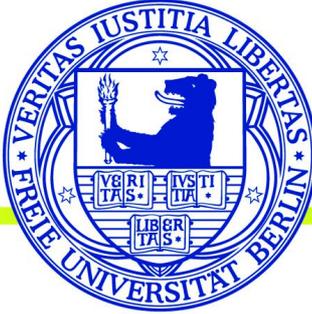


Freie Universität  Berlin

Analyse des Schutzmechanismus, induziert durch attenuierte simiane Immundefizienzviren

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Benjamin Gabriel
aus Frankfurt am Main
2014

DANKSAGUNG

Aus dem Robert Koch-Institut.

Angefertigt unter der Betreuung von PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin,
Februar 2011 bis Februar 2014

Erstgutachter: PD Dr. Norbert Bannert, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 16.10.2014

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Durchführung und Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Herrn PD Dr. Norbert Bannert danke ich für die Betreuung und Möglichkeit, dass ich diese Arbeit im Fachgebiet 18 des Robert Koch-Instituts durchführen konnte.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Stephen Norley sowie Dr. Uwe Fiebig, die diese Studie initiiert und entscheidend mitgeprägt haben. Ich danke beiden für die zahlreichen Ratschläge und Hilfestellungen während meiner Doktorandenzeit und ihr Vertrauen in meine Person.

Christiane Bug sowie Sandra Kühn danke ich für ihre Unterstützung besonders während der Anfangsphase meiner Doktorandenzeit. Ebenso danke ich Nicole Norley für ihre Unterstützung und Ratschläge im Laboralltag.

Bei Herrn Dr. Cheick Coulibaly und dem gesamten Team der Tierhaltung des Paul-Ehrlich-Instituts in Langen bedanke ich mich für die Betreuung der Versuchstiere sowie aller damit verbundenen Aufgaben. Herrn Dr. Michael Mühlebach, Dr. Roland Plesker und Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Unterstützung und Organisation seitens des Paul-Ehrlich-Instituts.

Dr. Stephanie Gurka, Dr. Anika Jäkel und Dr. Annabell Bachem danke ich für die vielen hilfreichen Hinweise bezüglich der FACS-Analysen.

Und letztendlich danke ich der gesamten Arbeitsgruppe des Fachgebiets 18, insbesondere Dr. Janna Seifried, Dr. Nicola Strasz, Dr. Veronika Lausch, Katharina Fiddeke, Dr. Oliver Hohn und Dr. Kirsten Hanke für die angenehme Atmosphäre, die vielen guten Ratschläge und wissenschaftlichen Diskussionen.

Inhalt

Danksagung.....	3
Inhalt.....	5
Abkürzungen.....	7
Einleitung.....	11
30 Jahre HIV: Von den ersten Fällen bis zur Identifizierung von HIV.....	11
Ursprung des HI-Virus.....	12
Vielfalt und Vorkommen der HI-Viren.....	14
Aufbau des HIV-Partikels.....	15
Der Replikationszyklus von HIV und seine Angriffspunkte während der antiretroviralen Therapie.....	16
Ablauf der Infektion mit HI-Viren: Ein Prozess in drei Abschnitten.....	24
Rhesusaffen und das simiane Immundefizienzvirus: ein Modell.....	30
Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I beim Rhesusaffen.....	31
Attenuierte SI- und HI-Viren.....	32
Ein Blick über attenuierte Viren hinaus: Bisherige Ansätze der HIV-Impfstoffentwicklung.....	36
Ziel der Arbeit.....	41
Material und Methoden.....	43
Zellen, Bakterien, Reagenzien und Geräte.....	43
Impf- und Belastungsvirus.....	47
Versuchtiere, Vakzinierung, antiretrovirale Therapie, Belastung sowie Probenentnahme.....	48
Bestimmungen des viralen Proteins p24.....	49
Bestimmung der Viruskonzentration in Plasmaproben.....	50
SIVmac239 bzw. RT-SHIV Δ nef spezifisches PCR Setup.....	50
Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen.....	51
Detektion von Provirus mittels Ko-Kultur.....	52
Herstellung von Zelllysaten für anschließende PCR-Analysen.....	53
Mamu-Typisierung.....	53
Detektion antiretroviraler Substanzen in Plasmaproben.....	55
Identifikation von Fluchtmutanten.....	56
Verstärkung der Infektion mittels Zentrifugation (Spinoculation).....	57
Antikörper ELISA.....	57
Aviditäts-ELISA.....	58
Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität.....	58
Detektion neutralisierender Antikörper.....	59

INHALT

Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Plasmaproben.....	60
Quantifizierung SIV-spezifischer CD8+ T-Zellen.....	61
IFN- γ ELISpot.....	61
Bestimmung der Antikörperspezifitäten.....	62
Ergebnisse.....	65
Mamu-Typisierung der Rhesusaffen.....	65
Immunisierungsphase: Infektion mit RT-SHIV Δ nef.....	66
Inhibition der viralen Replikation des RT-SHIV Δ nef Virus: Phase der antiretrovirale Therapie.....	74
Belastungsphase: Infektion mit SIVmac239.....	78
Ergebnisüberblick.....	94
Diskussion.....	97
Schlussfolgerung.....	109
Zusammenfassung.....	111
Summary.....	113
Literatur.....	115
Anhang.....	133
IFN- γ ELISpot Assay.....	133
Zytokindaten.....	134
Eigenständigkeitserklärung.....	137

Abkürzungen

6HB	sechsfaches Helixbündel (<i>six-helix-bundle</i>)
A700	Alexa Fluor 700
Ab	Antikörper
ACK	Erythrozytenlysepuffer bestehend aus Ammonium, Chlor und Kalium
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus sabaues</i>)
AID₁₀₀	<i>animal infectious dose, 100%</i>
AIDS	erworbenes Immun
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APOBEC3	<i>apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3</i>
APS	Ammoniumpersulfatlösung
ART	antiretrovirale Therapie
ARV	<i>AIDS-associated retrovirus</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BFA	Brefeldin A
BHQ1	<i>Black Hole Quencher-1</i>
bnAb	breit neutralisierende Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR5	Chemokinrezeptor 5
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC	'Centers of Disease Control'
cDNA	komplementäre DNA
CPRC	'California Primate Research Center'
CPSF6	<i>cleavage and polyadenylation specific factor 6</i>
CRF	zirkulierende, rekombinante Viren
Ct	<i>cycle threshold</i>
CTL	zytotoxische T-Zellen
CXCR4	Chemokinrezeptor 4
Cy7	Konjugate von Phycoerythrin
CypA	Cyclophilin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure

ABKÜRZUNGEN

dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
ELISpot	<i>enzyme-linked immunospot assay</i>
Env	Oberflächenprotein von HIV bzw. SIV
FACS	<i>fluorescent activated cell scan</i>
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluorescein
for	<i>forward</i> (vorwärts) Primer
Fv-1	<i>Friend virus susceptibility 1</i>
Gag	Gruppenspezifisches Antigen von HIV bzw. SIV
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GenTSV	Gentechnik-Sicherheitsverordnung
gp	Glykoprotein
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	Hochleistungsfüssigkeitschromatographie
HR	Heptadwiederholung
HR-C	C-terminale Heptadwiederholung
HR-N	N-terminale Heptadwiederholung
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HTLV	<i>human T cell leukemia virus</i>
i.v.	intravenös
IDU	<i>intravenous drug user</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobase
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i> (Bakterienmedium)
LTNP	<i>long-term non progressor</i>
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M-MuLV	Moloney Murines Leukämiavirus
mAb	monoklonaler Antikörper
mac	<i>Macaca mulata</i>

