrollgruppe wtgag, erzielt. Hingegen liegt die IL-6 Freisetzung im Rahmen der Meßgenauigkeit nur minimal über der der Kontrollgruppe.

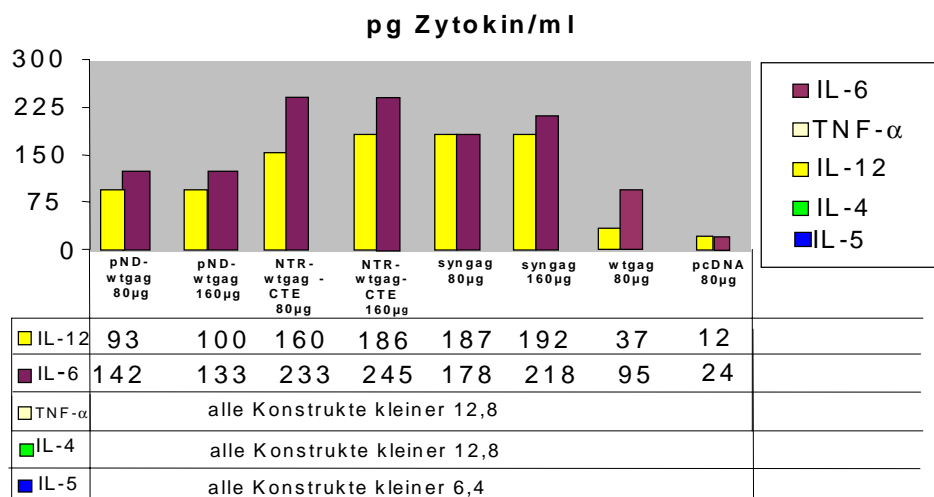


Abbildung C11: Quantifizierung der Sekretion von IL-12, IL-6, TNF- α , IL-4 und IL-5 nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten (48h) mit VLPs (1µg). Freigesetzte Menge an Zytokin ist in pg/ml angegeben.

Die Ergebnisse aus den Zytokintests haben gezeigt, daß die NTR-wtgag-CTE und syngag-Vektoren auch auf Zytokinebene eine starke TH1 gerichtete Immunantwort auslösen, die durch Erhöhung der Dosismenge noch gesteigert werden kann. Das pND-wtgag-Konstrukt zeigt zwar Tendenzen für eine TH1-gerichtete Immunantwort ist aber im Vergleich zu den anderen Plasmiden deutlich schlechter. Keines der verwendeten Konstrukte induzierte eine TH2-gerichtete Immunantwort mit erhöhter IL-4 und IL-5 Zytokinsekretion.

C.2.3.3 Immunologische Austestung der DNA von Rev-unabhängigen Vektor-konstrukten *in vitro*

Um der Frage nachzugehen, ob die DNA der Expressionskonstrukte *per se* ein TH1 begünstigendes Zytokin-Milieu generiert, das für die beobachteten Antigen-spezifischen TH1 Antworten verantwortlich ist, wurden Milzzellen nicht immunisierter Balb/C Mäuse präpariert (B.6.3.1), *in vitro* mit unterschiedlichen DNA-Dosismengen (10 und 1µg) stimuliert (B.6.3.2) und nach 36 Stunden auf Zytokinsekretion (IL-5 und IFN- γ) getestet. Von jedem Konstrukt wurden Doppelansätze ausgelesen. In der nachfolgenden Abbildung C12 ist der Mittelwert dargestellt. Als Negativkontrolle wurden nicht stimulierte Milzzellen verwendet.

Wie aus der Abbildung C12 ersichtlich, konnte eine immunstimulatorische Eigenschaft der DNA bei den im Versuch verwendeten DNA-Mengen nicht nachgewiesen werden. Die IL-5 Sekretion war bei allen Ansätzen sehr gering und nicht von der Probe unstimulierter Milzzellen zu unterscheiden. Eine Tendenz zu einer erhöhten, allerdings nicht signifikanten Interferon- γ Sekretion war bei den drei Rev-unabhängigen Konstrukten zu sehen. Diese Daten deuten darauf hin, daß die DNA-Vektoren ansich, trotz der Erhöhung von CpG-Motiven beim syngag – Vektor, nicht immunogen sind und die erzielten hohen INF- γ Werte in Abbildung C10 auf eine unterschiedliche Expressions-rate der Vektoren zurückzuführen ist.

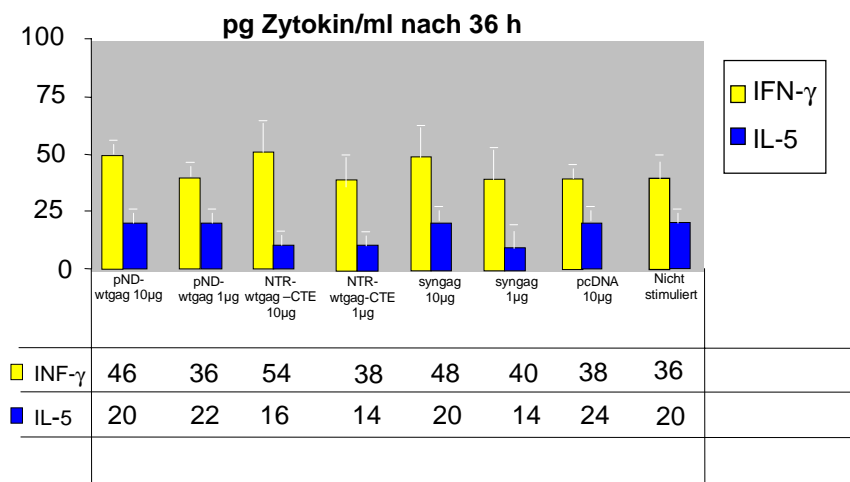


Abbildung C 12: Stimulierung ungeprimter Splenozyten mit Plasmid-DNA (10 und 1µg). (1) pND-wtgag, (2) NTR-wtgag-CTE, (3) syngag, (4) wtgag und (5) pcDNA3.1. Die freigesetzte Menge an Zytokin ist in pg/ml angegeben.

C.2.3.4 Nachweis von zytotoxischen T-Zellen

Eine Woche nach der letzten Immunisierung wurden die Milzen, wie schon mehrmals beschrieben, präpariert. Einzelzellkulturen von Splenozyten wurden gewonnen und auf zytotoxischen CD8⁺ T-Zellreaktivitäten hin analysiert. Erste Hinweise auf zytotoxische CD8⁺ T-Zellreaktivität konnten schon anhand des Zytokinmusters beobachtet werden (siehe C2.3.2). Die Stimulation und INF-γ Freisetzung der Milzzellpopulation mit dem Peptid A9I, welches nur ein spezifisches ZTL-Epitop beinhaltet und nicht wie die VLPs noch zusätzlich CD4⁺ T-Helferepitope enthalten, spricht für die spezifische Induktion von ZTLs. In weiterführenden Experimenten wurde die Induktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen genauer analysiert.

C.2.3.4.1 ELISPOT-Test

Mit Hilfe des ELISPOT-Test, der unter B.6.4.1 beschrieben wurde, kann die Anzahl INF-γ sezernierenden Zellen 24h nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit dem Peptid A9I quantifiziert werden. Das anschließende Auszählen der markierten Zellen erfolgte mit einem automatisierten ELISPOT-Lesegerät (BioSys). Die in Abbildung C13 angegebenen Daten geben Mittelwerte aus drei Ansätzen wieder. Sowohl das NTR-wtgag-CTE- als auch das syngag-Plasmid zeigte eine erhöhte Anzahl an spezifisch stimulierbaren, INF-γ freisetzenden Zellen. Ein Anstieg an INF-γ freisetzenden Zellen durch Immunisierung mit doppelten DNA-Menge konnte nur beim syngag-Vektor beobachtet werden. Bei verabreichten 80µg DNA werden durch das syngag Konstrukt dreimal soviel INF-γ freisetzende Zellen *geprimed* wie durch das NTR-wtgag-CTE Konstrukt. Bei 160µg DNA ist der Faktor fünfmal so groß. Die nicht immunisierte Gruppe, die mit Vektor, wtgag oder pND-wtgag immunisierte Gruppe, zeigten keine

signifikanten Werte an INF- γ freisetzenden Zellen. In diesen Mausgruppen lag die Anzahl der detektierten Zellen an der Sensitivitätsgrenze des Tests (kleiner 5).

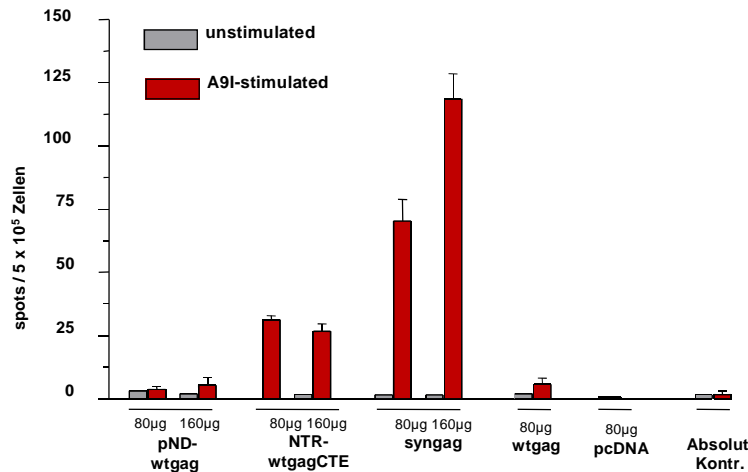


Abbildung C 13: Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantworten von Milzzellen eine Woche nach der zweiten Booster-Immunisierung: Bestimmt wurde hierbei die Anzahl INF- γ sezernierender Zellen mit Hilfe des Peptids A9I im ELISPOT. Die Balken geben den Mittelwert aus drei Ansätzen wieder. Grau nicht restimuliert und rot spezifisch mit dem Peptid A9I. Die Werte repräsentieren die Anzahl an positiven Zellen pro 5×10^5 untersuchter Zellen. Ausgelesen mit dem ELISPOT-Lesegeräte (BioSys). Als absolut Kontrolle wurden nicht immunisierte Mäuse verwendet.

C.2.3.4.2 Analyse der intrazellulären INF- γ Produktion mittels FACS

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnten Fragen bezüglich der verantwortlichen INF- γ sezernierenden Subpopulationen genauer analysiert werden. Die Beschreibung der Methode ist unter B.6.4.2 aufgeführt. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse wurden entnommen und wie unter B.6.3.1 beschrieben präpariert. Durch die spezifische Oberflächenfärbung von CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, sowie die intrazelluläre Färbung von INF- γ , konnte die Anzahl der CD8⁺-Lymphozyten, die INF- γ produzieren quantifiziert werden. In der Gruppe mit pND-wtgag-Plasmid immunisierten Mäusen produzierten, unabhängig von der DNA-Dosismenge (80 oder 160µg), nur 0,1% der mit Peptid restimulierten CD8⁺-Zellen INF- γ . Besser sah es bei dem NTR-wtgag-CTE Konstrukt aus. Mit 80µg DNA produzierten 0,4% der Zellen INF- γ . Der Abfall auf 0,2% in der Gruppe mit 160µg DNA ist am wahrscheinlichsten auf experimentelle Ursachen bei der Immunisierung zurückzuführen. Im ELISPOT konnte zwar auch keine Steigerung bei diesem Konstrukt durch erhöhte DNA-Menge beobachtet werden, aber zu einer Reduktion der ZTL-Aktivität kam es nicht. Wie auch schon im ELISPOT wurden die höchsten Werte in der Gruppe die mit syngag-Plasmid immunisiert wurde erzielt. 0,6% der restimulierten CD8⁺ Zellen in der Gruppe mit 80µg und 1,2% in der Gruppe mit 160µg DNA, produzierten INF- γ . In Abbildung C14 sind auf der linken Seite der prozentuelle Anteile an CD8⁺ Interferon- γ produzierenden Zellen, auf der rechten Seite die Absolutwerte, bezogen auf 3×10^4 CD8⁺ Zellen dargestellt.

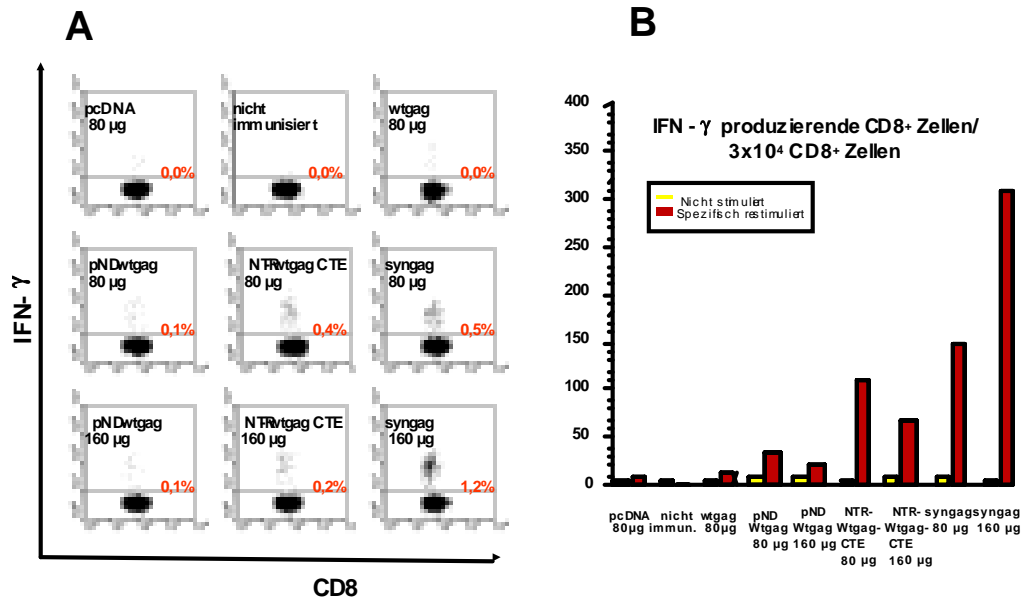


Abbildung C 14: Intrazelluläre INF- γ Färbung CD8⁺ T-Lymphozyten restimuliert mit dem Peptid A9I. **(A):** Prozentueller Anteil spezifisch restimulierter INF- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten bezogen auf die Gesamtpopulation an CD8⁺ T-Lymphozyten. **(B):** Absolute Anzahl an INF- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten von 3×10^4 untersuchten CD8⁺ T-Lymphozyten (rote Balken). Zur Kontrolle der spezifischen Restimulation wurden nicht stimulierte Zellen mitgemessen (gelbe Balken).

C.2.3.4.3 Chrom-Freisetzungstest

Mit Hilfe des *Chrom-Freisetzungstests* (siehe B.6.4.3) kann im Gegensatz zu den vorangegangenen Auslesesystemen die lytische Wirkung der induzierten CD8⁺ T-Zellen beurteilt werden. Die Bestimmung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellreaktivitäten der Milzzellpopulationen ergab, daß die verwendeten Konstrukte NTR-wtgag-CTE und syngag nach dreimaliger Immunisierung im Balb/C Mausmodell ZTLs induzieren können. Ca. 12-15% (bei einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 100:1, E:T) der murinen P815 Zielzellen, welche das MHC-Klasse I (H-2K^d) restringierte Peptid A9I (AMQMLKETI) auf der Oberfläche präsentierten, sind bei den syngag immunisierten Mäusen von spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen erkannt und infolgedessen lysiert worden. Die spezifische Lyse bei dem NTR-wtgag-CTE Konstrukt lag zwischen 8% und 10% (E:T, 100:1). Bei den Mäusen, immunisiert mit pND-wtgag, wtgag sowie dem Leervektor (pcDNA), konnte keine spezifische Lyse beobachtet werden. Zur Kontrolle der Spezifität des A9I Peptids wurden auch unbehandelte, sowie mit einem unspezifischen Peptid (V3-Peptid) behandelte P815 Zellen analysiert. Weder die unbehandelten noch die mit einem unspezifischen Peptid behandelten Zellen wurden erkannt und lysiert. Die angegebenen Daten sind in der nachfolgenden Abbildung C15 dargestellt.

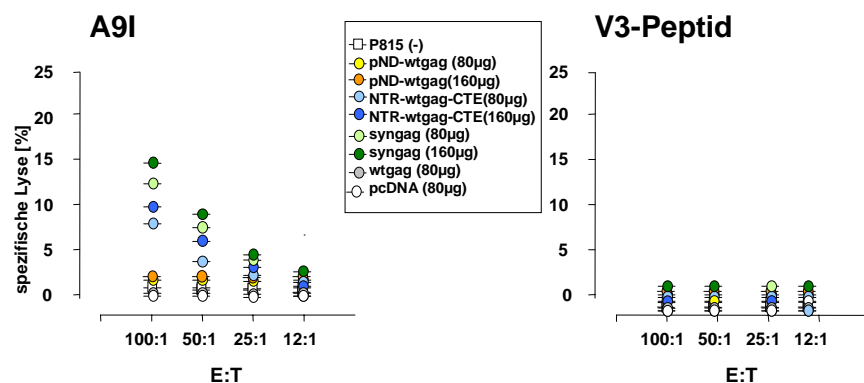


Abbildung C 15: Gag-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellantworten von Milzzellen eine Woche nach der zweiten Booster-Immunisierung: Bestimmt wurde hierbei die spezifische Lyse der mit den Peptiden A9I und V3 beladenen P815 Zielzellen im Chrom-Freisetzungstest. **E:T** (Effektor- zu Zielzell-Verhältnis); A9I (AMQMLKETI); V3-Peptid (RGPGRFVTI)

C.2.4 Austestung unterschiedlicher Applikationsformen

Es ist bekannt, daß die Immunogenität von DNA Impfstoffen in Primaten generell schlechter ist, als in Kleintiermodellen wie z.B. der Maus. Dementsprechend sind die zu verabreichenden DNA-Mengen, die notwendig sind eine effektive Immunantwort in Primaten zu erzielen, deutlich höher als im Mausmodell (mg versus µg) (Gramzinski et al., 1998; Richmond et al., 1998). Aus diesem Grund sollten die nachfolgenden Ansätze Möglichkeiten aufzeigen, zum einen die Immunogenität der *intramuskulären* Immunisierung zu steigern, zum anderen die Menge, die zu verabreichenden DNA zu verringern. Da aus den vorangegangenen Experimenten das syngag-Plasmid als das immunogenste der Rev-unabhängigen Expressionskonstrukte hervorging, wurden die nachfolgenden Experimente nur noch mit dem syngag-Konstrukt durchgeführt.

C.2.4.1 Intramuskuläre Immunisierung plus Elektropuls

Bereits 1999 zeigten Mathiesen und Mir, daß durch Anlegen einer Spannung von 100Volt an die Injektionsstelle die Aufnahme der DNA in Myozyten nachhaltig gesteigert wird (Mathiesen, 1999; Mir et al., 1999). Um den Einfluß der „*in vivo* Elektroporation“ auf die Immunogenität der syngag DNA Vakzine zu analysieren, wurden fünf BALB/c Mäuse je Gruppe narkotisiert. Anschließend wurden die Beine rasiert und mit 40µg syngag Plasmid DNA pro Bein *intramuskulär* immunisiert. Kurze Zeit nach der Immunisierung wurden die Elektroden in einem Abstand von 0,2cm um die Einstichstelle gelegt und beiden Muskeln im Abstand von 50ms je fünf Impulse bei einer Spannung von 100Volt verabreicht. Weitere fünf Impulse wurde nach dem Drehen der Elektroden um 90° gesetzt. Nach drei und sechs Wochen fanden Auffrischimpfungen statt die wie bei der Grundimmunisierung mit der Verabreichung

von Elektropulsen (e.p.) kombiniert wurden. Zum Vergleich wurden weitere fünf Mäuse mit 80µg syngag Plasmid-DNA konventionell immunisiert und keinen Elektropulsen ausgesetzt. Als Negativkontrolle wurden fünf Mäuse mit 80µg wtgag DNA immunisiert. Eine Woche nach der zweiten *Booster*-Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen und auf Gag-spezifische Antikörper untersucht. In der nachfolgenden Abbildung C16 ist zu erkennen, daß die Gesamtantikörpertiter bei den Mäusen, welche den zusätzlichen Elektropuls erhielten leicht erhöht waren. Vier von fünf Tieren reagierten positiv im ELISA, selbst bei Serumverdünnungen größer 1/100 000. In der Vergleichsgruppe, welche keinen Elektropuls bekommen hatte, wiesen nur zwei von fünf Tieren Titer über 100 000 auf. Des weiteren konnte beobachtet werden, daß die Verabreichung von Elektropulsen keinen Einfluß auf die Induktion der Antikörperisotypen hatte. Auch mit Verabreichung von Elektropulsen induziert das syngag-Konstrukt eindeutig eine TH1-vermittelte Immunantwort dokumentiert durch hohe IgG2a Antikörpertiter.

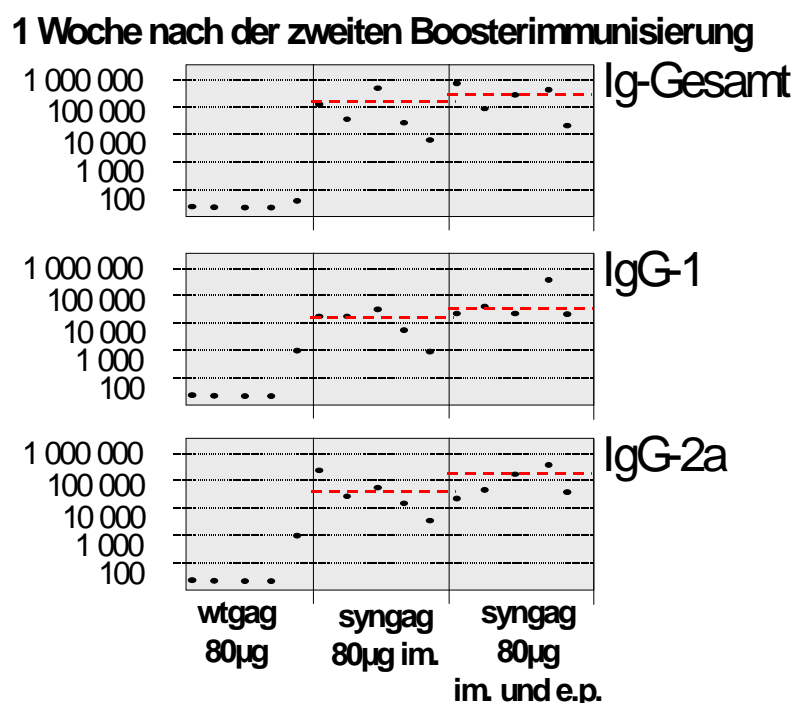


Abbildung C 16: Humorale Immunantwort nach i.m. (tibialis anterior) Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit 80µg Plasmid DNA mit und ohne Elektropuls. Die Seren wurden eine Woche nach der zweiten Auffrischungsimpfung entnommen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie die der Antikörper-Isotypen IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurden mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer \log_{10}) bestimmt. Die roten Striche geben den Mittelwert aus fünf untersuchten Tieren an.

C.2.4.2 Immunisierung mit der „Partikel-gun“

Die Verabreichung von DNA kann auf wenigstens zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Zum einen durch Injektion mit einer Nadel *intramuskulär*, wie in den von mir beschriebenen Versuchsreihen sowie *intradermal* oder *subkutan*. Alternativ können aber auch DNA-bepackte Goldpartikel mit Hilfe einer Druckpistole („Partikel-gun“) in die Epidermis der Tiere geschossen werden. Dazu wurden die 0,95µm großen Goldpartikel mit 2µg syngag- oder wtgag-DNA/mg Gold beladen. Vor Verabreichung der DNA wurde der Bauch von zehn Mäusen rasiert und mit 70%-igem Ethanol

desinfiziert. Die „Partikel-gun“ (Accel[®], BioRad laboratories, Hercules, CA) wurde uns freundlicherweise von Dr. Schirmbeck zur Verfügung gestellt. Die Verabreichung von 0,5mg Goldpartikel, bei einem Helium-Druck von 400psi pro Schuß entsprach einer Menge von ca. 1µg Plasmid-DNA. Bei dieser Versuchsreihe wurden zehn Tiere mit der „Partikel-gun“ (pg.) und weitere zehn Tiere herkömmlich mit 80µg DNA *intramuskulär* (im.) immunisiert. Jeweils fünf Tiere pro Gruppe bekamen das syngag-Konstrukt, die anderen fünf das wtgag-Konstrukt verabreicht. Nach drei und sechs Wochen bekamen die Mäuse je nach Gruppe im. oder pg. Auffrischungsimpfungen. Nach sieben Wochen wurden die Gruppen auf Antikörperproduktion und Zytokinfreisetzung getestet (Abbildung C17 und 18). Restimuliert wurden die präparierten Milzen mit Gag Protein.

1 Woche nach der zweiten Boosterimmunisierung

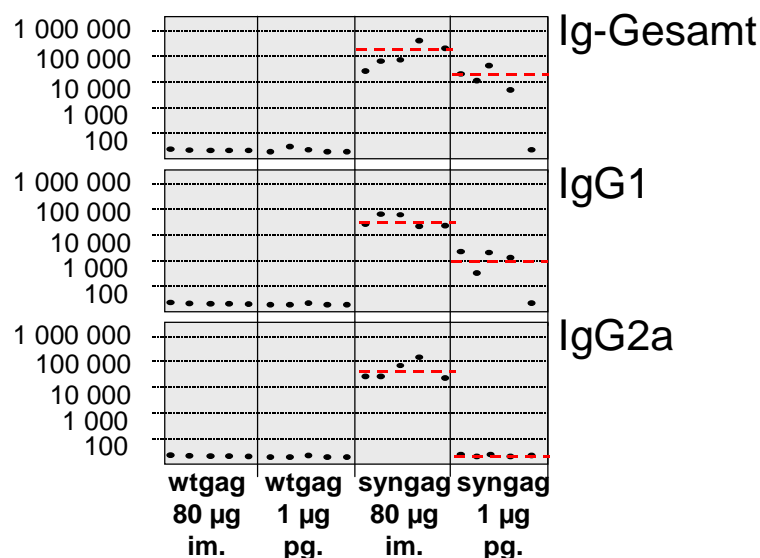


Abbildung C 17: Humorale Immunantwort nach intramuskulärer oder intradermaler („Partikel-gun“) Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit 80 bzw. 1µg Plasmid DNA. Die Seren wurden eine Woche nach der zweiten Auffrischimpfung entnommen. Die absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer, sowie die der Antikörper Isotypen, IgG1 und IgG2a der einzelnen Seren wurde mittels ELISA (reziproker Endpunkt-ELISA Titer log₁₀) bestimmt. Die roten Striche geben den Mittelwert aus fünf untersuchten Tieren an.

Wie aus der Abbildung C17 ersichtlich, induziert das wtgag-Konstrukt weder *intramuskulär* noch mit der „Partikel-gun“ Gag-spezifische Antikörper. Das syngag-Konstrukt mit „Partikel-gun“ Immunisierung zeigte eine schwächere IgG-Gesamt Antikörperimmunantwort mit nicht nachweisbarem IgG2a-Antikörperisotyp. Die Induktion von IgG1 konnte hingegen nachgewiesen werden und lag bei Serumverdünnungen zwischen 1:1 000 und 1:4 000. Eine immunisierte Maus aus dieser Gruppe zeigte keine Immunantwort. Der Nachweis von IgG1 Isotypen in Abwesenheit von IgG2a deutet eindeutig auf eine TH2-gerichtete Immunantwort hin. Jedoch konnte auf Zytokinebene keine IL-5 Sekretion beobachtet werden, ein weiteres Indiz für eine TH2 gerichtete Immunantwort. Allerdings konnten geringe Mengen an freigesetztem IFN-γ nach Restimulation mit VLPs beobachtet werden. Die Menge an sezerniertem IFN-γ war um den Faktor 10 geringer als bei der vergleichbaren *intramuskulären* Immunisierung. Im Gegensatz zu der Antikörperimmunantwort wird durch die „Partikel-

gun“ Immunisierung auf Zytokinebene eine TH1-gerichtete Immunantwort beobachtet.

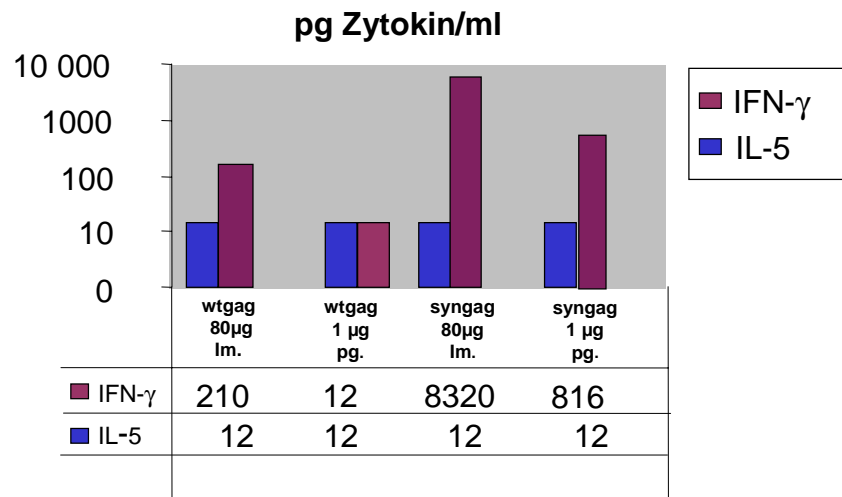


Abbildung C 18: Quantifizierung der Sekretion von INF- γ und IL-5 nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten (48h) mit VLPs (1 μ g). Freigesetzte Menge an Zytokin ist in pg/ml angegeben.

C.2.5 Kurzzusammenfassung (II)

Die Mausimmunologie konnte uns eine Reihe von Fragen bezüglich der Immunogenität und Verabreichungsform von synthetischen und anderen Rev-unabhängigen Reporterkonstrukten beantworten.

- Nach zweimaliger *intramuskulärer* Verabreichung von 80 μ g syngag Plasmid-DNA wird bei allen immunisierten Mäusen eine starke TH1 gerichtete spezifische humorale Immunantwort induziert, die durch höhere Dosis oder weiterer Auffrischungsimpfung nicht signifikant gesteigert werden kann.
- Die Verwendung eines anderen Vektorrückgrades, sowie das Einfügen eines funktionellen Introns hatte keinen Einfluß auf die humorale Immunogenität des syngag-Konstruktes.
- Im Vergleich mit anderen Rev-unabhängigen Konstrukten erwies sich das syngag Konstrukt nicht nur auf humoraler, sondern auch auf zellulärer Ebene, den anderen Konstrukten überlegen. Obwohl alle verglichenen Konstrukte eine TH1 gerichtete Immunantwort auf Zytokinebene induzierten, lagen die erzielten Werte jedoch um Zehnerpotenzen unter denen des syngag-Konstruktes. Zytotoxische T-Zellen konnten nur bei NTR-wtgag-CTE und syngag induziert werden.
- Im Gegensatz zur humoralen Immunantwort kann die zelluläre Immunantwort des syngag Konstruktes durch höhere Dosismenge gesteigert werden.
- Die zusätzliche Verabreichung von Elektropulsen nach der intramuskulären

Immunisierung erwies sich als vielversprechend und konnte die humorale Immunantwort des syngag-Konstruktes steigern.

- Durch *intradermale* Verabreichung des optimierten gag-Konstruktes mittels „Partikel-gun“ können deutlich geringere DNA-Mengen, durch die gezielte Immunisierung von antigenpräsentierenden Zellen, verwendet werden. Doch ist die induzierte Immunantwort deutlich geringer (Faktor 20-100) und weist auf humoraler Ebene ein sehr viel ungünstigeres TH2 Profil auf.

Die Austestung im murinem System gibt uns jedoch nur erste Anhaltspunkte bezüglich Effektivität und Sicherheit der verwendeten Konstrukte. Das entscheidende Kriterium für weitere humane Studien ist die Testung der Konstrukte im SHIV-Makakenmodell. Wobei auch dieses Tiermodellsystem, wie unter A5 und A6 angesprochen wurde, nicht die tatsächliche Situation einer HIV-Virusinfektion im Menschen widerspiegelt.

C.3 Entwicklung und Austestung von Expressions-Konstrukten für das Rhesus-Makaken-Modell

Die Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Studien haben gezeigt, daß Vektoren, welche auf synthetischen HIV- bzw. SIV-Genen basieren, neben der Erfüllung höchster Sicherheitsstandards, auch einen guten Ansatz bieten, immunogene und effektive DNA-Vektoren für die Austestung im Primatenmodell und spätere klinische Studien zu generieren. Wie aus der Einleitung (A.6.2) ersichtlich, ist das SHIV/ Rhesus-Makaken-Modell zur Zeit das relevanteste Tiermodell zur Austestung lentiviraler Vakzine-Konstrukte.

C.3.1 Entwicklung und Konstruktion verschiedener DNA-Vektoren für Immunogenitäts- und Verträglichkeitsstudien im SHIV-Makakenmodell

Neben dem bereits beschriebenen SIV_{mac239} syngag-Konstrukt wurde im Rahmen dieser Promotion eine Reihe von synthetischen Genen hergestellt, welche bislang bereits in unterschiedlichen Primatenstudien eingesetzt wurden. Die Herstellung und Klonierung der Konstrukte erfolgte in ähnlicher Weise, wie für das syngag-Konstrukt unter B.3 beschrieben. Alle hergestellten Subkonstrukte wurden im pCR-Script Klonierungsvektor zusammengebaut und über Kpn I und Xho I in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ (Stratagene) unter die Kontrolle eines CMV Promotors inseriert.

Primäres Ziel einer Vakzine gegen die Struktur- und regulatorischen Proteine ist es, eine starke und effiziente zelluläre Immunantwort zu generieren. Eine Vielzahl immunogener HIV-spezifischer Epitope wurde innerhalb der Strukturproteine Env, Gag und Pol, als auch der regulatorischen und akzessorische Proteine Tat, Rev, Nef und Vpr identifiziert. Aufgrund der hohen Variabilität der unterschiedlichen Virussubtypen, sind Virus-Isolat übergreifende hoch-konservierte Epitope von besonderem Interesse. Das virale Strukturprotein Gag enthält eine Vielzahl konservierter T-Helfer- und ZTL

Epitope und wird zudem in der Zielzelle in großer Menge exprimiert (Caley et al., 1999; Harrer et al., 1996a; Harrer et al., 1998; Klein et al., 1995a; Lynch et al., 1998; Wagner et al., 1999). Aber auch die nur zeitweise, bzw. in geringeren Mengen, exprimierten Proteine Rev, Tat und Pol beinhalten konservierte Epitope. Zwar sind diese Epitope im Rahmen einer Infektion, aufgrund der geringen Expression, nicht in der Lage ZTLs zu induzieren, dennoch reicht die Expression aus, um Antigen auf der Oberfläche zu präsentieren. Effiziente Vakzine-Konzepte, die gegen die früh im viralen Replikationszyklus exprimierten Proteine Tat und Rev gerichtet sind, könnten die HIV-Replikation in einem frühem Stadium inhibieren und infolgedessen eine systemische Ausbreitung des Virus verhindern.

Für eine Fokussierung auf das Gag-Pol Polypeptid sprechen zum einen Beobachtungen aus klinischen Studien, die darauf hindeuten, daß Patienten mit einer ausgeprägten Gag-spezifischen, zellvermittelten T-Helfer Immunantwort eine HIV-Infektion kontrollieren können (Ogg et al., 1998; Rosenberg et al., 1997). Zum anderen besteht eine Korrelation zwischen Langzeitüberlebenden und einer Gag-spezifischen zytotoxischen Immunantwort, die sich vornehmlich gegen hoch konservierte Epitope richtet (Wagner et al., 1999). Für das SIV_{mac239} syn-gag-pol-Konstrukt (4358 Bp) wurde die AS-Sequenz des SIVMM239 (GenBank Nr. M33262) Isolats verwendet und an die Kodonwahl hochexpremierender Säugergene (Wada et al., 1990) angepasst. Der überlappende Bereich von gag und pol (Nukleotidsequenz 1175-1532) wurde nicht modifiziert um den natürlichen *frameshift* zwischen gag und pol nicht zu verändern. Der natürliche *frameshift* erfolgt nur in ca. 5% der Fälle, was zur Folge hat, daß bei diesem Konstrukt 20 mal mehr Gag- als Gag-Pol-Produkte generiert werden. Alternativ dazu wurde eine Variante hergestellt, bei der das aktive Proteasezentrum zerstört wurde (Austausch Aspartat zu Asparagin; AS 528) um eine Prozessierung der Expressionskonstrukte zu unterbinden. Die Klonierung des SIV_{mac239} syn-gag-pol Konstruktes ist auch in der Publikation (Wagner et al., 2000) beschrieben. Das SIV_{mac239} syn-gag-pol-nef Konstrukt ist erst vor kurzem fertiggestellt worden und wird in noch folgenden Primatenstudien am BPRC (Biomedical Primate Research Centre) in Rijswijk ausgetestet. Neben der Induktion einer starken zellulären Immunantwort ist ein weiteres Ziel einer Vakzine die Induktion von neutralisierenden Antikörpern. Das einzige virale HIV Genprodukt, von dem bekannt ist, daß es neutralisierende Antikörper induziert ist der „envelope glycoprotein complex“. Da die neutralisierenden Antikörper nur bedingt kreuzreaktiv sind (Moore et al., 1995a; Trkola et al., 1995), wurden synthetische Env-DNA-Impfstoffvektoren entwickelt die dem Virus, mit dem die immunisierten Affen später infiziert werden, homolog sind.

Die 89.6P synenv-Konstrukte beruhen auf dem *dualtropic* SHIV89.6P Isolat (GenBank Nr. U89134). 89.6P-synenv-160 enthält das komplette env-Gen des SHIV89.6P-Isolats und ist 2609Bp lang. Das 89.6P synenv-120-Konstrukt endet nach der internen Gp120/Gp41 Spaltstelle (REKR Position 506-509). Gp 120 wird prozessiert, kann sich aber an der Zellmembran nicht verankern und wird von der transfizierten Zelle freigesetzt. Das Konstrukt 89.6P synenv-140 ist um 154 AS länger und schließt den Beginn der Transmembrandomäne (AS 663) ein. Bei diesem Konstrukt wurde die interne Gp120/Gp41 Spaltstelle (AS 509 Arginin zu Serin) zerstört. Aufgrund des fehlenden Transmembrananteils kann dieses Konstrukt freigesetzt werden. Aber durch den nicht abgespalteten Gp41-Anteil wird dieses Konstrukt in der Zelle oligomerisiert

und als Komplex ausgeschleust. Der Vorteil dieses Konstruktes besteht darin, daß hier Komplexe freigesetzt werden, welche die native Tertiärstruktur des virale Oberflächenproteins wiedergeben. Mit Hilfe der Signalsequenz („leader“-Sequenz) werden immature Proteine wie z.B. Env in das ER transportiert, durch die Signalpeptidase gespalten, glykosiliert und weiter zur Zytoplasmamembran transportiert. (Li et al., 1994). Ohne Signalsequenz würde Env in nicht glykosilierter Form im Kern akkumulieren. Li und Kollegen konnten 1994 zeigen, daß durch Verwendung von Signalsequenzen Mellitin oder IL-3 eine höhere Expression des Env-Proteins zu beobachten war. Mittlerweile sind mehrere Signalsequenzen beschrieben worden, u.a. auch die humane CD5-Signalsequenz (MPMGS LQPLATLYLLG-MLVASCLG, GenBank Nr. P06127).

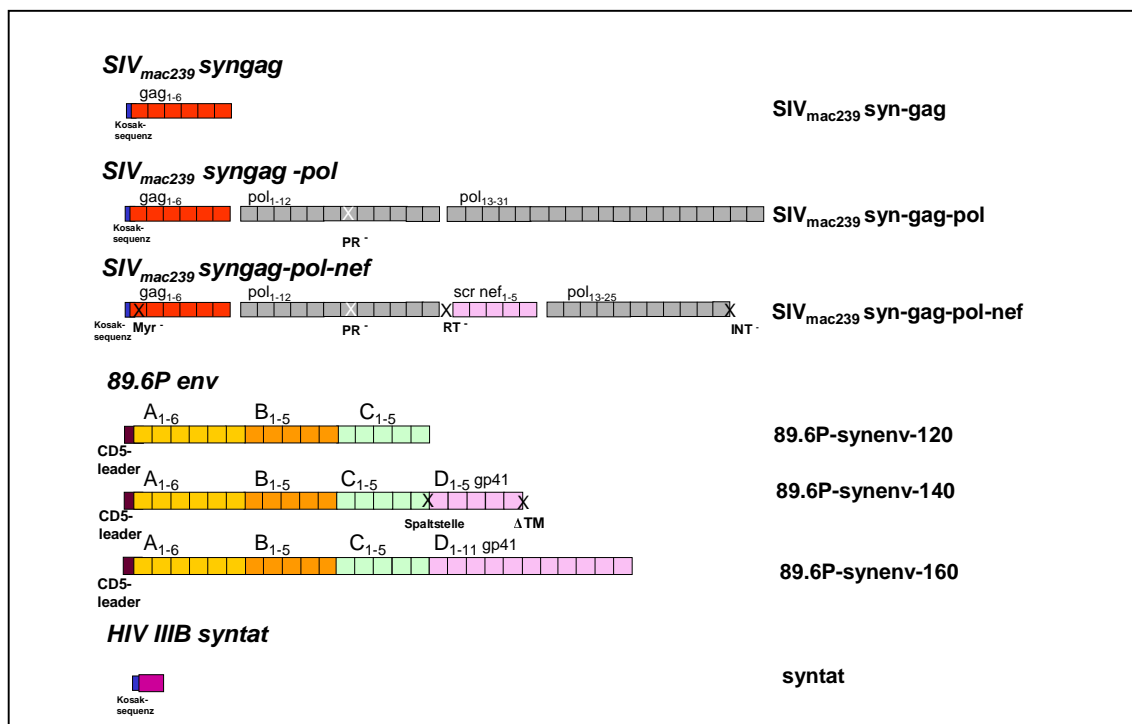


Abbildung C 19: Graphische Darstellung unterschiedlicher synthetischer DNA-Vakzinekonstrukte für die Austestung im SHIV-Makakenmodell.

SIV_{mac239} syngag/gagpol Konstrukte: **Kosaksequenz:** eukaryontische Translationsinitiationssequenz [GCC GCC ACC] (Kozak, 1987). **PR:** Zerstörung des aktiven Zentrums der Protease (Austausch der AS 528, Aspartat zu Asparagin). **Myr:** Zerstörung der Myristylierungsstelle (Austausch der AS 2, Glyzin zu Alanin). **RT:** Zerstörung des aktiven Zentrums der reversen Transkriptase durch Integration eines nicht funktionellen nef-Gens. **Scr nef:** „scrambled nef“ ist ein nicht funktionelles nef Gen, bei dem der N- und C-terminale Bereich vertauscht zusammengebaut wurden, somit wurde die Funktion des Gens zerstört aber möglicherweise relevante Epitope erhalten. Die AS-Sequenz von **scr nef** stammt im Gegensatz zu der restlichen Sequenz der SIV-Konstrukte (SIV_{mac239}) vom nahe verwandten Isolat SIV_{mac251}. **INT:** vollständig entfernte Integrase.

