

4 Diskussion

Mit der Herstellung von *nef*-Deletionsmutanten in einem SIV/HIV Reverse Transkriptase-Hybrid Virus wurde die Voraussetzung geschaffen, um die Ergebnisse der ersten, mit attenuierten Viren durchgeführten Vakzinierungs-Experimente genauer zu analysieren. Durch keinen anderen Ansatz in der SIV/HIV-Vakzinologie konnte bisher ein so effektiver Schutz in Rhesusaffen erzeugt werden; es konnte bisher auch nicht geklärt werden, ob eine Immunantwort oder andere Mechanismen dafür verantwortlich sind.

Die Immunisierung bzw. Infektion mit Δ *nef*-Mutanten bleibt bislang im Tiermodell die einzige Möglichkeit, Schutz vor anschließender Infektion durch Wildtyp-Viren zu erzeugen. Bereits 1992 wurde gezeigt, daß Rhesusaffen durch eine vorhergehende Immunisierung mit einem hoch attenuierten Klon von SIV_{mac}, der eine große Deletion im *nef*-Gen trägt vollkommen vor Belastung mit dem pathogenen Wildtyp-Virus geschützt sind (Daniel *et al.*, 1992). Zu diesem Zeitpunkt ergaben andere Ansätze wie die Verwendung von inaktivierten Virus, aufgereinigte Virusproteine oder auch rekombinanter Viren, die Teile von SIV tragen, nur selten eine protektive Immunantwort. Um bei einer eventuellen Übertragung dieser Ansätze auf den Menschen eine größere Sicherheit für die Empfänger der Δ *nef*-Mutanten zu erhalten, wurden zu diesen Tiermodellen auch weitergehende SIV-Deletionsmutanten hergestellt. Diese tragen in anderen Genen und/oder regulatorischen Bereichen mehrere Deletionen, um die Gefahr einer Rückmutation zum Wildtyp-Stamm auszuschließen (Wyand *et al.*, 1994; Wyand *et al.*, 1996). Es wurden viele Studien in Rhesusaffen durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen Vitalität des attenuierten Immunisierungsvirus und dem Zeitraum, der benötigt wird um einen Schutz zu erzielen durchgeführt, ohne daß ermittelt werden konnte, welche Immunparameter die Manifestation des Schutzes anzeigen (Norley *et al.*, 1996b). Als sich im Laufe der Zeit immer weiter herausstellte, daß sich durch sämtliche andere Impfstoffkandidaten nicht der gewünschte Schutz in Tiermodellen erzeugen ließ, begann man, trotz aller Bedenken gegenüber Rückmutationen, HIV-Deletionsmutanten als Impfstoffe in Betracht zu ziehen. Zu dieser Zeit meldeten sich genügend Freiwillige, auch Wissenschaftler selbst für eine Immunisierung mit attenuierten HIV. Es stellte sich jedoch rechtzeitig heraus, daß selbst der hoch attenuierte, mehrere Deletionen tragende SIV_{mac239} Δ 3 (Wyand *et al.*, 1994) in neugeborenen Rhesusaffen zu hohen Titern sich vermehrt und das simiane AIDS (SAIDS) verursachen kann (Baba *et al.*, 1995). Im folgenden wurde auch bei den Tieren, die in den ursprünglichen Studien mit SIV-Deletionsmutanten infiziert wurden, Symptome von SAIDS beobachtet. Weiterhin wurde über die letzten Jahre beobachtet, daß