ABKÜRZUNGEN

MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MID50	<i>monkey infectious dose 50</i>
MSM	<i>men who have sex with men</i>
MTCT	<i>mother-to-child transmission</i>
NERPRC	'New England Regional Primate Research Center'
NHP	Nichtmenschenaffen (<i>non-human primate</i>)
NIH	'National Institute of Health'
NK (-Zellen)	natürliche Killerzellen (NK-Zellen)
Nup	Nukleopodin
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylenediamin Dihydrochlorid
p	Protein
p.i.	<i>post infection</i>
PacB	Pacific Blue
PacO	Pacific Orange
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepuffte Salzlösung
pc	<i>post-challenge</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycocerythrin
Pen	Penicillin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pi	<i>post-infection</i>
qPCR	quantitative PCR
rev	<i>reverse</i> (rückwärts) Primer
Rev	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
Rh	Rhesus(affe)
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
RM	Rhesusmakak/ Rhesusaffe (<i>Macaca mulatta</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	'Roswell Park Memorial Institute'
RPRC	'Regional Primate Research Center'
RRE	<i>Rev responsive element</i>

ABKÜRZUNGEN

RT	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RTC	Reverse-Transkription-Komplex
SA	Streptavidin
SBBC	Sydney Blutbank Kohorte ('Sydney bloodbank cohort')
SHIV	chimäres Virus, bestehend aus SIV und HIV Komponenten (Genen)
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
sm	Rußmangabe (<i>sooty mangabey</i>)
SM	Rußmangabe (<i>sooty mangabey</i>)
Strep	Streptomycin
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TAR	<i>trans-activation response element</i>
Tat	<i>trans-activator of transcription</i>
TCID50	<i>tissue culture infection dose 50</i>
Tcm	zentrale Gedächtnis-T-Zellen (<i>central memory T cells</i>)
TCR	T-Zell Rezeptor
Tem	Gedächtnis-Effektor-T-Zellen (<i>effector memory T cells</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Th	T-Helferzelle
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumornekrosefaktor
TNPO3	Transportin 3
Treg	regulatorische T-Zelle
TRIM5	<i>tripartite motif containing 5</i>
Ttm	Übergangs-Gedächtnis-T-Zellen (<i>transitional memory T cells</i>)
U	Einheiten (<i>units</i>)
URF	einzigartige, rekombinante Viren (<i>unique recombinant form</i>)
wpc	<i>weeks post-challenge</i>
wpi	<i>weeks post-infection</i>

1 Einleitung

1.1 30 Jahre HIV: Von den ersten Fällen bis zur Identifizierung von HIV

Im Juni und Juli 1981 wurde im amerikanischen 'Morbidity and Mortality Weekly Report' (MMWR) ein ungewöhnlich häufiges und untypisches Auftreten verschiedener Krankheiten wie zum Beispiel Lungenentzündungen, ausgelöst durch den Pilz *Pneumocystis carinii*, oder Karposi's Sarkomen festgestellt und beschrieben^{1,2}. Bei den veröffentlichten Fällen handelte es sich um fünf Männer im Alter zwischen 29 und 36 Jahren, bei denen zwischen Oktober 1980 und Mai 1981 eine *P. carinii* Pneumonie diagnostiziert wurde¹. Das ungewöhnliche an diesen Diagnosen: *P. carinii* Pneumonien treten normalerweise nur bei immunsupprimierten Personen auf und nicht, wie in diesen Fällen, bei zuvor gesunden Individuen. Auch die anschließend beschriebenen Fälle von Karposi's Sarkomen bei 26 bis 51-jährigen Patienten lagen deutlich über dem Jahresmittel und traten in einer eigentlich nicht von dieser Krankheit betroffenen Personengruppe auf².

In den folgenden zwei Jahren wurden weitere Beschreibungen und Beobachtungen von Erkrankungen in dafür untypischen Personengruppen publiziert. Hinweise auf Fehlfunktionen des zellulären Immunsystems manifestierten sich mit den ersten Untersuchungen zum Verhältnis von T-Helfer- zu Suppressorzellen³, und der Begriff des *acquired cellular immunodeficiency syndrome* (AIDS) tauchte zum ersten Mal auf⁴⁻⁶. Im März 1983 bezifferte die CDC die Anzahl der AIDS Erkrankungen auf 1.200 seit Beschreibung der ersten Fälle im Juni 1981⁷. Hauptsächlich betroffen waren seitdem die Gruppen der MSM (*men who have sex with men*) und IDUs (*intravenous drug users*). Aber auch bei Heterosexuellen⁸, Empfängern von Blutprodukten wie zum Beispiel Hämophilen⁹⁻¹¹ und auch Kindern bzw. Säuglingen^{11,12} traten, wenn auch mit einer deutlich niedrigeren Häufigkeit, AIDS-Fälle auf. Die Vielfalt der betroffenen Populationen deutete bereits früh auf das Vorhandensein eines infektiösen Agens hin.

Im Mai 1983 isolierte eine Forschergruppe aus Frankreich schließlich ein Virus aus einem Patienten mit Lymphadenopathie: das HI-Virus¹³, zum damaligen Zeitpunkt von den Franzosen noch als LAV (*lymphadenopathy-associated virus*) bezeichnet. Ein Zusammenhang zwischen diesem Virus und AIDS war jedoch noch nicht bestätigt. In den folgenden Monaten wurden weitere Publikationen bezüglich der Identifikation eines neuen Virus in Patienten mit und ohne AIDS Symptomatik veröffentlicht¹⁴⁻¹⁹. Der Nachweis, dass das neu entdeckte Virus tatsächlich die Ursache für die gehäuft auftretenden Immundefizienzen war, wurde durch die erfolgreiche Kultivierung des Virus in Zellkultur möglich und folgte rund ein Jahr später^{15,20-22}.

Im Jahr 1985 gelang es mit Hilfe von Sequenzanalysen das bis dahin unter dem Namen HTLV-III bzw. LAV oder ARV bezeichnete Virus der Gruppe der Lentiviren zuzuordnen²³⁻²⁶. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass das Virusisolat der Amerikaner (HTLV-III) mit dem Isolat der Franzosen (LAV) identisch war. Diese Beobachtung bestätigte sich später und führte zur Schlussfolgerung, dass es sich beim HTLV-III um eine LAV Kontamination handelte^{25,27-29}. Die vorherige Hypothese, dass der AIDS Erreger ein Virus aus der Familie der humanen

T-Zell Leukämieviren sein könnte, wurde ebenfalls widerlegt²⁵. 1986 erhielt das HI-Virus schließlich seinen Namen: humanes Immundefizienzvirus, kurz HIV³⁰.

1.2 Ursprung des HI-Virus

Das plötzliche Aufkommen des AIDS-Erregers, dessen ungewöhnliche Pathogenese sowie seine epidemiologische Ausbreitung führten nach seiner Identifizierung 1983 zur intensiven Suche nach dessen Ursprung. Die ersten Publikationen, die die Aufmerksamkeit bei der Suche nach der Herkunft des HI-Virus auf den afrikanischen Kontinent lenkten, wurden 1983 und 1984 veröffentlicht^{31–35}. Bereits vor der Publikation von Barré-Sinoussi¹³ deuteten frühe Krankheitsfälle, bei denen die Symptome den von der CDC festgelegten AIDS-Kriterien entsprachen³⁶, auf HIV-Infektionen in Zaire, der heutigen Demokratischen Republik Kongo, hin^{31,37–39}. Gleichzeitig kam es zur Beobachtung AIDS-ähnlicher Symptome bei in Gefangenschaft lebender Altweltaffen.