SHIV 89.6P synenv Konstrukte: Die AS-Sequenz der synthetischen 89.6P env Konstrukte beruht auf einem isolierten Klon des Schwarmvirus SHIV-89.6 (Reimann et al., 1996a) siehe auch B.6.2. **CD5-leader:** humane CD-5 Signalsequenz. **Δ Spaltstelle:** zerstörte Gp120 Spaltstelle an AS-Position 509. **Δ TM:** entfernte Transmembrandomäne (AS-Position 664-704).

HIV IIIB syntat: Die AS-Sequenz des synthetischen tat-Konstruktes beruht auf dem Laborstamm HX10 (Ratner et al., 1987). Die beiden funktionellen tat-Regionen wurden „in frame“ kloniert.

Neben den Genen für Struktur- und Oberflächenproteine stehen auch frühe regulatorische Gene wie z.B. das tat-Gen im Fokus der Impfstoffentwicklung (Cafaro et al., 1999; Cafaro et al., 2000; Cafaro et al., 2001; Ensoli et al., 2002). Das tat-Gen besteht aus zwei, partiell den env-Leserahmen überlappenden Exons: Exon1 (NS: 5189-5403) und Exon2 (NS: 7734-7779). Die AS-Sequenz des hier verwendete HIV_{III}B syntat Konstruktes ist vom HX10 Isolat abgeleitet (GenBank Nr. M15654).

In der Abbildung C19 sind alle für die Primatenstudien entwickelten Vektorkonstrukte in Form ihrer Subklone dargestellt. Sämtliche Aminosäure (AS)- und Nukleotidsequenzen (NS) sind im Anhang aufgelistet.

C.3.2 Austestung der Konstrukte *in vitro* im Western-Blot

Die Expression der entsprechenden Polypeptide von den pcDNA basierten SIV_{mac239} syn-gag-pol- und 89.6P synenv-Vakzinevektoren wurde nach transienter Transfektion von H1299 Zellen durch den immunologischen Nachweis der jeweiligen Proteine überprüft (Abb. C 20 A u. B).

Zur genaueren Charakterisierung des SIV_{mac239} syn-gag-pol-Konstruktes sollte der biochemische Aufbau der GagPol-Partikel mit denen von SIV_{mac239}-Partikeln verglichen werden. Dazu wurden in einem Parallelansatz H1299 Zellen zum einem mit proviralem SIV, zum anderen mit SIV_{mac239} syn-gag-pol transfiziert. Um eine Prozessierung der Pr56^{gag} und Pr160^{gagpol} Vorläuferproteine zu unterbinden, wurden analog transfizierte Zellen mit 100µM Saquinavir behandelt. Saquinavir ist ein Proteaseinhibitor der spezifisch lentivirale Proteasen inhibiert. Es bindet an das aktive Zentrum der viralen Protease, kann aber dort nicht umgesetzt werden. Die Aktivität der SIV-Protease war durch die Prozessierung des Pr56^{Gag} in p26/27^{CA} und p41 nachweisbar. Aus den Kulturüberständen der transfizierten Zellen wurden mittels Ultrazentrifugation durch ein 30% Saccharosekissen die Partikel angereichert und das Pellet einer Immunoblotanalyse unterworfen (siehe B.5). Die GagPol-Partikel ließen sich unter den gleichen Bedingungen wie die SIV-Partikel durch das Succrosekissen sedimentieren und besitzen also eine ähnliche Schwebedichte. Darüberhinaus war das Verhältnis Pr56^{gag} zu p26/27^{CA} bei beiden Partikelpräparationen sehr ähnlich (Abb. C20A). Eine vergleichbare Prozessierungseffizienz der SIV Protease in den GagPol-Partikeln ist somit anzunehmen. In Gegenwart von Saquinavir ist eine effiziente Prozessierung der Pr56^{gag} und Pr160^{gagpol} Vorläufers nicht möglich. In den Partikelpräparationen war das 160 kDa große Gag-Pol Durchleseprotein nur in Gegenwart von Saquinavir nachweisbar. Da es nur in 5% der Fälle zu einem ribosomalen –1 Rastersprung bei der Translation der GagPol-mRNA kommt, ist der Pr160^{gagpol} Vorläufer nur in geringen Mengen, als dünne hochmolekulare Bande im Immunoblot, nachweisbar. Auch hier ist das Verhältnis Pr55^{gag} zu Pr160^{gagpol} bei den GagPol Partikeln ähnlich wie bei dem SIV Proviruskonstrukt.

Um die Expression der 89.6P synenv-Konstrukte zu detektieren, wurden unterschiedliche institutseigene Patientenseren auf Kreuzreaktivität gegenüber den auf Primatenzellen adaptierten Hüllproteinen getestet. Dazu wurden zunächst solche Patientenseren herangezogen, die in Vortests schon hohe Titer an HIV Env spezifischen Antikörpern zeigten. Das Patientenserum 5335 ergab die beste Kreuzreaktivität und wurde folglich für die Detektion der 89.6P-Konstrukte verwendet. Wie aus Abbildung C20B hervorgeht, erwiesen sich alle verwendeten synthetischen env-

Konstrukte in transfizierten H1299 Zellen, ohne die Zugabe von Rev, hinsichtlich ihrer Expressionsleistung als vergleichbar effizient.

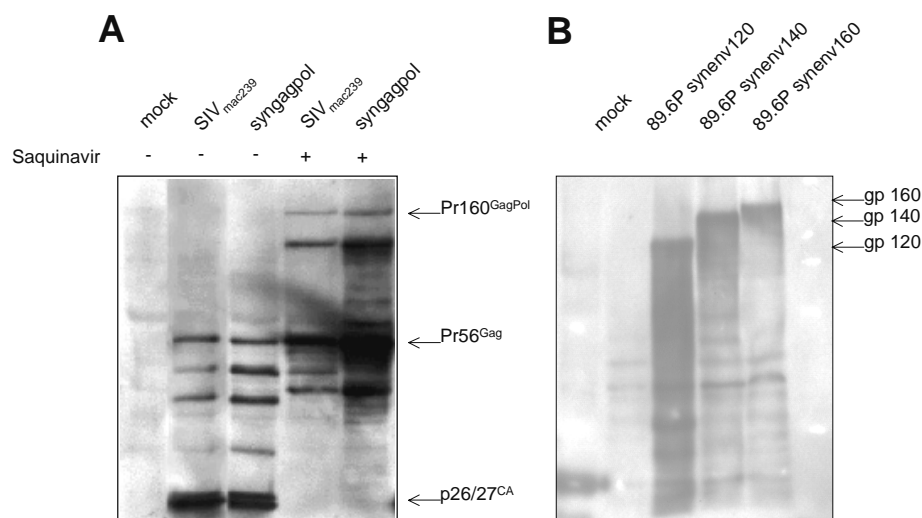


Abbildung C 20: (A): Präparation prozessierter wie nicht prozessierter viraler sowie virus-ähnlicher GagPol-Partikel. H1299 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert; nach 72h wurde der Zellkulturüberstand geerntet. Die Prozessierung des GagPol Volllänge Proteins Pr160 wurde durch Zugabe (+) von 100µM Saquinavir 24h vor der Transfektion überprüft. Jeweils 10ml Kulturüberstand wurden mittels Ultrazentrifugation durch ein Sacharosekissen sedimentiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem p27-spezifischen Antikörper (3F7 der Firma Intracel, London) im Immunoblot nachgewiesen. Die Positionen der Gag- und GagPol-Proteine, sowie deren Prozessierungsderivate sind rechts durch Pfeile markiert. (B): H1299 Zellen wurden mit den angegebenen Konstrukten transfiziert, und nach 48h geerntet, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem humanen Patientenserum (5335 vom Institut für Med. Mikrobiologie, Regensburg) im Immunoblot nachgewiesen. Die Positionen der Glykoproteine (Gp) sind rechts durch Pfeile markiert.

C.3.3 Austestung der Konstrukte *in vivo* im SHIV-Makaken-Modell in unterschiedlichen Studien

Die Testung der DNA Vakzine Kandidaten in Primaten (Rhesusaffen) stellt besondere Anforderungen an die Infrastruktur der Labors und Kenntnisse des Tierpflegepersonals. Die Immunogenität und Wirksamkeit von HIV Impfstoffkandidaten kann demnach nur in den entsprechend spezialisierten Primatenzentren stattfinden. Basierend auf den in dieser Arbeit entworfenen und charakterisierten Konstrukte wurden mittlerweile, teils von unserer Arbeitsgruppe induziert und koordiniert, teils von Kollegen aus dem Ausland vorgeschlagen, eine Reihe präklinischer Studien in Rhesusaffen auf den Weg gebracht. Drei der bisher am weitesten fortgeschritten Studien sind in Abbildung C21 aufgeführt und in ihren wesentlichen Eckpunkten wiedergegeben. Zwei der Studien DPZ1 und BPRC2 werden nachfolgend genauer beschrieben und diskutiert. Andere Studien, wie der Vergleich von Tat-DNA-Vektoren zu DNA-Vektoren, die Strukturgene (gag,pol, env) exprimieren, stehen am Beginn der Auswertung oder, wie die Austestung des SIV_{mac239} gag-pol-nef-Konstruktes, sind noch in Vorbereitung und können im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht mehr analysiert

werden.

Die Studie DPZ1 wurde in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. Christiane Stahl-Hennig am Deutschen Primaten Zentrum (DPZ) in Göttingen durchgeführt, die anderen Studien BPRC1, BPRC2 und weitere Studien finden in Kooperation mit Prof. Jonathan Heeney am „Biomedical Primate Research Centre“ (BPRC) in Rijswijk (Niederlande) statt.

Studienbezeichnung	BPRC 1	BPRC 2	DPZ 1
Beteiligte Arbeitsgruppen	Wagner/Heeney RIMMH/BPRC	Wagner/Heeney RIMMH/BPRC	Wagner/Stahl-Hennig RIMMH/DPZ
Primär-immunisierung	synthetische DNA gag _{SIVmac239} , tat _{IIIB} , env (gp140) _{89.6P}	synthetische DNA gag _{SIVmac239} , tat _{IIIB} , env (gp140) _{89.6P}	synthetische DNA gagpol _{SIVmac239} , env (gp120/160) _{89.6P}
Dosismenge	je 0,6mg	je 0,6mg	0,5mg (gagpol), je 0,25mg (env)
Adjuvantien		+/- IL-12/18 (Plasmid DNA)	
Applikationsform	i.m./i.d.	i.m./i.d.	i.m./i.d.
Auffrischungs-immunisierung	rekombinantes Protein r-gag, r-tat, r-env	MVA gag, tat, env (gp160)	MVA gag, pol, env (gp160)
Applikationsform	i.m./i.d.	i.m./i.d.	i.m./i.d.; nasal
Challenge-virus	SHIV 89.6 P	SHIV 89.6 P	SHIV 89.6 P
Dosismenge	20 MID ₅₀	20 MID ₅₀	40 MID ₅₀
Infektionsroute	i.v.	i.v.	rektal

Abbildung C 21: Primatenstudien: Austestung unterschiedlicher synthetischer Gene im Prime-Boost-Verfahren in Kombination mit rekombinantem Protein oder attenuierten Vaccinia-Vektoren (MVAs), sowie Austestung des Einflusses von Adjuvantien (IL-12 u. IL-18) auf die Immunogenität der verwendeten Vektoren. **RIMMH:** Regensburg Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene; **BPRC:** Biomedical Primate Research Centre; **DPZ:** Deutsches Primaten Zentrum; **i.m.:** intramuskulär; **i.d.:** intradermal; **i.v.:** intravenös; **MID₅₀:** halbmaximale infektiöse Dosis.

C.3.3.1 BPRC2-Studie

Verwendete Vektoren und Viren

- **DNA-Impfstoffvektoren:** Als DNA-Vektoren zur Expression viraler Genprodukte wurden in dieser Studie die Konstrukte SIV_{mac239} syngag, 89.6P synenv-140 sowie HIV_{IIIB} syntat unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors (HCMV IE1) im pcDNA-Vektor eingesetzt. Für die Expression der Interleukine IL-12 und IL-18 wurden die Konstrukte pND IL-12 und pND IL-18 (zur Verfügung gestellt von Prof. Heeney) verwendet. Auch diese beiden Konstrukte befinden sich unter CMV-Promotorkontrolle und beinhalten eine GM-CSF (**G**ranulocyte-**m**acrophage **c**olony-**s**timulating **f**actor) Signalsequenz zur verbesserten Sekretion von IL-12 und IL-18. Die verwendeten DNA Konstrukte wurden vor der Immunisierung, wie unter B.6.1.1 beschrieben,

hergestellt und auf Endotoxingehalt getestet. Für die Immunisierungsstudien wurden nur DNA-Präparationen verwendet deren Endotoxin-Gehalt $< 1 \text{ EU/ml}$ war (entspricht LPS-Anteil kleiner als 1 ng).

- **MVA-Impfstoffvektoren:** Die in dieser Studie verwendeten rekombinanten Vaccinia Viren basieren auf dem hoch attenuierten „Modified Vaccinia Ankara“ (MVA) Virusisolat, daß durch zahlreiche *in vivo* Passagen auf Hühnerembryo-fibroblasten (CEF) attenuiert wurde und auf den meisten Säugerzellen replikationsdefizient ist. Die im beschriebenen Experiment eingesetzten MVAs exprimieren das analoge Set von Antigenen SIV_{mac239} gag und SHIV_{89.6P(KB9)} env Gp160 unter der Kontrolle eines modifizierten „H5 Vaccinia Virus“ Promotors. Die Expression des HIV_{IIIB} Tat Proteins erfolgt unter der Kontrolle des Vaccinia Virus spezifischen 7.5K *early/late* Promotors. Die für die Studie benötigten MVA-Dosismengen wurde uns von Prof. Moss (NIH) zur Verfügung gestellt.
- **Challengevirus:** Das chimäre SHIV_{89.6P} Virus enthält die Gene tat, rev, vpu und env vom HIV_{89.6P}-Isolat auf dem Hintergrund des SIV_{mac239} Genoms (siehe auch Einleitung A.6.2 Makakenmodell). Der *Challenge-Virusstock* wurde in Rhesus Makaken PBMCs hergestellt und *intravenös* in Rhesusaffen titriert. Dieser Virusstock induziert nach *intravenöser* Verabreichung hohe Virustiter im Blut und verursacht eine AIDS-ähnliche Erkrankung in den infizierten Tieren. Für die Infektion der Versuchstiere wurden 20 infektiöse Einheiten (MID_{50} , Einheit der halbmaximalen infektiösen Dosis; **monkey infectious dose**) *intravenös* pro Tier verabreicht. Der *Challenge* erfolgte zwei Monate nach der letzten MVA Auffrischungsimpfung und 38 Wochen nach der ersten DNA-Immunisierung.

Immunisierungsgruppen

Fünf Gruppen zu je vier Tieren wurden vor Versuchsbeginn serologisch auf SIV, STLV und SRV Infektionen hin getestet. Keines der Versuchstiere war positiv oder zeigte immunsupprimierte Parameter.

Die Tiere der Gruppe 1A wurden als Kontrolltiere verwendet und nicht immunisiert. Die Affen der Gruppe 1B wurden mit 1,8mg pND-„Leer-Vektor“ (1,5mg im. / 0,3mg id.) und je 0,6mg IL-12- und IL-18-DNA-Vektor (0,5mg im. / 0,1mg id.) grundimmunisiert. Nach sechs, zwölf und 18 Wochen wurde die DNA-Impfung wiederholt. Nach 24 und 30 Wochen wurden 1×10^8 MVA Partikel (ohne virale Gene) je zur Hälfte *intramuskulär* und *intradermal* verabreicht.

Die Gruppen 2, 3 und 4 wurden mit je 0,6mg SIV syngag, 89.6P synenv 140 und HIV_{IIIB} syntat DNA (jeweils 0,5mg im. und 0,1mg id.) grundimmunisiert. Die Gruppe 2 erhielt zusätzlich die gleiche Menge an IL-12- und IL-18-Plasmid DNA verabreicht wie die Gruppe 1B. Der Gruppe 3 wurde nur IL-12-DNA gegeben und die Gruppe 4 erhielt anstelle der Interleukin- kodierenden DNAs adäquate Mengen an „Leer-DNA“. Wie schon für die Gruppe 1B beschrieben wurde die DNA-Immunisierung nach sechs, zwölf und 18 Wochen wiederholt.

	Gruppe	Anz. der Tiere	Immunisierungskonstrukte		
Kontrollen:	(1A)	4	Nicht immunisiert		
	(1B)	4	DNA (virale Gene) Leer-DNA 1,5mg (im.)/ 0,3mg (id.)	DNA (Interleukine) IL-12 u. IL-18 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	MVA Leer-MVA 5 x 10 ⁷ (im.) 5 x 10 ⁷ (id.)
Experiment:	(2)	4	SIV syngag, 89.6P synenv-140 u. HIV _{III} B syntat je 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	IL-12 u. IL-18 je 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	MVA gag/env u. MVA tat je 2,5 x 10 ⁷ (im.) 2,5 x 10 ⁷ (id.)
	(3)	4	SIV syngag, 89.6P synenv-140 u. HIV _{III} B syntat je 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	IL-12 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	MVA gag/env u. MVA tat je 2,5 x 10 ⁷ (im.) 2,5 x 10 ⁷ (id.)
	(4)	4	SIV syngag, 89.6P synenv-140 u. HIV _{III} B syntat je 0,5mg (im.)/ 0,1mg (id.)	Leer-DNA 1,0 mg (im.)/ 0,2mg (id.)	MVA gag/env u. MVA tat je 2,5 x 10 ⁷ (im.) 2,5 x 10 ⁷ (id.)

Abbildung C 22: Darstellung der verwendeten Menge an Immunisierungsvektoren sowie deren Verabreichungsform (Studie BPRC 2). **Leer-DNA** heißt Verabreichung von DNA-Vektoren ohne funktionelles Insert; **Leer-MVA** heißt Verabreichung von MVA-Vektoren ohne kodierendes Fremdgen; **im.**, intramuskuläre Verabreichung des Antigens; **id.**, intradermale Verabreichung des Antigens.

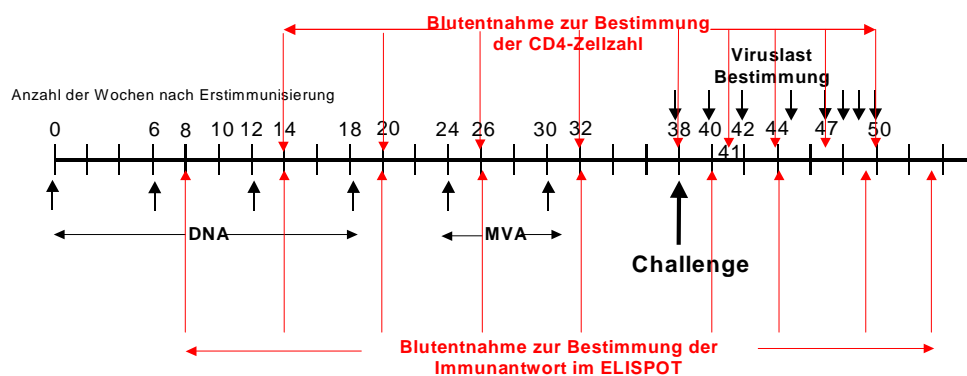


Abbildung C 23: Immunisierungs- und Ausleseprotokoll (Studie BPRC 2). Die immunisierten Tiere wurden viermal mit DNA- und zweimal mit MVA-Vektoren immunisiert. 38 Wochen nach Erstimmunisierung erfolgte der Challenge mit dem pathogenen Virusisolat 89.6P. Auslesen der humoralen und zellulären Immunantwort erfolgte in ELISPOT-Analysen, die Bestimmung der Viruslast mittels RT-PCR und der Verlauf der CD-4-Zellzahl durch FACS-Analysen.

Nach 24 und 30 Wochen wurden den Gruppen 2, 3 und 4 $0,5 \times 10^7$ infektiöse Einheiten gag/env- und tat-exprimierende MVA-Partikel *intramuskulär und intradermal verabreicht*, die Tiere der Gruppe 1B erhielten die gleiche Menge an MVA-„Leervektor“. Die Belastung mit dem pathogenem SHIV 89.6P erfolgte *intravenös* 38 Wochen nach der ersten Immunisierung.

In Abbildung C22 sind die Versuchsgruppen, sowie die verwendeten Antigene und Immunisierungsformen zusammenfassend dargestellt, in Abbildung C23 sind die zeitlichen Abläufe der Immunisierung und Blutentnahmen zur Bewertung der humoralen und zellulären Immunantwort sowie die Zeitpunkte der Viruslast Bestimmung nach Infektion zusammengefaßt.

C.3.3.1.1 Auslesen der induzierten Immunantwort

Wie aus der Abbildung C23 ersichtlich ist, wurde den immunisierten Tieren zu den angegebenen Zeitpunkten 8, 14, 20, 26, 32, 40, 44, 49 und 53 Wochen nach der Erstimmunisierung Blut zur Bestimmung der zellulären Immunantwort entnommen. Die isolierten PBMCs (**P**eriferel **B**lood **M**ononuclear **C**ells) wurden spezifisch sowohl mit viralen Proteinen Gag, Env und Tat als auch mit spezifischen Gag, Env und Tat Peptidpools restimuliert. Im ELISPOT wurden anschließend die freigesetzten Zytokine IL-2, IL-4 als auch $\text{INF-}\gamma$ anhand der Anzahl positiver Zytokin sezernierender Zellen (*spots*) von jeweils 2×10^6 Zellen bestimmt.

IL-2 Sekretion nach spezifischer Restimulation mit gereinigtem Protein ist ein Marker für die Anzahl an aktivierten T-Zellen. Die *Kontrolltiere* der Gruppen 1A und 1B zeigten zu keinem Zeitpunkt erhöhte IL-2 Freisetzung; weder nach Restimulation mit Gag VLPs noch nach Zugabe von Env Gp120 oder Tat Protein. Die höchsten IL-2 Werte wurden in der Gruppe 2 (IL-12, IL-18) mit Gag VLPs erreicht. Die Werte lagen zwischen 30 und 75 *spots* pro 2×10^6 Zellen. Das Maximum wurde nach 20-26 Wochen erreicht und nahm in den folgenden Wochen auf Werte zwischen 5 und 20 ab. Auch die Gruppen 3 (nur IL-12, ohne IL-18) und 4 (ohne IL-12 und IL-18) waren nach Stimulation mit Gag VLPs positiv. Jedoch lag in beiden Gruppen das Maximum bei 30-40 IL-2 sezernierenden *spots* und somit signifikant niedriger als in Gruppe 2 (IL-12, IL-18). Bei der Restimulation mit Env Protein verhielten sich die Gruppen 2-4 sehr ähnlich. Alle Werte lagen im Schnitt zwischen 5 und 25. In der Gruppe 2 zeigten zwei der Tiere nach Restimulation mit Tat erhöhte IL-2 Werte zum Zeitpunkt 24 Wochen. In der Gruppe 4 war nur ein Tier positiv, in der Gruppe 3 kein einziges. Dieser Versuch hat gezeigt, daß in allen drei Gruppen aktivierte T-Zellen vorlagen, welche spezifisch mit GagVLPs, Env Gp120 und in vereinzelt Fällen mit Tat restimuliert werden konnten. Jedoch konnte auch gezeigt werden, daß in Gruppe 2 (IL-12, IL-18) doppelt soviel aktivierte T-Zellen nach Restimulation mit GagVLP vorlagen wie in den Gruppen 3 (nur IL-12, ohne IL-18) und 4 (ohne IL-12 und IL-18).

IL-4 Sekretion nach spezifischer Restimulation mit gereinigtem Protein ist ein Indiz für eine T-Helfer-2 Immunantwort (TH2). Sowohl nach Restimulation mit Gag- als auch mit Env-Protein wurde innerhalb der Gruppen 2 und 3 Werte zwischen 25 und 75 IL-4 positive *spots* detektiert. Das Maximum lag immer zwischen der 20. und 26. Woche, also nach der letzten DNA-Immunisierung und vor der zweiten MVA-Immunisierung. Die Werte gingen zu den Zeitpunkten 32. und 40. Woche zurück, um in der 44. Woche ein zweites Maximum zu erreichen. Die Werte der Gruppe 4 (ohne IL-12

und IL-18) lagen im Schnitt zwischen 5 und 25 und waren somit deutlich niedriger.

INF- γ Sekretion nach spezifischer Restimulation mit gereinigtem Protein. PBMCs der Gruppen 2 bis 4 setzten sowohl nach Restimulierung mit Gag VLPs als auch nach Zugabe von Env Gp120, hohe Mengen an INF- γ frei. Die Werte der Gruppen 2 und 3 lagen zwischen 25 und 150 positiven *spots*, die der Gruppe 4 zwischen 15 und 60. Die INF- γ Sekretion steht für die Anwesenheit von Antigen-spezifischen T-Helferzellen, deren Immunantwort TH1-gerichtet scheint. Positiv auffällig war, wie bereits in den vorangegangenen Tests, daß die beobachteten γ -IFN Werte schon nach 20 Wochen sehr hoch waren, d.h. allein durch die Verabreichung der DNA-Konstrukte kann schon eine starke TH1-gerichtete T-Helferimmunantwort induziert werden. Die Werte blieben auch in der 30.- und 32.-Woche hoch, gingen aber im Zeitraum von 2 bis 6 Wochen nach dem *Challenge* eindeutig zurück. Bei den meisten immunisierten Tieren war jedoch zu späteren Zeitpunkten (nach 44, 49 und 53 Wochen) wieder eine Zytokin-freisetzung bei den mit Protein restimulierten PBMCs zu beobachten.

Gag-, Env- und Tat-spezifische ZTL-Aktivität nach Restimulation mit Peptiden.

Den Tieren wurde zu den gleichen Zeitpunkten, wie in den vorangegangenen Experimenten, Blut entnommen, die PBMCs wurden gereinigt und mit unterschiedlichen Gag-, Env- und Tat-spezifischen Peptiden restimuliert. Im ELISPOT wurde anschließend die INF- γ Sekretion der aktivierten CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten quantitativ ausgezählt. Mit dem hier verwendeten Gag-Peptid-Pool wurden in den Gruppen 2-4 nur geringe ZTL-Aktivität für den Zeitraum 44 bis 53 Wochen nach der Erstimmunisierung beobachtet. Die Werte lagen zwischen 5 und 15 positiven *spots* pro 2×10^6 eingesetzten PBMCs. Zu früheren Zeitpunkten, sowie in den Kontrollgruppen 1A und 1B konnte keine, durch Gag-Peptide stimulierbare ZTL-Aktivität gemessen werden. Bei Restimulation mit Env-Peptiden waren die Kontrollgruppen 1A und 1B ebenfalls negativ. In den Gruppen 2-4 konnte schon ab dem Zeitpunkt 14. Woche, Env induzierte ZTL-Aktivität gemessen werden. In den Gruppen 2 und 3 lag das Maximum, zum Zeitpunkt 26. Woche, bei 125-140 positiven *spots*. In der Gruppe 4 zeigten drei von vier Tieren nach Stimulation mit Env-Peptid ZTL-Aktivität, die im Schnitt zwischen 10 und 40 positiven *spots* lagen. Zwei Tiere der Gruppe 2 zeigten ZTL-Aktivität nach Restimulation mit Tat-Peptid. In den Gruppen 3 und 4 war jeweils nur ein Tier positiv. Die Diskrepanz zwischen den Werten PBMC + VLP (INF- γ -Sekretion), PBMC + Env-Peptid und den Werten die für PBMC + Gag-Peptid erhalten wurden, legt eindeutig nahe, daß Fehler beim Auslesen der Gag-spezifischen ZTL-Aktivität gemacht wurden. Denn ZTL-Aktivität konnte in allen immunisierten Tieren der Gruppen 2-4 gegen Env-Peptid generiert werden.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, daß die verwendeten Antigene in der Lage, sind sowohl eine humorale TH2-gerichtete (IL-4 ELISPOT) als auch eine zellvermittelte TH1-(INF- γ ELISPOT) Immunantwort zu induzieren. Desweiteren konnten auch Env bzw., mit den oben erläuterten Einschränkungen, geringe Mengen an Gag-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) induziert werden. In Abbildung C26 sind die oben beschriebenen Beobachtungen mit den Virusbeladungsdaten und dem CD4-Zellzahlverlauf graphisch zusammengefaßt.

C.3.3.1.2 Virusbeladung nach Infektion mit dem pathogenen SHIV 89.6P-Virus

Die vakzinieren Affen wurden, 38 Wochen nach der Erstimmunisierung, *intravenös* mit 20 MID₅₀ infektiösen Einheiten des hoch pathogenen SHIV_{89.6P} Isolats infiziert. Zur Kontrolle wurden auch vier nicht geimpfte Affen infiziert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 7, 9, 10, 11 und 12 Wochen nach dem *Challenge* wurde die Anzahl der viralen RNAs, mittels quantitativer RT-PCR, im Blut gemessen. Zum Zeitpunkt 0 wurde keinerlei virale RNAs nachgewiesen. Zwei Wochen nach der Infektion wurde sichtbar, daß eine Infektion der Tiere mit SHIV_{89.6P} stattgefunden hat. Die Anzahl der RNA-Kopien lag zwischen 10^5 und 10^8 pro ml Blut. Lediglich in der Gruppe 3 zeigte ein Tier (Ri192) nur RNA-Titer von 10^3 und bei dem Tier Ri233 konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Insgesamt konnte beobachtet werden, daß die initiale Virämie zwei Wochen nach Infektion mit SHIV_{89.6P} im Mittel in allen spezifisch immunisierten Gruppen (2-4), gegenüber den nicht geimpften (1A) oder Mock (1B) behandelten *Kontrolltieren*, signifikant um 1-2 Zehnerpotenzen reduziert war. Am deutlichsten war dieser Effekt in Gruppe 4 (ohne IL-12 und IL-18) zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigte uns, daß die spezifische Immunisierung zur Kontrolle der initialen Virämie beiträgt.

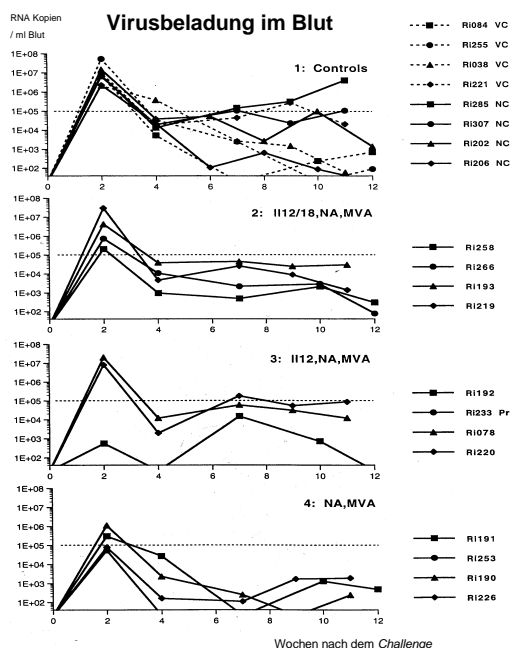


Abbildung C 24: Virusbeladung im Blut (Anzahl der RNA-Kopien pro ml Blut).

Elf Wochen nach der Infektion wurden in drei der vier nicht geimpften Kontrolltiere noch immer Werte größer 10^5 RNA Äquivalente/ml Blut gemessen. Alle immunisierten Tiere wiesen deutlich (1-2 Zehnerpotenzen) niedrigere Werte auf. Die niedrigsten Werte wurden in den Affen der Gruppen 2 und 4 beobachtet. Sie lagen nach zwölf Wochen zwischen 10^2 und 10^3 RNA Kopien pro ml Blut, was für eine rasche Besserung der initialen Virämie sowie einen früheren und niedrigeren „Set Point“ spricht. Letzterer ist laut klinischen Beobachtungen an HIV Infizierten entscheidend für

den späteren Krankheitsverlauf. Generell gilt: Je früher und niedriger der „Set Point“, desto günstiger die Prognose den Krankheitsverlauf zu verzögern oder durch Therapeutika einzudämmen. Die beschriebenen Ergebnisse der Virusbeladung im Blut sind in Abbildung C24 dargestellt.

C.3.3.1.3 Bestimmung der Anzahl an CD4⁺ Zellen im Blut

Die Anzahl der CD4⁺ Zellen wurde bei allen Tieren viermal im Abstand von 6 Wochen, jeweils vor dem *Challenge*, und viermal im Abstand von drei Wochen nach SHIV_{89.6P}-Belastung quantitativ bestimmt. In Abbildung C25 sind die CD4 Zellzahlen pro ml Blut zusammengefaßt. In der Kontrollgruppe 1A, deren Tiere nicht immunisiert wurden, war die Anzahl der CD4⁺ Zellen bereits sechs Tage nach der Infektion bei drei von vier Tieren um den Faktor 100 gegenüber den vor der Infektion gemessenen Werten, gesunken. In der Kontrollgruppe 1B, die neben „Leer-Vektoren“ nur IL-12 und IL-18 DNA bekommen haben, zeigten auch drei von vier Tieren sechs Tage nach der Infektion deutlich reduzierte CD4⁺ Zellzahlen, beim Tier RI 255 etwa um den Faktor 5, beim Tier RI 084 um den Faktor 8 und beim Tier RI 221 sogar etwa 100-fach. In keinem der spezifisch immunisierten Tiere, unabhängig von der Koverabreichung von Interleukin-12 und -18, konnte zu irgendeinem Zeitpunkt eine Reduktion der CD4-Zellzahl um mehr als 50% beobachtet werden. Dies bezieht sich auch auf spätere Meßpunkte, die bis 15 Wochen nach der Belastung mit SHIV_{89.6P} reichten (siehe Abbildung C24).

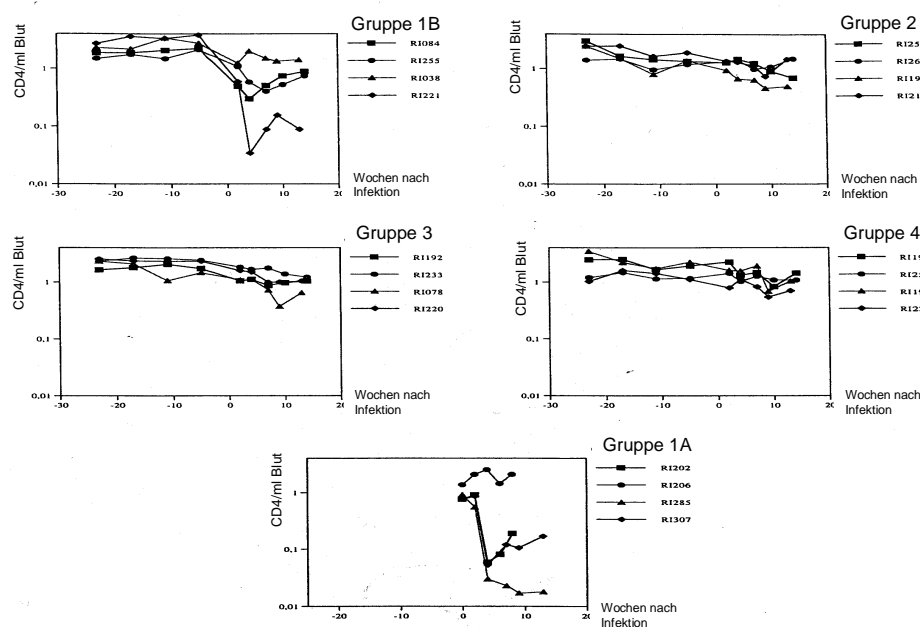


Abbildung C 25: Bestimmung der CD4⁺-Zellzahl pro ml Blut. Die Anzahl der CD4⁺ Zellen wurde bei allen Tieren 4x im Abstand von 6 Wochen, vor dem Challenge und 4x im Abstand von drei Wochen danach, quantitativ bestimmt.

C.3.3.1.4 Kurzzusammenfassung (IIIA)

Zusammenfassend lässt sich festhalten, daß erwartungsgemäß ein vollständiger Schutz, der sich durch eine sterile Immunität oder Eliminierung des Virus ausgezeichnet hätte, in keiner der drei immunisierten Gruppen erzielt werden konnte. Dennoch wurde die initiale Viruslast in allen drei Gruppen, wenn auch in unterschiedlichen Ausmaß deutlich reduziert und ein früherer und niedriger „Set Point“ erzielt. Der Benefit der Immunisierung wird besonders deutlich im Verlauf der CD4-Zellzahl nach Infektion. Durch die spezifische Immunisierung konnte die Reduktion dieser wichtigen Zellen des Immunsystems durch das hoch pathogene Virus SHIV_{89.6P}, verhindert werden. Durch die Verabreichung von Zytokinen wie IL-12 und IL-18 sollte das Immunsystem in Richtung TH1 *geprimed* werden. Die Gruppen 2 und 3 zeigten im Vergleich zur Gruppe 4 (ohne IL-12 und IL-18) eine erhöhte Induktion von ZTLs und T-Helferzellen, die möglicherweise auf eine breite und unspezifische T-Zell Aktivierung zurückzuführen ist. Da das Virus nach Infektion nur in aktivierten T-Zellen replizieren kann, werden Aufgrund der unspezifische T-Zell Aktivierung mehr Zielzellen initial infiziert und der positive Effekt der Immunisierung wird verringert. Dies korreliert mit der im Vergleich zur Gruppe 4 höheren initialen Viruslast und vergleichsweise späteren und inkonsistenteren „Set Point“. Auf Basis dieser Studie kann die Koverabreichung von Zytokin-Expimierenden DNAs nicht empfohlen werden. In Abbildung C26 sind die Daten der BPRC 2-Studie zusammenfassend dargestellt.

Zeitpunkt		Gruppe	1A (nicht immun.)			1B („Leer“-Vektor)			2 (mit IL-12 u. IL-18)			3 (nur mit IL-12)			4 (ohne IL-12 u. IL-18)		
		Antigen	Gag	Env	Tat	Gag	Env	Tat	Gag	Env	Tat	Gag	Env	Tat	Gag	Env	Tat
Vor dem Challenge	Nach DNA Imm.	IL-2 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	+++	+	+	++	+(+)	-	+(+)	+	(+)
		IL-4 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	+++	+	+	++	+++	-	+	+	-
		IFN-γ(Prot.)	-	-	-	-	-	-	++++	++	++	+++	+++	++	++(+)	++	+
		IFN-γ(Pept..)	-*	-	-	-*	-	-	-*	++++	++	-*	++++	+	-*	++	+
	Nach MVA Imm.	IL-2 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
		IL-4 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	+	+(+)	-	(+)	+	-
		IFN-γ(Prot.)	-	-	-	-	-	(+)	+++	+++	+	+++	+++	+	+++	++	(+)
		IFN-γ(Pept..)	-*	-	-	-*	-	-	-*	++	+	-*	++	+	-*	+	-
Nach dem Challenge	10 Wo	IL-2 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
		IL-4 (Prot.)	-	-	-	-	-	-	+(+)	+	+	+	+	-	-	-	-
		IFN-γ(Prot.)	-	-	-	-	-	-	++(+)	-	-	++	+	-	+	-	-
		INF-γ(Pept.)	-*	-	-	-*	-	-	(+)*	+++	-	(+)*	++	-	(+)*	(+)	-
	2 Wo	Viruslast pro ml Blut	~ 1x 10 ⁷			~ 8x 10 ⁶			~ 3x 10 ⁶			~ 5x 10 ⁶			~ 1x 10 ⁵		
	8 Wo		~ 7x 10 ⁴			~ 5x 10 ⁴			~ 8x 10 ³			~ 3x 10 ⁴			~ 3x 10 ³		
	3 Wo	CD4-Zellzahl pro ml Blut	~ 0,85			~ 0,9			~ 1,2			~ 1,2			~ 1,1		
	12 Wo		~ 0,09			~ 0,3			~ 1,2			~ 1,2			~ 1,1		

Abbildung C 26: : Zusammenfassung der Studie BPRC 2. Auslesen der Immunantwort erfolgte in ELISPOT-Analysen, die Bestimmung der Viruslast mittels RT-PCR und der Verlauf der CD-4-Zellzahl durch FACS-Analysen. Die Gewichtung der ELISPOT-Daten. – bedeutet weniger 10 positive spots; + zwischen 10 und 25 spots; ++ zwischen 25 und 50; +++ zwischen 50 und 100; ++++ über 100; (+) die Anzahl der gemessenen spots sind grenzwertig; * bedeutet die Werte sind nicht relevant, da der verwendete Gag-Peptidpool vermutlich nicht mehr funktionell war.

C.3.3.2 DPZ 1-Studie

Ungefähr 5 Monate zeitlich versetzt zu der oben beschriebenen Studie wurde Anfang 2001, in Zusammenarbeit mit PD Dr. Christiane Stahl-Hennig, eine weitere Primatenstudie am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen gestartet. In dieser Studie sollte einerseits unterschiedliche Applikationsformen (*nasal* vs. *intramuskulär/ intradermal*) der zweiten MVA-Auffrischungsimpfimmunisierung vergleichend analysiert werden, als auch die Wirksamkeit der verwendeten Vektoren bezüglich eines *rektalen Challenge* getestet werden. Zwar gewährleistet das *intravenöse Challenge* eine sicherere Infektion mit dem pathogenen Virus, doch ist der *vaginale* oder *rektale* Übertragungsweg für das humane System von größerer Bedeutung. Aufgrund der Tests von Blutkonserven und der Verwendung von Einmalspritzen ist die *intravenöse* Übertragung in den letzten Jahren drastisch zurückgegangen. Auch wurde im Vergleich zur BPRC-Studie in dieser Studie zum Teil andere kodonoptimierte DNA-Vektoren getestet (SIV_{mac239} syngag-pol, 89.6P synenv-120, 89.6P synenv-160).

Verwendete Impfstoffkonstrukte

- **DNA-Impfstoffvektoren:** Als DNA-Vektoren zur Expression viraler Genprodukte wurden in dieser Studie die Konstrukte SIV_{mac239} syngag-pol, 89.6P synenv-120 als auch 89.6P synenv-160 unter der Kontrolle des humanen CMV Promotors (HCMV IE1) im pcDNA 3.1-Vektor (Stratagene) verwendet.
- **MVA-Impfstoffvektoren und Challengevirus:** Wie bereits für die oben beschriebene Studie wurden auch in dieser Studie die von Prof. Bernhard Moss (NIH) zur Verfügung gestellten MVA's (SIV_{mac239} gag-pol als auch HIV_{89.6P(KB9)} env Gp160), zur Verstärkung der DNA-basierten Immunantwort verwendet. Zur Belastung der immunisierten Tiere wurden 40 MID₅₀ infektiöse Einheiten des schon beschriebenen SHIV_{89.6P} Schwarmvirus verwendet. Der *Challenge* erfolgte *rektal*, 40 Wochen nach der ersten, bzw. acht Wochen nach der letzten Auffrischungsimpfimmunisierung.

Immunisierungsgruppen

Drei Gruppen zu je zwei Tieren und zwei Gruppen mit vier Tieren, wurden vor Versuchsbeginn auf retro- oder lentivirale Infektionen getestet. Keines der Versuchstiere erwies sich als positiv oder zeigte immunsupprimierende Eigenschaften.