sich auch AIDS manifestiert in einigen Patienten der „Sydney Blood Bank Cohort“, einer Gruppe von Bluttransfusion-Empfänger, welche sich vor circa 16 Jahre mit einer natürlich aufgetretenen Δnef -HIV Mutante infizierten. Aus diesen Befunden war zu ersehen, daß Δnef -attenuierte Immundefizienzviren nicht als Impfstoffe in Frage kommen. Doch wird weiterhin mit SIV *nef*-Deletionsmutanten im Rhesusaffenmodell daran gearbeitet, die genauen Mechanismen aufzuklären, die für den anfänglichen Schutz vor Infektion mit Wildtyp-Viren zuständig sind. Denkbar wäre, das nicht nur die zu der Zeit der ersten SIV Δnef -Studien untersuchten Mechanismen der CTL-Aktivität oder der humoralen Immunantwort von Bedeutung sind, sondern auch damals unbekannte Mechanismen des Immunsystems. Untersucht wird unter anderem die Auswirkung von *nef*-Deletionsmutanten auf die nicht-CTL-basierende, antivirale Aktivität der CD8⁺ Lymphozyten (Binninger-Schinzler *et al.*, 2002). Auch werden im Δnef -SIV bzw. -SHIV Rhesusaffen-Modell weiterhin Versuche in Bezug auf die effektivste Applikation von Impfstoffkandidaten durchgeführt, z.B. die intranasale Immunisierung versus dem nachgewiesenen Schutz nach intravenöser Infektion (Enose *et al.*, 2002). Gelingt es, einige der Mechanismen, mit denen das Immunsystem die *in vivo* schlecht replizierenden Δnef -Viren kontrollieren kann genau zu charakterisieren, könnte es der Impfstoffentwicklung eine vielversprechende Richtung vorgeben. Durch die Methoden der DNA-Impfstoffe, der viralen Vektoren oder der Antikörper-Induktion mittels synthetisch dargestellter Epitope könnte möglicherweise ein Impfstoff konstruiert werden, der dieselbe Art von Immunantwort auslöst wie die Infektion mit Deletionsmutanten, ohne daß ein replizierendes Virus in den Körper gebracht werden muß.

Die zur Zeit noch erfolglose Suche kann aber darin begründet sein, daß die Immunantwort nicht der dem Schutz zugrunde liegende Mechanismus ist. Alternativ zu der von SIV Δnef induzierten Immunantwort wäre ein Modell denkbar, in dem die Durchsetzung des Wildtyp-Virus nach Belastung nicht durch die Immunantwort kontrolliert wird, sondern durch die Verfügbarkeit bzw. in diesem Fall Nicht-Verfügbarkeit von infizierbaren Zellen. Das meint, daß die im Organismus vorhandene Δnef -Mutante mit dem neu eingebrachten Wildtyp-Virus in Konkurrenz um geeignete Orte der Replikation steht und sich die Wildtyp-Infektion durch mangelnde Vermehrung der Viruspartikel nicht im Körper manifestieren kann. Laut dieser Hypothese infiziert das Δnef -Immunisierungsvirus alle aktivierten CCR5-positive CD4⁺ T-Zellen und integriert seine Erbinformation. Durch Vorhandensein des proviralen Δnef -Genoms sind diese nicht mehr für die Replikation des Wildtyp-Virus verfügbar, obwohl auch einige Veröffentlichungen das Auftreten einer zweite Infektion durch eine andere Virusvariante in einem HAART-Patienten beschreiben (Altfeld *et al.*, 2002). Jedoch ist dies

bei nur einem einzelnen Individuum beobachtet wurden, in den Tieren der eben erwähnten Rhesusaffen-Studien konnte das Vorhandensein des Wildtyp neben der Deletionsmutante nicht festgestellt werden. Ein Kernpunkt der Hypothese, daß die Nicht-Verfügbarkeit der Zielzellen die Wildtyp-Infektion verhindert, ist daß direkt in lymphatischen Geweben die Replikation der Δnef -Viren als auch das Auftreten der neuen, aktivierten und dadurch infizierbaren Zellen erfolgt. Somit ergibt sich auch in dem Moment der Belastung mit einer relativ hohen Dosis an Wildtyp-Partikeln ein Vorteil für die bereits in dem lymphatischen Geweben vorhandenen Δnef -Mutanten. Selbst wenn im Plasma die SIV Δnef -RNA nicht mehr nachweisbar ist, sind doch speziell in den Lymphknoten immer noch infizierte und somit auch Virus-produzierende Zellen vorhanden.