Henrickson und Kollegen berichteten im Februar 1983 von einer Gruppe von insgesamt 64 Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) des 'California Primate Research Center (CPRC)' mit AIDS-ähnlichen Symptomen⁴⁰. Lediglich drei Monate später erschien die im Mai 1983 veröffentlichte Untersuchung von Letvin *et al.*, welche ebenfalls AIDS-ähnliche Symptome in Altweltaffen der Gattung *Macaca* (*Macaca cyclopis*), gehalten im 'New England Regional Primate Research Center (NERPRC)', zeigte⁴¹. Die Charakterisierung der Viren, isoliert aus den Rhesusaffen des NERPRC, gelang zwei Jahre später^{42–44}. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass es sich bei dem neu entdeckten Virus nicht um ein Typ D Retrovirus handelte, welche in den vorherigen Jahren in verschiedenen Altweltaffen identifiziert worden waren^{45–49}, sondern um ein dem HIV-1 ähnliches Virus. Neben Rhesusaffen konnte das Virus auch in anderen Genera der Familie der *Cercopithecidae* detektiert werden, wie zum Beispiel in Afrikanischen Grünen Meerkatzen (*Chlorocebus aethiops*)^{50,51}, Schweinsaffen (*M. nemestrina*)⁵² oder Rußmangaben (*Cercocebus atys*)⁵³. Interessanter Weise führte die Infektion in Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGMs) oder Rußmangaben (*sooty mangabey*, SM) zu keinerlei Krankheitssymptomen, während in Rhesusmakaken (RM) die typischen AIDS-Symptome (Immundefizienz) zu beobachten waren⁵⁰. Ebenfalls interessant war die Tatsache, dass einige humane Serumproben aus Afrika besser SIV-Proteine detektierten als HIV-Proteine⁵⁴. Hieraus lies sich in erster Instanz schließen, dass sich diese Patienten mit einem HI-Virus infizierten, welches SIV ähnlicher war als HIV-1. Kurze Zeit später tauchten in der Literatur neue, dieses Virus benennende Bezeichnungen auf: LAV-II⁵⁵ und HTLV-IV⁵⁶. Entsprechend der 1986 eingeführten Taxonomie des AIDS-Erregers³⁰ wurde für diese Viren später die Bezeichnung HIV-2 verwendet.

Heute weiß man, dass das HIV-2 vom SI-Virus des Rußmangaben (SIV_{sm}) abgeleitet ist^{57–61}. Gleiches gilt für das SI-Virus des Rhesusaffen (SIV_{mac}), welches eine Übertragung über die Artengrenze von Rußmangaben auf Rhesusaffen darstellt^{57,62,63}.

Nachdem 1989 das erste SI-Virus aus Schimpansen isoliert wurde (SIV_{cpz}) konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um ein Virus handelt welches HIV-1 ähnlicher ist als HIV-2⁶⁴. Erste Analysen zeigten jedoch, dass sich die beiden Viren trotzdem deutlich voneinander unterschieden. Eine direkte Übertragung des SIV vom

Schimpanzen auf den Menschen, in welchem sich daraufhin das SI-Virus zum HIV-1 Virus entwickeln konnte, wurde aus diesem Grund zunächst ausgeschlossen⁶⁵.

Mit der Isolation weiterer Schimpansen-SIVs wurde jedoch deutlich, dass das Virus bzw. dessen Verbreitung eine Besonderheit aufweist, welche eng mit dem Vorkommen von Schimpansen verknüpft ist. Die Gattung Schimpanse (*Pan*) teilt sich in zwei Spezies auf, den Gemeinen Schimpansen (*Pan troglodytes*) und den Bonobo (*Pan paniscus*). Die Spezies *Pan troglodytes* lässt sich wiederum, basierend auf ihrem geografischen Vorkommen, in insgesamt vier Subspezies unterteilen: den Westafrikanischen Schimpansen (*P. t. verus*), den Nigerianisch-Kamerunschen Schimpansen (*P. t. vellerosus* oder *elliotti*), den Zentralafrikanischen Schimpansen (*P. t. troglodytes*) und den Ostafrikanischen Schimpansen (*P. t. schweinfurthii*). Vom SI-Virus betroffen sind lediglich der Zentral- und Ostafrikanische Schimpanse^{64,66-72}. Eine weitere Besonderheit der SI-Viren der Schimpansen (SIV_{cpzPtt} und SIV_{cpzPts}) ist deren genetischer Kode bzw. dessen Zusammensetzung. Während ein Teil des Genoms starke Ähnlichkeit mit dem Genom des SIV_{rcm} (Rotkopfmangabe, *Cercocebus torquatus*) aufweist, stimmt ein anderer Genomteil zu großen Teilen mit dem Genom des SIV_{gsn} (Große Weißnasenmeerkatze, *Cercopithecus nictitans*) überein⁷³. Die heute gültige Theorie geht davon aus, dass SIV_{cpz} durch die Übertragung von SIV_{rcm} und SIV_{gsn} auf den Schimpansen entstanden ist, und zwar nach dessen Auftrennung in den Westafrikanischen und Nigerianischen Schimpansen, jedoch vor der Aufteilung in den Zentral- und Ostafrikanischen Schimpansen^{68,72,74,75}. Dies erklärt die beiden unterschiedlichen SIV_{cpz} Varianten in Zentral- und Ostafrikanischen (SIV_{cpzPtt} bzw. SIV_{cpzPts}) sowie das Fehlen jeglicher SI-Viren bei Westafrikanischen und Nigerianischen Schimpansen.

Es gilt heute als erwiesen, dass HIV-1 durch eine Übertragung des SIV_{cpzPtt} vom Schimpansen auf den Menschen entstanden ist. Bestätigt wird diese Erkenntnis unter anderem durch phylogenetische Analysen, bei denen SIV_{cpzPtt} und HIV-1 eine monophyletische Gruppe bilden (Abbildung 1)⁷⁶. Die ersten Zoonosen von SIV_{cpzPtt} datiert man heute in die Zeit zwischen 1910 bis 1930^{77,78}. Als Ursprungsort dieser ersten Übertragungen vom Zentralafrikanischen Schimpansen auf den Menschen gilt Leopoldville, die heutige Stadt Kinshasa⁷⁸⁻⁸⁰. Dort lassen sich alle für die Pandemie verantwortlichen HIV-1 Subtypen finden⁷⁹. Auch die frühen HIV-1 Isolate stammen aus dieser Region^{78,80}. Bei der Übertragung selbst geht man davon aus, dass sich der Mensch über den Verzehr bzw. die Zubereitung von Schimpansenfleisch oder bei der Haltung von Schimpansen als Haustiere mit dem Erreger infizierte^{81,82}. Die Ausbreitung des Virus, zunächst innerhalb des Afrikanischen Kontinents und anschließend in die westliche Welt, vollzog sich dann im Zuge der Urbanisierung. Für