Die Tiere der Gruppe A bis C wurden als Kontrolltiere verwendet und nicht oder mit DNA- und MVA-„Leer-Vektoren“ immunisiert. Den Gruppen B und C wurde 1mg pcDNA3.1 pro Tier und Immunisierung verabreicht. 0,5mg endotoxin-freie Plasmid DNA wurde *intramuskulär* in die Sitzbeinmuskulatur (Ketamininjektion), die restlichen 0,5mg wurden *intradermal* in *gequaddelter* Form verabreicht. Den Gruppen D und E wurde ein Gemisch aus 0,5mg SIV_{mac239} syngag-pol, 0,25mg 89.6P synenv-120 und 0,25mg 89.6P synenv-160 DNA zur Hälfte *intramuskulär* und zur anderen Hälfte, wie für die Gruppen B und C beschrieben, *intradermal* verabreicht. Nach 8 und 16 Wochen wurde die DNA-Impfung wiederholt. Nach 24 Wochen wurden 1×10^8 MVA Partikel (ohne virale Gene den Gruppen B und C; mit den viralen Genen gag-pol und env den Gruppen D und E), zur Hälfte *intramuskulär* und zur anderen Hälfte *intradermal* verabreicht. Die zweite MVA Immunisierung nach 32 Wochen wurde bei den Gruppen

B und D wieder wie die Erste *intramuskulär* und *intradermal* verabreicht. Der Gruppe C wurden 1×10^{10} MVAs (ohne virale Gene) und der Gruppe E 1×10^{10} MVAs (mit den viralen Genen gag-pol und env) *nasal* verabreicht.

Die Belastung mit dem pathogenem SHIV 89.6P erfolgte *rektal* 40 Wochen nach der ersten Immunisierung mit einer MID_{50} von 40 infektiösen Einheiten.

	Gruppe	Anz. der Tiere	Immunisierungskonstrukte		
Kontrollen:	(A)	2	Nicht immunisiert		
	(B)	2	DNA Leer-DNA (pcDNA) 0,5mg (im.)/ 5x 0,1mg (id.)	MVA Leer-MVA $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)	MVA Leer-MVA $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)
	(C)	2	DNA Leer-DNA (pcDNA) 0,5mg (im.)/ 5x 0,1mg (id.)	MVA Leer-MVA $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)	MVA Leer-MVA 1×10^{10} (nasal)
Experiment:	(D)	4	DNA SIV syngag-pol (0,5mg) 89.6P synenv-120 (0,25mg) u.160 (0,25mg) 0,5mg (im.)/5x 0,1mg (id.)	MVA Gag-Pol/Env $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)	MVA Gag-Pol/Env $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)
	(E)	4	DNA SIV syngag-pol (0,5mg) 89.6P synenv-120 (0,25mg) u.160 (0,25mg) 0,5mg (im.)/5x 0,1mg (id.)	MVA Gag-Pol/Env $2 \times 5 \times 10^7$ (im.) $5 \times 2 \times 10^7$ (id.)	MVA Gag-Pol/Env 1×10^{10} (nasal)

Abbildung C 27: Darstellung der verwendeten Menge an Immunisierungsvektoren sowie deren Verabreichungsform (Studie DPZ 1). **Leer-DNA**, heißt Verabreichung von DNA-Vektoren ohne funktionelles Insert; **Leer-MVA** heißt Verabreichung von MVA-Vektoren ohne kodierendes Fremdgen; **im.**, intramuskuläre Verabreichung des Antigens; **id.**, intradermale Verabreichung des Antigens.

In Abbildung C27 sind die Versuchsgruppen, sowie die verwendeten Antigene und Immunisierungsformen zusammenfassend dargestellt. Die Abbildung C28 gibt die zeitlichen Abläufe der Immunisierung, der Blutentnahmen, sowie die Zeitpunkte der Viruslastbestimmung nach Infektion wieder.

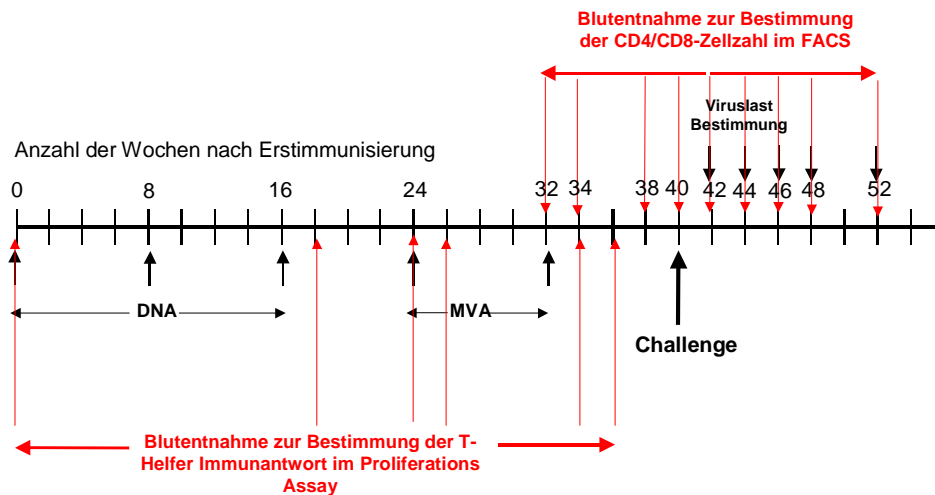


Abbildung C 28: Immunisierungs- und Ausleseprotokoll für die Primatenstudie DPZ 1. Die immunisierten Tiere wurden dreimal mit DNA- und zweimal mit MVA-Vektoren immunisiert. 40 Wochen nach Erstimmunisierung erfolgte der Challenge mit dem pathogenen Virusisolat 89.6P. Auslesen der T-Helferimmunantwort erfolgte im Proliferations-Assay, die Bestimmung der Viruslast mittels RT-PCR und der Verlauf der CD-4/CD8-Zellzahl sowie die Bestimmung der T_H„Memory“-Zellen wurde in FACS-Analysen bestimmt.

C.3.3.2.1 Proliferation SIV- und HIV-spezifischer T-Helferzellen

T-Helferzellen nehmen bei der Entstehung einer Antigen-spezifischen Immunantwort eine zentrale Stellung ein, da sie - von Ausnahmen abgesehen - sowohl für die erworbene zelluläre als auch für die humorale Antwort notwendig sind. Die Bestimmung der Proliferation spezifisch aktivierter T-Helferzellen wird daher für die Bewertung der Immunogenität der Impfstoffvektoren verwendet.

Die Proliferation von T-Lymphozyten in Folge spezifischer Stimulation wurde in frisch präparierten PBMCs zu den Zeitpunkten 0, 18, 24, 26, 34 und 36 Wochen nach der Erstimmunisierung durchgeführt. Die Zellen wurden in Dreifachansätzen mit SIV Gag VLPs 6h bei 37°C inkubiert. Als Marker für die Proliferation wurde der Einbau von Tritium (³H)-markierten Thymidin in proliferierende Zellen verfolgt. Phytohemagglutinin (PHA) wurde als positives, mitogen stimulierendes Kontrollantigen, Medium als Nullkontrolle verwendet. Die angegebenen Stimulationsindizes ergaben sich aus dem Quotienten des Thymidineinbaues und der Nullkontrolle. Indizes, deren Wert größer als 3,5 waren, wurden als positiv gewertet. Positive Stimulationsindizes wurden bei allen Tieren der Gruppen D und E gefunden. Die schlechtesten Werte der immunisierten Tiere hatte der Affe mit der Nummer 10126 aus der Gruppe D. Er wies nur einen Wert (24. Woche) auf, der sich klar positiv gegenüber den Daten der Kontrolltiere abhob. Hier wird deutlich wie unterschiedlich einzelne Tiere reagieren können, zumal bis zu Woche 26 die Gruppen D und E gleiche Mengen an DNA und MVAs über identischen Verabreichungsformen erhielten. Erst durch die zweite MVA-Auffrischungs-immunisierung nach 32 Wochen unterscheiden sich die Gruppen D (im./

id.) und E (*nasal*). Aus den Proliferations-Daten geht auch hervor, daß zwei Wochen nach dem zweiten MVA-Boost, in Woche 34, die Proliferations-Werte drastisch nachgaben. Nach weiteren zwei Wochen wiesen jedoch alle Tiere der Gruppe E, denen die zweite MVA-Immunisierung *nasal* verabreicht wurde, eindeutig positive Stimulationsindizes auf. Demgegenüber reagierte in der Gruppe D, zum gleichen Zeitpunkt nur ein einziges Tier positiv auf den Antigen-Stimulus. Somit scheint eine Auffrischungsimmunisierung mit MVAs am gleichen Ort und mit der gleichen Applikationsform nur schlecht zu funktionieren. Ein ähnliches Phänomen konnte auch bei einigen Zytokinantworten in der BPRC 2-Studie beobachtet werden.

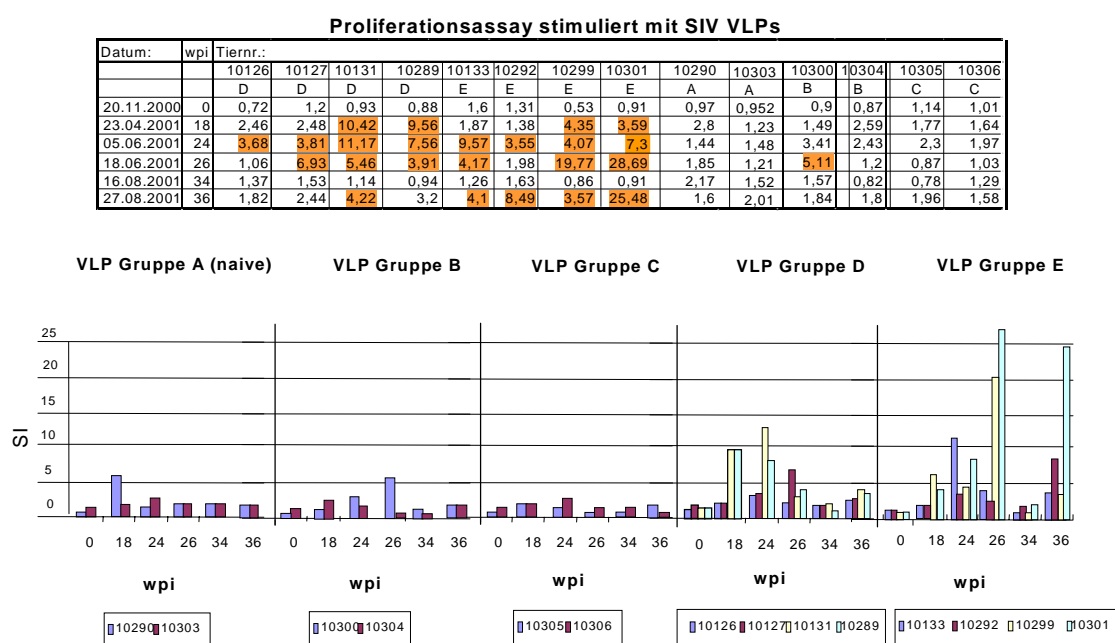


Abbildung C 29: Induktion einer spezifischen Proliferation der T-Helferzellen in immunisierten Makaken. Spezifische T-Zellproliferation wurde durch Einbau von ^3H -Thymidin in sich teilende PBMCs nach Stimulation mit SIV VLPs bestimmt. Spezifische Proliferation wird durch den Stimulationsindex (SI) bestimmt, der sich aus dem Quotienten der Aktivität zum Zeitpunkt der Messung und der Nullkontrolle (Medium) ergibt. Indizes größer 3,5 wurden als positiv gewertet und farblich hervorgehoben.

Neben der Stimulierung mit Gag VLPs, wurde zum Zeitpunkt der Grundimmunisierung bzw. 24 Wochen später isolierte PBMCs mit heterologem HIV env Gp120 (W61D) Protein stimuliert und auf ^3H -Thymidineinbau getestet. Keiner der aus den Immunisierten Tieren gewonnenen Werte lag nach 24 Wochen signifikant über den Werten der Nullkontrolle und der Kontrolltiere (Daten nicht gezeigt).

C.3.3.2.2 Virusbelastung im Blut nach Infektion mit dem pathogenen SHIV 89.6P Virus-Isolat

Die vakzinierten Affen wurden 40 Wochen nach der Erstimmunisierung *rektal* mit 40 MID₅₀ des hoch pathogenen SHIV_{89.6P} Isolats infiziert. Zur Kontrolle wurden auch zwei nicht geimpfte Affen infiziert (Gruppe A). Zu den Zeitpunkten 2, 4, 6, 8, und 12

Wochen nach dem *Challenge* wurde die Anzahl der viralen RNAs, mittels quantitativer RT-PCR, im Blut bestimmt. Zum Zeitpunkt 0, unmittelbar vor der Infektion, wurden keinerlei virale RNAs nachgewiesen. Zwei Wochen nach der Infektion wurde festgestellt, daß alle Tiere durch SHIV_{89.6P} infiziert wurden. Die Anzahl der RNA-Kopien lag zwischen 3×10^3 und 4×10^6 pro ml Blut. Acht Wochen nach der Infektion hatten beide nicht geimpften Kontrolltiere der Gruppe A mehr als 3×10^4 RNA Äquivalente pro ml Blut. Alle immunisierten Tiere der Gruppe D und E lagen unter diesem Wert. In der Gruppe E war nur noch bei einem Tier Virustiter nachzuweisen zum Zeitpunkt 6 Wochen lagen die Werte aller Tiere unter der Nachweisgrenze. Bei der Gruppe D war in einem Tier keine Viruslast mehr nachzuweisen. Die Titer der anderen 3 Tiere lagen zwischen 1×10^2 und 1×10^3 RNA Kopien pro ml Blut, was in jedem Fall für eine rasche Begrenzung der initialen Virämie spricht. Die beschriebenen Einzelwerte sind in Abbildung C30 dargestellt. Die Bestimmung der Mittelwerte der einzelnen Gruppen ist in Abbildung C34B graphisch dargestellt.

Viruslast (Anzahl der RNAs/ml Blut)

10290(A)	3,9E+6	2,3E+5	6,6E+4	4,2E+4
10303(A)	7,9E+5	2,1E+5	5,2E+4	3,7E+4
10300(B)	2,5E+6	8,3E+5	1,7E+4	9,7E+3
10304(B)	1,7E+5	2,9E+3	neg	neg
10305(C)	1,2E+6	7,4E+3	1,3E+2	neg
10306(C)	2,0E+6	1,1E+5	1,2E+4	9,1E+2
10126(D)	1,3E+5	9,3E+1	6,2E+1	3,8E+2
10127(D)	4,6E+5	1,2E+3	1,1E+3	1,7E+2
10131(D)	5,5E+4	neg	9,0E+3	1,7E+3
10289(D)	9,3E+3	neg	neg	neg
10133(E)	2,0E+4	9,1E+1	neg	neg
10292(E)	5,8E+5	2,0E+3	neg	neg
10299(E)	4,1E+3	5,5E+1	neg	6,7E+2
10301(E)	2,0E+3	2,2E+2	neg	neg

Wochen nach Infektion 2 4 6 8

Abbildung C 30: Viruslastbestimmung mittels PCR . Anzahl der RNA-Kopien pro ml Blut; bestimmt 2,4,6 und 8 Wochen nach Challenge mit dem pathogenem Virus 89.6P.

C.3.3.2.3 Bestimmung der Anzahl an CD4⁺ Zellen sowie das CD4/CD8 Verhältnis im Blut nach Infektion

Neben der Bestimmung der Viruslast im Blut, ist die Abnahme an CD4⁺ Zellen ein deutlicher Marker für den Verlauf der Virusinfektion. Da CD4⁺ T-Helferzellen der Hauptort der Virusreplikation sind, werden sie im Laufe der Virusreifung zerstört und das Verhältnis CD4⁺ zu CD8⁺-Zellen kehrt sich um (siehe auch A4).

Über einem Zeitraum von 16 Wochen nach Infektion wurde den untersuchten Tieren Blut entnommen und die Zellzahl an CD4⁺ bzw. CD8⁺-T-Zellen (CD3⁺-Marker für akti-

vierte T-Zellen) im FACS bestimmt. In Abbildung C28 ist der Verlauf der CD4⁺-Zellpopulation jeder Immunisierungsgruppe (B, C, D, und E) im Vergleich mit nicht immunisierten Affen (Gruppe A) dargestellt. Bereits zwei Wochen nach dem *Challenge* war bei den Affen, die nicht immunisiert wurden die CD4-Zellzahl unter 200. Einen ähnlichen drastischen Abfall der CD4-Zellzahl konnte auch in den Gruppen B und C, die mit Leervektoren immunisiert wurden, beobachtet werden. Anders verhielten sich die mit Antigen immunisierten Gruppen D und E. Hier konnte keine Reduktion der CD4-Zellzahl beobachtet werden. In der Gruppe D schwankten die Werte zwischen 500 und 1200, in der Gruppe E zwischen 800 und 1400 und lagen somit im Schnitt nicht unter den Werten zum Zeitpunkt der Infektion.

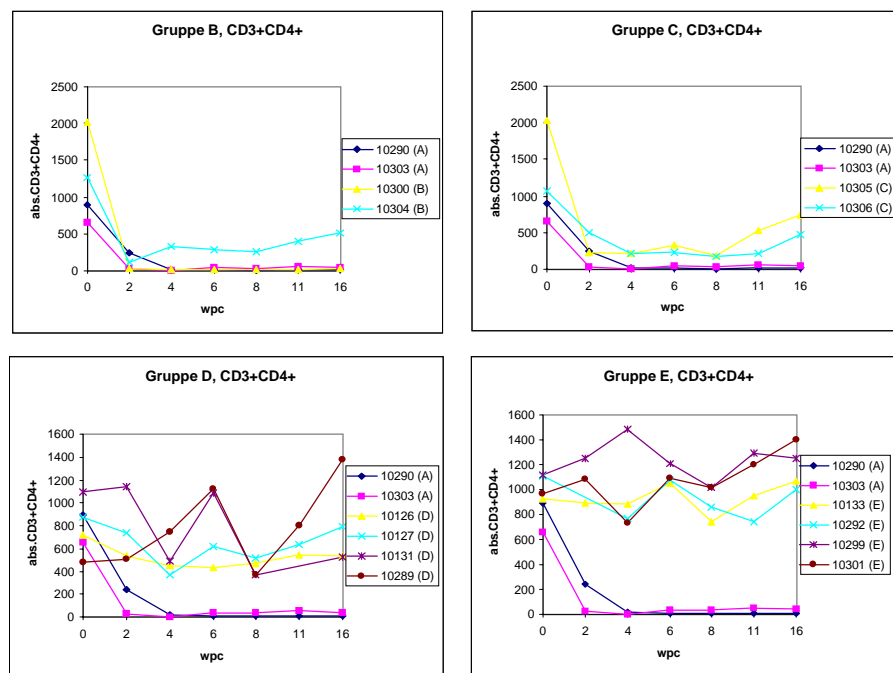


Abbildung C 31: FACS-Analyse : Bestimmung der CD4⁺-T-Zellpopulation (CD3⁺) nach Infektion mit dem pathogenen 89.6P SHIV-Isolat pro ml Blut. Die immunisierten Gruppen B, C, D und E wurden vergleichend mit der Gruppe A (nicht immunisierte Tiere) dargestellt; **wpc** (weeks post challenge).

Deutlich wird der positive Effekt der Immunisierung auch, wenn man das CD4/CD8 Verhältnis nach der Infektion über den Zeitraum von 16 Wochen betrachtet (Abbildung C32). Zwar fiel das CD4/CD8-Verhältnis zwei Wochen nach Infektion in der Gruppe D in drei von vier Tieren ab, doch stellte sich binnen kürzester Zeit das ursprüngliche Verhältnis wieder ein. In der Gruppe E, welche die zweite MVA-Immunisierung *nasal* verabreicht bekommen haben, war dieser kurzzeitige Abfall bei keinem Tier zu beobachten. Über den ganzen bisher untersuchten Zeitraum von 16 Wochen war das CD4/CD8-Verhältnis bei allen Tieren dieser Gruppe konstant.

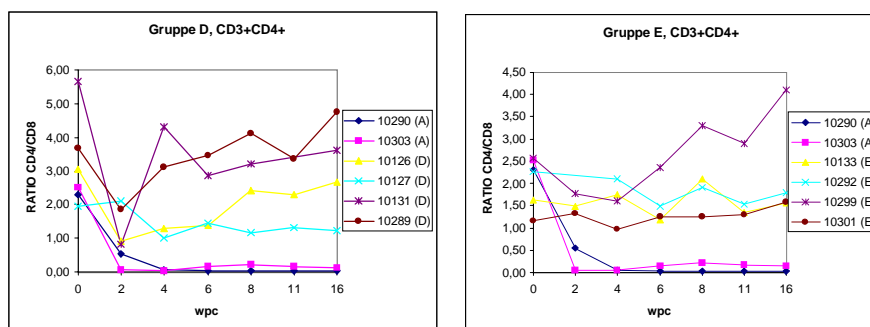


Abbildung C 32: FACS-Analyse : Bestimmung des Verhältnisses (RATIO) $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zell ($CD3^+$) nach Infektion mit dem pathogenen 89.6P SHIV-Isolat pro ml Blut. Die mit Antigen immunisierten Gruppen D und E wurden vergleichend mit der Gruppe A (nicht immunisierte Tiere) dargestellt; **wpc** (weeks post challenge).

C.3.3.2.4 Verlauf der T-Helfer-„Memory“-Zellpopulation nach Infektion

Ein weiterer wichtiger Marker zur Bewertung eines HIV-Impfstoffes ist die Induktion und Verlauf der T-Helfer-„Memory“-Zellen. Diese sind im Gegensatz zu anderen aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen sehr langlebig und können zum Teil über mehrere Jahre im Körper nachgewiesen werden. Ein Teil der $CD4^+$ -T-Zellen differenzieren nach Kontakt mit Fremdanitgenen zu „Memory“- Zellen, die im Affensystem anschließend CD29 auf der Oberfläche exprimieren. Diese Zellpopulation ist sehr wichtig für eine schnelle B-Zell- und ZTL-Antwort nach erneutem Kontakt mit Antigen. Wie aus der Abbildung C33 ersichtlich ist, bleibt die T-Helfer-Memory Population sowohl in der Gruppe D als auch in der Gruppe E, im Gegensatz zu den nicht immunisierten Tieren, konstant.

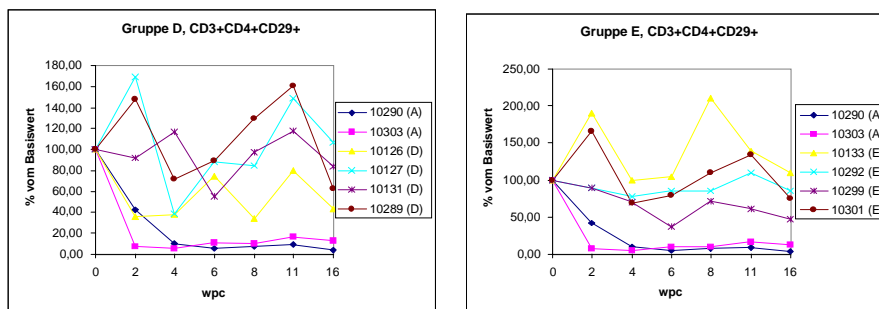


Abbildung C 33: FACS-Analys: Bestimmung der T-Helfer-Memory-Zellpopulation nach Infektion mit dem pathogenen 89.6P SHIV-Isolat im Blut. Die dargestellten Werte sind in Prozent vom Basiswert zum Zeitpunkt des Challenge angegeben. Die mit Antigen immunisierten Gruppen D und E wurden vergleichend mit der Gruppe A (nicht immunisierte Tiere) dargestellt; **wpc** (weeks post challenge).

C.3.3.2.5 Kurzzusammenfassung (IIIB)

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle Affen auch über den *rektalen* Infektionsweg infiziert wurden und in der Gruppe E drei von vier Tieren zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Infektion vollständig geschützt waren. In Abbildung C34B sind die Mittelwerte der einzelnen Guppen dargestellt und hier wird auch sehr deutlich, daß die initiale Viruslast sowohl in der Gruppe E als auch in der Gruppe D im Vergleich zu den Kontrollen deutlich reduziert war. Auch im Proliferations-Test deutete sich der positive Effekt durch die *nasale* Verabreichung der zweiten MVA-Auffrischungsimpfimmunisierung an (Abbildung C29). Durch die spezifische Immunisierung konnte sowohl in Gruppe D als auch in Gruppe E die Reduktion der CD4-Gesamtpopulation (siehe auch Abb. C34A) wie auch die für den langanhaltenden Schutz essentiellen T-„Memory“-Zellen (Abb. C33) des Immunsystems durch das hoch pathogene Virus SHIV_{89.6P}, verhindert werden. Diese Versuchsreihe hat uns einen vielversprechenden Ansatz für weiterführende humane Studien geliefert. Jedoch muß auch erwähnt werden, daß noch nicht alle immunologischen Parameter dieser Studie zum heutigen Zeitpunkt ausgelesen wurden. So stehen in den nächsten Monaten noch die Testung der *mukosalen* als auch *neutralisierenden* Immunantwort an.

Mittelwerte der untersuchten Gruppen

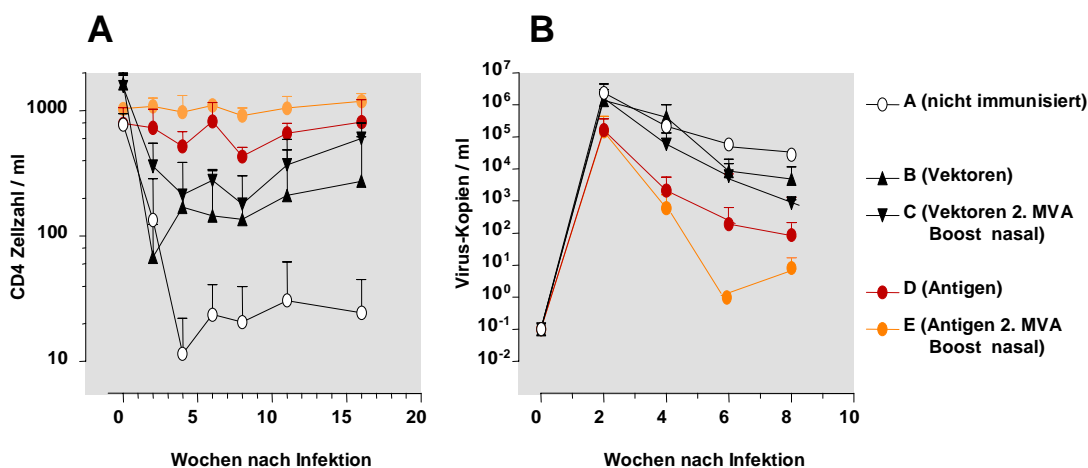


Abbildung C 34: Zusammenfassung der Studie DPZ 1. A: Verlauf der CD4-Zellzahl pro ml Blut 4, 6, 8, 12 und 16 Wochen nach Infektion mit SHIV_{89,6P} (Angabe des Mittelwertes der einzelnen Gruppen mit Standardabweichung). B: Verlauf der Viruslast pro ml Blut 2, 4, 6 und 8 Wochen nach Infektion mit SHIV_{89,6P} (Angabe des Mittelwertes der einzelnen Gruppen mit Standardabweichung).

C.4 Entwicklung und Herstellung von Expressionskonstrukten für humane Studien

Die Daten aus unseren Tierexperimenten haben gezeigt, daß die von uns verwendeten Antigene sicher und hoch immunogen sind. Um jedoch die hohe Variabilität der unterschiedlichen HIV-Varianten zu berücksichtigen, sollten im Vorfeld einer Impfstoffstudie die lokalen Virusvarianten molekular biologisch analysiert werden. Analysen im Südwesten von China (Yunnan), dem langfristigen Einsatzort unserer Vakzine, wurde das für diese Region representative Virusisolat 97-CN54 identifiziert (Su et al., 2000). Dieses Isolat ist ein Mosaikvirus aus B- und C-Typ Varianten. Es wurde als Ausgangsisolat für die von uns hergestellten humanen DNA-Vakzinekonstrukte gewählt.

Herstellung der humanen DNA-Expressions-Vektoren

Die Herstellung und Klonierung der unterschiedlichen synthetischen, an hochexpressierende Säugergene (Wada et al., 1990) angepassten DNA-Konstrukte erfolgte in analoger Weise, wie es für das SIV syngag-Konstrukt unter B. 3 beschrieben ist. Alle hergestellten Zwischenkonstrukte wurden über Kpn I und Sac I im pCR-Script Klonierungsvektor zusammengebaut.

Bei dem C-syngag-pol-nef Konstrukt wurde der natürliche *frameshift* zwischen gag und pol modifiziert um ein Durchleseprotein zu generieren. Somit werden gleiche Mengen

an gag und pol Genprodukte hergestellt und unter der Kontrolle eines CMV exprimiert. Desweiteren wurde die Myristilierungsstelle durch Austausch von Glyzin zu Alanin zerstört. Ziel dieser Mutation war es, das *Budding* in der transfizierten Zielzelle zu unterbinden. Damit kommt es zu einer intrazellulären Anhäufung des Antigens in der Zielzelle, welches somit in größeren Mengen an der Oberfläche über MHC I präsentiert werden kann. Aus Gründen der Sicherheit wurde zum einen das aktive Zentrum der Protease (Austausch: Aspartat zu Asparin, D \rightarrow N), der Reversen Transkriptase (durch Integration der *gescrambelten* nef-Sequenz in das aktive Zentrum) zerstört als auch die kodierende Sequenz der Integrase vollständig entfernt. Um nicht möglicherweise wichtige Epitope zu verlieren, wurde das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase 3' an den C-Terminus der Reversen Transkriptase kloniert.

Vom Env-Gen wurden analog zu den 89.6P-Konstrukten (siehe C3.1) vier unterschiedlich lange C-synenv-DNA-Vektorkonstrukte generiert (C-env-120, 140, 140TM und 160). Im Unterschied zu den synthetischen 89.6P-Konstrukten wurde für die humanen Studien keine CD5-Leader-Sequenz sondern die Konsensussequenz eines optimierten Leaders verwendet (persönliche Mitteilung von Prof. Liljestrom). In Abbildung C35 sind die für die humane Studie hergestellten Vektoren graphisch dargestellt. Die Nukleinsäure Sequenzen der Konstrukte sind im Anhang aufgelistet.

Die Entwicklung und Produktion von DNA-Vektoren, die in humanen Studien eingesetzt werden, unterliegen einem hohen Sicherheitsanspruch und können somit nur in speziellen Firmen, die eine Produktion unter GMP Bedingungen gewährleisten können, hergestellt werden. In unserem Fall erfolgt diese Zusammenarbeit mit Dr. Rocky Cranenburgh von *Cobra Therapeutics*, GB. Zwei der in der Abbildung C35 beschriebenen Konstrukte (C-synenv-120 und C-syngag-pol-nef) werden aktuell in den finalen Expressionsvektor pORT unter der Kontrolle eines CMV-Promotors kloniert. Die Verwendung des Expressionsvektor pORT für die humanen Studien hat eine Reihe von Vorteilen. Aufgrund des sehr kleinen Vektorrückgrades von 2296Bp werden die finalen Konstrukte nicht größer als ~6700Bp für das C-syngag-pol-nef- und ~3800Bp für das C-synenv-120-Konstrukt sein und somit eine Größe besitzen, die noch gut von Zellen aufgenommen werden kann. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß dieser Vektor schon in Menschen auf Verträglichkeit und Effektivität getestet wurde und aus Gründen der Sicherheit keine Antibiotika-Resistenzgene mehr besitzt.

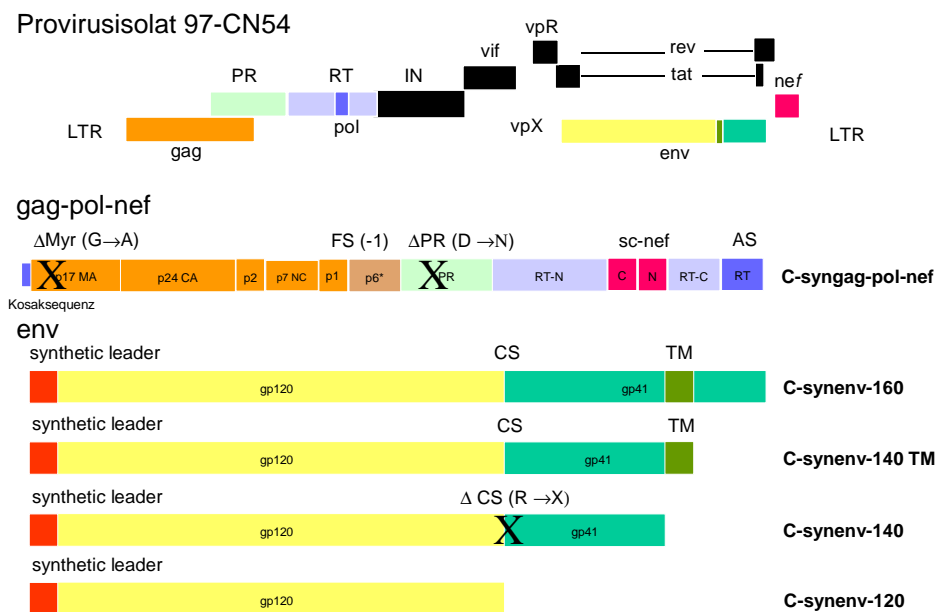


Abbildung C 35: Graphische Darstellung unterschiedlicher synthetischer DNA-Vakzinekonstrukte für die Austestung im humanen System.

C-syngag-pol-nef Konstrukte: **Kosaksequenz:** eukaryontische Translationsinitiationssequenz [GCC GCC ACC] (Kozak, 1987). **Δ PR:** Zerstörung des aktiven Zentrums der Protease (Austausch der AS Aspartat zu Asparagin). **ΔMyr:** Zerstörung der Myristylierungsstelle (Austausch der AS 2, Glyzin zu Alanin). **RT-N und RT-C:** Zerstörung des aktiven Zentrums der Reversen Transkriptase durch Integration eines nicht funktionellen nef-Gens. **Scr nef:** „scrambled nef“ ist ein nicht funktionelles nef Gen, bei dem der N- und C-terminale Bereich vertauscht zusammengebaut wurden. Somit wurde die Funktion des Gens zerstört aber möglicherweise relevante Epitope erhalten. **RT (AS):** Aktives Zentrum der Reversen Transkriptase.

C-synenv Konstrukte: Die AS-Sequenz der synthetischen Env-Konstrukte beruhen auch auf dem Provirusisolat 97-CN54 (Su et al., 2000). **syntheticleader:** optimierte Signalsequenz; **Δ CS:** zerstörte Gp 120 Spaltstelle; **TM:** Transmembrandomäne.

Die fertiggestellten neuartigen DNA-Impfstoffe werden anschließend im Rahmen eines europäischen Forschungsverbundes (EUROVAC) in Amsterdam und Lausanne in klinischen Studien der Phase I auf Verträglichkeit und Wirksamkeit voraussichtlich ab dem vierten Quartal des Jahres 2002 getestet.

D – DISKUSSION

D.1 Anforderungen an eine erfolgversprechende HIV-Vakzine

Die bisherigen Erfahrungen und ernüchternden Daten aus klinischen Vakzinestudien lassen die Maximalforderung nach einer sterilen Immunität, die ein klinisch einsetzbarer Impfstoff-Kandidat induzieren soll in den Hintergrund getreten. Vorrangiges Ziel einer HIV-Vakzine ist daher die Induktion einer langanhaltenden Immunität, die in der Lage sein sollte, die Virusreplikation zu senken und auf niedrigem Niveau zu kontrollieren, um den Ausbruch der Erkrankung zu verhindern.

D.1.1 Immunologische Anforderungen an eine HIV-Vakzine

Bis heute gibt es nur wenig Aufschluß darüber, welche Immunmechanismen effizient zur Abwehr einer HIV-Infektion beitragen können. Daher sollte ein wirksamer HIV-Impfstoff im Idealfall sowohl eine stark zellvermittelte Immunantwort als auch die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren. Dies würde die Etablierung einer Infektion verhindern oder wenigstens eine persistierende Infektion nach Übertragung von freiem oder zellgebundenem Virus unterbinden (Fast et al., 1993). Gemessen an der Bedeutung des sexuellen Übertragungsweges sollte das Virus idealerweise bereits an der Eintrittspforte, durch eine starke **mukosale Immunantwort**, aufgehalten werden. Sekretorische HIV-spezifische IgA Antikörper könnten somit das Virus an der Eintrittspforte daran hindern, körpereigene Zellen zu befallen und eine Primärinfektion auszulösen (Clerici et al., 1999; Kaul et al., 1998; McGhee et al., 1993; Staats et al., 1994).

Desweiteren sollte eine geeignete HIV-Vakzine im Idealfall auch **neutralisierende Antikörper** induzieren, die sich gegen konservierte Regionen, sowie konformationelle Epitope richten (Montefiori et al., 1999; Moore et al., 1999; Sattentau et al., 1995).

Studien an langzeitüberlebenden HIV-Patienten (Cao et al., 1995), Prostituierten mit hohem Infektionsrisiko (Rowland Jones et al., 1995), Partnern von HIV-Infizierten und Säuglingen HIV-infizierter Mütter (Bryson et al., 1995) deuten auf eine essentielle Beteiligung CD8-positiver, zytolytischer T-Zellen (ZTL) an der Kontrolle der HIV-Replikation hin (Goulder et al., 1996; Pantaleo et al., 1994; Wagner et al., 1998). Auch wird als mögliche Ursache für die Verlängerung der asymptomatischen Phase bei Langzeitüberlebenden die gerichtete **ZTL-Antwort gegen immundominante, hochkonservierte Regionen**, in funktionell wichtigen Bereichen unterschiedlicher HIV-1 Proteine; diskutiert (Harrer et al., 1998; Nowak et al., 1995; Phillips et al., 1991; Rowland Jones et al., 1992). Die Induktion einer effizienten zellulären Immunantwort und die Bildung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen scheint somit bei der Kontrolle und Elimination virusinfizierter Zellen von essentieller Bedeutung zu sein (Borrow et al., 1994; Walker et al., 1987; Walker et al., 1990). Aus diesem Grund sollte eine HIV-Vakzine nicht nur eine humorale, sondern auch eine effiziente zelluläre Immunantwort, sowie die Bildung langlebiger Gedächtniszellen induzieren können.

D.1.2 Antigene zur Induktion einer spezifischen Immunantwort

Das einzige virale HIV Genprodukt, von dem bislang bekannt ist, daß es neutralisierende Antikörper induziert ist der „**envelope glycoprotein complex**“. Dieser Komplex besteht aus drei Gp120- und drei Gp41- Untereinheiten; Er ist für das Anlagern des Virus sowie dessen Aufnahme in die Wirtszelle verantwortlich. In den letzten Jahren wurden zwar einige neutralisierende HIV-1 Env-Epitope (z.B. ELDKWA „2F5“ – Epitop am C-Terminus von Gp41 als auch GPGRAFY-Epitop im Gp120) gefunden, doch sind diese neutralisierenden Antikörper in infizierten Menschen sehr selten (Moore et al., 1997). Jeglicher Versuch das 2F5 Epitop als Peptid oder als Peptidfragment innerhalb eines komplexeren Immunogens dem Immunsystem zu präsentieren ist fehlgeschlagen (Coeffier et al., 2000; Eckhart et al., 1996; Liang et al., 1999; Purtscher et al., 1996). Anscheinend ist das „wahre“ Epitop im nativen Komplex abhängig von anderen Regionen im Gp41 oder Gp120. Da die neutralisierenden Antikörper nur bedingt kreuzreaktiv (Moore et al., 1995b) sind, ist die Entwicklung eines Impfstoffes, aufgrund der hohen genetischen Vielfalt der HIV-Subtypen, sehr schwierig. Um dieses Problem zu umgehen, gibt es zwei Alternativen. Entweder man paßt die Vakzine an lokale repräsentative Virusvarianten an oder verwendet analog der Grippe-Impfung ein Gemisch an Hüllproteinen unterschiedlichster Isolate. Andere Arbeitsgruppen versuchen neutralisierende Antikörper zu induzieren, indem sie Disulfid-Brücken stabilisierte oligomere Env-Konstrukte (Farzan et al., 1998) oder metastabile Gp120/Rezeptorstrukturen (Kwong et al., 1998) verwenden.

Während eine Immunisierung mit aufgereinigten, rekombinanten HI-viralen Hüllproteinen oder mit entsprechenden DNA-Vakzine-Kandidaten vornehmlich auf die Induktion der humoralen Immunantwort abzielt, sollte dagegen eine Vakzine gegen die **Strukturproteine** und **Regulatorproteine** vornehmlich die zelluläre Immunantwort stimulieren. Eine Vielzahl immunogener HIV-spezifischer Epitope wurde innerhalb der Strukturproteine Env, Gag und Pol, als auch der regulatorischen und akzessorische Proteine Tat, Rev, Nef und Vpr identifiziert. Aufgrund der hohen Variabilität der unterschiedlichen Virussubtypen, sind Virus-Isolat übergreifende hoch-konservierte Epitope von besonderem Interesse. Das virale Strukturprotein Gag enthält eine Vielzahl konservierter T-Helfer- und ZTL-Epitope und wird zudem in der Zielzelle in großer Menge exprimiert (Caley et al., 1999; Harrer et al., 1996b; Harrer et al., 1998; Klein et al., 1995b; Lynch et al., 1998; Wagner et al., 1999). Aber auch die nur zeitweise, bzw. in geringeren Mengen, exprimierten Proteine Rev, Tat und Pol beinhalten konservierte Epitope. Zwar sind diese Epitope im Rahmen einer Infektion, aufgrund der geringen Expression, nicht in der Lage ZTLs zu induzieren, dennoch reicht die Expression aus, um Antigen auf der Oberfläche zu präsentieren. Effiziente Vakzine-Konzepte, die gegen die früh im viralen Replikationszyklus exprimierten Proteine Tat und Rev gerichtet sind, könnten die HIV-Replikation in einem frühem Stadium inhibieren und infolgedessen eine systemische Ausbreitung des Virus verhindern. Klinische Daten konnten zeigen, daß virusspezifische ZTLs essentiell bei der Kontrolle einer chronischen HIV-Infektion sind (Musey et al., 1997). Desweiteren besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Auftreten von HIV-spezifischen ZTLs bzw. einer T-Helferresponse und der Anzahl von Viruspartikeln im Blut (Ogg et al., 1998; Rosenberg et al., 1997).

D.1.3 Mögliche Vektorsysteme zur Induktion einer ZTL-Immunantwort

Die Induktion spezifischer ZTLs kann durch unterschiedliche „Antigen-Delivery-Systeme“ wie Peptide, Proteine, rekombinante bakterielle und virale Vektoren als auch durch Plasmid DNA erfolgen.