Auch der typische Verlauf einer HIV-Infektion und die Progression von AIDS kann durch den Zusammenhang zwischen verfügbaren Zielzellen und Viruslast erklärt werden. Nach dem initialen Viruspeak stellt sich die Viruslast im Blut auf 10^4 - 10^5 Kopien viraler RNA / ml ein. Dieser Wert kann über Jahre gehalten werden und beruht nach der gängigen Theorie auf einem geregelten Gleichgewicht (steady state) zwischen Viruslast kontrollierender Immunantwort und Virus-Produktion durch aktivierte, infizierte Zellen. Doch verlangt ein solches Gleichgewicht eine strenge und unmittelbare Gegensteuerung, geringe Schwankungen in der Effektivität des Immunsystems von infizierten Tieren oder AIDS-Patienten sollte durch direkten Anstieg der Viruslast sichtbar sein. Experimente dazu sind im SIV/Rhesusaffen-Modell unter anderen von der Gruppe um N. Letvin durchgeführt wurden. In chronisch SIV-infizierten Rhesusaffen wurden die $CD8^+$ T-Zellen, denen, wie oben beschrieben, wichtige antivirale Aktivität durch CTLs und anderen Mechanismen zugeschrieben wird, durch einen Antikörper *in vivo* depletiert (Schmitz *et al.*, 1999). Zu beobachten ist ein starker Anstieg der Viruslast im Blut (RNA-Kopien/ml), der mit Auftreten neuer $CD8^+$ T-Zellen wieder abnimmt. Dieses Experiment demonstriert eine entscheidende Rolle der $CD8^+$ T-Zellen in der Kontrolle der Virusbelastung. Doch wurde in einer anderen Studie der Arbeitsgruppe von D. Ho (Jin *et al.*, 1999) bei demselben Ansatz der Antikörper-vermittelten $CD8^+$ -Zell-Depletion die $CD4^+$ Zellen mit untersucht; dabei zeigte sich, daß die Antikörper-Behandlung einen direkten Einfluß auf die Population der $CD4^+$ Zellen hat. Die meßbare Zahl der $CD4^+$ Zellen im Blut sinkt ebenfalls ab, wenn auch im geringeren Umfang. Somit werden nicht nur neue $CD8^+$ T-Zellen produziert, um die depletierte Population zu ersetzen, sondern es werden auch in einem unbekanntem Maßstab neue $CD4^+$ T-Zellen gebildet. Im Zusammenhang mit einer partiellen Schwächung des Immunsystems könnte es in den lymphatischen Geweben zu einer neuen Population von infizierbaren $CD4^+$ Zellen kommen, die für einen neuen Viruspeak wie

nach einer primären Infektion sorgen. Durch die variable Zahl der aktivierten, CCR5-positiven CD4⁺ T-Zellen in lymphatischen Geweben in den Experimenten können diese Studien zur Depletion der CD8⁺ T-Zellen nicht vollkommen ausschließen, daß die Menge an meßbaren Virus im Blut mit der Zahl der zur Verfügung stehenden infizierbaren Zellen korreliert anstatt mit der Kompetenz der zellulären Immunantwort.

Für diese Korrelation, also daß auch in der HIV-Infektion die Anzahl der infizierbaren Zellen mehr die Viruslast im Blut bestimmt als die Stärke der Immunantwort spricht die Studie in der Gruppe um A.S. Fauci. Durch Immunisierung von HIV-infizierten Patienten mit Tetanustoxin konnte eine Aktivierung des Immunsystems erreicht werden, gleichzeitig stieg aber die Plasmavirämie transient an (Ostrowski *et al.*, 1997). Eine Schlußfolgerung aus diesem Experiment wäre, daß durch diese Aktivierung auch verstärkt neue Zielzellen für HIV aktiviert werden und damit die Virusproduktion steigt, während die potentiell für das Gleichgewicht verantwortliche Immunantwort nicht mit gesteigert wurde.