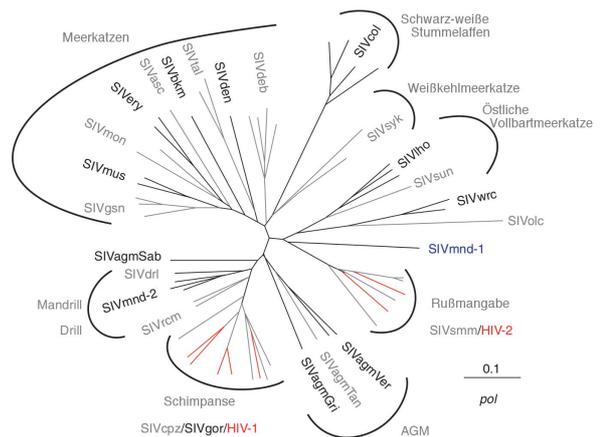


Abbildung 1. Phylogenetischer Stammbaum. Verändert nach Klatt *et al.* (2012)⁵⁷⁶.

eine Übertragung des SI-Virus Ostafrikanischer Schimpansen (SIV_{cpzPts}) auf den Menschen gibt es bis heute keinerlei Hinweise^{76,82}.

1.3 Vielfalt und Vorkommen der HI-Viren

Genetische Analysen zirkulierender HI-Viren zeigen, dass nicht nur ein HI-Virus existiert. Zum heutigen Zeitpunkt lassen sich die isolierten und sequenzierten HIV-1 Viren in insgesamt vier Gruppen unterteilen: M, N, O und P. Hierbei stellt jede der vier Gruppen mindestens eine Übertragung über die Artengrenze vom Affen (Schimpanse, im Falle von HIV-1 M, N und O, und Gorilla, im Falle von HIV-1 P) auf den Menschen dar (Abbildung 2). Bei der Gruppe M von HIV-1 handelt es sich um das Virus der weltweiten HIV Pandemie, welches seinen Ausgangspunkt in Leopoldville (heutiges Kinshasa, Demokratische Republik Kongo) hat⁷⁸⁻⁸⁰. Die Gruppen N, O und P sind bis heute hauptsächlich auf den Afrikanischen Kontinent (Kamerun sowie Gabon und angrenzende Gebiete) beschränkt.

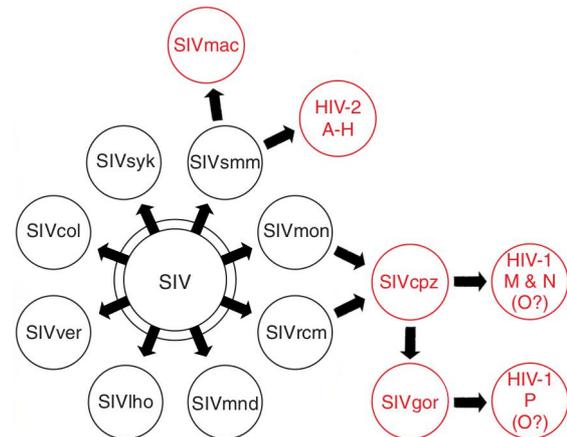


Abbildung 2. Ursprung der HI-Viren. Die Abkürzungen repräsentieren die jeweiligen Spezies, in welchen das Virus zirkuliert (siehe Abkürzungen). In rot sind Übertragungen über die Artengrenze gekennzeichnet. Abbildung verändert nach Sharp *et al.* 2011¹⁰¹.

Das HI-Virus der Gruppe O wurde erstmals 1990 identifiziert. Es zirkuliert seit ca. 1920 hauptsächlich in der Bevölkerung Kameruns, mit einem Anteil von ca. 1% an allen dort vorkommenden HIV-Infektionen⁸³⁻⁸⁵. Infektionen mit HIV-1 O, welche außerhalb Kameruns diagnostiziert wurden, sind alle auf Infektionen innerhalb Kameruns zurückzuführen⁸⁶. Das gleichzeitige Vorkommen von HIV-1 M und HIV-1 O in Kamerun führt dazu, dass rekombinante HIV-1 M/O Viren existieren und bei einigen Patienten nachweisbar sind⁸⁷⁻⁹⁰.

In die 1960er Jahre datiert man die Entstehung des HI-Virus der Gruppe N, für das bis heute weniger als 20 Infektionen nachgewiesen sind⁸⁵. Auch diese Infektionen sind hauptsächlich auf Kamerun beschränkt^{86,91}.

Das HI-Virus der Gruppe P wurde 2009 aus einem Patienten isoliert⁹² und ist bis heute in lediglich zwei Patienten nachgewiesen. Aus diesem Grund sind Datierungen bezüglich des ersten Auftretens dieses Virusstammes schwierig^{93,94}.

Während die Viren der Gruppen N, O und P aufgrund der geringen Verbreitung sowie Prävalenz und der damit einhergehenden geringen genetischen Diversität nicht weiter unterteilt werden, findet man beim HI-Virus der Gruppe M weitere Unterteilungsebenen: Subtypen (auch *clades* genannt), Subsubtypen sowie zirkulierende und einzigartige rekombinante Viren (*circulating recombinant forms*, CRE, bzw. *unique recombinant forms*, URF)⁹⁵. Zum heutigen Zeitpunkt unterscheidet man neun Subtypen (A bis D, F bis H, J und K) und insgesamt sechs unterschiedliche Subsubtypen in zwei der neun Subtypen (A1 bis A4, F1 und F2)⁹⁶. Die genetische Variabilität liegt

innerhalb der Subtypen bei 8 bis 17%, zwischen den Subtypen bei circa 17 bis 35%⁹⁷. Während die unterschiedlichen HIV-1 Gruppen unterschiedliche Transmissionsereignisse darstellen, geht die Entwicklung der unterschiedlichen Sub-, Subsubtypen und rekombinanten Viren auf die Verbreitung und Evolution der Viren im Menschen zurück. Bei den rekombinanten Virusformen kommen Rekombinationsereignisse hinzu, die durch Doppelbeziehungweise Superinfektionen zustande kommen können. Den größten Anteil an weltweiten HIV-Infektionen besitzen HI-Viren des Subtyps C mit circa 48%, gefolgt vom Subtyp A (12%), B (11%), CRF02_AG (8%), CRF01_AE (ehemals Subtyp E, 5%), G (5%) und D (2%). Einzigartige, rekombinante Viren (URFs) sowie alle restlichen CRFs (ohne CRF02_AG und CRF01_AE) besitzen jeweils einen Anteil von 4%. Auf die Subtypen F, H, J und K entfallen insgesamt weniger als 1% der weltweiten HIV-1 M Infektionen⁹⁷.

Auch beim HI-Virus des Typs 2 lassen sich Gruppen und CRFs unterscheiden. Bedingt durch mindestens neun unabhängige Transmissionsereignisse von Rußmangaben auf den Menschen unterscheidet man acht HIV-2 Gruppen: A bis H sowie ein rekombinantes Virus CRF_01AB⁹⁸⁻¹⁰⁰. HIV-2 A und B Viren finden sich verteilt über das gesamte Gebiet Westafrikas. Viren aller anderen Gruppen wurden bisher nur in ein bis zwei Patienten nachgewiesen, und dies lediglich an Orten, an denen auch die jeweiligen natürlichen Wirte vorkommen¹⁰¹⁻¹⁰³. Die Vermutung liegt aus diesem Grund nahe, dass es sich bei diesen Viren um sogenannte *dead-end*-Infektionen handelt, also Infektionen, die nicht erfolgreich im Wirt replizieren und von diesem übertragen werden können.