D.1.3.1 „Antigen-Delivery-Systeme“

VLPs

Polyvalente Proteinaggregate stellen hochimmunogene Antigene dar. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, daß durch partikuläre Strukturen im Vergleich zu nicht-aggregierten Proteinen neben wesentlich effizienterer Induktion von spezifischen Antikörpern und CD4⁺ T-Helferzellen auch CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen induziert werden konnten (Harris et al., 1992; Layton et al., 1993; Milich et al., 1985; Milich et al., 1986; Schirmbeck et al., 1994b). Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 1996 im Balb/C Maus-Modell zeigen (Deml et al., 1997a; Wagner et al., 1996b), daß exogen verabreichte, replikationsinkompetente Pr55^{gag}-VLPs, in denen kleine Fremdproteine durch Integration in ausgewählte Regionen des Pr55^{gag}-Polyproteins eingebaut wurden, effiziente Stimulatoren der zellvermittelten Immunantwort darstellen. In Makaken konnte mit diesen VLPs eine effiziente Antikörperantwort gegen das Pr55^{gag}-Polyprotein induziert werden, allerdings besaßen die Immunseren dieser Tiere keine virusneutralisierenden Eigenschaften (Notka et al., 1999a).

Virale Vektorsysteme

Rekombinante Viren stellen eine Variante von Lebendimpfungen dar. Hierbei werden Impfviren, die ihre pathogene Eigenschaft verloren haben – meist Poxviren (**New York vaccinia virus** (NYVAC; (Tartaglia et al., 1992; Tartaglia et al., 1994), ALVAC, fowlpox, canarypox und **Modified Vaccinia virus Ankara** (MVA) (Belyakov et al., 1998; Hanke et al., 1999; Seth et al., 1998; Sutter et al., 1992; Sutter et al., 1995)) – mit gentechnologischen Methoden so verändert, daß sie außer für ihre eigenen, zur Infektion und Replikation benötigten Genprodukte auch große Fremdgene anderer Organismen beinhalten können. Attenuierte Pox-Virus Vektoren wie MVA können zwar Humane- und Primaten-Zelllinien infizieren aber nicht mehr replizieren. Die Expression der Proteine erfolgt im Zytoplasma und ist somit unabhängig von Regulationen bezüglich des Kern Im- und Exports. Die Kultivierung von attenuierten MVAs erfolgt in embryonalen Hühnerfibroblasten. Mit diesem Vektorsystem konnte in einer Reihe von Tiermodellen ein Impfschutz sowohl gegen virale als auch bakterielle Infektionen, durch Induktion einer starken humoralen und zellvermittelten Immunantwort, beobachtet werden (Moss et al., 1984; Paoletti et al., 1984; Smith et al., 1983b; Wiktor et al., 1992). Weitere mögliche Kandidaten viraler Vektorsysteme stellen rekombinante Rhinoviren, Polioviren, SFV (Semliki Forest Virus) und Adenoviren dar.

Bakterielle Vektorsysteme

Nicht nur virale sondern auch bakterielle Vektorsysteme werden verwendet, um Fremdgene zu exprimieren. Erste Studien zeigen neben der humoralen und zellvermittelten eine erhöhte mukosale Immunantwort durch bakterielle Vektoren (Velin et al., 1998) (Übersicht: (Velin et al., 2000)). Dies gilt sowohl für die Vektoren *Salmonella typhimurium* (Burnett et al., 2000; Steger et al., 1997) als auch für

Streptococcus gordonii (Di Fabio et al., 1998; Oggioni et al., 1999). Neuestes Vektorsystem sind hyperattenuierte *Listeria monocytogenes* Stämme, die vielversprechende Immunantworten im Mausmodell generieren (Friedman et al., 2000; Rayevskaya et al., 2001). Ob die induzierten Immunantworten ausreichenden Schutz vor einer mukosalen HIV Infektion liefern, werden erst zukünftige Studien im Primatenmodell zeigen.

Attenuierte Lebendimpfstoffe haben nicht nur Vorteile sondern weisen auch Gefahren auf. So können Komplikationen bei bereits HIV-infizierten oder immunsuprimierten Personen, die mit attenuierten Vektoren immunisiert wurden, auftreten. Studien haben gezeigt, daß es zu heftigen lokalen Reaktionen sowie einer generalisierten Virusausbreitung kommen kann, die im schlimmsten Fall auch zum Tod führt (Picard et al., 1991; Redfield et al., 1987). Ein weiteres Problem bei der Verwendung von Rekombinanten Vektorsystemen besteht darin, daß auch Immunantworten gegen den Vektor *per se* induziert wurden und somit der gleiche Vektor nicht für unterschiedliche Impfstoffe verwendet werden kann.

Rekombinante DNA-Vakzine

In den vergangenen Jahren wurde wiederholt die Wirksamkeit einer DNA-Vakzine in unterschiedlichen Tiermodellen analysiert. So wurden effiziente DNA-Vakzine Kandidaten gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen viralen Krankheitserregern (z.B. dem Influenza Virus, Tollwutvirus, Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus und Masernvirus) aber auch gegen bakterielle Erreger (*Mycobacterium tuberculosis*) entwickelt und auf Immunogenität hin analysiert (Übersicht: (Schultz et al., 2000)). Die Immunisierung mit „nackter“ DNA bietet die Möglichkeit, sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort zu induzieren (Ulmer et al., 1993). Insbesondere das Vorkommen von unmethylierten CpG-Dinukleotiden in einem besonderen Basenkontext (CpG-Motiv) innerhalb bakterieller DNA bewirkt eine direkte Stimulation von B-, T- und natürlichen Killerzellen (Ballas et al., 1996; Krieg et al., 1995; Stacey et al., 1996) und trägt aufgrund der freigesetzten Zytokine (IL-6, IL-12 und INF- γ) zur gesteigerten Immunogenität der DNA-Vakzine bei (Klinman et al., 1996). Seit zirka vier bis fünf Jahren werden auch verschiedenste HIV/SIV-spezifische DNA-Vakzine Kandidaten entwickelt und in unterschiedlichen Tiermodellen getestet (Barouch et al., 2000; Fuller et al., 1997; Robinson et al., 1997; Shiver et al., 1997).

D.1.3.2 Modifikation von „nackter“ DNA durch Kombination mit Adjuvantien oder anderen Vektorsystemen

Arbeiten von Liu et al. haben gezeigt, daß die durch DNA-Vektoren induzierte Immunantwort durch mehrmalige Verabreichung der Plasmid-DNA gesteigert werden kann (*Prime-Boost*) (Shiver et al., 1997). Diese gesteigerte Immunantwort war auch über einen längeren Zeitraum stabil. Es konnten spezifische Antikörper noch nach zwölf Monaten in den immunisierten Mäusen nachgewiesen werden.

Um die von nackter DNA induzierte Immunantwort im Hinblick auf die Verwendung in Primatenstudien zu steigern, werden unterschiedlichste Ansätze analysiert.

Ein Ansatzpunkt bei der oralen Verabreichung von DNA besteht z.B. darin, daß die Plasmid-DNA in Kombination mit **kationischen Liposomen** verabreicht werden kann. Koltover und Kollegen konnten zeigen, daß die Transfektion von Säugerzellen mit

Plasmid-DNA durch die Anwesenheit von Liposomen erleichtert wird (Koltover et al., 1998). Aber auch erhöhte Immunogenität in *in vivo* Versuchen legt nahe, daß die Verwendung von Liposomen die DNA zum einem vor Degradation schützt, aber auch die Aufnahme der DNA in die Mukose gefördert wird. Die genaue Funktions- und Wirkungsweise ist jedoch noch nicht bekannt.

Ein anderer Ansatz besteht z.B. darin, durch **Ko-Expression von Zytokinen** die Immunogenität der DNA zu steigern. Chow et al. konnte im Mausmodell zeigen, daß die Koverabreichung von IL-12 und INF- γ kodierenden Genen, zu einem Hepatitis-B DNA-Impfstoffes die TH1 vermittelte Immunantwort steigern konnten (Chow et al., 1998). Die Koverabreichung von IL-4 bewirkte eine Reduktion der TH1- und einen Shift zu einer gesteigerten TH2-Immunantwort. Die Arbeitsgruppe um Lee z.B. verwendete bicistronische Plasmide, die neben dem E1 und E2 Hüllgenen von HCV auch das Gen von GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) beinhaltet (Lee et al., 1998). Auch Studien in Ratten konnten zeigen, daß die zusätzliche Expression von GM-CSF die spezifische Immunantwort gegen E1 und E2 steigern konnte.

Eine weitere Möglichkeit, die Effektivität von DNA-Plasmiden zu steigern, kann durch Einfügen von immunstimulatorischen bzw. der Eliminierung von inhibitorischen Sequenzmotiven (CpG-Motiven) erreicht werden. Dieser Möglichkeit wird auch in unserer Arbeitsgruppe intensiv nachgegangen. Das Problem bei den immunmodulierenden Motiven besteht darin, daß nur diejenigen Motive berücksichtigt werden können, die bereits bekannt sind. Vor allem Arbeiten von Krieg, Sato und Davis konnten den immunmodulatorischen Effekt durch Verabreichung von CpG Oligonukleotiden im Maussystem beschreiben (Davis et al., 1998; Krieg, 1996; Sato et al., 1996). Neueste Arbeiten zeigen, daß die im Mausmodell funktionellen Motive nicht diejenigen sind, die in Primaten- und Humanensystemen eine Rolle spielen (Davis, 2000; Hartmann et al., 2000b; Hartmann et al., 2000a).

Nicht nur durch Verwendung von immunstimulatorischen Regionen, sondern auch durch Modifikationen im verwendeten Antigen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, kann eine erhöhte Immunogenität der DNA-Konstrukte generiert werden. Dies gelingt durch Zerstörung von inhibitorischen Regionen und Entkoppelung des verwendeten Antigens aus seiner natürlichen Regulation im Zellkern.

Die meisten der aktuell analysierten HIV-spezifischen DNA-Vakzinekandidaten werden sowohl in den Primaten als auch in den ersten humanen Phase I Studien im Prime-Boost-Verfahren auf Sicherheit und Immunogenität ausgetestet. Plasmid-DNA wird sowohl in Kombination mit anderen rekombinanten Vektoren wie z.B. ALVAV und MVA (Amara et al., 2001; Heeney et al., 1999; Letvin et al., 1997) aber auch kombiniert mit Protein (Boyer et al., 2000) verabreicht.

D.1.4 Einfluß der Immunisierungsroute auf Immunogenität von DNA-Impfstoffen

D.1.4.1 Intramuskuläre Immunisierung

Die am häufigsten verwendete Verabreichungsform von DNA ist die Nadelinjektion in die Skelettmuskulatur. Die *intramuskulär* injizierte DNA liegt meist episomal vor und kann über einen Zeitraum von etwa zwei Monaten im Skelettmuskel (Davis et al.,

1993), aber auch in einer Vielzahl von inneren Organen, wie z.B. der Lunge oder Leber nachgewiesen werden (Malim et al., 1992; Winegar et al., 1996; Wolff et al., 1992). Jedoch ist die *in vivo* Aufnahme von Plasmid-DNA in Muskelzellen sehr gering. Einige Arbeitsgruppen konnten im Maus- und Rattenmodell durch kontrollierte Zerstörung und Regeneration von Muskelzellen mit Kardiotoxin eine erhöhte Aufnahme der Plasmid-DNA in sich regenerierenden Muskelzellen beobachten. Der Mechanismus, der für die Induktion einer effizienten Immunantwort nach *intramuskulärer* Immunisierung verantwortlich ist, wird kontrovers diskutiert. Muskelzellen exprimieren nur geringe Mengen an MHC-Klasse I Molekülen auf der Oberfläche und besitzen keine kostimulatorischen Membranproteine wie B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) oder MHC-Klasse II Moleküle (Whalen et al., 1995). Wenn die Muskelzelle keine Antigen-präsentierende Zelle (APZ) ist, wie ist dann die induzierte Immunantwort zu erklären ? (I) Einige Arbeitsgruppen gehen davon aus, daß durch die Injektion der DNA und der Verwendung von Kardiotoxin lokal durch eine Entzündungsreaktion Interferon freigesetzt wird, das in der Lage ist, die MHC-I Expression in Muskelzellen zu erhöhen. Wahrscheinlicher ist jedoch (II), daß die transfizierten Muskelzellen durch Sekretion oder Zellyse, lösliche Antigen oder apoptotische Vesikel, die dann von professionellen APZ aufgenommen werden und eine Immunantwort induzieren. Eine dritte Möglichkeit besteht darin (III), daß die DNA direkt von professionellen APZs wie z.B. den Dendritischen Zellen, die sich auch zwischen den Muskelzellen befinden, aufgenommen wird. Nach Aufnahme von Antigen differenzieren diese und wandern in die umliegenden sekundären, lymphatischen Organe (Lymphknoten) (Cho et al., 2001; Fu et al., 1997; Ulmer et al., 2000). Dort findet schließlich die Antigen-spezifische Stimulation naiver T-Lymphozyten statt, die wiederum in die primären Lymphorgane, wie z.B. der Milz, einwandern und die Bildung langlebiger Gedächtniszellen (*memory cells*) induzieren können. APZs sind somit in der Lage, Antigene sowohl MHC-Klasse I wie auch MHC-Klasse II restringiert zu präsentieren (Harding et al., 1994; Staerz et al., 1987). Die tatsächliche Funktionsweise der intramuskulären Immunisierung ist aber bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht geklärt. Vermutlich ist es gerade das Zusammenspiel unterschiedlicher Mechanismen, die zur hohen Immunogenität der DNA-Vakzine *in vivo* beiträgt.

D.1.4.2 Intradermale Immunisierung

Da sich in der Epidermis der Haut eine Vielzahl von APZs, wie Langerhans Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen befinden, ist die intradermale Verabreichung von DNA eine gute Alternative zur intramuskulären. Sie kann sowohl in saliner Form durch Nadelinjektion, oder gebunden an Goldpartikeln mit Hilfe der „Partikel-gun“, erfolgen. Die zu transfizierenden Zielzellen sind in beiden Fällen die Langerhans Zellen. Wie schon unter D.1.4.1 für Dendritische Zellen beschrieben, lösen sich die Langerhans Zellen aus dem Gewebeverband, differenzieren und wandern in sekundäre Lymphatische Organe ein und präsentieren dort das Antigen anderen Zellen des Immunsystems. Vergleichende Studien *intramuskulär vs. intradermal* von Feltquate et al. haben am Influenza Hämagglutinin H1-Expressionsplasmid gezeigt, daß die in saliner Form verabreichte DNA sowohl id. als auch im. ähnlich gute TH1 induzierte Immunantwort auslösen kann (Feltquate, 1998). Anders sieht es bei der *intradermalen* Verabreichung mittels „Partikel-gun“ aus. Hier wurden hohe Titer an IgG1 als auch Zytokine freigesetzt (IL-4; IL-5), die auf eine TH2 gerichtete

Immunantwort hinweisen. Ähnliche Ergebnisse haben sich auch in dieser Arbeit für das gruppenspezifischen Antigen (gag) von SIV beobachten lassen. Somit konnte gezeigt werden, daß die Verabreichungsform die Art der Immunantwort nachhaltig beeinflussen kann (Feltquate et al., 1997; Pertmer et al., 1996).

D.1.4.3 Orale oder nasale Immunisierung

Der Vorzug der *intranasalen* oder *oralen* Verabreichung von DNA-Vakzinen liegt insbesondere in der Induktion effizienter mukosaler Immunantworten (Eldridge et al., 1993; Gregoriadis et al., 1997; McGhee et al., 1992b; McGhee et al., 1992a), welche mit Hilfe der üblichen, standardisierten Impfstoffstrategien nicht oder bislang nur unzureichend induziert werden konnten (Lehner et al., 1992). Diese Verabreichungsform, wird wie unter D.1.3.1 beschrieben, oft in Kombination mit Liposomen verwendet. Aufgabe der Liposomen ist es, die DNA zu stabilisieren aber auch die Aufnahme über die Schleimhäute zu erleichtern. Insbesondere für eine HIV Vakzine ist aufgrund des sexuellen Übertragungsweges, eine effiziente mukosale Immunantwort, charakterisiert durch Antigen-spezifische sekretorische IgA- und IgG-Antikörper von großer Bedeutung. (Ishii et al., 1997; Klavinskis et al., 1997).

D.1.5 Anforderungen bezüglich Sicherheit und Qualität einer DNA-Vakzine

Neben den immunologischen Aspekten soll bei der Entwicklung eines Impfstoffes auch auf die Sicherheit und Qualität eines Impfstoffes geachtet werden.

D.1.5.1 Allgemeine Sicherheitsprobleme einer DNA-Vakzine

Die möglichen Risiken bei der Verabreichung von Plasmid-DNA wurden bereits in vielen Tiermodellen und klinischen Phase I Studien getestet und werden für jeden neuentwickelten DNA-Impfstoff standardmäßig kontrolliert. Getestet wird hierbei die Induktion von Tumoren, die Integration der Plasmid-DNA in das Wirtschromosom (Boyer et al., 1997b) als auch die Entwicklung von **Autoimmunantworten** gegen die eingebrachte Fremd-DNA (Donnelly et al., 1997; Katsumi et al., 1994). Bei Autoimmunkrankheiten wie SLE (*systemic lupus erythematosus*) konnten erhöhte Antikörper gegen ssDNA, dsRNA als auch gegen Ribonukleoprotein-Komplexe im Serum dieser Patienten beobachtet werden (Koffler et al., 1969). In Mausstudien konnte gezeigt werden, daß sich nach DNA Immunisierung Anti-DNA IgG-Antikörper gebildet haben (Mor et al., 1997), diese aber keinen Einfluß auf die Induktion von Autoimmunkrankheiten zeigten (Gilkeson et al., 1998; Xiang et al., 1995). Diese Beobachtungen bestätigten die Aussage von Jiao et al., der davon ausgeht, daß sich Autoimmunantikörper in der Regel gegen ssDNA oder dsRNA aber nicht gegen dsDNA richten (Jiao et al., 1992). Ein anderes Risiko besteht darin, daß extrachromosomale DNA die Möglichkeit besitzt **transformierend** in der Zielzelle zu wirken. Die Integration der Fremd-DNA kann zufällig, durch homologe Rekombination oder durch retrovirale Insertion erfolgen (Coffin, 1990). Im schlimmsten Fall können durch Integration Onkogene aktiviert oder Supressorgene inaktiviert werden. Um eine retrovirale Integration zu verhindern, wurden synthetische Vektoren für die humanen Studien verwendet, denen die Intergrase vollständig fehlten (siehe C.4). Alle bisherige Studien in Tiermodellen haben gezeigt, daß die Integrationsrate von Plasmid-DNA in das Chromosom viel geringer als die spontane Mutationsrate in Säugerzellen ist

(Martin et al., 1999; Nichols et al., 1995). Auch in humanen Studien bei Malaria, Hepatitis oder HIV wurde gezeigt, daß keine lokalen oder systemischen Reaktionen noch Autoimmunkrankheiten oder Induktion von Tumoren durch die Verabreichung von DNA beobachtet wurden (Boyer et al., 1999). Um Risiken bezüglich **Antibiotika-resistenzen** vorzubeugen, werden von uns für die humane Studien Vektoren verwendet, die keine Antibiotikagene mehr besitzen (pORT Vektor von Cobra Therapeutics siehe C.4).

D.1.5.2 HIV-spezifische Sicherheitsprobleme

Die Entwicklung von Expressionsvektoren, die auf HIV-1 Strukturgenen basieren und als DNA Impfstoff genutzt werden können, wurden bislang durch die komplexe virale Regulation eingeschränkt. So limitieren virale cis-aktive Sequenzen (LTR, TAR, NTR oder RRE), sowie die Abhängigkeit der Expression von transaktiven Proteinen (Tat, Rev), bisher die Effizienz solcher DNA-Vektoren.

Die Rev-abhängige Expression führt neben einem komplexen Vektordesign (bicistronische Expression von Rev, Gag und Pol) zu weitreichenden Sicherheitsrisiken, die einen Einsatz beim Menschen aus Sicherheitsgründen ausschließen: **Rev** könnte endogene Retroviren mobilisieren oder als Bestandteil einer therapeutischen Vakzine infektionsverstärkend auf Wildtyp Viren einwirken. **Verpackungsaktive Sequenzen (Psi)** befinden sich im 5'-NTR-Bereich sowie im 5' Bereich von Wildtyp Gag. Um die Möglichkeit einer Selbstverpackung der Gag-RNA bei einem Impfstoff zu verhindern, sollten Elemente wie Psi im Idealfall nicht zerstört werden. Bei der Verwendung von **wt-Sequenzen** kann es zu Rekombinationsereignissen mit endogenen Retroviren bzw. mit Wildtyp HI-Viren (wiederum bei der Verwendung als therapeutischen Vakzine) kommen und somit zur Rekonstitution infektiöser chimärer Viren führen. Die Entkopplung der Expression später HIV-1 Gene von viralen Wildtyp-Sequenzen, cis-aktiven Elementen und transaktiven Proteinen durch eine konsequente Kodonoptimierung erlaubt die Minimierung aller objektiven Sicherheitsbedenken auf das theoretische Minimum.

D.1.5.3 Probleme bei der Herstellung und Lagerung einer HIV-Vakzine

Ein Problem bei der Verwendung von bakteriellen und viralen Vektoren besteht im pathogenem Potential der rekombinanten Vektoren an sich. Ein weiteres besteht darin, daß auch durch den verwendeten Vektor eine spezifische Immunantwort mit Gedächtniszellen ausgelöst wird. Somit kann ein einmal verwendeter Vektor nicht für weitere Impfstoffkandidaten verwendet werden. Auch die Produktion rekombinanter Vektoren wie MVAs ist im Vergleich zu DNA-Vektoren aufwendiger und beinhaltet eine Reihe von Sicherheitsrisiken. Nach Kultivierung der Vektoren auf embryonalen Hühnerfibroblasten müssen die produzierten Vektoren über Gradientenzentrifugation gereinigt und in Plaque-Assays titriert werden.

Zirkuläre *supercoiled* DNA ist sehr stabil und einfach aufzureinigen. Die hohe Temperaturstabilität der Plasmid-DNA ist ein großer Vorteil gegenüber rekombinanten Vektoren, besonders in Entwicklungsländern, in denen nur begrenzte Möglichkeiten bestehen, Impfstoffe in gekühlter Form zu lagern (Ertl et al., 1996).

D.2 Expression relevanter SIV-Vakzinekandidaten.

D.2.1 Die Rev-abhängige Regulation später RNAs bei SIV entspricht derjenigen von HIV

Die Bedeutung von inhibitorischen RNA-Sequenzelementen und des 5'-NTRs für eine Rev/RRE-abhängige Regulation.

In Hinblick auf die Etablierung einer sicheren DNA-Vakzine erlauben bislang nur von SIV-abgeleitete Vektorkonstrukte Immunisierungsstudien und entsprechende Sicherheitsbewertungen in einem relevanten Tiermodell. Aus den daraus erhaltenen Aussagen können wichtige Rückschlüsse über die immunologischen Eigenschaften und mögliche Risiken analoger HIV-Vektoren für den späteren Einsatz im Menschen gezogen werden. Die Expression der dazu notwendigen Strukturproteine Gag, Gagpol und Env unterliegt im Rahmen der Virusreplikation einer komplexen Regulation ihrer m-RNA-Transkripte, die einerseits von der Präsenz des Virus-kodierter transaktiv-wirksamen Proteins Rev, als auch von der Interaktion mit zellulären Exportfaktoren, wie z.B. CRM1, abhängt (siehe A.3.2.2 oder Übersicht (Hope, 1999; Pollard et al., 1998)). Desweiteren wird für HIV-1 seit Jahren postuliert, daß sich innerhalb der gag-kodierenden Region zwei nicht genau lokalisierte AU-reiche Sequenzelemente INS-1 (in p17^{MA}) und INS-2 (in p24^{CA}) (Hadzopoulou Cladaras et al., 1989; Schwartz et al., 1992b) befinden, welche die Expression des Gens in Abwesenheit von Rev/RRE reprimieren (Cochrane et al., 1991; Maldarelli et al., 1991; Rosen et al., 1988). So führte eine partielle Eliminierung von AU-reichen Sequenzmotiven innerhalb des gag-Leserahmens durch stille Mutationen zur Überwindung der Rev-Abhängigkeit (Schwartz et al., 1992c). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß HIV-1 tat-mRNA, die normalerweise im Zellkern stabil ist, nach Fusion von zusätzlichen INS-Sequenzen eine verringerte Halbwertszeit besitzt und im Zellkern degradiert wird (Schwartz et al., 1992b).

Wie bei HIV-1 fällt auch bei SIV der hohe AU-Gehalt innerhalb bestimmter Bereiche des gag-Leserahmens auf und die im gag-Leserahmen befindlichen Sequenzmotive haben Ähnlichkeiten mit destabilisierenden AUUUA-Sequenzmotiven kurzlebiger, zellulärer *c-myc* und *c-fos* mRNAs (Shaw et al., 1986).

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bezüglich der Rev-abhängigen Expression von SIV gag zeigten deutliche Parallelen zu Ergebnissen an HIV-1 Gag-Reporterkonstrukten (Graf et al., 2000). In Analogie zu HIV ist davon auszugehen, daß auch bei SIV Gag – Reporterkonstrukten, AU-reiche Elemente nukleäre RNA destabilisieren oder den nukleären Export inhibieren und somit eine niedrige Expressionsrate in Abwesenheit des Rev/RRE-Systems bedingen (siehe C.1.2.1). In Anwesenheit des 5'-NTR, einschließlich des Spleißdonors, sowie in Abwesenheit von Rev/RRE akkumulieren die Wildtyp Gag RNAs im Kern und nur wenige Gag Transkripte werden ins Zytoplasma freigesetzt wo sie anschließend translatiert werden können. Befindet sich kein 5'-NTR Bereich mit einem funktionellen 5'Spleißdonor (SD) vor dem gag-Gen, wird die mRNA im Zellkern nicht geschützt und kann somit schnell degradiert werden. Dies hat zur Folge, daß nur minimale Mengen an gag-mRNA, vermutlich durch Diffusion, aus dem Zellkern gelangen. Die geringe Anzahl an mRNAs spiegelt sich auch in der minimalen Expression der wtgag-Konstrukte wieder.

Somit liegt die Vermutung nahe, daß INS-haltige RNA-Transkripte durch Wechselwirkung mit zellulären Spleißfaktoren stabilisiert werden und somit im Zellkern vor Degradation geschützt werden. Diese Beobachtungen werden von Lu und Kollegen bestätigt, die in *in vitro* Experimenten zeigten, daß eine hohe HIV-1 Env-Expression die Bindung des Ribonukleinsäureproteins U1-snRNP an der 5'-Hauptspleißdonorstelle 5'-seitig des *env*-Leserahmens voraussetzt (Lu et al., 1990). Zudem scheinen suboptimale Spleißvorgänge an der zeitlichen Trennung der Transkription und RNA-Prozessierung beteiligt zu sein und dadurch erst die Voraussetzung für eine INS-vermittelte Kernretention und einen effizienten mRNA-Export mit Hilfe von Rev zu ermöglichen (Chang et al., 1989; Kim et al., 1989). Obwohl die Hypothese einer INS-vermittelten, nukleären Kompartimentierung ungespleißter RNA-Spezies nicht bestätigt werden kann (Boe et al., 1998), scheitern den INS-Elementen bei der räumlichen Trennung der RNA-Transkripte von den Spleißzentren und dem Spleißfaktor SC-35 eine entscheidende Rolle zuzukommen (Berthold et al., 1996; Maldarelli et al., 1998).

Zusammengefaßt lassen die Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe darauf schließen, daß die Komplexierung von Rev/RRE mit zellulären Spleißfaktoren an der 5'-Hauptspleißdonorstelle möglicherweise eine rasche Degradierung der RNA-Transkripte im Zellkern verhindert und durch die Rekrutierung zellulärer Exportproteine (Rev/RRE-Rip/CRM1(RanGTP)) zu einem effizienten Rev-abhängigen RNA-Export viraler Transkripte beiträgt. Dieses Modellsystem erklärt auch die geringe Expressionsrate nach Transfektion mit dem Konstrukt wtgag-RRE, da allein durch die Anwesenheit von RRE und ohne funktionelle 5'-Spleißdonorstelle der Riboproteinkomplex vermutlich nicht oder nur teilweise gebildet wird. Der effiziente RNA-Export würde dementsprechend im engen Zusammenhang mit der Bildung eines funktionellen Riboproteinkomplexes stehen. Unklar bleibt allerdings, auf welche Weise genau INS-haltige Gag-RNAs mit funktioneller 5'-Hauptspleißdonorstelle in Abwesenheit von Rev im Zellkern letztendlich stabilisiert wird.

D.2.2 Rev-unabhängige Gag Expression

D.2.2.1 Rev-unabhängige Expression durch Integration des konstitutiven Transport-Elements

Die Integration des konstitutiven RNA-Transport-Elements (CTE) des Affen Mason-Pfizer D-Typ Retrovirus (MPMV) 3' der wtgag-Region resultierte in einer hohen Rev-unabhängigen Pr56^{gag}-Expression. Analog zur Rev/RRE-abhängigen Expression ist jedoch die Anwesenheit einer funktionellen 5'-Spleißdonorstelle erforderlich (C.1.2.2). Auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß CTE in der Lage ist, unabhängig von akzessorischen Proteinen den nukleären Export ungespleißter RNA-Transkripte zu vermitteln und das Rev/RRE-Regulationssystem effektiv zu ersetzen (Bray et al., 1994; Ernst et al., 1997; Rizvi et al., 1996a). In der Arbeit von Bogerd et al. konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression des defekten Nukleoproteins Nup214/Can zwar den Rev/RRE-abhängigen aber nicht den CTE-abhängigen RNA-Export HI-viraler Strukturgene inhibieren (Bogerd et al., 1998). Dies bedeutet, daß CTE für den nukleären Export viraler Transkripte einen anderen Exportweg verwendet als das Rev/RRE-System. Zusammengefaßt legt dies die Vermutung nahe, daß CTE durch direkte Wechselwirkung mit zellulären Faktoren (Gruter et al., 1998) sowie mit Hilfe des

zellulären Exportmechanismus, unabhängig von weiteren regulatorischen Proteinen den konstitutiven Transport retroviraler mRNAs ermöglicht. Analog zur Rev/RRE-Regulation trägt aber erst die Wechselwirkung der 5'-Spleißdonorstelle mit zellulären Spleißkomponenten zur Stabilisierung INS-haltiger Transkripte bei und ermöglicht nachfolgend die CTE-vermittelte Expression des Pr56^{gag} (siehe C.1.2.2). Die Funktions-bedingte Position des CTE in unmittelbarer Nähe des 3'Poly(A) (Rizvi et al., 1996a) läßt zudem darauf schließen, daß zelluläre Transportproteine und Poly(A)-bindende Faktoren für einen nukleären RNA-Export notwendig sind.

D.2.2.2 Rev-unabhängige Expression durch Integration eines funktionellen Introns

Arbeiten von Hammarskjöld et al. konnten zeigen, daß die Integration eines funktionellen Introns 5' des env-Leserahmens eine völlig Rev-unabhängige Expression von Env möglich ist (Hammarskjöld et al., 1994). Durch Integration eines kompletten Introns 5' des SIV wtgag-Konstruktes, konnte so alternativ zum CTE eine Rev-unabhängige Gag-Expression erzeugt werden (siehe C1.2.3). Die Anwesenheit eines funktionellen Introns erlaubt ein effizientes Prozessieren der mRNA-Transkripte, so daß eine INS-vermittelte Degradierung sowie die Akkumulation INS-haltiger Transkripte verhindert wird und diese vermutlich über den zellulären Transportweg in das Zytoplasma gelangen. Darüber hinaus konnte in Übereinstimmung mit Hammarskjöld und Kollegen eine Abnahme der Expression beobachtet werden, wenn der 5'-NTR-Bereich mit funktioneller Spleißdonorstelle 5' der gag-Gensequenz lokalisiert war (Hammarskjöld et al., 1994). Diese Beobachtung steht auch mit der Behauptung von Lu und Kollegen im Einklang, die der 5'-Hauptspleißdonorstelle inhibitorische Eigenschaften zuschreiben (Lu et al., 1990). Daten unserer Arbeitsgruppe deuten aber darauf hin, daß dieses Phänomen nicht auf einer Degradierung, sondern vielmehr auf eine Retention viraler RNA-Transkripte aufgrund ineffizienter Spleißvorgänge zurückzuführen ist.

D.2.2.3 Rev-unabhängige Expression durch Herstellung synthetischer Konstrukte

Die niedrige Expression SI-viraler Strukturproteine in Säugerzellen ist neben der Beteiligung cis-aktiver INS-Elemente an nukleären Exportereignissen auch auf eine wahrscheinlich verringerte Translationseffizienz AU-reicher RNA-Transkripte zurückzuführen. In vergleichenden Genanalysen zeigte sich eine hohe Präferenz für A und U an den *Wobble*-Positionen sowie ein reduzierter GC-Gehalt und die damit im engen Zusammenhang stehende Unterrepräsentation von CpG-Dinukleotiden in lentiviralen Genomen (Haas et al., 1996). Mehrere Befunde deuten darauf hin, daß die Reverse Transkriptase (RT) durch den bevorzugten Einbau von Adenosin (Hypermutationen) zu dieser Situation beiträgt (Vartanian et al., 1991). Ebenso scheint die hohe Fehlerrate, verbunden mit der hohen intrazellulären Konzentration von dTTP im Zellkern, die Transversion von C nach T zusätzlich zu fördern (Vartanian et al., 1994). Der hohe AU-Gehalt (>60%) und die damit verbundene Instabilität von ungespleißten und einfach-gespleißten Transkripten ermöglicht einen zeitlichen Ablauf der Synthese von Strukturproteinen, Enzymfunktionen sowie regulatorischen Proteinen. Darüber hinaus bietet die geringe Zahl an CpG-Motiven den Vorteil einer verringerten Immunogenität.

Durch die Adaption der Kodonwahl an den Kodon-Gebrauch hochexpmierender Säugetiere konnte die Expression der viralen Strukturproteine von transaktiven Protein Rev und cis-aktiven Elementen (RRE, INS und 5'-NTR) entkoppelt werden (C.1.2.4 und C.3.2). Das synthetische SIV_{mac}239 gag-Gen ermöglichte eine höhere Expression in Säugerzellen als alle anderen Rev-unabhängigen Konstrukte. Sogar die Freisetzung von Pr56^{gag}-Lipopartikeln konnte im Vergleich zu dem ebenfalls Rev-unabhängigen Kontrollkonstrukt NTR-wtgag-CTE um den Faktor 3-5 erhöht werden. Mit Hilfe des rekombinanten Vakzinia-Virus konnte die Transkription und Translation von nukleären Transportvorgängen entkoppelt werden und der Einfluß cis-aktiver Elemente wie RRE, CTE, 5'-NTR und insbesondere die inhibitorisch wirksamen INS-Sequenzen auf die Translationseffizienz ausgeschlossen werden (nicht gezeigte Daten). Die Arbeitsgruppe um Pavlakis stellte ein modifiziertes HIVgag-Konstrukt vor, in dem nur einzelne Regionen des gag-Gens adaptiert wurden. Die Expression dieses teilweise adaptierten Gens konnte durch Ko-Transfektion mit Rev noch gesteigert werden (Schneider et al., 1997). Eine Steigerung bezüglich der Expression war bei den von uns hergestellten Konstrukten durch Kotransfektion von Rev nicht mehr zu beobachten (C.1.2.4). Die hohe und gleichzeitig Rev-unabhängige Expression von Pr56^{gag} beruht daher auf der vollständigen Eliminierung inhibitorischer INS-Sequenzen und ist vor allem auf effizientere nukleäre mRNA-Exportvorgänge des gag-Transkripts zurückzuführen. Die bisherige Hypothese, daß die 5'-Hauptspleißdonorstelle selbst als ein inhibitorisches Element fungiert (Lu et al., 1990) und die Pr56^{gag}-Expression nachweislich reprimiert, nach Transfektion von syngag-Konstrukten mit 5'-NTR nicht bestätigt werden. Eine signifikante Reduzierung der Expressionsraten war in Anwesenheit einer funktionellen 5'-Spleißdonorstelle nicht zu beobachten. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen zusammengefaßt vermuten, daß eine signifikante Inhibierung aufgrund der 5'-Spleißdonorstelle nur dann erfolgt, wenn zusätzlich INS-Elemente vorhanden sind.

D.2.3 Die Rev-abhängige Expression ist speziesabhängig

Die für die Humane Zelllinie H1299 beobachteten Expressionsdaten konnten auch in der Affen Zelllinie COS-/ bestätigt werden. In weiterführenden Analysen konnte jedoch in unserer Arbeitsgruppe am HIV Pr55^{gag} gezeigt werden, daß es Unterschiede bezüglich der Expression in Primaten- und Nager-Zelllinien gibt (siehe Diplomarbeit Diana Hammer, 2001). Die Expression des Rev-abhängigen-(NTR-wtgag-RRE/ +Rev) und des Rev-unabhängigen (NTR-wtgag-CTE) Konstruktes sind in den untersuchten Nagetierzellen (C2C12, 3T3 und CHO) im Vergleich zu den Primatenzelllinien signifikant reduziert. Diese Beobachtung deutet auf das Fehlen von zellulären Faktoren in Nagerzellen hin, die wichtig für den Transport INS-haltiger RNAs aus dem Zellkern sind. Im Gegensatz dazu konnte beim INS-freiem syngag-Konstrukt kein zelltyp-oder gewebspezifischer Einfluß bezüglich der Gag Expression beobachtet werden.

D.3 Austestung der Konstrukte im Balb/C Mausmodell

Da es bis zum heutigen Zeitpunkt kein ideales Kleintiermodell für die Vortestung von lentiviralen Impfstoffen gibt, wurden Fragen bezüglich Immunität und Verträglichkeit

der entwickelten Vektoren im Balb/C Mausmodell untersucht. Mit Hilfe des SIV syngag-Konstruktes wurden zuerst Fragen, die die notwendige Dosismenge, Anzahl der Applikationen, Dauer und Polarisierung der induzierten humoralen Immunantwort betreffen, analysiert (siehe C.2.1). Die aus diesen Versuchen gewonnenen Daten zeigten uns, daß die dreimalige Verabreichung von 80µg syngag DNA vollkommen ausreicht, eine starke und spezifische Immunantwort auszulösen. Drei Monate nach der letzten Immunisierung konnten diese hohen AK-Titer noch nachgewiesen werden. Die Induktion langlebiger Gedächtniszellen durch DNA-Immunisierung ist in der Literatur wiederholt beschrieben (Davis et al., 1996; Raz et al., 1994). Auch die TH1-Polarisierung der Immunantwort mit hohen IgG2a-spezifischer AK im Serum ist in anderen DNA-Vakzine Studien beobachtet worden (Ulmer et al., 1995). Der Vergleich von zwei unterschiedlichen Expressionsvektoren machte uns deutlich, daß auch ein wtgag-Konstrukt, wenn es ein funktionelles Intron beinhaltet, eine spezifische Immunantwort induzieren kann (C.2.2). Jedoch war die Immunantwort drastisch reduziert und konnte nicht nur auf die geringere Expression (bezogen auf H1299 Zellen) zurückgeführt werden (siehe auch D.3.1). Durch Anfügen eines funktionellen Introns an das syngag-Konstrukt konnte keine Steigerung der Immunantwort beobachtet werden (C.2.2). Diese *in vivo* Daten korrelieren sehr gut mit den schon *in vitro* festgestellten Expressionsdaten (C.1.2.3). Anscheinend ist das syngag-Konstrukt schon so weit optimiert, daß eine Steigerung der Expression und Immunogenität durch weitere cis-ständige Elemente nicht möglich ist.

D.3.1 „Vergleich“ unterschiedlicher Rev-unabhängiger Konstrukte nach *intramuskulärer* Immunisierung.

Alle Rev-unabhängigen Konstrukte induzierten nach *intramuskulärer* Immunisierung sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte, TH1 gerichtete Immunantwort. Doch die Qualität und Quantität der Immunantworten war sehr unterschiedlich. In allen verwendeten Testsystemen war das syngag-Konstrukt bezüglich der induzierten Immunantwort den anderen Konstrukten überlegen. Sogar eine Verdoppelung der verabreichten Dosismenge reichte nicht aus, um annähernd die Werte des syngag Konstruktes zu erreichen. In der Arbeit von Megede et al. konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Sie verglichen in dieser Arbeit ein modifiziertes HIV_{SF-2} gag-Gen mit einem wtgag-Gen, dem ein PRE (posttranscriptional regulatory element) von HBV angefügt wurde (zur et al., 2000). Beide Konstrukte waren Rev-unabhängig und induzierten eine spezifische Immunantwort im Mausmodell. Jedoch war auch hier das synthetische gag-Gen dem Wildtyp-Gen bezüglich der Induktion von spezifischen Antikörpern und ZTLs überlegen. Wie auch in den von mir vorgestellten Versuchen war für das syngag-Konstrukt eine viel geringere Dosismenge nötig, um eine hohe Immunantwort auszulösen. *In vitro* Analysen in dieser Arbeit haben gezeigt, daß die hohe Immunogenität der synthetischen Konstrukte nicht an der Immunogenität der DNA (Anhäufung von CpG-Motiven) selbst (C2.3.3) sondern vermutlich an der gesteigerten Expression und Stabilität der Konstrukte liegt. Weiterführende Arbeiten von Ludwig Deml und Stephanie Steck in unserer Arbeitsgruppe konnten diese Beobachtung *in vivo* bestätigt werden. Sie entwickelten syngag-Vektoren, bei denen die internen CpG-Motive zerstört wurden (syngagΔCpG). Auch diese synthetischen Vektoren induzierten eine signifikante Immunantwort im Balb/C Mausmodell (Deml et al., 2001). Eine hohe Immunogenität konnte auch in der Arbeitsgruppe von Qiu et al., bei einem nur

teilweise synthetischen Gag-Expressionskonstrukt beobachtet werden (Qiu et al., 1999; Qiu et al., 2000). Nach dreimaliger i.m. Immunisierung mit 100µg Plasmid-DNA wurde sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort im Balb/C-Mausmodell induziert. Bei diesem teilweise synthetischen Konstrukt (p55M1-10) wurden durch gezielte Mutationen mögliche INS-Sequenzen im Gag-Leserahmen zerstört (Schneider et al., 1997).

D.3.2 Modifikation der *intramuskulären* Immunisierung durch Elektropuls

Viele der ausgetesteten DNA Impfstoffkandidaten erwiesen sich in Kleintiermodellen wie Mäusen, Ratten oder Kaninchen als gute Induktoren von spezifischen Immunantworten. Probleme traten jedoch bei der Immunisierung von Primaten auf. Viele DNA-Impfstoffkandidaten mußten sehr oft und in hohen Dosen verabreicht werden um eine moderate Immunantwort zu induzieren. Viele Arbeitsgruppen gehen davon aus, daß durch eine verbesserte Aufnahme der Plasmid – DNA in die Zielzelle vermutlich auch die Immunogenität der Expressionsvektoren in Primaten gesteigert werden kann.