Weitere Fragen zu der Rolle der Immunantwort bei der Regulation der Viruslast, speziell im SIV Δ *nef* / Rhesusaffen-Modell, wirft die Studie der Arbeitsgruppe um M. Cranage auf. Bei einem von sieben, mit der SIVmac C8-Mutante infizierten Rhesusaffen wurde über 45 Wochen hin die Rückmutation der vier Aminosäure-Deletion in Nef zu einer dem Wildtyp SIVmac 32H ähnlichen Sequenz beobachtet (Whatmore *et al.*, 1995). Nur bei diesem einen Tier aus der Rhesusaffen-Gruppe begann 12 Wochen nach der Infektion mit SIVmac Δ *nef*-C8 der Rückgang der CD4⁺ Zellen und es entwickelten sich Symptome von SAIDS. Das zu dem Wildtyp zurück mutierte Virus konnte sich im Körper durchsetzen und eine letale Infektion auslösen, während sich bei den restlichen Tieren die typische, vorerst nicht pathogene Δ *nef*-Infektion manifestierte. Drei dieser Tiere wurden später belastet mit dem pathogenen Wildtyp-Virus. Diese Tiere erwiesen sich als geschützt und es konnte weiterhin nur die SIV Δ *nef*-Mutante in den PBMC nachgewiesen werden. Es ergibt sich hier die Frage, warum bei einem Tier die Rückmutation zu dem Wildtyp zu SAIDS führt, während die Tiere, die eine hohe Dosis der Mutante injiziert bekamen, Wildtyp-uninfiziert verblieben. Bei einer entscheidenden Rolle der Immunantwort in der Kontrolle der durch SIV Δ *nef*-Mutanten hervorgerufenen Viruslast sollte das Immunsystem auch in der Lage sein, die wenigen entstandenen Revertanten genauso zu kontrollieren wie die pathogene Dosis an SIVmac 32H Wildtyp-Viren durch die Belastung. Ist aber die Konkurrenz um neu infizierbare Zellen ausschlaggebend für das Durchsetzen einer Wildtyp-Infektion, dann ließe es sich so erklären, daß die Revertante direkt am Ort der viralen Replikation im Körper entstanden ist, in den lymphatischen Geweben. In diesen befinden sich auch, wie erwähnt, die potentiellen

Zielzellen. Hier könnte dann das zum Wildtyp zurück mutierte Virus gegenüber der C8- Δnef Mutante einen selektiven Vorteil haben; es wurde bereits gezeigt, daß ein funktionelles *nef*-Gen *in vivo* von entscheidender Bedeutung ist für eine starke Replikation (Kestler *et al.*, 1991).

Starke Hinweise, daß das Immunsystem, zumindest nicht die CD8⁺ T-Zell-vermittelte Immunantwort wesentlich an der Regulation der Viruslast nach SIV Δnef -Infektion beteiligt ist, liefert ein Experiment von Stebbings *et al.* (Stebbing *et al.*, 1998). In mit der Δnef -C8 Mutante infizierten Rhesusaffen wurden die CD8⁺ T-Zellen durch Antikörper depletiert, bevor die Tiere mit dem pathogenen Wildtyp-Virus SIVmac 32H belastet wurden. Es konnte keine Replikation des Wildtyps in den SIV Δnef -C8 infizierten, CD8⁺ Zell-depletierten Tieren nachgewiesen werden, wie in bisherigen Δnef -Studien beschrieben verblieben die Tiere geschützt. Einschränkend ist zu sagen, daß die Depletion durch Antikörper, wie hier beschrieben, wahrscheinlich nicht alle vorhandene CD8⁺ T-Zellen entfernt. In den Lymphknoten können durchaus noch antiviral wirkende CD8⁺ T-Zellen verbleiben.

Um die Frage zu adressieren, in wie weit die Immunantwort wirklich für die Kontrolle der Infektion durch Δnef -SIV-Mutanten zuständig ist und effektiv die Durchsetzung der Wildtyp-Infektion verhindern kann, muß die Immunantwort von der aktuellen Δnef -Viruslast entkoppelt werden. Bislang wurden nur Tiere belastet, in denen das Δnef -Immunisierungsvirus noch repliziert, und deswegen eine mögliche, wenn auch noch nicht unwiderlegbar gemessene Immunantwort aufrecht erhalten wird. Durch Einsatz der in dieser Arbeit konstruierten Δnef -RTSHIV-Mutanten wird es möglich sein, nachdem sich die Immunantwort gegen die *nef*-Deletionsmutante etabliert hat, die Viruslast selbst durch Therapie mit dem NNRTI Nevirapin im Tier zu unterdrücken. Durch eine Behandlung mit dem RT-Inhibitor Nevirapin enthaltenden Medikament, welches sich in der HIV-Therapie bewährt hat, wird das Δnef -RTSHIV auch in den lymphatischen Geweben an der Replikation und somit an der Freisetzung neuer infektiöser Partikel gehindert. Im Körper kann sich während der Nevirapin-Behandlung eine neue Population von uninfizierten, primären Zielzellen für das Belastungsvirus aufbauen (siehe auch Grafik, Abbildung 3·1). Die Immunantwort selbst bleibt über die relativ kurze Zeit der Therapie und damit auch trotz sinkender Viruslast nahezu unverändert. Das Wildtyp-Belastungsvirus kann die neu entstandenen, aktivierten Zielzellen infizieren und ist in seiner Replikation durch die Spezifität von Nevirapin, welches ausschließlich die HIV Reverse Transkriptase inhibiert, nicht beeinträchtigt. Wenn keine Immunantwort vorliegt und die Konkurrenz um Zielzellen der alleinige Grund wäre, der die Infektion durch den Wildtyp verhinderte, dann sollte sich