An der Gesamtheit aller vorkommenden HIV-2 Infektionen besitzt die Gruppe A den größten Anteil. In Bereichen der Elfenbeinküste und Ghana kolokalisieren HIV-2 A und B Infektionen, wobei Viren der Gruppe B eine geringere Pathogenität als Viren der Gruppe A besitzen¹⁰⁴. Insgesamt beobachtet man ein Abfallen der HIV-2 Prävalenz in Westafrika und eine Zunahme der HIV-1 Infektionen¹⁰⁵. Doppelinfektionen mit HIV-2 und HIV-1 wurden in Patienten zwar bereits beschrieben, Rekombinationen zwischen beiden Virustypen konnten bisher jedoch nicht nachgewiesen werden.

1.4 Aufbau des HIV-Partikels

Die ersten elektronenmikroskopischen Abbildungen von HIV wurden 1983/84 veröffentlicht^{13,106-109} und in den darauf folgenden Jahren wurden zahlreiche Erkenntnisse bezüglich Aufbau und Struktur des circa 100 nm großen Viruspartikels gewonnen. Heute weiß man, dass sich ein HIV-Partikel aus insgesamt neun unterschiedlichen viralen Proteinen, dem RNA Genom sowie der Hüllmembran zusammensetzt (Abbildung 3). Hierbei ist das virale Genom, welches in Form zweier identischer RNA-Einzelstränge im Partikel vorliegt, mit dem viruskodierten Nukleokapsidprotein (NC, p7) komplexiert. Geschützt wird dieser Komplex durch das sogenannte Kapsid, einer Schale bestehend aus Kapsidproteinen (CA, p24) mit konischer Form. Diese Kapsidstruktur ist wiederum von einer Hüllmembran umgeben. Sie entstammt der Wirtszelle und geht aus der Zytoplasmamembran hervor. Auf der Innenseite der Membran angelagert sind die Matrixproteine (MA, p17). Sie sind über ihre N-terminalen Myristinsäurereste mit der Hüllmembran verbunden. In die Membran eingelagert ist das transmembrane Oberflächenprotein von HIV (TM, gp41). Circa 21 bis 42 dieser Proteine lassen sich auf einem fertigen HIV-Par-

tikel finden^{110,111}. Auf einem SIV-Partikel ist die Konzentration an gp41 um bis zu zehnfach erhöht¹¹¹. Mit den außenstehenden N-terminalen Enden der TM-Proteine nicht-kovalent verbunden ist das Oberflächenproteine von HIV: gp120 (SU). Jeweils ein TM-Protein ist mit einem SU-Protein assoziiert. Funktional aktiv sind diese Proteine jedoch nur als Trimere. In dieser Form stellen sie den Oberflächenrezeptor von HIV dar, welcher für die Virus-Zell-Bindung sowie die Absorption des Virus verantwortlich ist. Eine Verbindung zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran wird mit Hilfe des sogenannten Link-Proteins (LI, p6) hergestellt, welches sich zwischen Kapsid und Hüllmembran befindet. Weitere Bestandteile des Viruspartikels sind insgesamt drei durch das Virusgenom kodierte Enzyme: eine Protease (PR, p9), eine Reverse Transkriptase (RT, p66/51) und eine Integrase (IN, p32). Alle drei Enzyme sind innerhalb des Kapsids lokalisiert.

1.5 Der Replikationszyklus von HIV und seine Angriffspunkte während der antiretroviralen Therapie

Der Lebenszyklus der HI- und SI-Viren lässt sich in verschiedene Schritte unterteilen und beginnt, wie jeder virale Zyklus, mit der Adsorption der Viruspartikel an susceptible Wirtszellen. Die Penetration des Virus geschieht pH-unabhängig mit Hilfe eines Fusionsproteins, wodurch das virale Kapsid in die Zielzelle entlassen wird (Abschnitt 1.5.1). Im Zytoplasma der Zelle löst sich das Kapsid auf und der Prozess der viralen Transkription beginnt, bei dem das virale Genom, welches in Form zweier einzelsträngiger (+)-RNA-Moleküle vorliegt, in

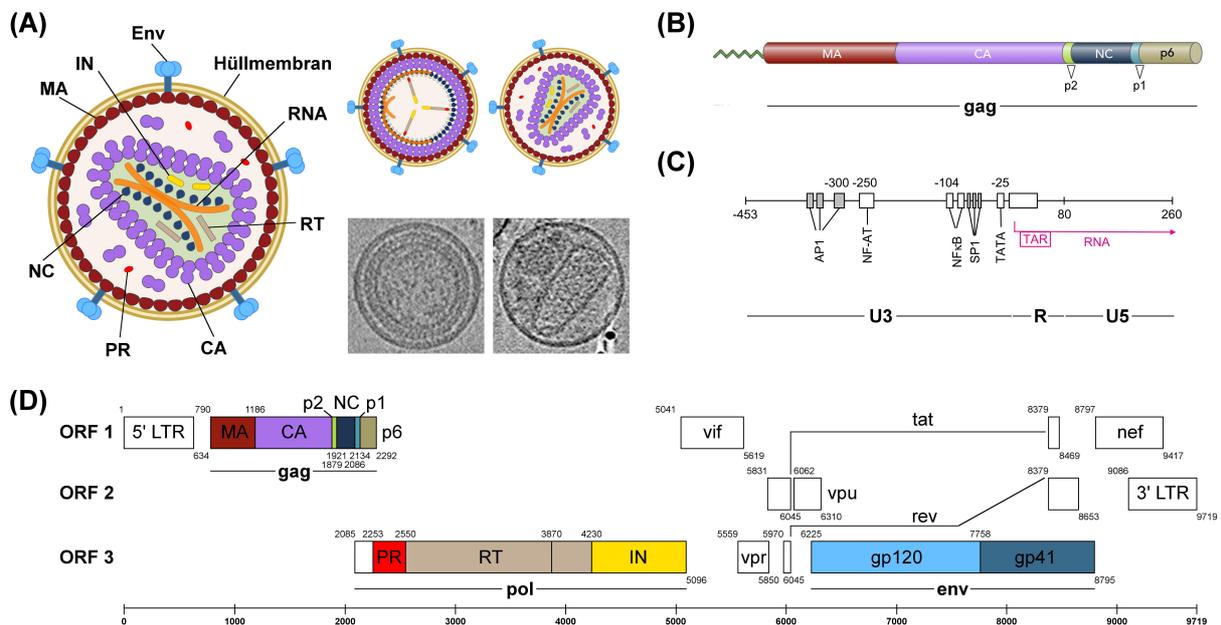


Abbildung 3. Morphologie des HIV Partikels und Aufbau des viralen RNA-Genoms. (A) Schematischer Aufbau eines HIV Partikels sowie Darstellung der unreifen und reifen Viruspartikel inklusive dazugehöriger Kryo-EM Tomographien. (B) Darstellung des linearen Gag Polypeptids. (C) Provirale 5'-LTR Region. (D) HIV-Genom. Dargestellt sind die drei offenen Leserahmen (ORF1 bis 3) des HIV-1 HXB2 Genoms und die darin kodierten Proteine. Die Farbkodierung ist bei allen Teilabbildungen einheitlich. Verändert nach Ganser-Pornillos (2008), Balasubramaniam (2011)^{232,581}, der HIV Datenbank des Los Alamos National Laboratory⁵⁷⁹ und Modrow (2010)⁵⁸².

doppelsträngige DNA umgeschrieben wird (Abschnitt 1.5.2). Anschließend werden die DNA-Moleküle in den Zellkern transportiert, wo sie in das Genom der Wirtszelle integrieren (Abschnitt 1.5.3). Die Synthese viraler Proteine geschieht als Teil des Wirtsgenoms mit Hilfe des zellulären Transkriptions- und Translationsapparates (Abschnitt 1.5.4). Die im Zytoplasma synthetisierten viralen Proteine bilden im Anschluss die neuen viralen Partikel, die sich zusammen mit dem viralen Genom an der Zellmembran zusammensetzen (Abschnitt 1.5.5). Der letzte Schritt des viralen Lebenszyklus, die Virusreifung, vollzieht sich dann als von der Wirtszelle freigesetztes Partikel (Abschnitt 1.5.5).

