

5 Zusammenfassung

Trotz weltweiter Bemühungen ist es bisher noch nicht möglich gewesen, einen Impfstoff gegen HIV zu entwickeln. Die Infektion mit HIV und die daraus resultierende Krankheit AIDS ist weiterhin eine tödliche Bedrohung in vielen Staaten der Erde; selbst in den Gebieten, in denen die AIDS-Therapie durch eine gute medizinische Infrastruktur möglich ist müssen die Betroffenen immer noch viele soziale und gesundheitliche Mißstände akzeptieren. Die konventionellen Techniken der Impfstoffentwicklung zeigten sich gegen diesen retroviralen Erreger als nicht funktionell oder zu risikoreich, da sich in Langzeit-Studien die eingesetzten Impfstoffkandidaten als Krankheits-induzierend erwiesen. Seit Beginn der HIV-Forschung wird nach einem „Ideal“-Impfstoff gesucht, welcher eine sterile Immunität erzeugt, also das Immunsystem dermaßen aktiviert, daß es zu keiner Infektion kommt. Da jedoch bisher sämtliche Versuche und Studien fehlschlagen oder nicht zu reproduzieren waren, wird von vielen Arbeitsgruppen an einem protektiven Impfstoff geforscht. Dieser kann keine Infektion verhindern, soll aber zumindest im Patienten das Immunsystem so stimulieren, daß die Viruslast im Körper gering gehalten wird ohne die tägliche Einnahme von Medikamenten. Damit würde dem Patienten selbst geholfen, als auch vielleicht die Verbreitung des Virus verlangsamt werden. Modernere experimentelle Ansätze sehen den Einsatz gentechnischer Methoden vor, um auf unterschiedliche Arten massive humorale und zelluläre Immunantworten gegen bestimmte HIV-Proteine zu erzeugen.

Die beiden Projekte dieser Arbeit sind sich thematisch einzuordnen in die Entwicklung von gentechnischen Impfstoffen gegen HIV. Zur Aufklärung der Wirkungsweise von molekularbiologisch erzeugten SIV-Deletionsmutanten sind zwei unterschiedliche Deletionen im *nef*-Gen eines RTSHIV-Molekularklons eingefügt worden. Weiterhin sind als Teil einer DNA-Vakzine zwei Codon-optimierte Gene, ausgehend von einem Molekularklon eines A/G-rekombinanten HIV-1 Primärisolats hergestellt und in einen Expressionsvektor eingefügt worden.

Das erste, im Paul-Ehrlich-Institut durchgeführte Projekt sollte die Grundlagen für ein Tierexperiment schaffen, mit dem die Mechanismen des durch Δ *nef*-SIV-Mutanten erzeugten, anfänglichen Schutzes vor Infektion in Rhesusaffen untersucht werden können. Ermöglicht wird dieser experimentelle Ansatz durch Einsatz eines SIV/HIV-Hybrid (SHIV) Genoms, der eine gegenüber bestimmten Inhibitoren sensitive, aus HIV stammende Reverse Transkriptase trägt. Diese in ein SIVmac239 eingefügt ergibt den Molekularklon RTSHIV. Durch Subklonierung des *nef*-Gens konnte mittels PCR-Techniken zwei Deletionsmutanten