nach Belastung die Infektion mit dem Wildtyp-SIV gegenüber den *in vivo* schwächer replizierenden *nef*-Deletionsmutanten durchsetzen.

Ausblickend steht nach der Herstellung und Testung der Δ *nef*-RTSHIV-Mutanten das Tierexperiment an. Dazu sollte eine genügend große Gruppe von Rhesusaffen mit den beiden, auf Rhesusaffen-PBMC angezüchteten RTSHIV-Deletionsmutanten infiziert werden und der Verlauf der Infektion durch Messung der Viruslast im Blut mittels real-Time PCR verfolgt werden. Ebenso sollte die Entwicklung der zellulären Immunantwort gemessen werden durch Tetramer-Anfärbung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen oder durch ELISPOT-Analysen. Diese Methoden waren bei den vorhergehenden Δ *nef*-Immunisierungsstudien in dieser Arbeitsgruppe noch nicht verfügbar und können nun weitere Informationen liefern. Abhängig von der Entwicklung der zellulären und der humoralen Immunantwort wird ein Zeitpunkt gewählt, zu dem die NNRTI-Therapie beginnt. Nach dem Absinken der Viruslast im Blut wird die Nevirapin-Behandlung beibehalten, um auch die virale Replikation in den lymphatischen Geweben effizient zu unterdrücken. Aus klinischen HIV/AIDS-Studien ergibt sich ein Zeitfenster, bis auch hier resistente Mutanten auftreten können. Davor muß die Belastung mit dem zum RTSHIV parentalen SIVmac239 bzw. einem eng verwandten Stamm erfolgen. Anhand von diagnostischer PCR kann festgestellt werden, ob das Wildtyp-Virus sich im Tier replizieren kann oder ob sich resistente Δ *nef*-Mutanten bilden und diese wieder für höhere Viruslast verantwortlich sind. Falls sich die Wildtyp-Infektion manifestiert, sollten sich auch sehr viel früher Anzeichen von SAIDS als bei den ursprünglich mit Δ *nef*-Viren infizierten Tieren ergeben. Wenn sich zeigt, daß die Immunantwort stark genug ist, um die Wildtyp-Infektion trotz der vorhandenen Zielzellen zu kontrollieren, können weitere Experimente unternommen werden, mit denen der dafür entscheidende Teil der Immunantwort identifizierbar ist. Dadurch könnte im günstigsten Fall der HIV-Impfstoff-Forschung ein neues oder genaueres Ziel gesetzt werden, nämlich die Induktion eines oder einiger spezifischer Effektoren des Immunsystems. Es ist geplant, dieses Experiment durchzuführen, sobald sich im S3-Tierstall für Primaten des Paul-Ehrlich-Instituts genügend Platz für die Versuchstiere ergibt, bzw. eine Kooperation mit einem anderen, den Anforderungen entsprechenden Institut entsteht.

Im zweiten Projekt dieser Arbeit wurden durch Techniken der PCR zwei Codon-optimierte HIV-1 Gene hergestellt und in einen zur Verfügung gestellten Expressionsvektor kloniert. Die Sequenzen für die beiden Gene *tat* und *gag* entstammen einem neu charakterisierten, A/G-

rekombinanten HIV-1 Primärisolat aus Nigeria. *In vitro*-Tests zeigen, daß die Expression beider Konstrukte genügend stark ist, um eine Immunisierungsstudie im Tierexperiment zu starten. Die *tat*- und *gag*-Vektoren können als Teil eines spezifisch auf Nigeria abgestimmten DNA-Impfstoffs eingesetzt werden.