Dieser Abschnitt soll einen Überblick über die einzelnen Stufen der Replikation geben. Am Ende jedes Abschnitts sind zusätzlich verschiedene antiretrovirale Therapeutika beispielhaft erwähnt, die innerhalb der entsprechenden Replikationsphase wirken.

1.5.1 Bindung und Fusion

Der erste Schritt des HI-Virus bei der Infektion ist seine Bindung an eine entsprechende Zielzelle. Hierbei kann die initiale Bindung durch unterschiedliche Moleküle, sowohl auf dem Viruspartikel als auch auf der Zielzelle, vermittelt werden. Diese Möglichkeit ergibt sich, da die Hüllmembran des Virus von der Zytoplasmamembran der Zelle abgeleitet ist, aus welcher das Virus freigesetzt wurde. Die Hüllmembran enthält somit Oberflächenmoleküle des Wirtes, die eine Bindung an die zukünftige Zielzelle vermitteln können^{112–115}.

Nach dieser initialen Bindung von Viruspartikel und Zielzelle kommt es zur Ausbildung der Adsorptions-vermittelnden Bindung zwischen dem Oberflächenprotein des Virus (Env) sowie den Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle, CD4 und CCR5 bzw. CXCR4. CD4 repräsentiert hierbei den Rezeptor von Env^{116,117}, die Oberflächenmoleküle CCR5 und CXCR4 stellen Korezeptoren dar. Während die initialen Bindungen optional sind, ist die Bindung an Rezeptor und Korezeptor für die Infektion obligatorisch.

Die Bindung zwischen dem viralen Oberflächenprotein Env und dem zellulären Oberflächenmolekül CD4 wird auf viraler Seite durch die sogenannte CD4 *binding site* (CD4bs) innerhalb des gp120 vermittelt¹¹⁸. Gp120 liegt stark glykosyliert vor und besteht aus insgesamt fünf konservierten und fünf zum Großteil auf der Außenseite des Proteins exponierten, loopförmigen variablen Domänen (C1 bis C5 bzw. V1 bis V5). Die Bindung von gp120 an CD4 führt zu Konformationsänderungen innerhalb der variablen Anteile V1, V2 und V3 und zur Ausbildung von β -Faltblatt Strukturen innerhalb des gp120^{118,119}.

Nachdem die CD4 Bindestelle im gp120 erfolgreich an CD4 gebunden hat und die ersten Konformationsänderungen eingetreten sind, kommt es zur Bindung des Korezeptors. Wie bereits erwähnt kann dieser zum einen der Chemokinrezeptor 5 (CCR5) oder der Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) sein. Je nach Korezeptorverwendung unterscheidet man CCR5 und CXCR4 Viren, die abgekürzt R5 und X4 genannt werden. Zusätzlich existieren auch Viren, die beide Korezeptoren binden können und entsprechend als R5X4 Viren bezeichnet werden¹²⁰. Bei der Übertragung des HI-Virus spielen hauptsächlich R5 und R5X4 Viren eine Rolle¹²¹. Übertragungen von X4 Viren finden sich äußerst selten.

Die Bindung des Korezeptors führt zu weiteren Konformationsänderung, diesmal jedoch im membranständigen gp41-Proteinanteil des Env. Diese Konformationsänderungen exponieren hydrophobe Bereiche des gp41, das sogenannte Fusionspeptid, welches am N-Terminus von gp41 liegt und daraufhin in die Zellmembran integrieren kann. Anschließend kommt es zur Faltung des gp41-Proteins an einer Gelenkregion (*hinge region*), die das Protein mittig in eine N-terminale und eine C-terminale Hälfte teilt. Innerhalb jeder dieser beiden Hälften liegen außerdem, durch Wiederholungen eines Motifs bestehend aus sieben Aminosäuren (*heptad repeat*) entstandene, helikale Strukturen (HR-N und HR-C). Durch die Faltung des gp41 innerhalb der Gelenkregion ist es den α -Helices der gp41-Proteine eines Env-Heterotrimers möglich, sich zusammenzulagern und Bündel bestehend aus sechs α -Helices zu bilden (6HB)¹²². Diese Zusammenlagerung innerhalb des gp41 führt dazu, dass sich die Hüllmembran des Viruspartikels und die Membran der Zelle nähern und eine Fusionspore ausbilden, durch welche das Kapsid ins Innere der Zelle gelangt¹²³.

Der erste Schritt der Infektion (Bindung und Fusion) kann durch Bindungsinhibitoren, Chemokinrezeptorantagonisten oder Fusionsinhibitoren verhindert werden.

Alle drei Gruppen antiretroviral-wirkender Moleküle verhindern die Bindung bzw. Fusion von HIV mit der Zielzelle durch sterische Hinderung oder Konformationänderungen in Proteinen, die für die Bindung oder Fusion essentiell sind (vornehmlich CD4, gp120 und gp41).

Zu den Bindungsinhibitoren von HIV-1 gehören unter anderem Moleküle, welche durch ihre Bindung an gp120 zu einer Konformationsänderung führen und so eine Bindung von gp120 an CD4 verhindern¹²⁴. Andere Moleküle, wie zum Beispiel monoklonale anti-CD4 Antikörper, verhindern die HIV-Bindung sterisch¹²⁵. Die immunologische Funktion des CD4 Moleküls wird hierbei nicht beeinflusst.

Der Chemokinrezeptor Maraviroc ist Bestandteil der antiretroviralen Therapie. Seine Wirkung basiert auf der Bindung von CCR5, wodurch eine Bindung des Chemokinrezeptor mit dem HIV-Partikel nicht mehr möglich wird¹²⁶.

Fusionsinhibitoren wie das Molekül mit dem Namen Enfuvirtide stellen Peptide mit α -helikalen Bereichen dar, welche die α -Helices des gp41 nachahmen^{125,127}. Während der Fusion binden diese Peptide an eine der beiden α -Helices des gp41 und verhindern so deren Zusammenlagerung und dadurch die Fusion mit der Zielzelle.