Vorarbeiten von Mathiesen und Mir et al. haben gezeigt, daß durch die Verwendung von Elektropulsen, nach Injektion der Plasmid-DNA, eine erhöhte Expression des Reportergens im immunisierten Muskelgewebe beobachtet werden konnte (Mathiesen, 1999; Mir et al., 1999). Diese Beobachtung legte den Schluß nahe, daß durch die Verabreichung von elektrischen Pulsen Zellmembranen durchlässiger für Plasmid-DNA werden und somit auch sich nicht teilende Zellen, wie z.B. Muskelzellen, besser transfiziert werden können. Wie in dieser Arbeit am SIV syngag vorgestellt (C.2.4.1), konnten auch andere Arbeitsgruppen eine Steigerung der Immunogenität durch Verabreichung von Elektropulsen beobachten (Selby et al., 2000; Widera et al., 2000). Die Steigerung der humoralen Immunantwort durch Elektropuls ist abhängig vom verwendeten Antigen als auch von der Dosismenge. Je geringer die verabreichte Dosismenge (0,2-20µg DNA) desto deutlicher ist der positive Effekt des Elektropulses. Diese Daten erklären auch, warum bei der Immunisierung mit 80µg SIV syngag nur eine geringe Steigerungen beobachtet werden konnten. Die genaue Wirkungsweise des Elektropulses ist noch nicht bekannt. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, daß transfizierte APZs oder inflammatorische Eigenschaften für die gesteigerte Immunantwort verantwortlich sind. Eine Steigerung der Immunantwort durch Elektropuls nach der Verabreichung von proteinösen Impfstoffen konnte nicht beobachtet werden (J.B. Ulmer nicht veröffentlichte Beobachtungen).

D.3.3 Intradermale Immunisierung mit „Partikel-gun“

Die Polarisierung der durch die Immunisierung induzierten Immunantwort hängt im wesentlichen von der Immunisierungsmethode ab (Feltquate et al., 1997). So wurde mehrfach demonstriert, daß die Immunisierung nackter Plasmid-DNA in gepufferter Lösung unabhängig von der i.m. bzw. i.d. Immunisierungsrouten, eine TH1-polarisierte Immunantwort induziert (D.1.4). Dagegen generiert eine, mit Hilfe der „Partikel-gun“ in den Muskel oder die Haut verabreichte Plasmid-DNA laut Literatur eine TH2-

polarisierte Immunantwort. Der Vorteil der „*Partikel-gun*“ Immunisierung beruht auf der direkten Transfektion von APZs, was zur Folge hat, daß nur geringen DNA-Mengen (1-2µg) pro Immunisierung benötigt werden (Fynan et al., 1993b; Pertmer et al., 1995). Die *intradermalen* Immunisierung von SIVsyngag mittels „*Partikel-gun*“ zeigte in dieser Arbeit, daß auf Antikörperebene eine eindeutig TH2-gerichtete Immunantwort mit hohen IgG1 und geringen IgG2a-AK-Isotypen induziert werden konnte. Jedoch auf Zytokinebene konnte nur eine geringe (Faktor 10 schlechtere als durch 80µg im.) INF-γ (TH1) und keine IL-5 (TH2) Sekretion beobachtet werden. So wird nach unseren Daten keine eindeutige TH2-Polarisierung durch „*Partikel-gun*“ Immunisierung, zumindest für das SIV-syngag-Konstrukt, beobachtet. Aber auch neuere Arbeiten z.B. von Yoshida et al. zeigten, daß durch „*Partikel-gun*“ Immunisierung INF-γ – Freisetzung und ZTL-Aktivität induziert werden kann (Yoshida et al., 2000). Da die Immunisierung mit „*Partikel-gun*“ im Vergleich zur Verabreichung in löslicher Form (C.2.4.2) deutlich schlechter war, verzichteten wir für die nachfolgenden Primatenstudien auf die Verabreichung von DNA mittels „*Partikel-gun*“.

D.4 Austestung der Konstrukte im SHIV-Makakenmodell

D.4.1 Vor- und Nachteile des SHIV-Makaken Modells.

Die Infektion von Makaken mit dem Simian immundeficiency virus (SIV) ist weltweit das am ehesten zu vertretende Modell, in welchem die Pathogenese und der Schutz vor einer lentiviralen Infektion studiert werden kann (Gardner et al., 1995; Stott et al., 1995). Viele Isolate des Affenimmundefizienzvirus, dem nächsten Verwandten des humanen Immundefizienzvirus, verursachen in Makaken eine fulminante Infektion, die im Verlauf eines Jahres zum Ausbruch der Immunschwäche SAIDS (Simian AIDS) führt. Dieses Tiermodell bietet somit die Möglichkeit, sowohl präventive, als auch immuntherapeutische Strategien zu überprüfen, deren Ziele von der Induktion einer sterilen Immunantwort, bis hin zu einer Verlängerung der symptomfreien Phase reichen können.

Wegen der eingeschränkten Übertragbarkeit der immunologischen Charakteristika zwischen HIV-1 und SIV wurden in den letzten Jahren Primatenmodelle entwickelt, welche auf chimären SIV/HIV-Immundefizienzviren (SHIV) basieren (siehe A.6.2).

Durch Klonierung einer Chimäre aus dem Env-Protein und seiner akzessorischen Gene tat, vpu und rev des HI-Virus 89.6, welches sowohl lympho- als auch makrophagotrop ist (Collman et al., 1992) und dem SIVmac239 entstand das Virus SHIV89.6. Dieses Virus replizierte zwar *in vitro* in Affen PBL schwächer, zeigte aber bei der Primärinfektion von Affen höhere Virustiter als die Vergleichschimäre SHIV-HXBc2 (Reimann et al., 1996a). Außerdem zeigten SHIV89.6 infizierte Affen eine Inversion im Verhältnis der CD4/CD8-Zellen wie sie für eine initiale Virusinfektion typischerweise beobachtet wird.

Wenig später wurde nach zweimaligem *in vivo* Passagieren des SHIV89.6 eine Variante isoliert (SHIV89.6P), welche zu einer CD4-Lymphopenie und zu AIDS opportunistischen Erkrankungen in Makaken führt (Reimann et al., 1996b). Dieses SHIV89.6P Virus, dessen Env aus einem Patientenisolat stammt, bildet somit die optimale Ausgangsbasis als *Challengevirus* für die Evaluation von HIV-Vakzinen und kann die genetischen Einflüsse der HIV-1 Pathogenese erklären helfen.

Das Isolat 89.6P war auch Ausgangspunkt unserer Arbeit für die Entwicklung von Impfstoffkandidaten, die im SHIV-Makakenmodell auf Funktionalität und Wirkung getestet werden konnten. Jedoch ist bei der Verwendung des SHIV-Makakenmodell zu berücksichtigen, daß SIV genetisch erhebliche Unterschiede zu HIV-1 aufweist und somit nur Tendenzen aufgezeigt werden, die klinische Impfstudien mit HIV nicht ersetzen können.

D.4.2 BPRC-2-Studie

Ziel dieser Studie war die Austestung optimierter neuartiger DNA-Vektoren (SIV_{mac239} syngag, 89.6P synenv-140 und HIV_{IIIB} syntat) im Prime-Boost-Verfahren mit einem schon beschriebenen viralen Vektorsystem (MVA-SIV_{mac239} gag, MVA-SHIV_{89.6P(KB9)} env Gp160 und MVA- HIV_{IIIB} Tat). Desweiteren wurde in dieser Studie der Einfluß von zusätzlichen Interleukin exprimierenden Vektoren (IL-12- und IL-18) analysiert. Ziel war es durch Ko-Expression dieser Zytokinen das Immunsystem in Richtung TH1 zu *primen* und somit die Immunogenität der verwendeten DNA-Vektoren zu steigern. Wie schon unter D.1.3.2 für einen Hepatitis-B DNA-Impfstoff beschrieben, kann die Verabreichung von IL-12 und INF- γ die durch DNA-Vektoren induzierte TH1 Immunantwort steigern, als auch durch Verwendung von IL-4 ein *Shift* Richtung TH2 im Mausmodell induziert werden (Chow et al., 1998). Den positiven Einfluß von IL-18 auf die humorale als auch zelluläre Immunantwort konnte in einer HIV-nef „DNA-Prime/ Protein-Boost“-Mausstudie (Billaut-Mulot et al., 2001) beobachtet werden. In einer anderen Studie konnte der positive Effekt von IL-12 in einer „DNA-Prime/ Vaccinia-Virus-Boost“-Mausstudie für das Env-Antigen dokumentiert werden (Gherardi et al., 2000). Aber nicht nur Studien in murinen Systemen belegen dies, sondern auch Studien im Rhesus-Makaken Modell von Barouch et al. mit IL-2 als Adjuvanz in Verbindung einer Gag-DNA-Vakzine belegen den immunstimulierenden Einfluß von Zytokinen. Auch die in unserer Studie erzielten Daten spiegeln den positiven Einfluß von IL-12 und IL-18 auf die induzierte Immunantwort wieder. Die Gruppen 2 und 3 zeigten im Vergleich zur Gruppe 4 (ohne IL-12 und IL-18) eine erhöhte Induktion von ZTLs und T-Helferzellen (siehe C.3.3.1.1.). Die jedoch nach unserer Ansicht möglicherweise auf eine breite und nichtspezifische T-Zell Aktivierung zurückzuführen ist. Dies wird deutlich wenn man sich die Belastungsexperimente mit dem pathogenen SHIV-Isolat 89.6P betrachtet (siehe C.3.3.1.2). Es konnte zwar erwartungsgemäß kein vollständiger Schutz nach *intravenösem Challenge*, der sich durch Eliminierung des Virus ausgezeichnet hätte, in keiner der drei immunisierten Gruppen beobachtet werden. Dennoch wurde die initiale Viruslast in allen drei Gruppen deutlich reduziert und ein früherer und niedrigerer „Set Point“ erzielt. Auch konnte durch die spezifische Immunisierung die Reduktion der CD4-Zellzahl durch das hoch pathogene Virus SHIV_{89.6P} verhindert werden. Auffällig war jedoch, daß die besten Werte sowohl bei der Reduktion der initialen Virämie, als auch bei der raschen Einstellung des „Set Points“, in der Gruppe an Tieren erzielt wurde, welcher keine kostimulatorischen Interleukine verabreicht wurden. Diese Daten lassen sich nur so erklären, daß zum Zeitpunkt der Infektion die Gruppen mit Interleukinen eine erhöhte unspezifische T-Zell-Aktivierung hatten. Da sich HIV bzw. SIV vor allem in aktivierten CD4⁺ T-Zellen repliziert, konnte das Virus bei der initialen Infektion mehr Zielzellen als in der Gruppe 4 (ohne Interleukine) erreichen. Aus diesem Grund konnten sich die positiven Effekte, die sich im Vorfeld der Infektion gezeigt haben, nicht auch auf die Eliminierung des Virus auswirken. Bei weiteren Studien zur

Wirksamkeit von Interleukinen sollte auch der unspezifische Aktivierungsgrad der CD4⁺ Zellen im Verlauf der Immunisierung beobachtet werden. Die Infektion mit dem hoch pathogenen Virus-Isolat SHIV 89.6P sollte erst zu dem Zeitpunkt erfolgen, zu welchem Gruppen mit Interleukin einen vergleichbaren Aktivierungsgrad wie Gruppen ohne Interleukin besitzen. Bei der Bewertung der Affenstudien muß sowohl berücksichtigt werden, daß die in diesen Studien verwendeten Infektionsmengen um den Faktor 20 bis 50 über den Mengen liegen, die für eine Infektion notwendig wären, als auch daß sehr aggressive *Challengeviren* wie das SHIV89.6P- Isolat verwendet werden.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die in dieser Studie getesteten kodon-optimierten Konstrukte unabhängig, vom *Boost* mit MVA-Vektoren oder der Verabreichung von Adjuvantien, eine starke zelluläre Immunantwort im Rhesus-Makakenmodell auslösen konnten. Die in Kombination mit MVA-Vektoren eine Reduktion der initialen Viremie, sowie eine schnelle Generierung eines niedrigen „Set Points“, als auch die Stabilisierung der CD4-Zellzahl bewirkt haben.

D.4.3 DPZ-1-Studie

In der zweiten Studie sollten weitere kodonoptimierte DNA-Vektoren (SIV_{mac239} syngag-pol, 89.6P synenv-120 und 89.6P synenv-160), der Einfluß von unterschiedlichen Applikationsformen (id./im. versus nasal) bei der zweiten MVA-Immunisierung als auch die Wirksamkeit der verwendeten Vektoren bezüglich einer *rektalen Challenge* analysiert werden. Zwar gewährleistet der *intravenöse Challenge* eine sicherere Infektion mit dem pathogenen Virus, doch ist der *vaginale* oder *rektale* Übertragungsweg für das humane System von größerer Bedeutung. Aufgrund der Tests von Blutprodukten und der Verwendung von Einmalspritzen ist der *intravenöse* Übertragungsweg in den letzten Jahren drastisch zurückgegangen (siehe Review (Letvin et al., 2002)). Ziel der *intranasalen* Verabreichung war es eine zusätzliche mukosale Immunantwort zu induzieren. Insbesondere für eine HIV-Vakzine ist aufgrund des sexuellen Übertragungsweges des Virus, eine effiziente mukosale Immunantwort, charakterisiert durch Antigen-spezifische sekretorische IgA und IgG Antikörper, sowie auch zelluläre Immunreaktionen in der Mukosa, von großer Bedeutung (Ishii et al., 1997; Klavinskis et al., 1997; Okada et al., 1997). Wie schon in der BPRC 2, konnte auch in dieser Studie durch die verwendeten DNA-Vektoren eine starke zelluläre Immunantwort induziert werden, die durch das verwendete „DNA-Prime/MVA-Boost“ Verfahren gesteigert werden konnte (siehe Proliferationstest Abb. C29). Eine solche Auffrischungsimmunisierung, der primären Immunisierung mit Antigen-kodierender Plasmid-DNA, kann nicht nur durch rekombinante Viren, wie z.B. MVAs, sondern auch durch rekombinantes Protein erfolgen (Studie BRC1). Dieses Prime-Boost-Verfahren stellt aufgrund der erhöhten Immunogenität viraler Antigene eine vielversprechende Immunisierungsstrategie kombinierter HIV/AIDS-Vakzine Kandidaten dar und wird in vielen Studien aktuell verwendet (Allen et al., 2000; Amara et al., 2001; Letvin et al., 1997; Robinson et al., 2000). Doch über den Sinn einer zweiten MVA-Immunisierung am gleichen Verabreichungsort, läßt sich nach unseren Daten streiten. Sowohl in der Studie BPRC 2 als auch in der Studie DPZ 1 konnte keine Verbesserung der Immunantwort nach erneuter im./id. Verabreichung

beobachtet werden. Besonders im Proliferations-Test der Studie DPZ 1 wird dies deutlich. Die Immunantwort geht deutlich zurück und nur die Gruppe, die die zweite MVA-Immunisierung nasal verabreicht bekommen hat, erholte sich. Diese Daten können so interpretiert werden, daß das Immunsystem nicht nur gegen die von den MVAs exprimierten Antigene, sondern auch gegen den Vektor an sich eine lokale Immunantwort ausgelöst hat. Erfolgt die zweite MVA-Immunisierung in ähnlicher Form, wird der verabreichte Vektor erkannt und vom Immunsystem eliminiert. Infolge dessen kann auch keine Auffrischungsimpunisierung erfolgen. Anders verhält es sich, wenn die zweite Auffrischungsimpunisierung nasal verabreicht wird, wie dies in der Gruppe E unserer Studie der Fall war. Durch die lokale Trennung der Applikationsorte konnte das Immunsystem nicht, oder zumindest nicht in dem Ausmaße wie in der Gruppe D gegen die zweite Immunisierung mit MVA-Vektoren reagieren. Somit konnte in dieser Gruppe tatsächlich eine Auffrischungsimpunisierung stattfinden. Der positive Effekt der nasalen Immunisierung konnte im Belastungsversuch nach dem *rektalen Challenge* beobachtet werden (siehe C3.3.2.2.).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß alle Affen auch über den *rektalen* Infektionsweg infiziert werden konnten und in der Gruppe E (2. MVA-Boost nasal) drei von vier Tieren zum Zeitpunkt acht Wochen nach der Infektion vollständig geschützt waren. Im Vergleich dazu war nur einer von vier Affen der Gruppe D (2. MVA-Boost im./id.) vollständig geschützt. Zur genaueren Analyse des verbesserten Schutzes der Gruppe E werden zum aktuellen Zeitpunkt die *mukosale* Immunantwort der immunisierten Tiere ausgelesen. Erst dann kann mit Sicherheit gesagt werden, ob die Induktion einer mukosalen Immunantwort oder die bessere Auffrischungsimpunisierung für den verbesserten Schutz ausschlaggebend war. Positiv zu werten war zudem, daß die initiale Viruslast in beiden Gruppen (D und E) im Vergleich zu den Kontrolltieren (A, B und C) deutlich reduziert war und durch die spezifische Immunisierung sowohl die Reduktion der CD4-Gesamtpopulation (siehe Abb. C34A) als auch die für den langanhaltenden Schutz essentiellen T-„Memory“-Zellen (Abb. C33) des Immunsystems durch das hoch pathogene Virus SHIV_{89.6P}, verhindert werden konnte.

Zwar sind zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht alle immunologischen Parameter ausgewertet, doch diese beiden Versuchsreihen im Rhesus-Makakenmodell haben uns einen vielversprechenden Ansatz für weitere Primatenstudien als auch gute Vorraussetzungen für weiterführende humane Studien geliefert.

D.5 Ausblick

Beginn der humanen Studien Ende 2002

Viele der gestellten Fragen bezüglich der Immunogenität, Wirksamkeit, Verwendung von Adjuvantien oder unterschiedlicher Immunisierungsrouten, der entwickelten DNA-Vektoren, konnten hinreichend beantwortet werden. Aber auch neue Fragen sind im Verlauf der Auswertung aufgetreten, auf die in weiteren Primaten-Studien geachtet werden muß. Die Ergebnisse aus den *in vitro* und *in vivo* Studien haben eindeutig gezeigt, daß Vektoren, welche auf synthetischen HIV- bzw. SIV-Genen basieren, aufgrund der Erfüllung höchster Sicherheitsstandards sich in besonderer Weise zur Testung analoger, auf ausgewählte HIV-Varianten fokussierter DNA-Vektoren in

weiterführenden klinischen Studien eignen. Langfristiges Ziel unseres Ansatzes ist es, sehr sichere und effektive Impfstoffe zu entwickeln, die optimal an die vor Ort vorkommenden Isolate angepasst sind und auch noch kostengünstig hergestellt und gelagert werden können. Der für die humanen Studien unter GMP-Bedingungen (GMP: good manufacturing practice) fertiggestellte „Batch“ an DNA-Vektoren wird aktuell zur Kontrolle auf Effektivität und Immunogenität im Balb/C-Mausmodell getestet. Gegen Ende dieses Jahres starten die ersten klinischen Studien in Amsterdam und Lausanne an freiwilligen, ausschließlich HIV-negativen Probanden, die allesamt keinerlei Risiko für eine HIV Infektion aufweisen sollten. In diesen Studien wird die Verträglichkeit sowie die zu verabreichende Menge an DNA-Vektoren immunologisch analysiert. Anschließend werden diese neuartigen Vektoren europaweit in unterschiedlichen „Prime-Boost“-Verfahren, in Kombination mit rekombinantem Protein oder attenuierten Vaccinia-Vektoren (MVA oder NYVAC), immunologisch getestet. Anschließend soll der vielversprechendste Ansatz auf Wirksamkeit vor Neuinfektion in China getestet werden. Um in dieser Phase der Austestung signifikante Werte zu bekommen, muß in Regionen gegangen werden die eine hohe Neuinfektionsrate besitzen. Eine solche Region befindet sich unter anderem im Südwesten von China. Auch sind die von uns entwickelten Vektoren optimal auf die dort vorkommenden Virusisolate angepaßt.

Gentherapievektoren

Das bessere Verständnis der lentiviralen Regulation, sowie deren Entkoppelung durch Verwendung von kodonoptimierten Genen haben uns nicht nur neue Ansätze für eine DNA-Vakzine, sondern auch für die Entwicklung sichererer lentiviraler Gentherapievektoren, ermöglicht.

Der Vorteil der lentiviralen Vektoren im Gegensatz zu den klassischen retroviralen besteht darin, daß von Lentiviren abgeleitete Vektoren grundsätzlich in der Lage sind ruhende Zellen stabil zu transduzieren. Unter dem *Sicherheitsaspekt* sind die kodierenden Sequenzen der SIV Gag/Pol Verpackungsfunktionen durch Veränderung des Kodon-Gebrauchs so verändert, daß erstens die Koexpression transaktiver Proteine (TAT, REV) bei gleichzeitig erhöhter Expression von Viruspartikeln vermieden wird, zweitens verpackungskompetente cis-aktive Sequenzen innerhalb des Gag-kodierenden Bereiches vollständig eliminiert und drittens die Wahrscheinlichkeit von Rekombinationen zwischen Verpackungs- und Transferkonstrukten drastisch minimiert wird (Wagner et al., 2000). In weiterführenden Arbeiten sollen die Vorteile der lentiviralen Vektorsysteme (*stabile* Transduktion *ruhender* Zellen) mit denen der adenoviralen Vektoren sowie von Alphaviren (hohe Virustiter; 10^{10} - 10^{12} /ml) kombiniert werden. Um somit sehr sichere und effektive Gentherapievektoren zu bekommen.

Dieses Beispiel sollte zeigen, daß das Einsatzgebiet von optimierten Genen nicht nur auf die Entwicklung von DNA-Vakzine-Vektoren beschränkt ist.

E - ABKÜRZUNGEN

A	Absorption oder Ampere
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	erworbenes Immundefizienz-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
Ak	Antikörper
Amp	Ampizillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin- 5'-triphosphat
BFA	Brefeldin A
Bp	Basenpaare
BPRC	„Biomedical Primate Research Centre“ (Rijswijk, Niederlande)
BSA	Rinderseru m-Albumin (<i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	Capsid-Protein
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
cm	Zentimeter
CRS	cis-aktive Repressorsequenzen
CTE	konstitutives Transport Element
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
d	desoxy
Da	Dalton
dam	Methylierungsdefekt in <i>Escherichia coli</i> (dam-Methylase)
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
DPZ	Deutsches Primaten Zentrum (Göttingen)
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure (Titrplex III)
ELISA	<i>Enzyme-linked-immunoabsorbent-assay</i>
EM	Elektronenmikroskop
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
gag	gruppenspezifisches Antigen
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gp	Glykoprotein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBsAg	Hepatitis-B-Virus-Oberflächenantigens
His	Histidin
HIV-1/2	humanes Immunschwäche-Virus Typ 1/2
H ₂ O _{bid.}	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse-radish peroxidase</i>)
IE	internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase

INS	Inhibitorische Sequenzen
Iono	Iontomycin
k	kilo
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
lacZ	Gen für β -Galaktosidase
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
LI	Linker-Protein
LPS	bakterielle Lipopolysaccharide
LTNP	Langzeitüberlebende (long term non progresser)
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molar (Mol pro Liter)
m	Meter oder milli
MA	Matrix-Protein
mA	Milliampere
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
min.	Minute
ml	Milliliter
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNS (<i>messenger</i>)
μ	mikro (10^{-6})
MW	Molekulargewicht
N	Normal
n	nano (10^{-9})
NBT	<i>4-Nitro blue tetrazolium chloride</i>
NC	Nukleocapsid
Nef	<i>negative factor</i>
N-Terminus	Aminoterminus
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase-chain reaktion</i>)
pH	Konzentration der H^{+} -Ionen in einer Lösung
pmol	picomol
<i>pol</i>	Polymerase (Enzymfunktionen)
PR	Protease
Psi (Ψ)	Verpackungssequenz
recA	Gen für das RecA Protein
recBCsbcB	Gene für Proteine aus dem Reparaturproteinkomplex von <i>E.coli</i>
recF	Gen für das RecF Protein
Rev	<i>regulator of expression of viral proteins</i>
RIA	<i>radioimmunoassay</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RRE	<i>rev responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase
Rt	Raumtemperatur
SA	Spleißakzeptor
SAIDS	Simian AIDS
SD	Spleißdonor
SDS	Natrium Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec.	Sekunde
SHIV	chimären SIV/HIV-Immundefizienzvirus
SIV	Affen-Immundefizienz-Virus
SP-1	Transkriptionsfaktor
SSC	Natriumcitratpuffer

Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	DNS-abhängige DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TAR	<i>tat activating region</i>
Tat	<i>transactivator of transcription</i>
TBS	Tris/Kochsalz-Puffer
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranprotein
TTBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
Tris	Trishydroxymethyaminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	Thymin-5'-triphosphat
U	Enzym-Einheit (<i>Units</i>)
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
vif	viraler Infektiositätsfaktor
vgl.	vergleiche
VLP	Virus-ähnliches Partikel (<i>virus-like particle</i>)
Vol.	Volumen
vpr	virales Protein R
vpu	virales Protein U
vpX	virales Protein X
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit (<i>weight per volume</i>)
x g	x-fache Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T-lymphocytes</i>)

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	L Leucin
R	Arginin	K Lysin
N	Asparagin	M Methionin
C	Cystein	F Phenylalanin
Q	Glutamin	P Prolin
E	Glutaminsäure	S Serin
G	Glycin	T Threonin
H	Histidin	W Tryptophan
I	Isoleucin	Y Tyrosin
D	Asparaginsäure	V Valin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

F - LITERATURVERZEICHNIS

F.1 Verwendete Literatur

- Agy, M. B., Frumkin, L. R., Corey, L., Coombs, R. W., Wolinsky, S. M., Koehler, J., Morton, W. R., and Katze, M. G. (1992). Infection of *Macaca nemestrina* by human immunodeficiency virus type-1. *Science* **257**, 103-106.
- Allan, J. S., Ray, P., Broussard, S., Whitehead, E., Hubbard, G., Butler, T., Brasky, K., Luciw, P., Cheng Mayer, C., Levy, J. A., and et al (1995). Infection of baboons with simian/human immunodeficiency viruses. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* **9**, 429-441.
- Allen, T. M., Vogel, T. U., Fuller, D. H., Mothe, B. R., Steffen, S., Boyson, J. E., Shipley, T., Fuller, J., Hanke, T., Sette, A., Altman, J. D., Moss, B., McMichael, A. J., and Watkins, D. I. (2000). Induction of AIDS virus-specific CTL activity in fresh, unstimulated peripheral blood lymphocytes from rhesus macaques vaccinated with a DNA prime/modified vaccinia virus Ankara boost regimen. *J.Immunol.* **164**, 4968-4978.
- Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Xu, Y., Herndon, J. G., Wyatt, L. S., Candido, M. A., Kozyr, N. L., Earl, P. L., Smith, J. M., Ma, H. L., Grimm, B. D., Hulse, M. L., Miller, J., McClure, H. M., McNicholl, J. M., Moss, B., and Robinson, H. L. (2001). Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* **292**, 69-74.
- Ameisen, J. C. and Capron, A. (1991). Cell dysfunction and depletion in AIDS: the programmed cell death hypothesis. *Immunol.Today* **12**, 102-105.
- Baba, T. W., Jeong, Y. S., Pennick, D., Bronson, R., Greene, M. F., and Ruprecht, R. M. (1995). Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* **267**, 1820-1825.
- Baba, T. W., Liska, V., Khimani, A. H., Ray, N. B., Dailey, P. J., Penninck, D., Bronson, R., Greene, M. F., McClure, H. M., Martin, L. N., and Ruprecht, R. M. (1999). Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques [see comments]. *Nat.Med.* **5**, 194-203.
- Ball, J. M., Hardy, M. E., Atmar, R. L., Conner, M. E., and Estes, M. K. (1998). Oral immunization with recombinant Norwalk virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *J.Virol.* **72**, 1345-1353.
- Ballas, Z. K., Rasmussen, W. L., and Krieg, A. M. (1996). Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J.Immunol.* **157**, 1840-1845.
- Barouch, D. H., Craiu, A., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Zheng, X. X., Santra, S., Frost, J. D., Krivulka, G. R., Lifton, M. A., Crabbs, C. L., Heidecker, G., Perry, H. C., Davies, M. E., Xie, H., Nickerson, C. E., Steenbeke, T. D., Lord, C. I., Montefiori, D. C., Strom, T. B., Shiver, J. W., Lewis, M. G., and Letvin, N. L. (2000). Augmentation of immune responses to HIV-1 and simian immunodeficiency virus DNA vaccines by IL-2/Ig plasmid administration in rhesus monkeys. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 4192-4197.
- Belyakov, I. M., Wyatt, L. S., Ahlers, J. D., Earl, P., Pendleton, C. D., Kelsall, B. L., Strober, W., Moss, B., and Berzofsky, J. A. (1998). Induction of a mucosal cytotoxic T-lymphocyte response by intrarectal immunization with a replication-deficient recombinant vaccinia virus expressing human immunodeficiency virus 89.6 envelope protein. *J.Virol.* **72**, 8264-8272.
- Berglund, P., Quesada-Rolander, M., Putkonen, P., Biberfeld, G., Thorstensson, R., and Liljestrom, P. (1997). Outcome of immunization of cynomolgus monkeys with recombinant Semliki Forest virus encoding human immunodeficiency virus type 1 envelope protein and challenge with a high dose of SHIV-4 virus. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **13**, 1487-1495.
- Berman, P. W., Gregory, T. J., Riddle, L., Nakamura, G. R., Champe, M. A., Porter, J. P., Wurm, F. M., Hershberg, R. D., Cobb, E. K., and Eichberg, J. W. (1990). Protection of chimpanzees from infection by HIV-1 after vaccination with recombinant glycoprotein gp120 but not gp160. *Nature* **345**, 622-625.
- Berthold, E. and Maldarelli, F. (1996). cis-acting elements in human immunodeficiency virus type 1 RNAs direct viral transcripts to distinct intranuclear locations. *J.Virol.* **70**, 4667-4682.
- Billaut-Mulot, O., Idziorek, T., Loyens, M., Capron, A., and Bahr, G. M. (2001). Modulation of cellular and humoral immune responses to a multiepitopic HIV-1 DNA vaccine by interleukin-18 DNA immunization/viral protein boost. *Vaccine* **19**, 2803-2811.
- Blattner, W., Gallo, R. C., and Temin, H. M. (1988). HIV causes AIDS. *Science* **241**, 515-516.
- Boe, S. O., Bjorndal, B., Rosok, B., Szilvay, A. M., and Kalland, K. H. (1998). Subcellular localization of human immunodeficiency virus type 1 RNAs, Rev, and the splicing factor SC-35. *Virology.* **244**, 473-482.
- Bogerd, H. P., Echarri, A., Ross, T. M., and Cullen, B. R. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus Rev and human T-cell leukemia virus Rex function, but not Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element activity, by a mutant human nucleoporin targeted to Crm1. *J.Virol* **72**, 8627-8635.
- Bolognesi, D. P. (1989). AIDS. Do antibodies enhance the infection of cells by HIV? [news]. *Nature* **340**, 431-432.
- Bontrop, R. E., Otting, N., Slierendregt, B. L., and Lanchbury, J. S. (1995). Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates. *Immunol.Rev.* **143**, 33-62.
- Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M., and Oldstone, M. B. (1994). Virus-specific CD8+ cytotoxic T-

- lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**, 6103-6110.
- Boyer, J. D., Chattergoon, M. A., Ugen, K. E., Shah, A., Bennett, M., Cohen, A., Nyland, S., Lacy, K. E., Bagarazzi, M. L., Higgins, T. J., Baine, Y., Ciccarelli, R. B., Ginsberg, R. S., MacGregor, R. R., and Weiner, D. B. (1999). Enhancement of cellular immune response in HIV-1 seropositive individuals: A DNA-based trial. *Clin. Immunol.* **90**, 100-107.
- Boyer, J. D., Cohen, A. D., Vogt, S., Schumann, K., Nath, B., Ahn, L., Lacy, K., Bagarazzi, M. L., Higgins, T. J., Baine, Y., Ciccarelli, R. B., Ginsberg, R. S., MacGregor, R. R., and Weiner, D. B. (2000). Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J. Infect. Dis.* **181**, 476-483.
- Boyer, J. D., Ugen, K. E., Chattergoon, M., Wang, B., Shah, A., Agadjanyan, M., Bagarazzi, M. L., Javadian, A., Carrano, R., Coney, L., Williams, W. V., and Weiner, D. B. (1997b). DNA vaccination as anti-human immunodeficiency virus immunotherapy in infected chimpanzees. *J. Infect. Dis.* **176**, 1501-1509.
- Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W. V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R. B., McCallus, D., Coney, L., and Weiner, D. B. (1997a). Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination [see comments]. *Nat. Med.* **3**, 526-532.
- Bray, M., Prasad, S., Dubay, J. W., Hunter, E., Jeang, K. T., Rekosh, D., and Hammariskjold, M. L. (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 1256-1260.
- Brown, P. H., Tiley, L. S., and Cullen, B. R. (1991). Effect of RNA secondary structure on polyadenylation site selection. *Genes Dev.* **5**, 1277-1284.
- Bruck, C., Thiriart, C., Fabry, L., Francotte, M., Pala, P., Van Opstal, O., Culp, J., Rosenberg, M., De Wilde, M., Heidt, P., and et al (1994). HIV-1 envelope-elicited neutralizing antibody titres correlate with protection and virus load in chimpanzees. *Vaccine*. **12**, 1141-1148.
- Bryant, M. and Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 523-527.
- Bryson, Y. J., Pang, S., Wei, L. S., Dickover, R., Diagne, A., and Chen, I. S. (1995). Clearance of HIV infection in a perinatally infected infant. *N. Engl. J. Med.* **332**, 833-838.
- Buge, S. L., Murty, L., Arora, K., Kalyanaraman, V. S., Markham, P. D., Richardson, E. S., Aldrich, K., Patterson, L. J., Miller, C. J., Cheng, S. M., and Robert Guroff, M. (1999). Factors associated with slow disease progression in macaques immunized with an adenovirus-simian immunodeficiency virus (SIV) envelope priming-gp120 boosting regimen and challenged vaginally with SIVmac251. *J. Virol.* **73**, 7430-7440.
- Buge, S. L., Richardson, E., Alipanah, S., Markham, P., Cheng, S., Kalyan, N., Miller, C. J., Lubeck, M., Udem, S., Eldridge, J., and Robert-Guroff, M. (1997). An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J. Virol.* **71**, 8531-8541.
- Bukrinsky, M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., Bukrinskaya, A. G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6580-6584.
- Burnett, M. S., Wang, N., Hofmann, M., and Barrie, K. G. (2000). Potential live vaccines for HIV. *Vaccine* **19**, 735-742.
- Cafaro, A., Caputo, A., Fracasso, C., Maggiorella, M. T., Goletti, D., Baroncelli, S., Pace, M., Sernicola, L., Koanga-Mogtomo, M. L., Betti, M., Borsetti, A., Belli, R., Akerblom, L., Corrias, F., Butto, S., Heeney, J., Verani, P., Titti, F., and Ensoli, B. (1999). Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat. Med.* **5**, 643-650.
- Cafaro, A., Caputo, A., Maggiorella, M. T., Baroncelli, S., Fracasso, C., Pace, M., Borsetti, A., Sernicola, L., Negri, D. R., ten Haaf, P., Betti, M., Michelini, Z., Macchia, I., Fanales-Belasio, E., Belli, R., Corrias, F., Butto, S., Verani, P., Titti, F., and Ensoli, B. (2000). SHIV89.6P pathogenicity in cynomolgus monkeys and control of viral replication and disease onset by human immunodeficiency virus type 1 Tat vaccine. *J. Med. Primatol.* **29**, 193-208.
- Cafaro, A., Titti, F., Fracasso, C., Maggiorella, M. T., Baroncelli, S., Caputo, A., Goletti, D., Borsetti, A., Pace, M., Fanales-Belasio, E., Ridolfi, B., Negri, D. R., Sernicola, L., Belli, R., Corrias, F., Macchia, I., Leone, P., Michelini, Z., ten Haaf, P., Butto, S., Verani, P., and Ensoli, B. (2001). Vaccination with DNA containing tat coding sequences and unmethylated CpG motifs protects cynomolgus monkeys upon infection with simian/human immunodeficiency virus (SHIV89.6P). *Vaccine* **19**, 2862-2877.
- Caley, I. J., Betts, M. R., Davis, N. L., Swanstrom, R., Frelinger, J. A., and Johnston, R. E. (1999). Venezuelan equine encephalitis virus vectors expressing HIV-1 proteins: vector design strategies for improved vaccine efficacy. *Vaccine* **17**, 3124-3135.
- Cao, Y., Qin, L., Zhang, L., Safrit, J., and Ho, D. D. (1995). Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **332**, 201-208.
- Carr, J. K., Salminen, M. O., Koch, C., Gotte, D., Arntstein, A. W., Hegerich, P. A., St Louis, D., Burke, D. S., and McCutchan, F. E. (1996). Full-length sequence and mosaic structure of a human immunodeficiency virus type 1 isolate from Thailand. *J. Virol.* **70**, 5935-5943.
- Chang, D. D. and Sharp, P. A. (1989). Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. *Cell* **59**, 789-795.

- Cho, J. H., Youn, J. W., and Sung, Y. C. (2001). Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J.Immunol.* **167**, 5549-5557.
- Chow, Y. H., Chiang, B. L., Lee, Y. L., Chi, W. K., Lin, W. C., Chen, Y. T., and Tao, M. H. (1998). Development of Th1 and Th2 populations and the nature of immune responses to hepatitis B virus DNA vaccines can be modulated by codelivery of various cytokine genes. *J.Immunol.* **160**, 1320-1329.
- Chun, T. W., Stuyver, L., Mizell, S. B., Ehler, L. A., Mican, J. A., Baseler, M., Lloyd, A. L., Nowak, M. A., and Fauci, A. S. (1997). Presence of an inducible HIV-1 latent reservoir during highly active antiretroviral therapy. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13193-13197.
- Clerici, M., Clark, E. A., Polacino, P., Axberg, I., Kuller, L., Casey, N. I., Morton, W. R., Shearer, G. M., and Benveniste, R. E. (1994). T-cell proliferation to subinfectious SIV correlates with lack of infection after challenge of macaques. *AIDS* **8**, 1391-1395.
- Clerici, M., Salvi, A., Trabattoni, D., Lo, C. S., Semplici, F., Biasin, M., Ble, C., Meacci, F., Romeo, C., Piconi, S., Mazzotta, F., Villa, M. L., and Mazzoli, S. (1999). A role for mucosal immunity in resistance to HIV infection. *Immunol.Lett.* **66**, 21-25.
- Clerici, M. and Shearer, G. M. (1993). A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol.Today* **14**, 107-111.
- Clever, J., Sasseti, C., and Parslow, T. G. (1995). RNA secondary structure and binding sites for gag gene products in the 5' packaging signal of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **69**, 2101-2109.
- Cochrane, A. W., Jones, K. S., Beidas, S., Dillon, P. J., Skalka, A. M., and Rosen, C. A. (1991). Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression. *J.Virol.* **65**, 5305-5313.
- Coeffier, E., Clement, J. M., Cussac, V., Khodaei-Boorane, N., Jehanno, M., Rojas, M., Dridi, A., Latour, M., El Habib, R., Barre-Sinoussi, F., Hofnung, M., and Leclerc, C. (2000). Antigenicity and immunogenicity of the HIV-1 gp41 epitope ELDKWA inserted into permissive sites of the MalE protein. *Vaccine* **19**, 684-693.
- Coffin, J. M. (1990). Molecular mechanisms of nucleic acid integration. *J.Med.Virol.* **31**, 43-49.
- Cohen, J. (1993). AIDS vaccine research. A new goal: preventing disease, not infection [news]. *Science* **262**, 1820-1821.
- Collman, R., Balliet, J. W., Gregory, S. A., Friedman, H., Kolson, D. L., Nathanson, N., and Srinivasan, A. (1992). An infectious molecular clone of an unusual macrophage-tropic and highly cytopathic strain of human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **66**, 7517-7521.
- Cullen, B. R. (1992). Mechanism of action of regulatory proteins encoded by complex retroviruses. *Microbiol.Rev.* **56**, 375-394.
- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., and Desrosiers, R. C. (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**, 1938-1941.
- Davis, H. L. (2000). CpG motifs for optimization of DNA vaccines. *Dev.Biol.(Basel)* **104**, 165-169.
- Davis, H. L., Mancini, M., Michel, M. L., and Whalen, R. G. (1996). DNA-mediated immunization to hepatitis B surface antigen: longevity of primary response and effect of boost. *Vaccine* **14**, 910-915.
- Davis, H. L., Michel, M. L., and Whalen, R. G. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum.Mol.Genet.* **2**, 1847-1851.
- Davis, H. L., Weeranta, R., Waldschmidt, T. J., Tygrett, L., Schorr, J., and Krieg, A. M. (1998). CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J.Immunol.* **160**, 870-876.
- Davis, N. L., Caley, I. J., Brown, K. W., Betts, M. R., Irlbeck, D. M., McGrath, K. M., Connell, M. J., Montefiori, D. C., Frelinger, J. A., Swanstrom, R., Johnson, P. R., and Johnston, R. E. (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J.Virol.* **74**, 371-378.
- Deacon, N. J., Tsykin, A., Solomon, A., Smith, K., Ludford-Menting, M., Hooker, D. J., McPhee, D. A., Greenway, A. L., Ellett, A., Chatfield, C., and . (1995). Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science* **270**, 988-991.
- Demkowicz, W. E., Littau, R. A., Wang, J. M., and Ennis, F. A. (1996). Human cytotoxic T-cell memory-Long-Lived responses to vaccinia virus. *J.Virol.* **70**, 2627-2631.
- Deml, L., Bojak, A., Steck, S., Graf, M., Wild, J., Schirmbeck, R., Wolf, H., and Wagner, R. (2001). Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of dna candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J.Virol.* **75**, 10991-11001.
- Deml, L., Kratochwil, G., Osterrieder, N., Knuchel, R., Wolf, H., and Wagner, R. (1997). Increased incorporation of chimeric human immunodeficiency virus type 1 gp120 proteins into Pr55gag virus-like particles by an Epstein-Barr virus gp220/350-derived transmembrane domain. *Virology* **235**, 10-25.
- Deml, L., Schirmbeck, R., Reimann, J., Wolf, H., and Wagner, R. (1997). Recombinant human immunodeficiency Pr55gag virus-like particles presenting chimeric envelope glycoproteins induce cytotoxic T- cells and neutralizing antibodies. *Virology* **235**, 26-39.