Der Vektor pTH selbst wurde in der Arbeitsgruppe um A. McMichael von einem pCMV-Vektor ausgehend hergestellt und seine Eignung als Immunisierungsvektor beschrieben (Hanke *et al.*, 1998). Die Klonierung der viralen, unmodifizierten Gene aus einem Moleklarklon des A/G-rekombinanten Isolats 00_200 ließ sich mit den herkömmlichen Methoden bewerkstelligen. Nachdem über Tabellen zur Codon-Benutzung in Menschen die neue Basensequenz für *tat* und *gag* erstellt wurde, mußten diese Gene jedoch komplett neu aus kurzen Oligonukleotiden zusammen gefügt werden. Die Basensequenz unterschied sich zu stark von der Originalsequenz, als daß durch Mutagenese oder Austausch einzelner Abschnitte die Originalsequenz zu der Codon-optimierten Sequenz hin modifiziert werden konnte. So wurde über mehrere Fusions-PCR-Schritte zunächst das *tat*-Konstrukt hergestellt, bevor mit dem fünfmal so großen *gag*-Konstrukt begonnen wurde. Das Zusammenfügen einzelner Abschnitte von *gag* erwies sich als wesentlich schwieriger, als es nach der *tat*-Konstruktion zu erwarten war. War jedoch eine Fusion von mehreren kurzen Stücke zu einem 200 - 300 Basenpaar großen Fragment erfolgreich, wurde in diesem weniger Fehler beobachtet als es bei *tat* der Fall war. Das Vorhandensein von einzelnen falschen Basen außerhalb der Fusionsstellen der Oligonukleotide kann auch auf Fehleinbauten in dem Ausgangsmaterial zurück zuführen sein. Bei der Verschmelzung von verschiedenen subklonierten Bereichen wurde häufig eine Multimerisierung beobachtet, aber der Einbau von falschen Basen oder Insertionen bzw. Deletionen durch „Mispriming“ trat selten auf. Letztendlich hat sich die Strategie bewährt, einzelne Bereich des *gag*-Gens zu klonieren und erst auf Fehler hin zu analysieren. Es konnte mit verschiedenen Bereichen weitergearbeitet werden, während andere Bereich sequenziert bzw. schon korrigiert wurden. Dadurch konnten bei der endgültigen Zusammenführung der Fragmente diese so gewählt werden, daß die Fehler in relativer Nachbarschaft zu einander lagen. Durch diese Anordnung konnte im endgültigen Konstrukt mit nur zwei Mutagenese-PCR die Fehler korrigiert werden und die vorgegebene Codon-optimierte Sequenz erreicht werden.

Die *in vitro*-Testung der Codon-optimierten Konstrukte versus der unmodifizierten Gene zeigte die erwarteten Ergebnisse. Im Western-Blot ist bei den *tat*-Konstrukten kein signifikanter Unterschied in der Expressionsstärke zu sehen. Obwohl sich die *tat*-Original-Basensequenz in ihrem prozentualen Anteil der zu verändernden Basen nicht

unverhältnismäßig von dem Wert für *gag* unterscheidet, wirkt sich die Codon-Optimierung nicht dermaßen aus. In *tat* sind keine inhibitorischen oder *cis*-aktiven Sequenzen bekannt, die durch die Codon-Optimierung eliminiert werden können, wie es bei *gag* der Fall ist. Wie schon beschrieben wurde (Deml *et al.*, 2001; Kotsopoulou *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000) unterliegt während der viralen Replikation die Expression von *gag* der Kontrolle durch Rev, durch die Codon-Optimierung kann die Expression unabhängig von der Anwesenheit von Rev erfolgen. Bei anderen Genen wie *tat*, die nicht solche regulatorisch wirkende Motive in der Basensequenz tragen, reicht der im pTH vorhandene starke CMV-Promoter aus, um eine effiziente Expression zu erhalten. Bei *gag* ist eine deutliche Steigerung der Expression zu beobachten. Bei der Konstruktion von Expressionsvektoren sorgt die Codon-Optimierung von *gag* und *env*, für die solche inhibitorischen Sequenzen beschrieben sind, für eine starke, Promoter-abhängige Expression in Säugetier-Zellen. Bei ohnehin stark exprimierten Genen ist die Codon-Optimierung für den *in vitro* und *in vivo* Einsatz nicht unbedingt nötig. Um *in vivo* eine Präsentation von Peptiden körperfremder Proteine zu erreichen, genügt wahrscheinlich eine basale Expression dieser Proteine in den Körperzellen. Das heißt, es bleibt zu klären, ob mit dem Codon-optimierte *tat*-Konstrukt eine bessere Immunisierung erreicht wird als mit dem Wildtyp-Gen in demselben Vektor. Die Codon-Optimierung bietet in jeden Fall den Vorteil, daß alle Gene unabhängig ihrer ursprünglichen Regulationsmechanismen stark exprimiert werden, es wurden noch keine kontraproduktiven Effekte in der Verwendung von Codon-optimierten Genen in DNA-Vakzinen berichtet.