1.5.2 Das Kopieren des viralen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA.

Die reverse Transkription, bei der die einzelsträngigen viralen (+)-Strang RNA Moleküle in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden, vollzieht sich zusammen mit dem *uncoating* des Nukleokapsids in einem koordinierten Prozess¹²⁸⁻¹³⁰. Als Bestandteil des Nukleokapsid wird die reverse Transkription von der sogenannten Reversen Transkriptase (RT) katalysiert, einem Enzym, welches die Aktivitäten einer RNA- und DNA-abhängigen DNA-Polymerase sowie einer RNase H besitzt und in circa 50-facher Ausfertigung im Virion vorliegt. Der Komplex, in welchem die reverse Transkription abläuft, bezeichnet man als Reverse-Transkription-Komplex,

kurz RTC. Neben der Reversen Transkriptase befinden sich auch zelluläre Proteine in diesem Komplex, die für die reverse Transkription notwendig sind.

Der Prozess der reversen Transkription läuft in verschiedenen Stufen ab, bei denen sich DNA-Synthese, RNA-Abbau und Strang-Transfers abwechseln. Ausgangspunkt für die reverse Transkription ist eine zelluläre Transfer-RNA (tRNA), welche an der sogenannten Primerbindestelle (pbs) bindet. Für die Strang-Transfers sind zwei identische Genombereiche von Bedeutung, die sogenannten *direct repeats* (R), welche am 5'- sowie 3'-Ende des Genoms liegen. RNase H-resistente Genombereiche (Polypurintrakte) gewährleisten nach der Bildung des RNA-DNA-Duplex die Synthese des DNA-Gegenstranges, indem sie die dafür notwendige Primerstruktur darstellen.

Untersuchungen *in vitro* konnten zeigen, dass für die Synthese doppelsträngiger DNA aus dem viralen (+)-Strang RNA Genom lediglich die Reverse Transkriptase notwendig ist. Die Situation *in vivo* unterscheidet sich jedoch von den *in vitro* Beobachtungen deutlich: Hier sind zahlreiche Proteine im Reverse-Transkriptase-Komplex vorhanden, die einen direkten oder indirekten Einfluss auf den Prozess der reversen Transkription besitzen. Zu diesen Proteinen zählen als virale Proteine das Matrixprotein, das Kapsidprotein, das Nukleokapsidprotein, die Integrase und Vpr¹³¹⁻¹³³. Das Kapsidprotein ist verantwortlich für die Struktur des RTCs sowie dessen Transport und Kernimport¹³⁴⁻¹³⁷. Das Nukleokapsidprotein wirkt, besonders in Bereichen mit ausgeprägter Sekundärstruktur oder während der Transferreaktionen der Nukleinsäuremoleküle, als Chaperon¹³⁸⁻¹⁴³. Die Funktion des Vpr ist nicht vollständig geklärt. Als Interaktionspartner von Vpr wurde das zelluläre Protein UNG2 (Uracil-DNA Glykosylase) nachgewiesen, welches die neu synthetisierte DNA modifizieren kann¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Für die virale Integrase ist die Funktion innerhalb des RTC ebenfalls nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen *in vivo* zeigten deutlich, dass einige Mutationen innerhalb der Integrase Auswirkungen auf die reverse Transkription haben können, während die Auswirkungen bei *in vitro* Untersuchungen ausblieben¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Ähnliches konnte auch bei anderen viralen Proteinen beobachtet werden, wie zum Beispiel Vif oder Tat. Diese Proteine üben *in vitro* einen Einfluss auf die reverse Transkription aus, während die *in vivo* Funktion derzeit unklar ist¹⁵²⁻¹⁵⁷.

Neben den viralen Proteinen können auch zelluläre Proteine, sogenannte Restriktionsfaktoren, mit dem Reverse-Transkription-Komplex interagieren. Hierzu zählen zum Beispiel Proteine aus der APOBEC3 (*apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 3*) Familie, TRIM5 α (*tripartite motif containing*), TRIMCyp oder Fv-1 (*Friend virus susceptibility 1*). APOBEC3-Proteine werden beim Zusammenbau viraler Partikel mit in die Virionen verpackt und gelangen so im späteren Verlauf in den Reverse-Transkription-Komplex. Dort verursachen sie während der reversen Transkription Mutationen, die die RT-Funktion stören und zum Abbruch der reversen Transkription führen^{158,159}.

TRIM5 α , TRIMCyp und Fv-1 interagieren mit dem viralen Kapsidprotein und beeinflussen den Prozess des *uncoating*, der eng mit dem Prozess der reversen Transkription verbunden ist. Auch diese Interaktionen führen zum Abbruch der reversen Transkription¹⁶⁰⁻¹⁷⁰.

Die Reverse Transkriptase ist aufgrund ihrer hohen Fehlerrate während der Synthese des proviralen DNA-Genoms maßgeblich an der Entstehung von Mutationen und Rekombinationen beteiligt.

Eine Auffälligkeit von HIV ist dessen große genetische Variabilität, sowohl zwischen einzelnen Infizierten bzw. Infektionsgruppen als auch innerhalb eines Infizierten selbst^{171,172,173-175}. Zwar sind natürliche Infektionen meist nur durch ein einzelnes Viruspartikel, dem sogenannten *founder virus*, begründet (Abschnitt 1.6.1), so lassen sich doch eine Vielzahl genetisch unterschiedlicher Viren (Quasispezies) in Infizierten nachweisen¹²¹. Neben der großen Anzahl infizierter Zellen und dessen hoher Umsatzrate liegt die Hauptursache für diese große genetische Variabilität im Auftreten von Mutationen¹⁷⁶. Diese können sich zu unterschiedlichen Zeiten im viralen Genom manifestieren: während der reversen Transkription des viralen RNA-Genoms in doppelsträngige DNA, während der Transkription der integrierten Provirus-DNA und während der Duplikation der proviralen DNA im Zuge der Zellteilung.

An der Transkription sowie Replikation proviraler DNA sind die zellulären Polymerasen (DNA-abhängige DNA-Polymerase, DNA Pol II, und DNA-abhängige RNA-Polymerase, RNA Pol II) beteiligt. Beide Enzyme sind in der Lage falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und deren Einbau zu korrigieren, wodurch sie als Hauptursache für die hohe Mutationsrate des HIV-Genoms ausscheiden¹⁷⁷. Im Falle der Replikation des proviralen Genoms kommt hinzu, dass aktivierte und infizierte Zellen eine geringe Halbwertszeit besitzen¹⁷⁸, wodurch es kaum zu Zellteilungen kommt.

Im Gegensatz zu den zellulären Polymerasen besitzt die virale Reverse Transkriptase keine Korrekturfunktion für falsch eingebaute Nukleotide^{179,180}. Schätzungsweise 10^4 bis 10^5 Mutationen treten täglich an jeder einzelnen Position des viralen Genoms bei einem Patienten auf¹⁷⁶. Die Mutationsrate der Reversen Transkriptase liegt bei circa $3,4 \times 10^{-5}$ *in vivo*^{181,182} und zwischen $5,0 \times 10^{-4}$ und $1,6 \times 10^{-5}$ *in vitro*¹⁸³.