- Deng, H. K., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Dimarzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.
- Desrosiers, R. C. (1990). HIV-1 origins. A finger on the missing link. *Nature* **345**, 288-289.
- Dewar, R. L., Vasudevachari, M. B., Natarajan, V., and Salzman, N. P. (1989). Biosynthesis and processing of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins: effects of monensin on glycosylation and transport. *J. Virol.* **63**, 2452-2456.
- Di Fabio, S., Medaglini, D., Rush, C. M., Corrias, F., Panzini, G. L., Pace, M., Verani, P., Pozzi, G., and Titti, F. (1998). Vaginal immunization of Cynomolgus monkeys with *Streptococcus gordonii* expressing HIV-1 and HPV 16 antigens. *Vaccine* **16**, 485-492.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W., and Liu, M. A. (1997). DNA vaccines. *Annu.Rev.Immunol.* **15**, 617-648.
- Dorfman, T., Mammano, F., Haseltine, W. A., and Gottlinger, H. G. (1994). Role of the matrix protein in the virion association of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **68**, 1689-1696.
- Earl, P. L., Sugiura, W., Montefiori, D. C., Broder, C. C., Lee, S. A., Wild, C., Lifson, J., and Moss, B. (2001). Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140. *J. Virol.* **75**, 645-653.
- Eckhart, L., Raffelsberger, W., Ferko, B., Klima, A., Purtscher, M., Katinger, H., and Ruker, F. (1996). Immunogenic presentation of a conserved gp41 epitope of human immunodeficiency virus type 1 on recombinant surface antigen of hepatitis B virus. *J.Gen. Virol.* **77** (Pt 9), 2001-2008.
- Eldridge, J. H., Staas, J. K., Chen, D., Marx, P. A., Tice, T. R., and Gilley, R. M. (1993). New advances in vaccine delivery systems. *Semin.Hematol.* **30**, 16-24.
- Elwood, B. F. and Stricker, R. B. (1994). Polio vaccines and the origin of AIDS. *Med.Hypotheses* **42**, 347-354.
- Emerman, M., Vazeux, R., and Peden, K. (1989). The rev gene product of the human immunodeficiency virus affects envelope-specific RNA localization. *Cell* **57**, 1155-1165.
- Ensoli, B. and Cafaro, A. (2002). HIV-1 Tat vaccines. *Virus Res.* **82**, 91-101.
- Ernst, R. K., Bray, M., Rekosh, D., and Hammariskjold, M. L. (1997). Secondary structure and mutational analysis of the Mason-Pfizer monkey virus RNA constitutive transport element. *RNA*, **3**, 210-222.
- Ertl, H. C. and Xiang, Z. (1996). Novel vaccine approaches. *J.Immunol.* **156**, 3579-3582.
- Farzan, M., Choe, H., Desjardins, E., Sun, Y., Kuhn, J., Cao, J., Archambault, D., Kolchinsky, P., Koch, M., Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998). Stabilization of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein trimers by disulfide bonds introduced into the gp41 glycoprotein ectodomain. *J. Virol.* **72**, 7620-7625.
- Fast, P. E. and Walker, M. C. (1993). Human trials of experimental AIDS vaccines. *AIDS* **7** Suppl 1, S147-59.
- Feltquate, D. M. (1998). DNA vaccines: vector design, delivery, and antigen presentation. *J.Cell Biochem.Suppl* **30-31**, 304-311.
- Feltquate, D. M., Heaney, S., Webster, R. G., and Robinson, H. L. (1997). Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J.Immunol.* **158**, 2278-2284.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-entry cofactor-Funktionale cDNA cloning of a seven transmembrane, G-protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.
- Fling, S. P. and Gregerson, D. S. (1986). Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high-molarity tris buffer system without urea. *Anal Biochem* **155**, 83-88.
- Freed, E. O., Englund, G., and Martin, M. A. (1995). Role of the basic domain of human immunodeficiency virus type 1 matrix in macrophage infection. *J. Virol.* **69**, 3949-3954.
- Freed, E. O. and Martin, M. A. (1995). Virion incorporation of envelope glycoproteins with long but not short cytoplasmic tails is blocked by specific, single amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 matrix. *J. Virol.* **69**, 1984-1989.
- Freed, E. O., Orenstein, J. M., Buckler White, A. J., and Martin, M. A. (1994). Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* **68**, 5311-5320.
- Friedman, R. S., Frankel, F. R., Xu, Z., and Lieberman, J. (2000). Induction of human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD8 T-cell responses by *Listeria monocytogenes* and a hyperattenuated *Listeria* strain engineered to express HIV antigens. *J. Virol.* **74**, 9987-9993.
- Fu, T. M., Ulmer, J. B., Caulfield, M. J., Deck, R. R., Friedman, A., Wang, S., Liu, X., Donnelly, J. J., and Liu, M. A. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol.Med.* **3**, 362-371.
- Fuller, D. H. and Haynes, J. R. (1994). A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120- specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **10**, 1433-1441.
- Fuller, D. H., Simpson, L., Cole, K. S., Clements, J. E., Panicali, D. L., Montelaro, R. C., Murphey Corb, M., and Haynes, J. R. (1997). Gene gun-based nucleic acid immunization alone or in combination with recombinant vaccinia vectors suppresses virus burden in rhesus macaques challenged with a heterologous SIV. *Immunol.Cell Biol.* **75**, 389-396.

- Fultz, P. N., Nara, P., Barre Sinoussi, F., Chaput, A., Greenberg, M. L., Muchmore, E., Kieny, M. P., and Girard, M. (1992). Vaccine protection of chimpanzees against challenge with HIV-1- infected peripheral blood mononuclear cells. *Science* **256**, 1687-1690.
- Fultz, P. N., Siegel, R. L., Brodie, A., Mawle, A. C., Stricker, R. B., Swenson, R. B., Anderson, D. C., and McClure, H. M. (1991). Prolonged CD4+ lymphocytopenia and thrombocytopenia in a chimpanzee persistently infected with human immunodeficiency virus type 1. *J.Infect.Dis.* **163**, 441-447.
- Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. (1993b). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 11478-11482.
- Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. (1993a). DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **90**, 11478-11482.
- Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M., and Hahn, B. H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes* troglodytes [see comments]. *Nature* **397**, 436-441.
- Gao, F., Yue, L., White, A. T., Pappas, P. G., Barchue, J., Hanson, A. P., Greene, B. M., Sharp, P. M., Shaw, G. M., and Hahn, B. H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**, 495-499.
- Gardner, M., Rosenthal, A., Jennings, M., Yee, J., Antipa, L., and Robinson, E. J. (1995). Passive immunization of rhesus macaques against SIV infection and disease. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **11**, 843-854.
- Gelderblom, H. R. (1991). Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS* **5**, 617-637.
- Gherardi, M. M., Ramirez, J. C., and Esteban, M. (2000). Interleukin-12 (IL-12) enhancement of the cellular immune response against human immunodeficiency virus type 1 env antigen in a DNA prime/vaccinia virus boost vaccine regimen is time and dose dependent: suppressive effects of IL-12 boost are mediated by nitric oxide. *J.Virol.* **74**, 6278-6286.
- Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D., and De Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**, 103-112.
- Gilkeson, G. S., Conover, J., Halpern, M., Pisetsky, D. S., Feagin, A., and Klinman, D. M. (1998). Effects of bacterial DNA on cytokine production by (NZB/NZW)F1 mice. *J.Immunol.* **161**, 3890-3895.
- Girard, M., Kieny, M. P., Pinter, A., Barre Sinoussi, F., Nara, P., Kolbe, H., Kusumi, K., Chaput, A., Reinhart, T., Muchmore, E., and et al (1991). Immunization of chimpanzees confers protection against challenge with human immunodeficiency virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 542-546.
- Girard, M., Meignier, B., Barre Sinoussi, F., Kieny, M. P., Matthews, T., Muchmore, E., Nara, P. L., Wei, Q., Rimsky, L., Weinhold, K., and et al (1995). Vaccine-induced protection of chimpanzees against infection by a heterologous human immunodeficiency virus type 1. *J.Virol.* **69**, 6239-6248.
- Goulder, P. J., Bunce, M., Krausa, P., McIntyre, K., Crowley, S., Morgan, B., Edwards, A., Giangrande, P., Phillips, R. E., and McMichael, A. J. (1996). Novel, cross-restricted, conserved, and immunodominant cytotoxic T lymphocyte epitopes in slow progressors in HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **12**, 1691-1698.
- Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Wolf, H., and Wagner, R. (2000). Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression [In Process Citation]. *J.Virol* **74**, 10822-10826.
- Graf, M., Shao, Y., Zhao, Q., Seidl, T., Kostler, J., Wolf, H., and Wagner, R. (1998). Cloning and characterization of a virtually full-length HIV type 1 genome from a subtype B'-Thai strain representing the most prevalent B-clade isolate in China. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **14**, 285-288.
- Gramzinski, R. A., Millan, C. L., Obaldia, N., Hoffman, S. L., and Davis, H. L. (1998). Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in Aotus monkeys: a comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. *Mol.Med.* **4**, 109-118.
- Gregoriadis, G., Saffie, R., (1997). Liposome-mediated DNA vaccination. *FEBS Lett.* **402**, 107-110.
- Gruter, P., Tabernero, C., von-Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B. K., and Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Mol.Cell* **1**, 649-659.
- Haas, J., Park, E. C., and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr.Biol.* **6**, 315-324.
- Hadzopoulou Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A., and Pavlakis, G. N. (1989). The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *J.Virol.* **63**, 1265-1274.
- Hammariskjold, M. L., Li, H., Rekosh, D., and Prasad, S. (1994). Human immunodeficiency virus env expression becomes Rev- independent if the env region is not defined as an intron. *J.Virol.* **68**, 951-958.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.

- Hanke, T. and McMichael, A. (1999). Pre-clinical development of a multi-CTL epitope-based DNA prime MVA boost vaccine for AIDS. *Immunol.Lett.* **66**, 177-181.
- Harding, C. V. and Song, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J.Immunol.* **153**, 4925-4933.
- Hariharan, M. J., Driver, D. A., Townsend, K., Brumm, D., Polo, J. M., Belli, B. A., Catton, D. J., Hsu, D., Mittelstaedt, D., McCormack, J. E., Karavodin, L., Dubensky, T. W., Jr., Chang, S. M., and Banks, T. A. (1998). DNA immunization against herpes simplex virus: enhanced efficacy using a Sindbis virus-based vector. *J.Virol.* **72**, 950-958.
- Harrer, T., Harrer, E., Barbosa, P., Kaufmann, F., Wagner, R., Bruggemann, S., Kalden, J. R., Feinberg, M., Johnson, R. P., Buchbinder, S., and Walker, B. D. (1998). Recognition of two overlapping CTL epitopes in HIV-1 p17 by CTL from a long-term nonprogressing HIV-1-infected individual. *J.Immunol.* **161**, 4875-4881.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R. P., Elbeik, T., Feinberg, M. B., Buchbinder, S. P., and Walker, B. D. (1996a). Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection-Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasiespecies in a person with prolonged infection and low viral load. *Journal of Immunology* **156**, 2616-2623.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Elbeik, T., Staprans, S. I., Feinberg, M. B., Cao, Y., Ho, D. D., Yilma, T., Caliendo, A. M., Johnson, R. P., Buchbinder, S. P., and Walker, B. D. (1996b). Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **12**, 585-592.
- Harris, S. J., Gearing, A. J., Layton, G. T., Adams, S. E., and Kingsman, A. J. (1992). Enhanced proliferative cellular responses to HIV-1 V3 peptide and gp120 following immunization with V3:Ty virus-like particles. *Immunology* **77**, 315-321.
- Hartmann, G. and Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J.Immunol.* **164**, 944-953.
- Hartmann, G., Weeratna, R. D., Ballas, Z. K., Payette, P., Blackwell, S., Suparto, I., Rasmussen, W. L., Waldschmidt, M., Sajuthi, D., Purcell, R. H., Davis, H. L., and Krieg, A. M. (2000). Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J.Immunol.* **164**, 1617-1624.
- Heeney, J., Akerblom, L., Barnett, S., Bogers, W., Davis, D., Fuller, D., Koopman, G., Lehner, T., Mooij, P., Morein, B., De Giuli Morghen, C., Rosenwirth, B., Verschoor, E., Wagner, R., and Wolf, H. (1999). HIV-1 vaccine-induced immune responses which correlate with protection from SHIV infection: compiled preclinical efficacy data from trials with ten different HIV-1 vaccine candidates. *Immunol.Lett.* **66**, 189-195.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M., and Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 7311-7315.
- Henderson, B. R. and Percipalle, P. (1997). Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. *J.Mol.Biol.* **274**, 693-707.
- Hengge, U. R., Walker, P. S., and Vogel, J. C. (1996). Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin. *J.Clin.Invest.* **97**, 2911-2916.
- Ho, D. D., Neumann, A. U., Perelson, A. S., Chen, W., Leonard, J. M., and Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126.
- Hope, T. J. (1999). The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys* **365**, 186-191.
- Hsu, H. W., Schwartzberg, P., and Goff, S. P. (1985). Point mutations in the P30 domain of the gag gene of Moloney murine leukemia virus. *Virology* **142**, 211-214.
- Imberti, L., Sottini, A., Bettinardi, A., Puoti, M., and Primi, D. (1991). Selective depletion in HIV infection of T cells that bear specific T cell receptor V beta sequences. *Science* **254**, 860-862.
- Indraccolo, S., Feroli, F., Minuzzo, S., Mion, M., Rosato, A., Zamarchi, R., Titti, F., Verani, P., Amadori, A., and Chieco-Bianchi, L. (1998). DNA immunization of mice against SIVmac239 Gag and Env using Rev- independent expression plasmids. *AIDS.Res.Hum.Retroviruses* **14**, 83-90.
- Ishii, N., Fukushima, J., Kaneko, T., Okada, E., Tani, K., Tanaka, S. I., Hamajima, K., Xin, K. Q., Kawamoto, S., Koff, W., Nishioka, K., Yasuda, T., and Okuda, K. (1997). Cationic liposomes are a strong adjuvant for a DNA vaccine of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **13**, 1421-1428.
- Jacks, T., Power, M. D., Masiarz, F. R., Luciw, P. A., Barr, P. J., and Varmus, H. E. (1988). Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. *Nature* **331**, 280-283.
- Jiao, S., Williams, P., Berg, R. K., Hodgeman, B. A., Liu, L., Repetto, G., and Wolff, J. A. (1992). Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum.Gene Ther.* **3**, 21-33.
- Jones, K. A. and Peterlin, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu.Rev.Biochem.* **63**, 717-743.
- Kahn, M. A. (2000). A review and update on HIV infection and the AIDS epidemic in the adolescent and adult. *J.Tenn.Dent.Assoc.* **80**, 21-27.
- Katsumi, A., Emi, N., Abe, A., Hasegawa, Y., Ito, M., and Saito, H. (1994). Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Hum.Gene Ther.* **5**, 1335-1339.

- Kaul, D. and Ogra, P. L. (1998). Mucosal responses to parenteral and mucosal vaccines. *Dev.Biol.Stand.* **95**, 141-146.
- Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., and Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J.Virol.* **63**, 3708-3713.
- Kjems, J., Brown, M., Chang, D. D., and Sharp, P. A. (1991). Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**, 683-687.
- Klavinskis, L. S., Gao, L., Barnfield, C., Lehner, T., and Parker, S. (1997). Mucosal immunization with DNA-liposome complexes. *Vaccine* **15**, 818-820.
- Klein, M., Van Baalen, C., Holwerda, A., Garde, S. R., Bende, R., Keet, I. P., Eeftinck Schattenkerk, J. K., Osterhaus, A. D. M., Schuitemaker, H., and Miedema, F. (1995). Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: A longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatics. *Journal.of.Experimental.Medicine* **181(4)**: 1365.1372. 1365-1372.
- Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J., and Krieg, A. M. (1996). CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **93**, 2879-2883.
- Koffler, D., Agnello, V., Carr, R. I., and Kunkel, H. G. (1969). Anti-DNA antibodies and renal lesions of patients with systemic lupus erythematosus. *Transplant.Proc.* **1**, 933-938.
- Koltover, I., Salditt, T., Radler, J. O., and Safinya, C. R. (1998). An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery. *Science* **281**, 78-81.
- Koup, R. A. and Ho, D. D. (1994). Shutting down HIV. *Nature* **370**, 416-416.
- Koup, R. A., Safrit, J. T., Cao, Y., Andrews, C. A., McLeod, G., Borkowsky, W., Farthing, C., and Ho, D. D. (1994). Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J.Virol.* **68**, 4650-4655.
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic.Acids.Res.* **15**, 8125-8148.
- Krieg, A. M. (1996). Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. *Trends.Microbiol.* **4**, 73-76.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549.
- Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648-659.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Laspia, M. F., Rice, A. P., and Mathews, M. B. (1989). HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**, 283-292.
- Layton, G. T., Harris, S. J., Gearing, A. J., Hill Perkins, M., Cole, J. S., Griffiths, J. C., Burns, N. R., Kingsman, A. J., and Adams, S. E. (1993). Induction of HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo with hybrid HIV-1 V3:Ty-virus-like particles. *J.Immunol.* **151**, 1097-1107.
- Le, S. Y., Malim, M. H., Cullen, B. R., and Maizel, J. V. (1990). A highly conserved RNA folding region coincident with the Rev response element of primate immunodeficiency viruses. *Nucleic.Acids.Res.* **18**, 1613-1623.
- Learmont, J. C., Geczy, A. F., Mills, J., Ashton, L. J., Raynes-Greenow, C. H., Garsia, R. J., Dyer, W. B., McIntyre, L., Oelrichs, R. B., Rhodes, D. I., Deacon, N. J., and Sullivan, J. S. (1999). Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N.Engl.J.Med.* **340**, 1715-1722.
- Lee, S. W., Cho, J. H., and Sung, Y. C. (1998). Optimal induction of hepatitis C virus envelope-specific immunity by bicistronic plasmid DNA inoculation with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *J.Virol.* **72**, 8430-8436.
- Lehner, T., Bergmeier, L. A., Panagiotidi, C., Tao, L., Brookes, R., Klavinskis, L. S., Walker, P., Walker, J., Ward, R. G., Hussain, L., and et al (1992). Induction of mucosal and systemic immunity to a recombinant simian immunodeficiency viral protein. *Science* **258**, 1365-1369.
- Letvin, N. L., Barouch, D. H., and Montefiori, D. C. (2002). Prospects for vaccine protection against hiv-1 infection and AIDS. *Annu.Rev.Immunol.* **20**, 73-99.
- Letvin, N. L., Montefiori, D. C., Yasutomi, Y., Perry, H. C., Davies, M. E., Lekutis, C., Alroy, M., Freed, D. C., Lord, C. I., Handt, L. K., Liu, M. A., and Shiver, J. W. (1997). Potent, protective anti-HIV immune responses generated by bimodal HIV envelope DNA plus protein vaccination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 9378-9383.
- Levine, A. M., Groshen, S., Allen, J., Munson, K. M., Carlo, D. J., Daigle, A. E., Ferre, F., Jensen, F. C., Richieri, S. P., Trauger, R. J., Parker, J. W., Salk, P. L., and Salk, J. (1996). Initial studies on active immunization of HIV-infected subjects using a gp120-depleted HIV-1 Immunogen: long-term follow-up. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.Hum.Retrovirol.* **11**, 351-364.
- Levy, J. A. (1993). Features of human immunodeficiency virus infection and disease. *Pediatr.Res.* **33**, S63-S69.
- Li, J., Lord, C. I., Haseltine, W., Letvin, N. L., and Sodroski, J. (1992). Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric

- HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.* **5**, 639-646.
- Li, Y., Luo, L., Thomas, D. Y., and Kang, C. Y. (1994). Control of expression, glycosylation, and secretion of HIV-1 gp120 by homologous and heterologous signal sequences. *Virology* **204**, 266-278.
- Liang, X., Munshi, S., Shendure, J., Mark, G., III, Davies, M. E., Freed, D. C., Montefiori, D. C., and Shiver, J. W. (1999). Epitope insertion into variable loops of HIV-1 gp120 as a potential means to improve immunogenicity of viral envelope protein. *Vaccine* **17**, 2862-2872.
- Liljestrom, P. and Garoff, H. (1991). A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology N.Y.* **9**, 1356-1361.
- Lu, S., Santoro, J. C., Fuller, D. H., Haynes, J. R., and Robinson, H. L. (1995). Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* **209**, 147-154.
- Lu, X. B., Heimer, J., Rekosh, D., and Hammarskjold, M. L. (1990). U1 small nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev- regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 7598-7602.
- Lubeck, M. D., Natuk, R. J., Chengalvala, M., Chanda, P. K., Murthy, K. K., Murthy, S., Mizutani, S., Lee, S. G., Wade, M. S., Bhat, B. M., and et al (1994). Immunogenicity of recombinant adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees following intranasal administration [published erratum appears in AIDS Res Hum Retroviruses 1995 Jan; 11(1):189]. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **10**, 1443-1449.
- Lynch, J. A., deSouza, M., Robb, M. D., Markowitz, L., Nitayaphan, S., Sapan, C. V., Mann, D. L., Bix, D. L., and Cox, J. H. (1998). Cross-clade cytotoxic T cell response to human immunodeficiency virus type 1 proteins among HLA disparate North Americans and Thais. *J.Infect.Dis.* **178**, 1040-1046.
- Maggi, E., Mazzetti, M., Ravina, A., Annunziato, F., De Carli, M., Piccinni, M. P., Manetti, R., Carbonari, M., Pesce, A. M., Del Prete, G., and et al (1994). Ability of HIV to promote a TH1 to TH0 shift and to replicate preferentially in TH2 and TH0 cells. *Science* **265**, 244-248.
- Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1991). Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation. *J.Virol.* **65**, 5732-5743.
- Maldarelli, F., Xiang, C., Chamoun, G., and Zeichner, S. L. (1998). The expression of the essential nuclear splicing factor SC35 is altered by human immunodeficiency virus infection. *Virus.Res.* **53**, 39-51.
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Fenrick, R., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R. (1989). Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86**, 8222-8226.
- Malim, M. H., Freimuth, W. W., Liu, J., Boyle, T. J., Lyster, H. K., Cullen, B. R., and Nabel, G. J. (1992). Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J.Exp.Med.* **176**, 1197-1201.
- Malim, M. H., Tiley, L. S., McCarn, D. F., Rusche, J. R., Hauber, J., and Cullen, B. R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**, 675-683.
- Manickan, E., Yu, Z., Rouse, R. J., Wire, W. S., and Rouse, B. T. (1995). Induction of protective immunity against herpes simplex virus with DNA encoding the immediate early protein ICP 27. *Viral.Immunol.* **8**, 53-61.
- Martin, T., Parker, S. E., Hedstrom, R., Le, T., Hoffman, S. L., Norman, J., Hobart, P., and Lew, D. (1999). Plasmid DNA malaria vaccine: the potential for genomic integration after intramuscular injection. *Hum.Gene Ther.* **10**, 759-768.
- Mascola, J. R., Snyder, S. W., Weislow, O. S., Belay, S. M., Belshe, R. B., Schwartz, D. H., Clements, M. L., Dolin, R., Graham, B. S., Gorse, G. J., Keefer, M. C., McElrath, M. J., Walker, M. C., Wagner, K. F., McNeil, J. G., McCutchan, F. E., and Burke, D. S. (1996). Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Vaccine Evaluation Group. *J.Infect.Dis.* **173**, 340-348.
- Mathiesen, I. (1999). Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther.* **6**, 508-514.
- McCutchan, F. E., Salminen, M. O., Carr, J. K., and Burke, D. S. (1996). HIV-1 genetic diversity. *AIDS* **10 Suppl 3**, S13-20.
- McGhee, J. R. and Kiyono, H. (1993). New perspectives in vaccine development: mucosal immunity to infections. *Infect.Agents Dis.* **2**, 55-73.
- McGhee, J. R., Mestecky, J., Dertzbaugh, M. T., Eldridge, J. H., Hirasawa, M., and Kiyono, H. (1992). The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* **10**, 75-88.
- McGhee, J. R., Yamamoto, M., Kang, D. W., Eldridge, J. H., Mestecky, J., Moldoveanu, Z., Compans, R., Kiyono, H., Miller, C., Marthas, M., and . (1992). Isotype of anti-SIV responses in infected rhesus macaques and in animals immunized by mucosal routes. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8**, 1389.
- Michel, M. L., Mancini, M., Riviere, Y., Dormont, D., and Tiollais, P. (1990). T- and B-lymphocyte responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in macaques immunized with hybrid HIV/hepatitis B surface antigen particles. *J.Virol.* **64**, 2452-2455.
- Milich, D. R., McLachlan, A., Chisari, F. V., Kent, S. B., and Thornton, G. B. (1986). Immune response to the pre-S(1) region of the hepatitis B surface antigen (HBsAg): a pre-S(1)-specific T cell response can bypass nonresponsiveness to the pre-S(2) and S regions of HBsAg. *J.Immunol.* **137**, 315-322.

- Milich, D. R., Thornton, G. B., Neurath, A. R., Kent, S. B., Michel, M. L., Tiollais, P., and Chisari, F. V. (1985). Enhanced immunogenicity of the pre-S region of hepatitis B surface antigen. *Science* **228**, 1195-1199.
- Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 4262-4267.
- Montefiori, D. and Moore, J. P. (1999). HIV vaccines. Magic of the occult? *Science* **283**, 336-337.
- Moore, J. and Trkola, A. (1997). HIV type 1 coreceptors, neutralization serotypes, and vaccine development. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **13**, 733-736.
- Moore, J. P. and Burton, D. R. (1999). HIV-1 neutralizing antibodies: how full is the bottle? *Nat.Med.* **5**, 142-144.
- Moore, J. P., Trkola, A., Korber, B., Boots, L. J., Kessler, J. A., McCutchan, F. E., Mascola, J., Ho, D. D., Robinson, J., and Conley, A. J. (1995). A human monoclonal antibody to a complex epitope in the V3 region of gp120 of human immunodeficiency virus type 1 has broad reactivity within and outside clade B. *J.Virol.* **69**, 122-130.
- Mor, G., Singla, M., Steinberg, A. D., Hoffman, S. L., Okuda, K., and Klinman, D. M. (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease? *Hum.Gene Ther.* **8**, 293-300.
- Moss, B., Smith, G. L., Gerin, J. L., and Purcell, R. H. (1984). Live recombinant vaccinia virus protects chimpanzees against hepatitis B. *Nature* **311**, 67-69.
- Mossman, S. P., Bex, F., Berglund, P., Arthos, J., O'Neil, S. P., Riley, D., Maul, D. H., Bruck, C., Momin, P., Burny, A., Fultz, P. N., Mullins, J. I., Liljestrom, P., and Hoover, E. A. (1996). Protection against lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14 disease by a recombinant Semliki Forest virus gp160 vaccine and by a gp120 subunit vaccine. *J.Virol.* **70**, 1953-1960.
- Musey, L., Hughes, J., Schacker, T., Shea, T., Corey, L., and McElrath, M. J. (1997). Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection [see comments]. *N.Engl.J.Med.* **337**, 1267-1274.
- Nakamura, Y., Kameoka, M., Tobiume, M., Kaya, M., Ohki, K., Yamada, T., and Ikuta, K. (1997). A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *Vaccine* **15**, 489-496.
- Nasioulas, G., Zolotukhin, A. S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C. P., Pavlakis, G. N., and Felber, B. K. (1994). Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA. *J.Virol.* **68**, 2986-2993.
- Nathanson, N., McGann, K. A., Wilesmith, J., Desrosiers, R. C., and Brookmeyer, R. (1993). The evolution of virus diseases: their emergence, epidemicity, and control. *Virus Res.* **29**, 3-20.
- Neumann, A. U., Tubiana, R., Calvez, V., Robert, C., Li, T. S., Agut, H., Autran, B., and Katlama, C. (1999). HIV-1 rebound during interruption of highly active antiretroviral therapy has no deleterious effect on reinitiated treatment. Comet Study Group. *AIDS* **13**, 677-683.
- Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V., and Troilo, P. J. (1995). Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **772**, 30-39.
- Notka, F., Stahl-Hennig, C., Dittmer, U., Wolf, H., and Wagner, R. (1999). Accelerated clearance of SHIV in rhesus monkeys by virus-like particle vaccines is dependent on induction of neutralizing antibodies. *Vaccine* **18**, 291-301.
- Notka, F., Stahl, H. C., Dittmer, U., Wolf, H., and Wagner, R. (1999). Construction and characterization of recombinant VLPs and Semliki-Forest virus live vectors for comparative evaluation in the SHIV monkey model. *Biol.Chem.* **380**, 341-352.
- Nowak, M. A., May, R. M., Phillips, R. E., Rowland Jones, S., Lalloo, D. G., McAdam, S., Klenerman, P., Koppe, B., Sigmund, K., Bangham, C. R., and et al (1995). Antigenic oscillations and shifting immunodominance in HIV-1 infections. *Nature* **375**, 606-611.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P., Cao, Y., Rowland Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D., Nixon, D. F., and McMichael, A. J. (1998). Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**, 2103-2106.
- Oggioni, M. R., Medaglini, D., Romano, L., Peruzzi, F., Maggi, T., Lozzi, L., Bracci, L., Zazzi, M., Manca, F., Valensin, P. E., and Pozzi, G. (1999). Antigenicity and immunogenicity of the V3 domain of HIV type 1 glycoprotein 120 expressed on the surface of *Streptococcus gordonii*. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **15**, 451-459.
- Okada, E., Sasaki, S., Ishii, N., Aoki, I., Yasuda, T., Nishioka, K., Fukushima, J., Miyazaki, J., Wahren, B., and Okuda, K. (1997). Intranasal immunization of a DNA vaccine with IL-12- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-expressing plasmids in liposomes induces strong mucosal and cell-mediated immune responses against HIV-1 antigens. *J.Immunol.* **159**, 3638-3647.
- Palker, T. J., Matthews, T. J., Langlois, A., Tanner, M. E., Martin, M. E., Searce, R. M., Kim, J. E., Berzofsky, J. A., Bolognesi, D. P., and Haynes, B. F. (1989). Polyvalent human immunodeficiency virus synthetic immunogen comprised of envelope gp120 T helper cell sites and B cell neutralization epitopes. *J.Immunol.* **142**, 3612-3619.
- Pantaleo, G., Demarest, J. F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J. W., Borrow, P., Saag, M. S., Shaw, G. M., Sekaly, R. P., and et al (1994). Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV [see comments]. *Nature* **370**, 463-467.
- Paoletti, E., Lipinkas, B. R., Samsonoff, C., Mercer, S., and Panicali, D. (1984). Construction of live vaccines using

- genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 193-197.
- Parolin, C., Dorfman, T., Palu, G., Gottlinger, H., and Sodroski, J. (1994). Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis- acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J.Virol.* **68**, 3888-3895.
- Paul, N. L., Marsh, M., McKeating, J. A., Schulz, T. F., Liljestrom, P., Garoff, H., and Weiss, R. A. (1993). Expression of HIV-1 envelope glycoproteins by Semliki Forest virus vectors. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **9**, 963-970.
- Perelson, A. S., Essunger, P., and Ho, D. D. (1997). Dynamics of HIV-1 and CD4+ lymphocytes in vivo. *AIDS* **11 Suppl A**, S17-S24.
- Perelson, A. S., Neumann, A. U., Markowitz, M., Leonard, J. M., and Ho, D. D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**, 1582-1586.
- Perez, L. G., O'Donnell, M. A., and Stephens, E. B. (1992). The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J.Virol.* **66**, 4134-4143.
- Pertmer, T. M., Eisenbraun, M. D., McCabe, D., Prayaga, S. K., Fuller, D. H., and Haynes, J. R. (1995). Gene gun-based nucleic acid immunization: elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* **13**, 1427-1430.
- Pertmer, T. M., Roberts, T. R., and Haynes, J. R. (1996). Influenza virus nucleoprotein-specific immunoglobulin G subclass and cytokine responses elicited by DNA vaccination are dependent on the route of vector DNA delivery. *J.Virol.* **70**, 6119-6125.
- Phillips, R. E., Rowland Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., and et al (1991). Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature* **354**, 453-459.
- Phillipotts, R. J., Venugopal, K., and Brooks, T. (1996). Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch.Virol.* **141**, 743-749.
- Picard, O., Lebas, J., Imbert, J. C., Bigel, P., and Zagury, D. (1991). Complication of intramuscular/subcutaneous immune therapy in severely immune-compromised individuals. *J.Acquir.Immune.Defic.Sydr.* **4**, 641-643.
- Pollard, V. W. and Malim, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein [In Process Citation]. *Annu.Rev.Microbiol.* **52:491-532**, 491-532.
- Purcell, D. F. and Martin, M. A. (1993). Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J.Virol.* **67**, 6365-6378.
- Purtscher, M., Trkola, A., Grassauer, A., Schulz, P. M., Klima, A., Dopfer, S., Gruber, G., Buchacher, A., Muster, T., and Katinger, H. (1996). Restricted antigenic variability of the epitope recognized by the neutralizing gp41 antibody 2F5. *AIDS* **10**, 587-593.
- Qiu, J. T., Liu, B., Tian, C., Pavlakis, G. N., and Yu, X. F. (2000). Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. *J.Virol.* **74**, 5997-6005.
- Qiu, J. T., Song, R., Dettenhofer, M., Tian, C., August, T., Felber, B. K., Pavlakis, G. N., and Yu, X. F. (1999). Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J.Virol.* **73**, 9145-9152.
- Ramirez, J. C., Gherardi, M. M., and Esteban, M. (2000). Biology of attenuated modified vaccinia virus Ankara recombinant vector in mice: virus fate and activation. *J.Virol.* **74**, 923-933.
- Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L. L., Mitsuya, H., Liou, R. S., Gallo, R. C., and Wong Staal, F. (1987). Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **3**, 57-69.
- Rayevskaya, M. V. and Frankel, F. R. (2001). Systemic immunity and mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag protein in mice by a new hyperattenuated strain of *Listeria monocytogenes*. *J.Virol.* **75**, 2786-2791.
- Raz, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A., and . (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 9519-9523.
- Redfield, R. R., Wright, D. C., James, W. D., Jones, T. S., Brown, C., and Burke, D. S. (1987). Disseminated vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency virus (HIV) disease. *N.Engl.J.Med.* **316**, 673-676.
- Reimann, K. A., Li, J. T., Veazey, R., Halloran, M., Park, I. W., Karlsson, G. B., Sodroski, J., and Letvin, N. L. (1996b). A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J.Virol.* **70**, 6922-6928.
- Reimann, K. A., Li, J. T., Voss, G., Lekutis, C., Tennerracz, K., Racz, P., Lin, W. Y., Montefiori, D. C., Leeparritz, D. E., Lu, Y. C., Collman, R. G., Sodroski, J., and Letvin, N. L. (1996a). An Env gene from a primary human immunodeficiency virus type I isolat confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J.Virol.* **70**, 3198-3206.
- Ria, F., Chan, B. M., Scherer, M. T., Smith, J. A., and Geffer, M. L. (1990). Immunological activity of covalently linked T-cell epitopes. *Nature* **343**, 381-383.

- Richardson, J. H., Child, L. A., and Lever, A. M. (1993). Packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA requires cis-acting sequences outside the 5' leader region. *J. Virol.* **67**, 3997-4005.
- Richieri, S. P., Bartholomew, R., Aloia, R. C., Savary, J., Gore, R., Holt, J., Ferre, F., Musil, R., Tian, H. R., Trauger, R., Lowry, P., Jensen, F., Carlo, D. J., Maigetter, R. Z., and Prior, C. P. (1998). Characterization of highly purified, inactivated HIV-1 particles isolated by anion exchange chromatography. *Vaccine* **16**, 119-129.
- Richmond, J. F., Lu, S., Santoro, J. C., Weng, J., Hu, S. L., Montefiori, D. C., and Robinson, H. L. (1998). Studies of the neutralizing activity and avidity of anti-human immunodeficiency virus type 1 Env antibody elicited by DNA priming and protein boosting. *J. Virol.* **72**, 9092-9100.
- Rinaldo, C., Huang, X. L., Fan, Z. F., Ding, M., Beltz, L., Logar, A., Panicali, D., Mazzara, G., Liebmann, J., Cottrill, M., and et al (1995). High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Virol.* **69**, 5838-5842.
- Rizvi, T. A., Lew, K. A., Murphy, E. C., Jr., and Schmidt, R. D. (1996). Role of Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) in the propagation of MPMV vectors by genetic complementation using homologous/heterologous env genes. *Virology*. **224**, 517-532.
- Rizvi, T. A., Schmidt, R. D., and Lew, K. A. (1997). Mason-Pfizer monkey virus (MPMV) constitutive transport element (CTE) functions in a position-dependent manner. *Virology*. **236**, 118-129.
- Rizvi, T. A., Schmidt, R. D., Lew, K. A., and Keeling, M. E. (1996). Rev/RRE-independent Mason-Pfizer monkey virus constitutive transport element-dependent propagation of SIMac239 vectors using a single round of replication assay. *Virology* **222**, 457-463.
- Robertson, D. L., Hahn, B. H., and Sharp, P. M. (1995). Recombination in AIDS viruses. *J. Mol. Evol.* **40**, 249-259.
- Robinson, H. L., Montefiori, D. C., Johnson, R. P., Kalish, M. L., Lydy, S. L., and McClure, H. M. (2000). DNA priming and recombinant pox virus boosters for an AIDS vaccine. *Dev. Biol. (Basel)* **104**, 93-100.
- Robinson, H. L. and Torres, C. A. (1997). DNA vaccines. *Semin. Immunol.* **9**, 271-283.
- Rosen, C. A. and Pavlakis, G. N. (1990). Tat and Rev: positive regulators of HIV gene expression [published erratum appears in AIDS 1990 Aug;4(8):following A48]. *AIDS* **4**, 499-509.
- Rosen, C. A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1988). Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 2071-2075.
- Rosenberg, E. S., Billingsley, J. M., Caliendo, A. M., Boswell, S. L., Sax, P. E., Kalams, S. A., and Walker, B. D. (1997). Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia [see comments]. *Science* **278**, 1447-1450.
- Rowland Jones, S., Sutton, J., Ariyoshi, K., Dong, T., Gotch, F., McAdam, S., Whitby, D., Sabally, S., Gallimore, A., Corrah, T., and et al (1995). HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women [published erratum appears in Nat Med 1995 Jun;1(6): 598]. *Nat. Med.* **1**, 59-64.
- Rowland Jones, S. L., Phillips, R. E., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., Elvin, J. G., Rothbard, J. A., Bangham, C. R., Rizza, C. R., and et al (1992). Human immunodeficiency virus variants that escape cytotoxic T-cell recognition. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 1353-1354.
- Saag, M. S. and Kilby, J. M. (1999). HIV-1 and HAART: a time to cure, a time to kill [news; comment]. *Nat. Med.* **5**, 609-611.
- Safrit, J. T., Andrews, C. A., Zhu, T., Ho, D. D., and Koup, R. A. (1994). Characterization of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte clones isolated during acute seroconversion: recognition of autologous virus sequences within a conserved immunodominant epitope. *J. Exp. Med.* **179**, 463-472.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A., and Raz, E. (1996). Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* **273**, 352-354.
- Sattentau, Q. J. and Moore, J. P. (1995). Human immunodeficiency virus type 1 neutralization is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J. Exp. Med.* **182**, 185-196.
- Schirmbeck, R., Melber, K., Kuhrober, A., Janowicz, Z. A., and Reimann, J. (1994b). Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J. Immunol.* **152**, 1110-1119.
- Schirmbeck, R., Melber, K., Mertens, T., and Reimann, J. (1994a). Antibody and cytotoxic T-cell responses to soluble hepatitis B virus (HBV) S antigen in mice: implication for the pathogenesis of HBV-induced hepatitis. *J. Virol.* **68**, 1418-1425.
- Schlienger, K., Mancini, M., Riviere, Y., Dormont, D., Tiollais, P., and Michel, M. L. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 major neutralizing determinant exposed on hepatitis B surface antigen particles is highly immunogenic in primates. *J. Virol.* **66**, 2570-2576.

- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1997). Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* **71**, 4892-4903.
- Schultz, J., Dollenmaier, G., and Molling, K. (2000). Update on antiviral DNA vaccine research (1998-2000). *Intervirology* **43**, 197-217.
- Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1992). Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J. Virol.* **66**, 7176-7182.
- Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E. M., and Pavlakis, G. N. (1990). Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **64**, 2519-2529.
- Schwartz, S., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1991). Expression of human immunodeficiency virus type 1 vif and vpr mRNAs is Rev-dependent and regulated by splicing. *Virology* **183**, 677-686.
- Schwartz, S., Felber, B. K., and Pavlakis, G. N. (1992a). Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol.* **66**, 150-159.
- Sedegah, M., Hedstrom, R., Hobart, P., and Hoffman, S. L. (1994). Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 9866-9870.
- Selby, M., Goldbeck, C., Pertile, T., Walsh, R., and Ulmer, J. (2000). Enhancement of DNA vaccine potency by electroporation in vivo. *J.Biotechnol.* **83**, 147-152.
- Selby, M. J., Doe, B., and Walker, C. M. (1997). Virus-specific cytotoxic T-lymphocyte activity elicited by coimmunization with human immunodeficiency virus type 1 genes regulated by the bacteriophage T7 promoter and T7 RNA polymerase protein. *J. Virol.* **71**, 7827-7831.
- Seth, A., Ourmanov, I., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Carroll, M. W., Wyatt, L. S., Moss, B., Forman, M. A., Hirsch, V. M., and Letvin, N. L. (1998). Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus gag pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/peptide tetramer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 10112-10116.
- Sharp, P. M., Bailes, E., Robertson, D. L., Gao, F., and Hahn, B. H. (1999). Origins and evolution of AIDS viruses. *Biol.Bull.* **196**, 338-342.
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM- CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-667.
- Shiver, J. W., Davies, M. E., Yasutomi, Y., Perry, H. C., Freed, D. C., Letvin, N. L., and Liu, M. A. (1997). Anti-HIV env immunities elicited by nucleic acid vaccines. *Vaccine* **15**, 884-887.
- Smaglik, P. (2000). Bacterial AIDS vaccine ready for testing. *Nature* **405**, 386.
- Smith, G. L., Mackett, M., and Moss, B. (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* **302**, 490-495.
- Smith, G. L., Murphy, B. R., and Moss, B. (1983). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80**, 7155-7159.
- Staats, H. F., Jackson, R. J., Marinaro, M., Takahashi, I., Kiyono, H., and McGhee, J. R. (1994). Mucosal immunity to infection with implications for vaccine development. *Curr.Opin.Immunol.* **6**, 572-583.
- Stacey, K. J., Sweet, M. J., and Hume, D. A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J.Immunol.* **157**, 2116-2122.
- Staerz, U. D., Karasuyama, H., and Garner, A. M. (1987). Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein. *Nature* **329**, 449-451.
- Steger, K. K. and Pauza, C. D. (1997). Immunization of Macaca mulatta with aroA attenuated Salmonella typhimurium expressing the SIVp27 antigen. *J.Med.Primatol.* **26**, 44-50.
- Stott, J. and Almond, N. (1995). Assessing animal models of AIDS [comment]. *Nat.Med.* **1**, 295-297.
- Su, L., Graf, M., Zhang, Y., von Briesen, H., Xing, H., Kostler, J., Melzl, H., Wolf, H., Shao, Y., and Wagner, R. (2000). Characterization of a virtually full-length human immunodeficiency virus type 1 genome of a prevalent intersubtype (C/B') recombinant strain in china [In Process Citation]. *J Virol* **74**, 11367-11376.
- Sutter, G. and Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 10847-10851.
- Sutter, G. and Moss, B. (1995). Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev.Biol.Stand.* **84**, 195-200.
- Taberner, C., Zolotukhin, A. S., Valentin, A., Pavlakis, G. N., and Felber, B. K. (1996). The posttranscriptional control element of the simian retrovirus type 1 forms an extensive RNA secondary structure necessary for its function. *J. Virol.* **70**, 5998-6011.
- Tang, D. C., DeVit, M., and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-154.