hergestellt werden, die durch unterschiedlich große Deletionen auch verschiedene Replikationseffizienzen *in vivo* besitzen sollten. Die Δnef -RTSHIV Mutante trägt eine Deletion von 181 Basenpaaren im *nef*-Gen, was den gesamten Bereich des *nef*-Gens beinhaltet, der nicht mit *env* oder der 3'-LTR überlappt. Durch die resultierende Leserahmen-Verschiebung entsteht ein 62 Aminosäuren großes, trunkiertes Protein, welches die 58 N-terminalen Aminosäuren des Wildtyp-Nef und nur noch vier folgende, nicht dem ursprünglichen Nef entstammende Aminosäuren besitzt. Die sogenannte C8- Δnef -RTSHIV Mutante trägt eine Deletion von 12 Basenpaaren im *nef*-Gen, die keine Änderung des Leserahmen erzeugt. Es entsteht ein dem Wildtyp gegenüber um vier Aminosäuren deletiertes Nef-Protein von 259 Aminosäuren, es fehlen die Aminosäuren Nummer 143 bis 146. Es wurde für beide RTSHIV-Deletionsmutanten gezeigt, dass sich durch Transfektion der Moleklarklone infektiöse Viren erzeugen lassen. Das Vorhandensein der Deletionen sowie der HIV Reversen Transkriptase wurde durch Sequenzierung der proviralen Bereiche in infizierten C8166-Zellen und PBMC nachgewiesen. Die Sensitivität beider RTSHIV-Deletionsmutanten gegenüber dem Non-Nukleosid-Analoga Reverse Transkriptase Inhibitor (NNRTI) Nevirapine wurde *in vitro* nachgewiesen, für den Wildtyp-Virus als potentiell Belastungsvirus wurde die unbeeinträchtigte Replikation gezeigt. Weiterführend ist der Einsatz dieser Δnef -RTSHIV Konstrukte in einer Rhesusaffen-Studie geplant.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde am Robert Koch-Institut ein zweites Projekt durchgeführt, welches die Konstruktion einer Virusstamm-spezifischer DNA-Vakzine als Ziel hatte. In einer Arbeitsgruppe im RKI wurden Primärisolate von A/G rekombinanten HIV-1 Stämmen aus in dem afrikanischen Staat Nigeria charakterisiert, diese unterscheiden sich durch ihr Mosaikgenome von den intensiv untersuchten HIV-1 Subtyp B, welcher die größte Bedeutung für die Vakzine-Forschung in West-Europa hat. Ausgehend von Moleklarklonen zweier Isolate wurden die *tat*- und *gag*-Gene sequenziert und auf vorzeitige Stop-Codons und CTL-Epitope hin analysiert, unter Berücksichtigung der zu Verfügung stehenden Information über die Verbreitung bestimmter HLA-Allele in Nigeria. Diese Analyse wurde nur zur Auswahl eines bestimmten Isolates durchgeführt, da jedoch letztendlich im Immunisierungsvektor die kompletten Gene eingesetzt werden, sind sämtliche mögliche Epitope für alle vorkommende HLA-Typen enthalten. Ausgehend von einem Moleklarklon des Isolats 00_200 wurden die Wildtyp-Gene in einen zur Verfügung gestellten Expressions- oder Immunisierungsvektor kloniert, durch Sequenzierung verifiziert und auf Expression der Proteine in Zelllinien getestet. Um die Expression dieser Gene zu optimieren wurde das Verfahren der Codon-Optimierung eingesetzt, welches in der Arbeitsgruppe für zukünftige

Impfstoff-Entwicklungen etabliert werden sollte. Dabei wurde die Basensequenz beider Gene unter Berücksichtigung der humanen Codon-Verwendung neu geschrieben, es wurden inhibitorische Sequenzen in *gag* entfernt sowie in *tat* und in *gag* immunstimulatorische CpG-Motive eingefügt, ohne daß die Aminosäuresequenz der Proteine verändert wurde. Kurze, 40 oder 80 Basen lange Oligonukleotide wurden über verschiedene Methoden der PCR zu Konstrukten von 303 Basenpaaren für *tat* bzw. 1491 Basenpaaren für *gag* zusammen gesetzt und diese Codon-optimierten Gene des Isolats 00_200 in den Expressionsvektor eingefügt. Die Expressionsstärke der Wildtyp-Gene und der Codon-optimierten Gene von *tat* und *gag* wurde durch Western-Blot verglichen; bei den *gag* enthaltenen Vektoren wurde durch eine Kotransfektion mit GFP und einem p24-ELISA die um Faktor 800 stärkere Expression der Codon-optimierten Konstrukte nachgewiesen. Diese vier Vektoren können so in einem Mäuse-Experiment eingesetzt werden, um die Immunogenität der verschiedenen Konstrukte zu beurteilen, bei guten Ergebnissen dann weitergehen in Primaten um den erreichbaren Schutz zu ermitteln. Beispielhaft sind diese Vektoren ein Anfang für eine DNA-Vakzine, die für den in einer Region vorkommenden Virusstamm spezifiziert ist.