Die Verwendung von DNA-Vakzinen etabliert sich immer mehr in der Forschung nach einem HIV-Impfstoff, obwohl auch bei anderen Krankheiten wie Malaria und Pocken sich die Bemühungen auf ähnliche Ansätze fokussieren. In Verbindung mit unterschiedlichen Boost-Immunisierungen haben DNA-Vakzinierungen im SIV/Rhesusaffen-Modell starke zelluläre Immunantworten auslösen können. In Bezug auf einen ungefährlichen, protektiven Impfstoff ist mit der Konstruktion von kompletten Codon-optimierten HIV-Genen in effizienten Immunisierungsvektoren ein sehr variabel kombinierbarer Weg zur Immunisierung entwickelt worden.

Es sind schon mehrere verschiedene Gene, mit und ohne Codon-Optimierung in unterschiedlichen Vektoren in Immunisierungsstudien eingesetzt worden. Problematisch ist jedoch, daß jede dieser Studien bislang nur für Gene aus jeweils einem HIV-1 Subtyp stammend durchgeführt worden sind. Bisher wird davon ausgegangen, daß die beste Strategie zu einem Impfstoff ist, eine wirksame, massive zelluläre Immunantwort gegen genau die Epitope auszulösen, die auch das möglicherweise infizierende Virus besitzt. Das heißt, nach

vorherrschender Meinung sind die Prime-Boost Systeme, die Gene von nur einem HIV-Stamm verwenden nicht universell einsetzbar. Ein Großteil der HIV-Impfstoff-Forschung wird in USA oder Europa durchgeführt und benutzte auch deswegen lange Zeit die in diesen Gegenden vorherrschenden HIV-1 Stämme. Deswegen beruhen viele frühen Vakzinierungs-Experimente auf Subtyp B Genomen bzw. dessen Proteine. Diese Immunisierungskonstrukte sind nicht in Gegenden einsetzbar, in denen die Gefahr einer Infektion mit einem anderen HIV-1 Subtyp sehr viel höher ist, wie z.B. Subtyp A prävalent ist in einigen afrikanischen Staaten. Es gibt jedoch auch Studien, die sich mit einer Vakzine spezifisch für einige afrikanische Länder befassen, unter anderem wird von der Arbeitsgruppe um A. McMichael an der Entwicklung eines DNA-Prime/MVA-Boost Impfstoffes für Kenia gearbeitet (Hanke *et al.*, 2002a). In diesem Ansatz werden neben dem Gag-Protein auch weitere, von Subtyp A abstammende CTL-Epitope als HIV-Antigene eingesetzt. Besonders das Auftreten der Mosaikgenome bzw. nach neuerer Nomenklatur der CRFs („Circulating Rekombinant Forms“) erschwert die Übertragbarkeit von den bisher entwickelten Impfstoffkandidaten. Der oben beschriebene Impfstoff gegen Subtyp A versagt unter Umständen bei einer Infektion durch eine A/G-rekombinante Form (CRF02_AG), da diese in vielleicht für die zelluläre Immunantwort wichtigen Bereichen von *pol*, *env*, *tat* oder *nef* Subtyp B abstammende Epitope trägt. In dieser Arbeit wurde gezielt ein Immunisierungskonstrukt hergestellt, das auf den tatsächlich in Nigeria verbreiteten HIV-1 Isolaten basiert. Um bei Erfolg der im Test befindlichen Prime-Boost Verfahren auch überregional Menschen schützen zu können, sollten für CRF-spezifische Impfstoffkandidaten in Kombination mit den anderen in der Entwicklung befindlichen Subtyp-spezifischen Impfstoffen angewandt werden.