- Tartaglia, J., Cox, W. I., Pincus, S., and Paoletti, E. (1994). Safety and immunogenicity of recombinants based on the genetically-engineered vaccinia strain, NYVAC. *Dev.Biol.Stand.* **82**, 125-129.
- Tartaglia, J., Cox, W. I., Taylor, J., Perkus, M., Riviere, M., Meignier, B., and Paoletti, E. (1992). Highly attenuated poxvirus vectors. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **8**, 1445-1447.
- Tascon, R. E., Colston, M. J., Ragno, S., Stavropoulos, E., Gregory, D., and Lowrie, D. B. (1996). Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat.Med.* **2**, 888-892.
- Tripathy, S. P., Kumar, A., Manivel, V., Panda, S. K., and Rao, K. V. (1992). Design and synthesis of a self-assembling peptide derived from the envelope proteins of HIV type 1. An approach to heterovalent immunogens. *J.Immunol.* **148**, 4012-4020.
- Trkola, A., Pomales, A. B., Yuan, H., Korber, B., Maddon, P. J., Allaway, G. P., Katinger, H., Barbas, C. F., Burton, D. R., Ho, D. D., and et al (1995). Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J.Virol.* **69**, 6609-6617.
- Tung, F. Y., Rinaldo, C. R., Jr., and Montelaro, R. C. (1998). Replication-defective HIV as a vaccine candidate. *AIDS Res.Hum.Retroviruses* **14**, 1247-1252.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Deck, R. R., DeWitt, C. M., and Liu, M. A. (1995). Immunization against viral proteins with naked DNA. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **772**, 117-125.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., and et al (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein [see comments]. *Science* **259**, 1745-1749.
- Ulmer, J. B. and Otten, G. R. (2000). Priming of CTL responses by DNA vaccines: direct transfection of antigen presenting cells versus cross-priming. *Dev.Biol.(Base)* **104**, 9-14.
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A., Asjo, B., and Wain Hobson, S. (1991). Selection, recombination, and G----A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J.Virol.* **65**, 1779-1788.
- Vartanian, J. P., Meyerhans, A., Sala, M., and Wain Hobson, S. (1994). G-->A hypermutation of the human immunodeficiency virus type 1 genome: evidence for dCTP pool imbalance during reverse transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 3092-3096.
- Velin, D., Hopkins, S., and Kraehenbuhl, J. (1998). Delivery systems and adjuvants for vaccination against HIV. *Pathobiology* **66**, 170-175.
- Velin, D. and Kraehenbuhl, J. P. (2000). Delivery systems and adjuvants for vaccination against HIV. *EXS* **89**, 227-237.
- Wada, K., Aota, S., Tsuchiya, R., Ishibashi, F., Gojobori, T., and Ikemura, T. (1990). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **18 Suppl**, 2367-2411.
- Wagner, R. Rekombinante HIV-1 Core-Partikel und davon abgeleitete Fusionsproteine: Modell für eine HIV-Vakzine. 1991.Max-von-Pettenkofer-Institut,München. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Wagner, R., Boltz, T., Deml, L., Modrow, S., and Wolf, H. (1993). Induction of cytolytic T lymphocytes directed towards the V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 external glycoprotein gp120 by p55gag/V3 chimeric vaccinia viruses. *J.Gen.Virol.* **74**, 1261-1269.
- Wagner, R., Deml, L., Notka, F., Wolf, H., Schirmbeck, R., Reimann, J., Teeuwsen, V., and Heeney, J. (1996a). Safety and immunogenicity of recombinant human immunodeficiency virus-like particles in rodents and rhesus macaques. *Intervirology* **39**, 93-103.
- Wagner, R., Deml, L., Schirmbeck, R., Niedrig, M., Reimann, J., and Wolf, H. (1996b). Construction, expression and immunogenicity of chimeric HIV-1 virus-like particles. *Virology* **220**, 128-140.
- Wagner, R., Deml, L., Schirmbeck, R., Reimann, J., and Wolf, H. (1994). Induction of a MHC class I-restricted, CD8 positive cytolytic T- cell response by chimeric HIV-1 virus-like particles in vivo: implications on HIV vaccine development. *Behring.Inst.Mitt.* 23-34.
- Wagner, R., Fliessbach, H., Wanner, G., Motz, M., Niedrig, M., Deby, G., von Brunn, A., and Wolf, H. (1992). Studies on processing, particle formation, and immunogenicity of the HIV-1 gag gene product: a possible component of a HIV vaccine. *Arch.Virol.* **127**, 117-137.
- Wagner, R., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., Grunwald, T., Foley, P., and Uberla, K. (2000). Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors [In Process Citation]. *Hum Gene Ther* **11**, 2403-2413.
- Wagner, R., Leschonsky, B., Harrer, E., Paulus, C., Weber, C., Walker, B. D., Buchbinder, S., Wolf, H., Kalden, J. R., and Harrer, T. (1999). Molecular and functional analysis of a conserved CTL epitope in HIV-1 p24 recognized from a long-term nonprogressor: constraints on immune escape associated with targeting a sequence essential for viral replication. *J.Immunol.* **162**, 3727-3734.
- Wagner, R., Teeuwsen, V. J., Deml, L., Notka, F., Haaksma, A. G., Jhagjhoorsingh, S. S., Niphuis, H., Wolf, H., and Heeney, J. L. (1998). Cytotoxic T cells and neutralizing antibodies induced in rhesus monkeys by virus-like particle HIV vaccines in the absence of protection from SHIV infection. *Virology.* **245**, 65-74.
- Walker, B. D., Chakrabarti, S., Moss, B., Paradis, T. J., Flynn, T., Durno, A. G., Blumberg, R. S., Kaplan, J. C., Hirsch, M. S., and Schooley, R. T. (1987). HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in seropositive individuals. *Nature* **328**, 345-348.

- Walker, B. D. and Plata, F. (1990). Cytotoxic T lymphocytes against HIV. *AIDS* **4**, 177-184.
- Wang, B., Boyer, J., Srikantan, V., Coney, L., Carrano, R., Phan, C., Merva, M., Dang, K., Agadjanian, M., Gilbert, L., and et al (1993). DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol.* **12**, 799-805.
- Weissenhorn, W., Dessen, A., Harrison, S. C., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41 [see comments]. *Nature* **387**, 426-430.
- Whalen, R. G. and Davis, H. L. (1995). DNA-mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **75**, 1-12.
- Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S. W., Chen, M., Leung, L., Otten, G. R., Thudium, K., Selby, M. J., and Ulmer, J. B. (2000). Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J.Immunol.* **164**, 4635-4640.
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., Mackett, M., and et al (1984). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **81**, 7194-7198.
- Wiktor, T. J., Macfarlan, R. I., Reagan, K. J., Dietzschold, B., Curtis, P. J., Wunner, W. H., Kieny, M. P., Lathe, R., Lecocq, J. P., Mackett, M., and et al (1992). Protection from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. 1984 [classical article]. *Biotechnology* **24**, 508-512.
- Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992). Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J.Virol.* **66**, 7193-7200.
- Winegar, R. A., Monforte, J. A., Suing, K. D., O'Loughlin, K. G., Rudd, C. J., and Macgregor, J. T. (1996). Determination of tissue distribution of an intramuscular plasmid vaccine using PCR and in situ DNA hybridization. *Hum.Gene Ther.* **7**, 2185-2194.
- Wolf, H., Modrow, S., Soutschek, E., Motz, M., Grunow, R., and Döbl, H. (1990). Production, mapping and biological characterisation of monoclonal antibodies to the core protein (p24) of the human immunodeficiency virus type 1. *AIFO* **1**, 24-29.
- Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. (1992). Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* **1**, 363-369.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-1468.
- Wolff, J. A., Williams, P., Acsadi, G., Jiao, S., Jani, A., and Chong, W. (1991). Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo. *Biotechniques* **11**, 474-485.
- Xiang, Z. Q., Knowles, B. B., McCarrick, J. W., and Ertl, H. C. (1995). Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus. *Virology* **214**, 398-404.
- Xin, K. Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiyama, K., Mizukami, H., Hamajima, K., Nomiyama, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., and Okuda, K. (2001). A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum.Gene Ther.* **12**, 1047-1061.
- Yoshida, A., Nagata, T., Uchijima, M., Higashi, T., and Koide, Y. (2000). Advantage of gene gun-mediated over intramuscular inoculation of plasmid DNA vaccine in reproducible induction of specific immune responses. *Vaccine* **18**, 1725-1729.
- Yu, X., Yuan, X., Matsuda, Z., Lee, T. H., and Essex, M. (1992). The matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 is required for incorporation of viral envelope protein into mature virions. *J.Virol.* **66**, 4966-4971.
- zur, M. J., Chen, M. C., Doe, B., Schaefer, M., Greer, C. E., Selby, M., Otten, G. R., and Barnett, S. W. (2000). Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J.Virol.* **74**, 2628-2635.

F.2 Eigene Veröffentlichungen

Fitzon,T., Leschonsky,B., **Bieler,K.**, Paulus,C., Schroder,J., Wolf,H., Wagner,R. Proline residues in the HIV-1 NH2-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication.*Virology* 2000 Mar;268(2):294-307.

Deml, L., Graf, M., Leschonsky, B., Bojak, A., **Bieler, K.**, Su, L., Shao, Y., Wolf, H. and Wagner, R. (1998). Strategies to improve the efficacy of particulate HIV subunit vaccines for future field studies. In: „Proceedings of 2nd EC Biotechnology Meeting on Vaccinology” (Roy, P., Leclerc, C., eds) pp 89-92. CEC DG XII, Biotechnology Division.

Graf, M., Bojak, A., Deml, L., **Bieler, K.**, Wolf, H., and Wagner, R. Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10822-6.

Wagner, R., Graf, M., **Bieler, K.**, Wolf, H., Grunwald, T., Foley, P., and Überla, K. Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: Implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 2000 Nov;11(17):2403-13.

Bieler, K., Wagner, R. Synthetic genes for prevention and therapy: Implications of safety and efficacy of DNA vaccines and lentiviral vectors. Book capitel Nr.9 pp 147-168, WILEY-VCH, 2001: "Plasmids for therapy and vaccination"; Edited by M. Schleef.

Bieler, K., Wild, J., Hui J., Graf, M., Wolf, H., Wagner, R. Influence of codon usage on expression and immunogenicity of DNA vaccine constructs. Wird eingereicht bei Vaccine.

Weitere drei Veröffentlichungen über die durchgeführten Primatenstudien sind in Vorbereitung und werden Ende 2002 erscheinen.

F.3 Patentanmeldung

Wagner, R., Graf, M., **Bieler, K.**, Deml, L. (2000). Synthetic gagpol genes and their uses (EP/170500).

F.4 Eigene Vorträge

Bieler, K., Deml, L., Bojak, A., Graf, M., Wolf, H., Wagner, R. (1999). Einfluß von Modifikationen im Kodon-Gebrauch auf die Immunogenität und Sicherheit von DNA-Vakzine Kandidaten am Beispiel des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens Pr55gag. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Bremen.

Bieler, K., Lucas, T., Bojak, A., Deml, L., Graf, M., Wolf, H., Wagner, R. (2000). Vergleichende Untersuchungen zur Sicherheit, Expression und Immunogenität von Rev-unabhängigen HIV-1 DNA Impfstoffen. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Wien.

Bieler, K., Lucas, T., Bojak, A., Deml, L., Graf, M., Wolf, H., Wagner, R. (2000). Comparative analysis of Rev-independent HIV-1 DNA vaccines regarding safety, expression and immunogenicity. The 5th European Conference on Experimental AIDS Research, Madrid.

Wild, J., **Bieler, K.**, Zhang, J., Wolf, H., Wagner, R. (2002). Vom synthetischen Gen zum HIV-DNA-Impfstoff. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Virologie GfV, Erlangen.

G - DANKSAGUNG

PD Dr. Ralf Wagner danke ich für die Überlassung des Themas, die Finanzierung und fachlich hervorragende Betreuung der Arbeit sowie die konstruktive Diskussionsbereitschaft bei fachlichen als auch persönlichen Anliegen.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf danke ich für die Bereitstellung des modernen Arbeitsplatzes sowie die finanzielle Unterstützung bei Kongressen. Bei Herrn Prof. Dr. Kalbitzer möchte ich mich recht herzlich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Ein weiteres großes Dankschön geht an die „Postdocs“ Frank Notka, Ludwig Deml, und Jens Wild für deren unermüdliche Hilfsbereitschaft und fachliche Diskussionen. Ebenso gilt mein Dank Christine Ludwig, Stephanie Steck, Alexandra Bojak, Ingrid Winkel, Kerstin Püllmann sowie den vielen Praktikanten für Ihre Hilfsbereitschaft, Kollegialität und die schöne Arbeitsatmosphäre. Einen besonderen Dank möchte ich an zwei Leute loswerden. Zum einen meiner Diplomantin Tanja Lukas als auch Josef Köstler die mich in eindrucksvollerweise tatkräftig unterstützt hat. Ohne die engagierte Mitarbeit dieser beiden wäre der Umfang an Hergestellten und getesteten DNA-Vektoren - von Maus- über Primaten- in Humane-Studien - nicht zu bewältigen gewesen. Bedanken möchte ich mich auch im Besonderen bei Dr. Marcus Graf für die schöne und produktive Zusammenarbeit, die wir hoffentlich bald wieder auffrischen können. Auch bei allen andern Kollegen des Instituts und bei GENEART, die ich nicht namentlich aufgeführt habe, möchte ich mich für ihre Freundschaft und das angenehme Arbeitsklima der letzten Jahre bedanken.

Bei Prof. Dr. Jonathan Heeny und PD Dr. Christiane Stahl-Hennig sowie deren Mitarbeitern, bedanke ich mich für die gute und produktive Zusammenarbeit bei den durchgeführten Primaten-Studien. Desweiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Tierversuchsanlage H4 für die Aufzucht, Haltung und Pflege der Versuchstiere bedanken. Bedanken möchte ich mich auch im besonderen bei meiner Freundin Christine für ihre tatkräftige Unterstützung.

H - ANHANG

Synthetische DNA-Vektoren für die Maus- und Primaten-Studien

SIV_{mac239} syn-gag

```
(EcoRI)1  gcggcgggta ccgaattcgc cgccagcATG GCGTGAGGA ACAGCGTGCT
51  GAGCGGCAAG AAGGCCGACG AGCTGGAGAA GATCAGGCTG AGGCCCAACG
101 GCAAGAAGAA GTAtATGCTG AAGCACGTGG TGTGGGCCGC CAACGAGCTG
151 GACAGGTTTCG GCCTGGCCGA GAGCCTGCTG GAGAACAAGG AGGGCTGCCA
201 GAAGATCCTG AGCGTGCTGG CCCCCTGGT GCCCACCAGC AGCGAGAACC
251 TGAAGAGCCT GTACAACACC GTGTGCGTGA TCTGGTGCAT CCACGCCGAG
301 GAGAAGGTGA AGCACACCGA GGAGGCCAAG CAGATCGTGC AGAGGCACCT
351 GGTGGTGGAG ACCGGCACCA CCGAGACCAT GCGCAAGACC AGCAGGCCCA
401 CCGCCCCCAG CtcCGGcGc GCGGCAACT ACCCGTGCA GCAGATCGGC
451 GGCAACTACG TGCACCTGCC CCTGAGCCCC AGGACCTGA ACGCTGGGT
501 GAAGCTGATC GAGGAGAAGA AGTTCGGCGC CGAGGTGGTG CCCGGCTTCC
551 AGGCCCTGAG CGAGGGCTGC ACCCctTACG ACATCAACCA GATGCTGAAC
601 TGCGTGGGCG ACCACCAGGC CGCCATGCAG ATCATCAGGG ACATCATCAA
651 CGAGGAGGCC GCCGACTGGG ACCTGCAGCA CCctCAGCCC GCCCctCAGC
701 AGGGCCAGCT GAGGGAGCCC AGCGGCAGCG ACATCGCCGG CACCACaAGC
751 AGCGTGGACG AGCAGATCCA GTGGATGTAC AGGCAGCAGA ACCctATCCC
801 CGTGGGCAAC ATCTACAGGA GGTGGATCCA GCTGGGCCTc CAGAAGTGCG
851 TGAGGATGTA CAACCCCaCa AACATCCTGG ACGTGAAGCA GGGaCCaAAG
901 GAGCCCTTCC AGtcatatGT GGACAGGTTT TACAAGAGCC TGAGGGCCGA
951 GCAGACCGAC GCCGCCGTGA AGAACTGGAT GACCCAGACC CTGCTGATCC
1001 AGAACGCCAA CCCCGACTGC AAGCTGGTGC TGAAGGGCCT GGGCGTGAAC
1051 CCCACCCTGG AGGAGATGCT GACCGCCTGC CAGGGCGTGG GCGGCCCCGG
1101 CCAGAAGGct AGGCTGATGG CCGAGGctCT GAAGGAGGCC CTGGCCCCCG
1151 TGCCCATCCC CTTCGCCGCC GCCCAGCAGA GGGGaCCCAG GAAGCCCATC
1201 AAGTGTGGA ACTGCGGCAA GGAGGGCCAC AGCGCCAGGC AGTGCAGGGC
1251 CCCAGGAGG CAGGGCTGCT GGAAGTGCGG CAAGATGGAC CACGTGATGG
1301 CCAAGTGCCC CGACAGGCAG GCCGGTTTTT TAGGCCTTGG TCCATGGGGA
1351 AAGAAGCCCC GCAATTTCCC CATGGCTCAA GTGCATCAGG GGCTGATGCC
1401 AACTGCTCCC CCAGAGGACC CAGCTGTGGA TCTGCTAAAG AACTACATGC
1451 AGTTGGGCAA GCAGCAGAGA GAAAAGCAGA GAGAAAGCAG AGAGAAGCCT
1501 TACAAGGAGG TGACAGAGGA TTTGCTGCAC CTCAATTCTC TCTTTGGAGG
1551 AGACCAGTAG taaagatctc tcgaggagct caagc (XhoI)
```

SIV_{mac239} syn-gag-pol

```
(EcoRI)1  gcggcgggta ccgaattcgc cgccagcATG GCGTGAGGA ACAGCGTGCT
51  GAGCGGCAAG AAGGCCGACG AGCTGGAGAA GATCAGGCTG AGGCCCAACG
101 GCAAGAAGAA GTAtATGCTG AAGCACGTGG TGTGGGCCGC CAACGAGCTG
151 GACAGGTTTCG GCCTGGCCGA GAGCCTGCTG GAGAACAAGG AGGGCTGCCA
201 GAAGATCCTG AGCGTGCTGG CCCCCTGGT GCCCACCAGC AGCGAGAACC
251 TGAAGAGCCT GTACAACACC GTGTGCGTGA TCTGGTGCAT CCACGCCGAG
```


301 GAGAAGGTGA AGCACACCGA GGAGGCCAAG CAGATCGTGC AGAGGCACCT
 351 GGTGGTGGAG ACCGGCACCA CCGAGACCAT GCCCAAGACC AGCAGGCCCA
 401 CCGCCCCAG CtcCGGcGc GGCGGCAACT ACCCCGTGCA GCAGATCGGC
 451 GGCAACTACG TGCACCTGCC CCTGAGCCCC AGGACCCTGA ACGCTGGGT
 501 GAAGCTGATC GAGGAGAAGA AGTTCGGCGC CGAGGTGGTG CCCGGCTTCC
 551 AGGCCCTGAG CGAGGGCTGC ACCCctTACG ACATCAACCA GATGCTGAAC
 601 TGCGTGGGCG ACCACCAGGC CGCCATGCAG ATCATCAGGG ACATCATCAA
 651 CGAGGAGGCC GCCGACTGGG ACCTGCAGCA CCctCAGCCC GCCCctCAGC
 701 AGGGCCAGCT GAGGGAGCCC AGCGGCAGCG ACATCGCCGG CACCACaAGC
 751 AGCGTGGACG AGCAGATCCA GTGGATGTAC AGGCAGCAGA ACCctATCCC
 801 CGTGGGCAAC ATCTACAGGA GGTGGATCCA GCTGGGCCTc CAGAAGTGCG
 851 TGAGGATGTA CAACCCCaA AACATCCTGG ACGTGAAGCA GGGaCCaAAG
 901 GAGCCCTTCC AGtcatatGT GGACAGGTTT TACAAGAGCC TGAGGGCCGA
 951 GCAGACCGAC GCCGCCGTGA AGAACTGGAT GACCCAGACC CTGCTGATCC
 1001 AGAACGCCAA CCCCGACTGC AAGCTGGTGC TGAAGGGCCT GGGCGTGAAC
 1051 CCCACCCCTGG AGGAGATGCT GACCGCCTGC CAGGGCGTGG GCGGCCCCGG
 1101 CCAGAAGGct AGGCTGATGG CCGAGGctCT GAAGGAGGCC CTGGCCCCCG
 1151 TGCCCATCCC CTTCGCCGCC GCCCAGCAGA GGGGaCCCAG GAAGCCCATC
 1201 AAGTGCTGGA ACTGCGGCAA GGAGGGCCAC AGCGCCAGGC AGTGCAGGGC
 1251 CCCCAGGAGG CAGGGCTGCT GGAAGTGCGG CAAGATGGAC CACGTGATGG
 1301 CCAAGTGCCC CGACAGGCAG GCCGGTTTTT TAGGCCTTGG TCCATGGGGA
 1351 AAGAAGCCCC GCAATTTCCC CATGGCTCAA GTGCATCAGG GGCTGATGCC
 1401 AACTGCTCCC CCAGAGGACC CAGCTGTGGA TCTGCTAAAG AACTACATGC
 1451 AGTTGGGCAA GCAGCAGAGA GAAAAGCAGA GAGAAAGCAG AGAGAAGCCT
 1501 TACAAGGAGG TGACAGAGGA TTGCTGCAC CTCAATTCTC TCTTTGAGG
 1551 AGACCAAGTAG TGACCGCCCA CATCGAGGGC CAGCCCCTGG AGGTGCTGCT
 1601 GGACACCGGC GCCGACGACA GCATCGTGAC CGGCATCGAG CTGGGaCCCC
 1651 ACTACACCCC CAAGATCGTG GGCGGCATCG GCGGCTTCAT CAACACaAAG
 1701 GAGTACAAGA ACGTGGAGAT CGAGGTGCTG GGCAAGAGGA TCAAGGGCAC
 1751 CATCATGACC GGCACACCCC CCATCAACAT CTTCGGCAGG AACCTGCTGA
 1801 CCGCCCTGGG CATGAGCCTG AACTTCCCCA TCGCCAAGGT GGAGCCCCTG
 1851 AAGGTGGCCC TGAAGCCCGG CAAGGACGGC CCCAAGCTGA AGCAGTGGCC
 1901 tCTGAGCAAG GAGAAGATCG TGGCCCTGAG GGAaATCTGC GAGAAGATGG
 1951 AGAAGGACGG CCAGCTGGAG GAGGCCcctC CCACCAACCC CTACAACACC
 2001 CCCACCTTCG CCATCAAGAA GAAGGACAAG AACAAGTGGA GGATGCTGAT
 2051 CGACTTCAGG GAGCTGAACA GGGTGACaCA GGACTTCACC GAGGTGCAGC
 2101 TGGGCATCCC tCACCCCGCC GGCCTGGCCA AGAGGAAGAG GATCACCGTG
 2151 CTGGACATCG GCGACGCCTA CTTCAGCATC CctCTGGACG AGGAGTTCAG
 2201 GCAGTACACC GCCTTCACCC TGCCCAGCGT GAACAACGCC GAGCCCGGCA
 2251 AGAGGTACAT CTACAAGGTG CTGCCCCAGG GCTGGAAGGG CAGCCCCGCC
 2301 ATCTTCAGT ACACCATGAG GCACGTGCTG GAGCCCTTCA GGAAGGCCAA
 2351 CCCCACGTG ACCCTGGTGC AGTACATGGA CGACATCCTG ATCGCctccG
 2401 ACAGGACCGA CCTGGAGCAC GACAGGTGG TGCTcCAGAG CAAGGAGCTG
 2451 CTGAACAGCA TCGGCTTCAG CACCCCGGAG GAGAAGTTCC AGAAGGACCC
 2501 tCCCTTCAG TGATGGGCT ACGAGCTGTG GCCCACCAG TGGAAGCTcC
 2551 AGAAGATCGA GCTGCCCCAG AGGGAGACCT GGACCGTGAA CGACATCCAG
 2601 AAGCTGGTGG GCGTGCTGAA CTGGGCCGCC CAGATtTACC CCGGCATCAA
 2651 GACCAAGCAC CTGTGCAGGC TGATCcGcGG CAAGATGACa CTGACCGAGG
 2701 AGGTGCAGTG GACCGAGATG GCCGAGGCCG AGTACGAGGA GAACAAGATC

2751 ATtCTGAGCC AGGAGCAGGA GGGCTGTAC TACCAGGAGG GCAAGCCCCCT
 2801 GGAGGCCACC GTGATCAAGA GCCAGGACAA CCAGTGGAGC TACAAGATCC
 2851 ACCAGGAGGA CAAGATCCTG AAGGTGGGCA AGTTCGCCAA GATCAAGAAC
 2901 ACCCACACCA ACGGCGTGAG GCTGCTGGCC CACGTGATCC AGAAGATCGG
 2951 CAAGGAGGCC ATCGTGATCT GGGGCCAGGT GCCCAAGTTC CACCTGCCCCG
 3001 TGGAGAAGGA CGTGTGGGAG CAGTGGTGGA CCGACTACTG GCAGGTGACa
 3051 TGGATCCCCG AGTGGGACTT CATCAGCACC CctCctCTGG TGAGGCTGGT
 3101 GTTCAAtCTG GTGAAGGACC CCATCGAGGG CGAGGAGACC TACTACACCG
 3151 ACGGCAGCTG CAACAAGCAG AGCAAGGAGG GCAAGGCCGG CTACATCACC
 3201 GACAGGGGCA AGGACAAGGT GAAGGTGCTG GAGCAGACCA CCAACCAGCA
 3251 GGCCGAGCTG GAGGCC'TTCC TGATGGCCCT GACCGACAGC GGCCCCAAGG
 3301 CCAACATCAT CGTGGACAGC CAGTAtGTGA TGGGCATCAT CACCGCTGTC
 3351 CCCACCGAGA GCGAGAGCAG GCTGGTGAAC CAGATCATCG AGGAGATGAT
 3401 tAAGAAGAGC GAGATtTACG TGGCCTGGGT GCCCGCCCAC AAGGGCATCG
 3451 GCGGCAACCA GGAGATCGAC CACCTGGTGA GCCAGGGCAT CAGGCAGGTG
 3501 CTGTTCTTGG AGAAGATCGA GCCCGCCCAG GAGGAGCACG ACAAGTACCA
 3551 CAGCAACGTG AAGGAGCTGG TGTTCAAGTT CGGCCTGCCC AGGATCGTGG
 3601 CCAGGCAGAT CGTGGACACC TGCGACAAGT GCCACCAGAA GGGCGAGGCC
 3651 ATCCACGGCC AGGCCAACAG CGACCTGGGC ACCTGGCAGA TGGACTGCAC
 3701 CCACCTGGAG GGCAAGATCA TCATCGTGGC CGTGCACGTG GctAGCGGT
 3751 TCATCGAGGC CGAGGTGATC CctCAGGAGA CCGGCAGGCA GACCGCCCTG
 3801 TTCCTGCTGA AGCTGGCCGG CAGGTGGCCC ATCACCACC TGACACCCGA
 3851 CAACGGCGCC AACTTCGCCA GCCAGGAGGT GAAGATGGTG GCCTGGTGGG
 3901 CCGGCATCGA GCACACCTTC GGCGTGCCCT ACAACCCCA GAGCCAGGGC
 3951 GTGGTGGAGG CCATGAACCA CCACCTGAAG AACCAGATCG ACAGGATCAG
 4001 GGAGCAGGCC AACAGCGTGG AGACCATCGT GCTGATGGCC GTGCACTGCA
 4051 TGAActTCAA GAGGAGGGGC GGCATCGGCG ACATGACCCC CGCCGAGAGG
 4101 CTGATCAACA TGATtACCAC CGAGCAGGAG ATCCAGTTCC AGCAGAGCAA
 4151 GAACAGCAA TTTCAAGAACT TCAGGGTGTA tTACAGGGAG GGCAGGGACC
 4201 AGCTGTGGAA GGGCCCCGGC GAGCTGTGTG GGAAGGGCGA GGGCGCtGTG
 4251 ATCCTGAAGG TGGGCACCGA CATCAAGGTG GTGCCCAGGA GGAAGGCCAA
 4301 GATCATCAAG GACTACGGCG GCGGCAAGGA GGTGGACAGC AGCAGCCACA
 4351 TGGAGGACAC CGGCGAGGCC AGGGAGGTGG CCTGAtaaag atct**ctcgag**
 4401 gagctcaagc (XhoI)

SIV_{mac239} syn-gag-pol-nef

(EcoRI)1 ggcgatccc ccgggctgca **ggaattcgcc** aggATGCGCG TGAGGAACAG
 51 CGTGCTGAGC GGCAAGAAGG CCGACGAGCT GGAGAAGATC AGGCTGAGGC
 101 CCAACGGCAA GAAGAAGTAT ATGCTGAAGC ACGTGGTGTG GGCCGCCAAC
 151 GAGCTGGACA GGTTCCGCCCT GGCCGAGAGC CTGCTGGAGA ACAAGGAGGG
 201 CTGCCAGAAG ATCCTGAGCG TGCTGGCCCC CCTGGTGCCC ACCGGCAGCG
 251 AGAACCTGAA GAGCCTGTAC AACACCGTGT GCGTGATCTG GTGCATCCAC
 301 GCCGAGGAGA AGGTGAAGCA CACCGAGGAG GCCAAGCAGA TCGTGACAGG
 351 GCACCTGGTG GTGGAGACCG GCACCACCGA GACCATGCCC AAGACCAGCA
 401 GGCCACCGC CCCCAGCTCC GGCCGCGGCG GCAACTACCC CGTGCAGCAG
 451 ATCGGCGGCA ACTACGTGCA CCTGCCCCCTG AGCCCCAGGA CCCTGAACGC
 501 CTGGGTGAAG CTGATCGAGG AGAAGAAGTT CGGCGCCGAG GTGGTGCCCCG
 551 GCTTCCAGGC CCTGAGCGAG GGCTGCACCC CTTACGACAT CAACCAGATG

601 CTGAACTGCG TGGGCGACCA CCAGGCCGCC ATGCAGATCA TCAGGGACAT
651 CATCAACGAG GAGGCCGCCG ACTGGGACCT GCAGCACCTT CAGCCCGCCC
701 CTCAGCAGGG CCAGCTGAGG GAGCCCAGCG GCAGCGACAT CGCCGGCACC
751 ACAAGCAGCG TGGACGAGCA GATCCAGTGG ATGTACAGGC AGCAGAACCC
801 TATCCCCGTG GGCAACATCT ACAGGAGGTG GATCCAGCTG GGCCTCCAGA
851 AGTGCGTGAG GATGTACAAC CCCACAAACA TCCTGGACGT GAAGCAGGGA
901 CCAAAGGAGC CTTTCCAGTC ATATGTGGAC AGGTTCTACA AGAGCCTGAG
951 GGCCGAGCAG ACCGACGCCG CCGTGAAGAA CTGGATGACC CAGACCCTGC
1001 TGATCCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGC TGGTGCTGAA GGGCCTGGGC
1051 GTGAACCCCA CCTTGGAGGA GATGCTGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG
1101 CCCC GCCCAG AAGGCTAGGC TGATGGCCGA GGCTCTGAAG GAGGCCTTGG
1151 CCCCCTGCC CATCCCTTC GCCGCCGCC AGCAGAGGGG ACCCAGGAAG
1201 CCCATCAAGT GCTGGAAGTG CGGCAAGGAG GGCCACAGCG CCAGGCAGTG
1251 CAGGGCCCCC AGGAGGCAGG GCTGCTGGAA GTGCGGCAAG ATGGACCACG
1301 TGATGGCCAA GTGCCCCGAC AGGCAGGCCG GTTTTAGGCC TTGGTCCATG
1351 GGGAAAGAAG CCCCGCAATT TCCCCATGGC TCAAGTGCAT CAGGGGCTGA
1401 TGCCAACTGC TCCCCCAGAG GACCCAGCTG TGATCTGCT AAAGAACTAC
1451 ATGCAGTTGG GCAAGCAGCA GAGAGAAAAG CAGAGAGAAA GCAGAGAGAA
1501 GCCTTACAAG GAGGTGACAG AGGATTGCT GCACCTCAAT TCTCTCTTG
1551 GAGGAGACCA GTAGTGACCG CCCACATCGA GGGCCAGCCC GTGGAGGTGC
1601 TGCTGAACAC CGGCGCCGAC GACAGCATCG TGACCGGCAT CGAGCTGGGA
1651 CCCCCTACA CCCCCAAGAT CGTGGGCGGC ATCGGCGGCT TCATCAACAC
1701 AAAGGAGTAC AAGAACGTGG AGATCGAGGT GCTGGGCAAG AGGATCAAGG
1751 GCACCATCAT GACCGGCGAC ACCCCCATCA ACATCTTCGG CAGGAACCTG
1801 CTGACCGCCC TGGGCATGAG CCTGAACTTC CCCATCGCCA AGGTGAGGCC
1851 CGTGAAGGTG GCCCTGAAGC CCGGCAAGGA CGGCCCAAG CTGAAGCAGT
1901 GGCTCTGAG CAAGGAGAAG ATCGTGGCCC TGAGGGAAAT CTGCGAGAAG
1951 ATGGAGAAGG ACGCCAGCT GGAGGAGGCC CCTCCCACCA ACCCTACAA
2001 CACCCCACC TTCGCCATCA AGAAGAAGGA CAAGAACAAG TGGAGGATGC
2051 TGATCGACTT CAGGGAGCTG AACAGGGTGA CACAGGACTT CACCGAGGTG
2101 CAGCTGGGCA TCCCTCAGCC CGCCGGCCTG GCCAAGAAGG AGAAGGGCGG
2151 CCTGGAGGGC ATCTACTACA GCGCCAGGAG GCACAGGATC CTGGACATGT
2201 ACCTGGAGAA GGAGGAGGGC ATCATCCCCG ACTGGCAGGA CTACACCAGC
2251 GGCCCCGGCA TCAGATACCC CAAGACCTTC GGCTGGCTGT GGAAGCTGGT
2301 GCCCCTGAAC GTGAGCGACG AGGCCCAGGA GGACGAGAGG CACTACCTGA
2351 TGCAGCCCGC CCAGACCAGC AAGTGGGACG ACCCTTGGGG CGAGGTGCTG
2401 GCCTGGAAGT TTGACCCAC CCTGGCCTAC ACCTACGAGG CCTACGCCAG
2451 ATACCCCGAG GAGCTGGAGG CCAGCCAGGC CTGCCAGAGG AAGAGGCTGG
2501 AGGAGGGCAT GGGCGGCGCC ATCAGCATGA GGAGGAGCAA GCCCGCCGGC
2551 GACCTGAGGC AGAAGCTGCT GAGGGCCAGG GCGGAGACCT ACGGCAGGCT
2601 GCTGGGCGAG GTGGAGGACG GCAGCAGCCA GAGCCTGGGC GGCCTGGGCA
2651 AGGGCTGAG CAGCAGGAGC TGCGAGGGCC AGAAGTACAA CCAGGGCCAG
2701 TACATGAACA CCCCTGGAG GAACCCCGCC GAGGAGAAGG AGAAGCTGGC
2751 CTACAGGAAG CAGAACATGG ACGACATCGA CGAGGAGGAC GACGACCTGG
2801 TGGGCGTGAG CGTGAGGCC AAGGTGCCCC TGAGGGCCAT GACCTACAAG
2851 CTGGCGATCG ACATGAGCCA CTTATCCTG AACAGCATCG GCTTCAGCAC
2901 CCCCAGGAG AAGTTCCAGA AGGACCCTCC CTTCCAGTGG ATGGGCTACG
2951 AGCTGTGGCC CACCAAGTGG AAGCTCCAGA AGATCGAGCT GCCCAGAGG
3001 GAGACCTGGA CCGTGAACGA CATCCAGAAG CTGGTGGGCG TGCTGAACTG

```

3051  GGCCGCCAG ATTACCCCG GCATCAAGAC CAAGCACCTG TGCAGGCTGA
3101  TCCGCGGCAA GATGACACTG ACCGAGGAGG TGCAGTGGAC CGAGATGGCC
3151  GAGGCCGAGT ACGAGGAGAA CAAGATCATT CTGAGCCAGG AGCAGGAGGG
3201  CTGCTACTAC CAGGAGGGCA AGCCCCTGGA GGCCACCGTG ATCAAGAGCC
3251  AGGACAACCA GTGGAGCTAC AAGATCCACC AGGAGGACAA GATCCTGAAG
3301  GTGGGCAAGT TCGCCAAGAT CAAGAACACC CACACCAACG GCGTGAGGCT
3351  GCTGGCCAC GTGATCCAGA AGATCGGCAA GGAGGCCATC GTGATCTGGG
3401  GCCAGGTGCC CAAGTTCCAC CTGCCCCTGG AGAAGGACGT GTGGGAGCAG
3451  TGGTGGACCG ACTACTGGCA GGTGACATGG ATCCCCGAGT GGGACTTCAT
3501  CAGCACCCCT CCTCTGGTGA GGCTGGTGTT CAATCTGGTG AAGGACCCCA
3551  TCGAGGGCGA GGAGACCTAC TACACCGACG GCAGCTGCAA CAAGCAGAGC
3601  AAGGAGGGCA AGGCCGGCTA CATCACCGAC AGGGGCAAGG ACAAGGTGAA
3651  GGTGCTGGAG CAGACCACCA ACCAGCAGGC CGAGCTGGAG GCCTTCCTGA
3701  TGGCCCTGAC CGACAGCGGC CCCAAGGCCA ACATCATCGT GGACAGCCAG
3751  TATGTGATGG GCATCATCAC CGGCTGCCCC ACCGAGAGCG AGAGCAGGCT
3801  GGTGAACCAG ATCATCGAGG AGATGATTAA GAAGAGCGAG ATTTACGTGG
3851  CCTGGGTGCC CGCCCACAAG GGCATCGGCG GCAACCAGGA GATCGACCAC
3901  CTGGTGAGCC AGGGCATCAG GCAGGTGCTG AGGAAGAGGA TCACCGTGCT
3951  GGACATCGGC GACGCCCTACT TCAGCATCCC TCTGGACGAG GAGTTCAGGC
4001  AGTACACCGC CTTACCCCTG CCCAGCGTGA ACAACGCCGA GCCCGCAAG
4051  AGGTACATCT ACAAGGTGCT GCCCCAGGGC TGGAAGGGCA GCCCCCCAT
4101  CTTCCAGTAC ACCATGAGGC ACGTGCTGGA GCCCTTCAGG AAGGCCAACC
4151  CCGACGTGAC CCTGGTGAG TACATGGACG ACATCCTGAT CGCCTCCGAC
4201  AGGACCGACC TGGAGCACGA CAGGGTGGTG CTCCAGAGCA AGGAGCTGTA
4251  Gctcgagggg gggcccggtt cccaattcg (XhoI)

```

89.6P syn-env120 (CD5-Leader)

```

(KpnI) 1  ccaagtcttg gtaccgaatt cgccgccagc ATGCCCATGG GGTCTCTGCA
51  ACCGCTGGCC ACCTGTACC TGCTGGGGAT GCTGGTCGCT TCCGTGTAG
101  CGACCGAGAA GCTGTGGGTG ACCGTGTACT ACGGCGTGCC CGTGTGGAGG
151  GAGGCCACCA CCACCCTGTT CTGCGCCAGC GACGCCAAAG CCTACGACAC
201  CGAGGTGCAC AACGTGTGGG CCACCCACGC CTGCGTGCCC ACCGACCCCA
251  ACCCCCAGGA GGTGGTGCTG GGCAACGTGA CCGAGAACTT CAATATGTGG
301  AAGAACAACA TGGTGGACCA GATGCACGAG GACATCATCA GCCTGTGGGA
351  CGAGAGCCTG AAGCCCTGCG TGAAGCTGAC CCCCTGTGC GTGACCCTGA
401  ACTGCACCAA CCTGAACATC ACCAAGAACA CCACCAACCT GACCAGCAGC
451  AGCTGGGGCA TGATGGAGGA GGGCGAGATC AAGAACTGCA GCTTCTACAT
501  CACCACCTCC ATCAGGAACA AGGTGAAGAA GGAGTACGCC CTGTTCAACA
551  GGCTGGACGT GGTGCCCGTG AAGAACACCA GCAACACCAA GTACAGGCTG
601  ATTAGCTGCA ACACCAGCGT GATTACCCAG GCCTGCCCTA AAGTGAGCTT
651  CCAGCCCATC CCCATCCACT ACTGCGTGCC CGCCGGCTTC GCCATCCTGA
701  AGTGCAACAA CAAGACCTTC AACGCAGCG GCCCCTGCAC CAACGTGAGC
751  ACCGTGCAGT GCACCCACGG CATCAGGCCC GTGGTGTCTA CCCAGCTGCT
801  GCTGAACGGC AGCCTGGCCG AAGAGGACAT CGTGATCAGG AGCGAGGACT
851  TCACCGACAA CGTGAAGACC ATCATCGTGC AGCTGAACGA GAGCGTGGTG
901  ATTAAC TGCA CCAGGCCCAA CAACAACACC AGGGAGAGGC TGAGCATCGG
951  CCCC GG CAGG GCCTTCTACG CCAGGAGGAA CATCATCGGC GACATCAGGC
1001  AGGCCCACTG CAACATCAGC AGGGCCAAGT GGAACAACAC CCTGCAGCAG
1051  ATCGTCATCA AGCTGAGGGA GAAGTTCAGG AACAAGACCA TCGCCTTCAA

```

```

1101 CCAGAGCAGC GCGGCGGACC CCGAGATCGT GATGCACAGC TTCAACTGCG
1151 GCGGCGAGTT CTCTACTGTC AACACCGCCC AGCTGTTCAC CAGCACCTGG
1201 AACGTGGCCG GCGGCACCAA CGGCACCGAG GGCAACGACA TCATCACCTT
1251 GCAGTGCAGG ATCAAGCAGA TCATCAACAT GTGGCAGAAG GTGGGCAAGG
1301 CCATGTACGC CCCTCCCATC ACCGGCCAGA TCAGGTGCAG CAGCAACATC
1351 ACCGGCCTGC TGCTGACTCG CGACGGCGGC AACAGCACCG AGACCGAGAC
1401 CGAGATCTTC AGGCCCGGCG GCGGCGACAT GAGGGACAAC TGGAGGAGCG
1451 AGCTGTACAA GTACAAGGTG GTGAGGATCG AGCCCATCGG CGTGGCCCCC
1501 ACCAGGGCCA AGAGGAGGAC CGTGCAGAGG GAGAAGAGGT AGtaaggatc
1551 cctcagcat gcatctagag ggccctattc (XhoI)

```

89.6P syn-env140 (CD5-Leader)

```

(KpnI) 1 gcggcgggta ccgaattcgc cgccagcATG CCCATGGGGT CTCTGCAACC
51 GCTGGCCACC TTGTACCTGC TGGGGATGCT GGTGCTTCC GTGCTAGCGA
101 CCGAGAAGCT GTGGGTGACC GTGTACTACG GCGTGCCCGT GTGGAGGGAG
151 GCCACCACCA CCCTGTTCTG CGCCAGCGAC GCCAAaGCCT ACGACACCGA
201 GGTGCACAAC GTGTGGGCCA CCCACGCCTG CGTGCCCAAC GACCCCAACC
251 CCCAGGAGGT GGTGCTGGGC AACGTGACCG AGAACTTCAA tATGTGGAAG
301 AACAACTGG TGGACCAGAT GCACGAGGAC ATCATCAGCC TGTGGGACGA
351 GAGCCTGAAG CCCTGCGTGA AGCTGACCCC CCTGTGCGTG ACCCTGAACT
401 GCACCAACCT GAACATCACC AAGAACACCA CCAACCTGAC CAGCAGCAGC
451 TGGGGCATGA TGGAGGAGGG CGAGATCAAG AACTGCAGCT TCTACATCAC
501 CACctcCATC AGGAACAAGG TGAAGAAGGA GTACGCCCTG TTCAACAGGC
551 TGGACGTGGT GCCCGTGAAG AACACCAGCA ACACCAAGTA CAGGCTGATt
601 AGCTGCAACA CCAGCGTGAT tACCCAGGCC TGCCctAAaG TGAGCTTCCA
651 GCCCATCCCC ATCCACTACT GCGTGCCCGC CGGCTTCGCC ATCCTGAAGT
701 GCAACAACAA GACCTTCAAC GGCAGCGGCC CCTGCACCAA CGTGAGCACC
751 GTGCAGTGCA CCCACGGCAT CAGGCCCCTG GTGtctACCC AGTGCTGCT
801 GAACGGCAGC CTGGCCGAaG AGGACATCGT GATCAGGAGC GAGGACTTCA
851 CCGACAACGT GAAGACCATC ATCGTGACG TGAACGAGAG CGTGGTGATt
901 AACTGCACCA GGCCCAACAA CAACACCAGG GAGAGGCTGA GCATCGGCCC
951 CGGCAGGGCC TTCTACGCCA GGAGGAACAT CATCGGCGAC ATCAGGCAGG
1001 CCCACTGCAA CATCAGCAGG GCCAAGTGGA ACAACACCCT GCAGCAGATC
1051 GTcATCAAGC TGAGGGAGAA GTTCAGGAAC AAGACCATCG CCTTCAACCA
1101 GAGCAGCGGC GCGGACCCCG AGATCGTGAT GCACAGCTTC AACTGCGGCG
1151 GCGAGTTCTT CTACTGCAAC ACCGCCAGC TGTTCAACAG CACCTGGAAC
1201 GTGGCCGGCG GCACCAACGG CACCGAGGGC AACGACATCA TCACCTGCA
1251 GTGCAGGATC AAGCAGATCA TCAACATGTG GCAGAAGGTG GGCAAGGCCA
1301 TGTACGCCCC tCCCATCACC GGCCAGATCA GGTGCAGCAG CAACATCACC
1351 GGCTGCTGC TGActcGcGA CGGCGGCAAC AGCACCGAGA CCGAGACCGA
1401 GATCTTCAGG CCCGGCGGCG GCGACATGAG GGACAACTGG AGGAGCGAGC
1451 TGTACAAGTA CAAGGTGGTG AGGATCGAGC CCATCGGCGT GGCCCCACCC
1501 AGGGCCAAGA GGAGGACCGT GCAGAGGGAG AAGAGCGCCG TGGGCATCGG
1551 CGCCGTGTTC CTGGGCTTCC TGGGCGCCGC CGGCAGCACA ATGGGCGCCG
1601 CCAGCGTGAC CTGACCGTG CAGGCCAGGC TGCTGCTGAG CGGCATCGTG
1651 CAGCAGCAGA ACAACCTGCT GAGaGCCATC GAGGCCAGC AGAAtATGCT
1701 GAGGCTGACC GTGTGGGGCA TCAAGCAGCT GCAGGctAGG GTGCTGGCCC
1751 TGGAGAGaTA CCTGAGGGAC CAGCAGCTGA TGGGCATtTG GGGCTGCAGC

```

1801 GGCAAGCTGA TCTGCACCAC CAGCGTGCct TGGAACTGA GCTGGAGCAA
 1851 CAAGAGCGTG GACGACATCT GGAACAACAT GACCTGGATG GAGTGGGAGA
 1901 GGGAGATCGA CAACTACACC GACTACATCT ACGACCTGCT GGAGAAGAGC
 1951 CAGACCCAGC AGGAGAAGAA CGAGAAGGAG CTGCTGGAGC TGGACAAGTa
 2000 gtaaggatcc **ctcgaggagc** tcaagc (XhoI)

89.6P syn-env160 (CD5-Leader)

(KpnI)1 gcggcg**ggta** **cegaattcgc** cgccagcATG CCCATGGGGT CTCTGCAACC
 51 GCTGGCCACC TTGTACCTGC TGGGGATGCT GGTTCGTTCC GTGCTAGCGA
 101 CCGAGAAGCT GTGGGTGACC GTGTACTACG GCGTGCCCGT GTGGAGGGAG
 151 GCCACCACCA CCCTGTTCTG CGCCAGCGAC GCCAAaGCCT ACGACACCGA
 201 GGTGCACAAC GTGTGGGCCA CCCACGCCTG CGTGCCACC GACCCCAACC
 251 CCCAGGAGGT GGTGCTGGGC AACGTGACCG AGAACTTCAA tATGTGGAAG
 301 AACAACTGG TGGACCAGAT GCACGAGGAC ATCATCAGCC TGTGGGACGA
 351 GAGCCTGAAG CCCTGCGTGA AGCTGACCCC CCTGTGCGTG ACCCTGAACT
 401 GCACCAACCT GAACATCACC AAGAACACCA CCAACCTGAC CAGCAGCAGC
 451 TGGGGCATGA TGGAGGAGGG CGAGATCAAG AACTGCAGCT TCTACATCAC
 501 CACctcCATC AGGAACAAGG TGAAGAAGGA GTACGCCCTG TTCAACAGGC
 551 TGGACGTGGT GCCCGTGAAG AACACCAGCA ACACCAAGTA CAGGCTGAtt
 601 AGCTGCAACA CCAGCGTGAT tACCCAGGCC TGCCctAAaG TGAGCTTCCA
 651 GCCCATCCCC ATCCACTACT GCGTGCCCGC CGGCTTCGCC ATCCTGAAGT
 701 GCAACAACAA GACCTTCAAC GGCAGCGGCC CCTGCACCAA CGTGAGCACC
 751 GTGCAGTGCA CCCACGGCAT CAGGCCCGTG GTGtctACCC AGCTGCTGCT
 801 GAACGGCAGC CTGGCCGAaG AGGACATCGT GATCAGGAGC GAGGACTTCA
 851 CCGACAACGT GAAGACCATC ATCGTGCAGC TGAACGAGAG CGTGGTGATt
 901 AACTGCACCA GGCCCAACAA CAACACCAGG GAGAGGCTGA GCATCGGCCC
 951 CGGCAGGGCC TTCTACGCCA GGAGGAACAT CATCGGCGAC ATCAGGCAGG
 1001 CCCACTGCAA CATCAGCAGG GCCAAGTGA ACAACACCCT GCAGCAGATC
 1051 GTcATCAAGC TGAGGGAGAA GTTCAGGAAC AAGACCATCG CCTTCAACCA
 1101 GAGCAGCGGC GCGGACCCCG AGATCGTGAT GCACAGCTTC AACTGCGGCG
 1151 GCGAGTTCTT CTACTGCAAC ACCGCCCAGC TGTTCAACAG CACCTGGAAC
 1201 GTGGCCGCGC GCACCAACGG CACCGAGGGC AACGACATCA TCACCCTGCA
 1251 GTGCAGGATC AAGCAGATCA TCAACATGTG GCAGAAGGTG GGCAAGGCCA
 1301 TGTACGCCCC tCCCATCACC GGCCAGATCA GGTGCAGCAG CAACATCACC
 1351 GGCCTGCTGC TGActcGcGA CGGCGGCAAC AGCACCGAGA CCGAGACCGA
 1401 GATCTTCAGG CCCGGCGGCG GCGACATGAG GGACAACTGG AGGAGCGAGC
 1451 TGTACAAGTA CAAGGTGGTG AGGATCGAGC CCATCGGCGT GGGCCCCACC
 1501 AGGGCCAAGA GGAGGACCGT GCAGAGGGAG AAGAGGGCCG TGGGCATCGG
 1551 CGCCGTGTTC CTGGGCTTCC TGGGCGCCGC CGGCAGCACA ATGGGCGCCG
 1601 CCAGCGTGAC CCTGACCGTG CAGGCCAGGC TGCTGCTGAG CGGCATCGTG
 1651 CAGCAGCAGA ACAACCTGCT GAGaGCCATC GAGGCCAGC AGAAtATGCT
 1701 GAGGCTGACC GTGTGGGGCA TCAAGCAGCT GCAGGctAGG GTGCTGGCCC
 1751 TGGAGAGaTA CCTGAGGGAC CAGCAGCTGA TGGGCATtTG GGGCTGCAGC
 1801 GGCAAGCTGA TCTGCACCAC CAGCGTGCct TGGAACTGA GCTGGAGCAA
 1851 CAAGAGCGTG GACGACATCT GGAACAACAT GACCTGGATG GAGTGGGAGA
 1901 GGGAGATCGA CAACTACACC GACTACATCT ACGACCTGCT GGAGAAGAGC
 1951 CAGACCCAGC AGGAGAAGAA CGAGAAGGAG CTGCTGGAGC TGGACAAGTG
 2001 GGctAGCCTG TGGAACTGGT TCGACATCAC CAACTGGCTG TGGTACATCA

```

2051  GGCTGTTTCAT CATGATCGTG GGCGGaCTGA TCGGCCTGAG GATCGTGTTTC
2101  GCCGTGCTGA GCATCGTGAA CAGGGTGAGG CAGGGCTACA GCCCCCTGAG
2151  CTTCAGACC CTGCTGCCCC CCAGCAGGGG CCCCAGACAGG CCCCAGGGCA
2201  CCGAGGAGGA GGGCGGCGAG AGGGACAGGG ACAGGAGCGG CCCCAGCGTG
2251  AACGGCAGCC TGGCCCTGAT CTGGGACGAC CTGAGGAGCC TGTGCCTGTT
2301  CAGCTACCAC AGGCTGAGGG ACCTGCTGCT GATCGTGACa AGGATCGTGG
2351  AGCTGCTGGG CAGGAGGGGC TGGGAGGCCC TGAAGTACTG GTGGAACCTG
2401  CTGCAGTACT GGAGCCAGGA GCTGAAGAAC AGCGCCGTGA GCCTGCTGCA
2451  GTACGGCTGG AGCTACTTCC ACGAGGCCGT GCAGGCCGTG TGGAGGAGCG
2501  CCACCGAGAC CCTGGCCGGC GCCTGGGGCG ACCTGTGGGA GACCCCTGAGG
2551  AGGGGCGGCA GGTGGATtCT GGCCATCCCC AGGAGGATCA GGCAGGGCCT
2601  GGAGCTGACC CTGCTGTagt aaggatccct cgaggagctc aagc (XhoI)

```

Synthetische DNA-Vektoren für die Humanen-Studien

C-syn-gag-pol-nef

```

(KpnI) 1  tcccccgggc tgcaggaatt cgatatcaag cttatcgata ccgtcgacct
      51  cgaggggggg cccggtacct aATGGCCGCC AGGGCCAGCA TCCTGAGGGG
101  CGGCAAGCTG GACAAGTGGG AGAAGATCAG GCTGAGGCCG GCGGCAAGA
151  AGCACTACAT GCTGAAGCAC CTGGTGTGGG CCAGCAGGGA GCTGGAGAGG
201  TTCGCCCTGA ACCCCGGCCT GCTGGAGACC AGCGAGGGCT GCAAGCAGAT
251  CATGAAGCAG CTGCAGAGCG CCCTGCAGAC CGGCACCGAG GAGCTGAGGA
301  GCCTGTTCAA CACCGTGGCC ACCCCCTACT GCGTGCACAC CGAGATCGAC
351  GTGAGGGACA CCAGGGAGGC CCTGGACAAG ATCGAGGAGG AGCAGAACAA
401  GATCCAGCAG AAGACCCAGC AGGCCAAGGA GGCCGACGGC AAGGTGAGCC
451  AGAACTACCC CATCGTGAGC AACCTGCAGG GCCAGATGGT GCACCAGCCC
501  ATCAGCCCCA GGACCTGAA TGCATGGGTG AAGGTGGTGG AGGAGAAGGC
551  CTTAGCCCC GAGGTGATCC CCATGTTAG CGCCCTGAGC GAGGGCGCCA
601  CCCCTCAGGA CCTGAACACC ATGCTGAACA CCGTGGGCGG CCACCAGGCC
651  GCCATGCAGA TCCTGAAGGA CACCATCAAC GAGGAGGCCG CCGAGTGGGA
701  CAGGCTGCAC CCCGTGCACG CCGGCCCCAT CGCCCCCGGC CAGATGAGGG
751  AGCCCAGGGG CAGCGACATC GCCGACCA CCAGCAACCT GCAGGAGCAG
801  ATCGCCTGGA TGACCAGCAA CCCACCCGTG CCCGTGGGCG ACATCTACAA
851  GAGGTGATC ATCCTGGGTT TAAACAAGAT CGTGAGGATG TACAGCCCCA
901  CCAGCATCCT GGACATCAAG CAGGGCCCCA AGGAGCCCTT CAGGGACTAC
951  GTGGACAGGT TCTTCAAGAC CCTGAGGGCC GAGCAGGCCA CCCAGGGCGT
1001  GAAGAACTGG ATGACCGACA CCCTGCTGGT GCAGAACGCC AACCCGACT
1051  GCAAGACCAT CTTGAGGGCC CTGGGCCCCG GCGCCAGCAT CGAGGAGATG
1101  ATGACCGCCT GCCAGGGCGT GGGCGGCCCC AGCCACAAGG CCAAGGTGCT
1151  GGCCGAGGCC ATGAGCCAGA CCAACAGCGC CATCCTGATG CAGAGGAGCA
1201  ACTTCAAGGG CAGCAAGAGG ATCGTGAAGT GCTTCAACTG CGGCAAGGAG
1251  GGCCACATCG CCAGGAACTG CAGGGCCCCC AGGAAGAAGG GCTGCTGGAA
1301  GTGCGGCAAG GAGGGCCACC AGATGAAGGA CTGCACCGAG AGGCAGGCCA
1351  ACTTCTGGG CAAGATCTGG CCCAGCCACA AGGGCGGCCC CGGCAACTTC
1401  CTGCAGAAAC GGCCCGAGCC CACCGCCCCC CCCGAGGAGA GCTTCAGGTT
1451  CGAGGAGGAG ACCACCACCC CCAGCCAGAA GCAGGAGCCC ATCGACAAGG
1501  AGCTGTACCC CTTGACCAGC CTGAAGAGCC TGTTTCGGCA CGACCCAGC
1551  AGCCAGGAAT TCTTCAGGGA GAACCTGGCC CTGCCCCAGG GCAGGGCCAG
1601  GGAGTTCAGC AGCGAGCAGA CCAGGGCCAA CAGCCCCACC AGGGGCGAGC

```

1651 TGCAGGTGTG GGGCAGGGAC AACAAACAGCA TCAGCGAGGC CGGCGCCAAC
 1701 AGGCAGGGCA CCATCAGCTT CAACTTCCCC CAGATCACCC TGTGGCAGAG
 1751 GCCCCTGGTG ACCATCAAGA TCGGCGGCCA GCTGAAGGAG GCCCTGCTGA
 1801 ACACCGGCGC CGGCGACACC GTGCTGGAGG ACCTGAACCT GCCCGCAAG
 1851 TGGAAGCCCA AGATGATCGG CGGCATCGGC GGCTTCATCA AGGTGAGGCA
 1901 GTACGAGCAG ATCCCCATCG AGATCTGCGG CCACAAGGCC ATCGGCACCG
 1951 TGCTGGTGGG CCCCAACCCC GTGAACATCA TCGGCAGGAA CCTGTGACC
 2001 CAGCTGGGCT GCACCCTGAA CTTCCCCATC AGCCCCATCG AGACCGTGCC
 2051 CGTGAAGCTG AAGCCCGGCA TGGACGGCCC CAAGGTGAAG CAGTGCCCCC
 2101 TGACCGAGGA GAAGATCAAG GCCCTGACCG CCATCTGCGA CGAGATGGAG
 2151 AAGGAGGGCA AGATCACCAA GATCGGCCCC GAGAACCCCT ACAACACCCC
 2201 CATCTTCGCC ATCAAGAAGA AGGACAGCAC CAAGTGGAGG AAGCTGGTGG
 2251 ACTTCAGGGA GCTGAACAAG AGGACCCAGG ACTTCTGGGA GGTGCAGCTG
 2301 GGCATCCCCC ACCCGCCCGG CCTGAAGAAG AAGAAGAGCG TGACCGTGCT
 2351 GGACGTGGGC GACGCCTACT TCAGCATCCC CCTGTACGAG GACTTCAGGA
 2401 AGTACACCGC CTTACCATC CCCAGCAGGA ACAACGAGAC CCCCGCATC
 2451 AGCTACCAGT ACAACGTGCT GCCCCAGGGC TGGAAGGGCA GCCTCGCCAT
 2501 CTTCCAGAGC AGCATGACCA TCGAGGAGCT GATCTACAGC AAGAAGAGGC
 2551 AGGAGATCCT GGACCTGTGG GTGTACCACA CCCAGGGCTA CTTCCCCGAC
 2601 TGGCACAACT ACACCCCGG CCCCAGCGTG AGGTTCCCCC TGACCTTCGG
 2651 CTGGTGCTTC AAGCTGTGTC CCGTGGACCC CAGGGAGGTG GAGGAGGCCA
 2701 ACGAGGGCGA GGACAACTGC CTGCTGCACC CCGTGTGCCA GCACGGCATG
 2751 GAGGACGACC ACAGGGAGGT GCTGAAGTGG AAGTTCGACA GCCAGCTGGC
 2801 CCACAGGCAC AGGGCCAGGG AGCTGCACCC CGAGTTCTAC AAGGACTGCA
 2851 TGGGCGGCAA GTGGAGCAAG AGCAGCATCG TGGGCTGGCC CGCCATCAGG
 2901 GAGAGGATGA GGAGGACCGA GCCCCCGGCC GACGGCGTGG GCGCCGTGAG
 2951 CAGGGACCTG GAGAAGCACG GCGCCATCAC CAGCAGCAAC ACCGCGCCA
 3001 CCAACGAGGA CTGCGCCTGG CTGGAGGCCC AGGAGGAGGG CGAGGTGGGC
 3051 TTCCCCGTGA GGCCCCAGGT GCCCCTGAGG CCCATGACCT ACAAGGGCGC
 3101 CGTGGACCTG AGCTTCTTCC TGAAGGAGAA GGGCGGCCTG GAGGGCCTGA
 3151 GGCAGCACCT GCTGAGGTGG GGCTTCACCA CCCCCGACAA GAAGCACCAG
 3201 AAGGAGCCCC CCTTCCTGTG GATGGGCTAC GAGCTGCACC CCGACAAGTG
 3251 GACCGTGCAG CCCACCCAGC TGCCCAGAGG GGATAGCTGG ACCGTGAACG
 3301 ACATCCAGAA GCTGGTGGGC AAGCTGAACT GGGCCAGCCA GATCTACCCC
 3351 GGCATCAAGG TGAGGCAGCT GTGCAAGCTG CTGAGGGGCG CCAAGGCCCT
 3401 GACCGACATC GTGCCCCTGA CCGAGGAGGC CGAGCTGGAG CTGGCCGAGA
 3451 ACAGGGAGAT CCTGAAGGAG CCCGTGCACG GCGTGTACTA CGACCCAGC
 3501 AAGGACCTGA TCGCCGAGAT CCAGAAGCAG GGCCAGGAGC AGTGGACCTA
 3551 CCAGATCTAC CAGGAGCCCT TCAAGAACCT GAAGACCGGC AAGTACGCCA
 3601 AGATGAGGAC CGCCACACC AACGACGTGA AGCAGCTGAC CGAGGCCGTG
 3651 CAGAAGATCG CCATGGAGGG CATCGTGATC TGGGGCAAGA CCCCCAAGTT
 3701 CAGGCTGCCC ATCCAGAAGG AGACCTGGGA GACCTGGTGG ACCGACTACT
 3751 GGCAGGCCAC CTGGATCCCC GAGTGGGAGT TCGTGAACAC CCCTCCCCTG
 3801 GTGAAGCTGT GGTATCAGCT GGAGAAGGAC CCCATCGTGG GCGTGGAGAC
 3851 CTTCTACGTG GACGGCGCCG CCAACAGGGA GACCAAGATC GGCAAGGCCG
 3901 GCTACGTGAC CGACAGGGGC AGGAAGAAGA TCGTGAGCCT GACCGAGACC
 3951 ACCAACCAGA AGACCGAGCT GCAGGCCATC TGCATCGCCC TGCAGGACAG
 4001 CGGCAGCGAG GTGAACATCG TGACCGACAG CCAGTACGCC CTGGGCATCA
 4051 TCCAGGCCCA GCCCGACAAG AGCGAGAGCG AGCTGGTGAA CCAGATCATC


```

4101 GAGCAGCTGA TGAAGAAGGA GAGGGTGTAC CTGAGCTGGG TGCCCCCCCA
4151 CAAGGGCATC GCGGGCAACG AGCAGGTGGA CAAGCTGGTG AGCAGCGGCA
4201 TCAGGAAGGT GCTGAAGACC CTGGAGCCCT TCAGGAAGCA GAACCCCGGC
4251 ATCGTGATCT ACCAGTACAT GGACGACCTG TACGTGGGCA GCGACCTGGA
4301 GATCGGCCAG CACAGGACCA AGTAAagatc tctcgaggag ctcaagcggg
4351 cggatcccc gggtgcagg a (SacI)

```

C-syn-env120 (Synth.Leader)

```

(KpnI) 1 ctactatag ggagaccaa gcttggtacc gaattcgccg ccagcATGGA
51 CAGGGCCAAG CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCTGCTGCTG CCCCAGGCCC
101 AGGCCGTGGG CAACCTGTGG GTGACCGTGT ACTACGGCGT GCCCGTGTGG
151 AAGGGCGCCA CCACCACCTT GTTCTGCGCC AGCGACGCCA AGGCCTACGA
201 CACCGAGGTG CACAACGTGT GGGCCACCCA CGCCTGCGTG CCCGCCGACC
251 CCAACCCCCA GGAGATGGTG CTGGAGAACG TGACCGAGAA CTTCAACATG
301 TGAAGAACG AGATGGTGAA CCAGATGCAG GAGGACGTCA TCAGCCTGTG
351 GGACCAGAGC CTGAAGCCCT GCGTGAAGCT GACCCCTCTG TCGGTGACCC
401 TGGAGTGCAG GAACGTGAGC AGCAACAGCA ACGACACCTA CCACGAGACC
451 TACCACGAGA GCATGAAGGA GATGAAGAAC TGCAGCTTCA ACGCCACCAC
501 CGTGGTGAGG GACAGGAAGC AGACCGTGTA CGCCCTGTTC TACAGGCTGG
551 ACATCGTGCC CCTGACCAAG AAGAACTACA GCGAGAACAG CAGCGAGTAC
601 TACAGGCTGA TCAACTGCAA CACCAGCGCC ATCACCAGG CCTGCCCCAA
651 GGTGACCTTC GACCCCATCC CCATCCACTA CTGCACCCCC GCCGGCTACG
701 CCATCTTGAA GTGCAACGAC AAGATCTTCA ACGGCACCGG CCCCTGCCAC
751 AACGTGAGCA CCGTGCACTG CACCCACGGC ATCAAGCCCG TGGTGAGCAC
801 CCAGCTGCTG CTGAACGGCA GCCTGGCCGA GGGCGAGATC ATCATCAGGA
851 GCGAGAACCT GACCAACAAC GTGAAAACCA TCATCGTGCA CCTGAACCAG
901 AGCGTGAGGA TCGTGTGCAC CAGGCCCGGC AACAAACCA GGAAGAGCAT
951 CAGGATCGGC CCCGCCAGA CTTTCTACGC CACCGGCGAC ATCATCGGCG
1001 ACATCAGGCA GGCCCACTGC AACATCAGCG AGGACAAGTG GAACGAGACC
1051 CTGCAGAGGG TGAGCAAGAA GCTTGCCGAG CACTTCCAGA ACAAGACCAT
1101 CAAGTTCGCC AGCAGCAGCG GCGGCGACCT GGAGGTGACC ACCCAGAGCT
1151 TCAACTGCAG GGGCGAGTTC TTCTACTGCA ACACCAGCGG CCTGTTCAAC
1201 GGCGCCTACA CCCCCAACGG CACCAAGAGC AACAGCAGCA GCATCATCAC
1251 CATCCCCTGC AGGATCAAGC AGATCATCAA CATGTGGCAG GAGGTGGGCA
1301 GGGCCATGTA CGCCCTCCC ATCAAGGGCA ACATCACCTG CAAGACAAAC
1351 ATCACCGGCC TGCTGCTGGT GAGGGACGGC GGCACCGAGC CCAACGACAC
1401 CGAGACCTTC AGGCCCGGCG GCGGCGACAT GAGGAACAAC TGGAGGAGCG
1451 AGCTGTACAA GTACAAGGTG GTGGAGATCA AGCCCTGGG CGTGGCCCCC
1501 ACCACCACCA AGAGGAGGGT GGTGGAGAGG GAGAAGAGGT GATAAagatc
1551 tctcgagcat gcatctagag ggccccctaa atgctagagc tcgctgatca (XhoI)

```

C-syn-env140 (Synth.Leader)

```

(EcoRI) 1 accgaattcg cggccagcAT GGACAGGGCC AAGCTGCTGC TGCTGCTGCT
51 GCTGCTGCTG CTGCCCCAGG CCCAGGCCGT GGGCAACCTG TGGGTGACCG
101 TGTAACACGG CGTGCCCGTG TGAAGGGCG CCACCACCAC CCTGTTCTGC
151 GCCAGCGACG CCAAGGCCTA CGACACCGAG GTGCACAACG TGTGGGCCAC
201 CCACGCCTGC GTGCCCCCGG ACCCAACCC CCAGGAGATG GTGCTGGAGA

```

```

251  ACGTGACCGA  GAACTTCAAC  ATGTGGAAGA  ACGAGATGGT  GAACCAGATG
301  CAGGAGGACG  TCATCAGCCT  GTGGGACCAG  AGCCTGAAGC  CCTGCGTGAA
351  GCTGACCCCC  CTGTGCGTGA  CCCTGGAGTG  CAGGAACGTG  AGCAGCAACA
401  GCAACGACAC  CTACCACGAG  ACCTACCACG  AGAGCATGAA  GGAGATGAAG
451  AACTGCAGCT  TCAACGCCAC  CACCGTGGTG  AGGGACAGGA  AGCAGACCGT
501  GTACGCCCTG  TTCTACAGGC  TGGACATCGT  GCCCTGACC  AAGAAGAACT
551  ACAGCGAGAA  CAGCAGCGAG  TACTACAGGC  TGATCAACTG  CAACACCAGC
601  GCCATCACCC  AGGCCTGCCC  CAAGGTGACC  TTCGACCCCA  TCCCCATCCA
651  CTACTGCACC  CCCGCCGGCT  ACGCCATCCT  GAAGTGCAAC  GACAAGATCT
701  TCAACGGCAC  CGGCCCTGTC  CACAACGTGA  GCACCGTGCA  GTGCACCCAC
751  GGCATCAAGC  CCGTGGTGAG  CACCCAGCTG  CTGCTGAACG  GCAGCCTGGC
801  CGAGGGCGAG  ATCATCATCA  GGAGCGAGAA  CCTGACCAAC  AACGTGAAAA
851  CCATCATCGT  GCACCTGAAC  CAGAGCGTGG  AGATCGTGTG  CACCAGGCCC
901  GGCAACAACA  CCAGGAAGAG  CATCAGGATC  GGCCCCGGCC  AGACCTTCTA
951  CGCCACCGGC  GACATCATCG  GCGACATCAG  GCAGGCCAC  TGCAACATCA
1001 GCGAGGACAA  GTGGAACGAG  ACCCTGCAGA  GGGTGAGCAA  GAAGCTTGCC
1051 GAGCACTTCC  AGAACAAGAC  CATCAAGTTC  GCCAGCAGCA  GCGGCGGCGA
1101 CCTGGAGGTG  ACCACCCACA  GCTTCAACTG  CAGGGGCGAG  TTCTTCTACT
1151 GCAACACCAG  CGGCCTGTTC  AACGGCGCCT  ACACCCCCAA  CGGCACCAAG
1201 AGCAACAGCA  GCAGCATCAT  CACCATCCCC  TGCAGGATCA  AGCAGATCAT
1251 CAACATGtGG  CAGGAGGTGG  GCAGGGCCAT  GTACGCCCT  CCCATCAAGG
1301 GCAACATCAC  CTGCAAGAGC  AACATCACCG  GCCTGCTGCT  GGTGAGGGAC
1351 GCGGCGACCG  AGCCCAACGA  CACCGAGACC  TTCAGGCCCG  GCGGCGGCGA
1401 CATGAGGAAC  AACTGGAGGA  GCGAGCTGTA  CAAGTACAAG  GTGGTGAGGA
1451 TCAAGCCCT  GGGCGTGGCC  CCCACCACCA  CCAAGAGGAG  GGTGGTGGAG
1501 AGGGAGAAGA  GCGCCGTGGG  CATCGGCGCC  GTGTTCTTGG  GCTTCTTGGG
1551 CGTGGCCGGC  AGCACCATGG  GCGCCGCCAG  CATCACCTTG  ACCGTGCAGG
1601 CCAGGCAGCT  GCTGAGCGGC  ATCGTGCAGC  AGCAGAGCAA  CCTGCTGAGG
1651 GCCATCGAGG  CCCAGCAGCA  CCTGCTGCAG  CTGACCGTGT  GGGGCATCAA
1701 GCAGCTGCAG  ACCAGGGTGC  TGGCCATCGA  GAGGTACCTG  AAGGACCAGC
1751 AGCTGTGTTG  CATCTGGGGC  TGCAGCGGCA  AGCTGATCTG  CACCACCGCC
1801 GTGCCCTGGA  ACAGCAGCTG  GAGCAACAAG  AGCCAGAAGG  AGATCTGGGA
1851 CAACATGACC  TGGATGCAGT  GGGACAAGGA  GATCAGCAAC  TACACCAACA
1901 CCGTGTACAG  GCTGCTGGAG  GAGAGCCAGA  ACCAGCAGGA  GAGGAACGAG
1951 AAGGACCTGC  TGGCCCTGGA  CAGCTGATAA  agatctctcg  aggtcgacgg
2001 tatcgataag  cttgatatcg  aattcctgca  gcccggggga  tccgccccgg
2051 ctagagcggc  cgccaccgcg  gtggagctcc  agcttttggt  ccctttagtg
2101 agggttaatt  gcgcgc (SacI)

```

C-syn-env140TM (Synth.Leader)

```

(KpnI) 1  ggcgaaattgg gtaccgaatt  cgccgccagc  ATGGACAGGG  CCAAGCTGCT
51  GCTGCTGCTG  CTGCTGCTGC  TGCTGCCCCA  GGCCAGGCC  GTGGGCAACC
101  TGTGGTGAC  CGTGACTAC  GCGTGCCCCG  TGTGGAAGGG  CGCCACCACC
151  ACCCTGTTCT  GCGCCAGCGA  CGCCAAGGCC  TACGACACCG  AGGTGCACAA
201  CGTGTGGGCC  ACCCAGCCT  GCGTGCCCGC  CGACCCCAAC  CCCAGGAGA
251  TGGTGTGGA  GAACGTGACC  GAGAACTTCA  ACATGTGGAA  GAACGAGATG
301  GTGAACCAGA  TGCAGGAGGA  CGTCATCAGC  CTGTGGGACC  AGAGCCTGAA
351  GCCCTGCGTG  AAGCTGACCC  CCCTGTGCGT  GACCCTGGAG  TGCAGGAACG

```

401 TGAGCAGCAA CAGCAACGAC ACCTACCACG AGACCTACCA CGAGAGCATG
 451 AAGGAGATGA AGAACTGCAG CTTCAACGCC ACCACCGTGG TGAGGGACAG
 501 GAAGCAGACC GTGTACGCCC TGTCTACAG GCTGGACATC GTGCCCCTGA
 551 CCAAGAAGAA CTACAGCGAG AACAGCAGCG AGTACTACAG GCTGATCAAC
 601 TGCAACACCA GCGCCATCAC CCAGGCCTGC CCCAAGGTGA CCTTCGACCC
 651 CATCCCCATC CACTACTGCA CCCCCGCCGG CTACGCCATC CTGAAGTGCA
 701 ACGACAAGAT CTTCAACGGC ACCGGCCCCCT GCCACAACGT GAGCACCCTG
 751 CAGTGACACC ACGGCATCAA GCCCCGTGGT AGCACCCAGC TGCTGCTGAA
 801 CGGCAGCCTG GCCGAGGGCG AGATCATCAT CAGGAGCGAG AACCTGACCA
 851 ACAACGTGAA AACCATCATC GTGCACCTGA ACCAGAGCGT GGAGATCGTG
 901 TGCACCAGGC CCGGCAACAA CACCAGGAAG AGCATCAGGA TCGCCCCCGG
 951 CCAGACCTTC TACGCCACCG GCGACATCAT CGGCGACATC AGGCAGGCCC
 1001 ACTGCAACAT CAGCGAGGAC AAGTGGAACG AGACCTTGCA GAGGGTGAGC
 1051 AAGAAGCTTG CCGAGCACTT CCAGAACAAG ACCATCAAGT TCGCCAGCAG
 1101 CAGCGGCGGC GACCTGGAGG TGACCACCCA CAGCTTCAAC TGCAGGGGCG
 1151 AGTTCTTCTA CTGCAACACC AGCGGCCTGT TCAACGGCGC CTACACCCCC
 1201 AACGGCACCA AGAGCAACAG CAGCAGCATC ATCACCATCC CCTGCAGGAT
 1251 CAAGCAGATC ATCAACATGT GGCAGGAGGT GGGCAGGGCC ATGTACGCCC
 1301 CTCCCATCAA GGGCAACATC ACCTGCAAGA GCAACATCAC CGGCCTGCTG
 1351 CTGGTGAGGG ACGGCGGCAC CGAGCCCAAC GACACCGAGA CCTTCAGGCC
 1401 CGGCGGCGGC GACATGAGGA ACAACTGGAG GAGCGAGCTG TACAAGTACA
 1451 AGGTGGTGGA GATCAAGCCC CTGGGCGTGG CCCCCACCAC CACCAAGAGG
 1501 AGGGTGGTGG AGAGGGAGAA GAGGGCCGTG GGCATCGGCG CCGTGTTCCT
 1551 GGGCTTCCTG GCGGTGGCCG GCAGCACCAT GGGCGCCGCC AGCATCACCC
 1601 TGACCGTGCA GGCAGGCAG CTGCTGAGCG GCATCGTGCA GCAGCAGAGC
 1651 AACCTGCTGA GGGCCATCGA GGCCAGCAG CACCTGCTGC AGCTGACCGT
 1701 GTGGGGCATC AAGCAGCTGC AGACCAGGGT GCTGGCCATC GAGAGGTACC
 1751 TGAAGGACCA GCAGCTGCTG GGCATCTGGG GCTGCAGCGG CAAGCTGATC
 1801 TGCACCACCG CCGTGCCCTG GAACAGCAGC TGGAGCAACA AGAGCCAGAA
 1851 GGAGATCTGG GACAACATGA CCTGGATGCA GTGGGACAAG GAGATCAGCA
 1901 ACTACACCAA CACCGTGTAC AGGCTGCTGG AGGAGAGCCA GAACCAGCAG
 1951 GAGAGGAACG AGAAGGACCT GCTGGCCCTG GACAGCTGGA AGAACCTGTG
 2001 GAGCTGGTTC GACATCACCA ACTGGCTGTG GTACATCAAG ATCTTCATCA
 2051 TCATCGTGGG CGGCCTGATC GGCCTGAGGA TCATCTTCGC CGTGTGAGC
 2101 ATCGTGAACA GGTGAGGCA GGGCTACTGA ttgtcttcga gctccagctt
 2151 ttgttcctt tagtgagggt taattgcgcg cttggcgtaa (SacI)

C-syn-env160 (Synth.Leader)

(EcoRI)1 ccggtctcag cggcgggtac cgaattcgcc gccagcATGG ACAGGGCCAA
 51 GCTGCTGCTG CTGCTGCTGC TGCTGCTGCT GCCCCAGGCC CAGGCCGTGG
 101 GCAACCTGTG GGTGACCGTG TACTACGGCG TGCCCGTGTG GAAGGGCGCC
 151 ACCACCACCC TGTCTGCGC CAGCGACGCC AAGGCCTACG ACACCGAGGT
 201 GCACAACGTG TGGGCCACCC ACGCCTGCGT GCGCGCCGAC CCCAACCCCC
 251 AGGAGATGGT GCTGGAGAAC GTGACCGAGA ACTTCAACAT GTGGAAGAAC
 301 GAGATGGTGA ACCAGATGCA GGAGGACGTC ATCAGCCTGT GGGACCAGAG
 351 CCTGAAGCCC TCGGTGAAGC TGACCCCCCT GTGCGTGACC CTGGAGTGCA
 401 GGAACGTGAG CAGCAACAGC AACGACACCT ACCACGAGAC CTACCACGAG
 451 AGCATGAAGG AGATGAAGAA CTGCAGCTTC AACGCCACCA CCGTGGTGAG

501 GGACAGGAAG CAGACCGTGT ACGCCCTGTT CTACAGGCTG GACATCGTGC
 551 CCCTGACCAA GAAGAACTAC AGCGAGAACA GCAGCGAGTA CTACAGGCTG
 601 ATCAACTGCA ACACCAGCGC CATCACCCAG GCCTGCCCCA AGGTGACCTT
 651 CGACCCCATC CCCATCCACT ACTGCACCCC CGCCGGCTAC GCCATCCTGA
 701 AGTGCAACGA CAAGATCTTC AACGGCACCG GCCCCTGCCA CAACGTGAGC
 751 ACCGTGCAGT GCACCCACGG CATCAAGCCC GTGGTGAGCA CCCAGCTGCT
 801 GCTGAACGGC AGCCTGGCCG AGGGCGAGAT CATCATCAGG AGCGAGAACC
 851 TGACCAACAA CGTGAAAACC ATCATCGTGC ACCTGAACCA GAGCGTGGAG
 901 ATCGTGTGCA CCAGGCCCGG CAACAACACC AGGAAGAGCA TCAGGATCGG
 951 CCCC GGCCAG ACCTTCTACG CCACCGGCCG CATCATCGGC GACATCAGGC
 1001 AGGCCCACTG CAACATCAGC GAGGACAAGT GGAACGAGAC CCTGCAGAGG
 1051 GTGAGCAAGA AGCTTGCCGA GCACTTCCAG AACAAGACCA TCAAGTTCGC
 1101 cAGCAGCAGC GCGGCGGACC TGGAGGTGAC CACCCACAGC TTCAACTGCA
 1151 GGGGCGAGTT CTTCTACTGC AACACCAGCG GCCTGTTCAA CGGCGCCTAC
 1201 ACCCCCAACG GCACCAAGAG CAACAGCAGC AGCATCATCA CCATCCCCTG
 1251 CAGGATCAAG CAGATCATCA ACATGTGGCA GGAGGTGGGC AGGGCCATGT
 1301 ACGCCCCTCC CATCAAGGGC AACATCACCT GCAAGAGCAA CATCACCGGC
 1351 CTGCTGCTGG TGAGGGACGG CGGCACCGAG CCCAACGACA CCGAGACCTT
 1401 CAGGCCCGGC GCGGCGGACA TGAGGAACAA CTGGAGGAGC GAGCTGTACA
 1451 AGTACAAGGT GGTGGAGATC AAGCCCCTGG GCGTGGCCCC CACCACCACC
 1501 AAGAGGAGGG TGGTGGAGAG GGAGAAGAGG GCCGTGGGCA TCGGCGCCGT
 1551 GTTCCTGGGC TTCCTGGGCG TGGCCGGCAG CACCATGGGC GCCGCCAGCA
 1601 TCACCCTGAC CGTGCAGGCC AGGCAGCTGC TGAGCGGCAT CGTGCAGCAG
 1651 CAGAGCAACC TGCTGAGGGC CATCGAGGCC CAGCAGCACC TGCTGCAGCT
 1701 GACCGTGTGG GGCATCAAGC AGCTGCAGAC CAGGGTGCTG GCCATCGAGA
 1751 GGTACCTGAA GGACCAGCAG CTGCTGGGCA TCTGGGGCTG CAGCGGCAAG
 1801 CTGATCTGCA CCACCGCCGT GCCCTGGAAC AGCAGCTGGA GCAACAAGAG
 1851 CCAGAAGGAG ATCTGGGACA ACATGACCTG GATGCAGTGG GACAAGGAGA
 1901 TCAGCAACTA CACCAACACC GTGTACAGGC TGCTGGAGGA GAGCCAGAAC
 1951 CAGCAGGAGA GGAACGAGAA GGACCTGCTG GCCCTGGACA GCTGGAAGAA
 2001 CCTGTGGAGC TGGTTCGACA TCACCAACTG GCTGTGGTAC ATCAAGATCT
 2051 TCATCATCAT CGTGGGCGGC CTGATCGGCC TGAGGATCAT CTTGCGCGTG
 2101 CTGAGCATCG TGAACAGGGT GAGGCAGGGC TACAGCCCCC TGAGCTTCCA
 2151 GACCCTGACC CCCAACCCCG GCGGCCCCGA CAGGCTGGGC AGGATCGAGG
 2201 AGGAGGGCGG CAAGCAGGAC AGGGACAGGA GCATCAGGCT GGTGAACGGC
 2251 TTCCTGGCCC TGGCCTGGGA CGACCTGAGG AACCTGTGCC TGTTTCAGCTA
 2301 CCACAGGCTG AGGGACTTCA CCCTGGTGGC CGCCAGGGTG GTGGAGCTGC
 2351 TGGGCAGGAA CAGCCTGAGG GGCTGCAGA GGGGCTGGGA GGCCCTGAAG
 2401 TACCTGGGCA GCCTGGTGCA GTACTGGGGC CAGGAGCTGA AGAAGAGCAC
 2451 CATCAGCCTG GTGGACACCA TCGCCATCGC CGTGGCCGAG GGCACCGACA
 2501 GGATCATCGA GCTGGTGAG GGCCTGTGCA GGGCCATCTA CAGCATCCCC
 2551 AGGAGGATCA GGCAGGGCTT CGAGGCCGCC CTGCAGTGAt aaagatctct
 2601 **cgagggggggg** cccggtaccc aattcgc (XhoI)