Wie in Abschnitt 1.5.2 dargestellt ist es der Reversen Transkriptase während des Umschreibens des einzelsträngigen RNA-Genoms in doppelstränge DNA möglich zwischen den beiden RNA-Molekülen zu wechseln (*template switch*). Hierin besteht eine weitere Quelle genetischer Diversität: die Rekombination. Diese kann während der Synthese der (-)-Strang- oder (+)-Strang-DNA auftreten, wobei Untersuchungen zeigten das Rekombinationsereignisse hauptsächlich während der Synthese der (-)-Strang-DNA auftreten¹⁸⁴⁻¹⁸⁷. Möglich wird das Ereignis der Rekombination allerdings erst durch die Tatsache, dass zwei Kopien des viralen Genoms während des Zusammenbaus in virale Partikel verpackt werden. Den beiden heterologen Genomen dieser Viruspartikel ist es bei der späteren Infektion möglich im Zuge der reversen Transkription zu rekombinieren^{188,189}. Das Ergebnis der Rekombinationen innerhalb des HIV-Genoms ist die Entstehung neuer, rekombinanter Viruspartikel und die damit einhergehende Diversifizierung der zirkulierenden Viruspopulationen (Abschnitt 1.3).

An dieser Stelle soll nicht unerwähnt bleiben, dass die genetische Vielfalt innerhalb eines Individuums, also die Quasispezies, neben den bisher erwähnten Faktoren wie Replikations- und Mutationsrate sowie durch Rekombinationsereignisse noch durch weitere Vorgänge beeinflusst wird. Hierzu zählen Selektionsprozesse ausge-

löst durch die humorale und zelluläre Immunantwort im Wirt¹⁹⁰ sowie die Limitierung all dieser Prozesse durch die virale Fitness¹⁹¹.

Reverse Transkriptase Inhibitoren stellen die größte Gruppe antiretroviraler Therapeutika dar.

Bei der Suche nach HIV-Proteinen, welche sich als Ziel für eine antiretrovirale Therapie eignen, gelangte die Reverse Transkriptase sehr früh in den Fokus der Forschung und Moleküle dieser Gruppe gehörten zu den ersten zugelassenen HIV-Therapeutika¹⁹². Heute umfasst die Gruppe der RT-Inhibitoren die meisten antiretroviralen Substanzen, welche sich zwei Untergruppen zuordnen lassen: den nukleosidischen (NRTIs) und den nicht-nukleosidischen RT-Inhibitoren (NNRTIs). NRTIs sind Analoge der Nucleoside, also des Substrats der Reversen Transkriptase, mit welchem sie konkurrieren und, wenn in den von der RT synthetisierten DNA-Strang eingebaut, zum Strangabbruch führen¹⁹³⁻¹⁹⁵. NNRTIs hingegen binden nicht im katalytischen Zentrum, an welchem auch native Nucleoside binden, sondern an einer weiter entfernt liegenden nicht-katalytischen Tasche^{196,197}. Dort vermitteln sie eine allosterische Inhibition der Reversen Transkriptase. Während NRTIs aufgrund ihres Wirkmechanismus auch die Replikation anderer Lentiviren wie zum Beispiel HIV-2 oder SIV inhibieren, entfalten NNRTIs ihre Wirkung einzig gegen HIV-1^{197,198}.

Zu den als *pro-drugs* verabreichten NRTIs zählen unter anderem Tenofovir, Lamivudin, und Zidovudin, auch bekannt als AZT. Efavirenz, Nevirapin oder Etravirin gehören der Gruppe der NNRTIs an, welche die Aktivität der Polymerase reduzieren.

1.5.3 Die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom

Für die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom sind drei Prozesse notwendig: (1) das Prozessieren des doppelsträngigen DNA-Genoms, welches durch die reverse Transkription entstanden ist (Abschnitt 1.5.2), (2) das Öffnen des Wirtszellgenoms an den Stellen der Integration (*integration acceptor sites*), und (3) das Verbinden des prozessierten viralen mit dem geöffneten zellulären Genom. Die Öffnung des Wirtszellgenoms geschieht nach der Prozessierung des viralen Genoms, bei dem DNA-Enden entstehen, die in der Lage sind mit dem Wirtszellgenom zu reagieren und so dessen Öffnung bedingen. Katalysiert werden alle diese Prozesse durch das virale Enzym Integrase (IN), welches innerhalb des Präintegrationskomplexes (PIC) mit der doppelsträngigen DNA assoziiert ist, und der zellulären DNA-Reparaturmaschinerie.

Bei der Prozessierung des viralen Genoms, welches nach der reversen Transkription stumpfe Enden (*blunt ends*) aufweist, werden an jedem 3'-Ende zwei Nucleotide entfernt. Die Sequenz der dadurch um zwei Nucleotide verkürzten 3'-Enden ist konserviert und es entstehen immer CA-3' Enden. Diese Enden reagieren in der weiteren Folge mit der Wirtszell-DNA, brechen dort Phosphodiesterbindungen auf und interagieren mit den freierwerdenden Enden. Im Falle von HIV liegen die beiden aufgebrochenen Phosphodiesterbindungen fünf Nucleotide voneinander entfernt. Die freien 5'-Enden der viralen DNA und die freien 3'-Enden der zellulären DNA werden anschließend mit Hilfe zellulärer Enzyme repariert. Hierbei kommt es zur Duplikation der fünf Nucleotide inner-

halb der zellulären DNA, die während des Angriffs der viralen 3'-Enden entstanden sind. Die 5'-Überhänge der viralen DNA-Stränge werden entfernt.

Integraseinhibitoren stellen eine relativ neue Klasse antiretroviraler Therapeutika dar.

Während der erste RT Inhibitor bereits 1987 zur Therapie von HIV-1 zugelassen wurde, kam der erste Integraseinhibitor erst 2007 im Patienten zum Einsatz. Der unter dem Namen Raltegravir bekannte Inhibitor wirkt, indem er den Komplex bestehend aus Integrase und proviralem DNA-Genom bindet und den Prozess des Strangtransfers inhibiert. Im Gegensatz zu anderen antiretroviralen Therapeutika ist für die Inhibition der Integration somit die Bindung zweier viralen Komponenten, der Integrase und der proviralen DNA, notwendig.

1.5.4 Transkription und Translation: Ablauf und Kontrolle der Synthese viraler Proteine

Das virale Genom liegt nach dessen Integration als sogenanntes Provirus-Genom (oder kurz Provirus) innerhalb der Wirts-DNA vor. In dieser Form dient es als Matrize für die Synthese verschiedener RNA-Spezies, deren Expression zeitlich reguliert ist. Zunächst lässt sich die Bildung kurzer viraler RNAs detektieren, die für die viralen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren und zahlreiche Spleißvorgänge durchlaufen haben. Später in der Infektion kommt es zur Bildung von Env-, Vif-, Vpr- und Vpu-kodierenden RNAs. Diese RNA-Spezies stellen nur teilweise gespleißte RNAs dar. Gänzlich ungespleißte RNAs findet man erst spät im Infektionszyklus. Von ihnen werden die Proteine Gag und Pol translatiert. Zusätzlich werden die ungespleißten RNA-Moleküle als virales Genom in die entstehenden Viruspartikel verpackt¹⁹⁹.

Die zeitliche Kontrolle der Genexpression und der Synthese des Genoms findet zum einen auf der Stufe der Transkription statt. Die Transkription, durchgeführt durch die zelluläre RNA Polymerase II, ist in der frühen Phase der Virusreplikation noch äußerst schwach und bricht in den meisten Fällen kurz nach der Initiation wieder ab. Kommt es dennoch zur Synthese längerer RNA-Moleküle, so handelt es sich ausschließlich um kurze, komplett gespleißte RNA-Moleküle, von denen die viralen Proteine Tat, Rev und Nef translatiert werden. Grund für die Instabilität der Transkription ist die Tatsache, dass an dieser sehr frühen Transkription noch keine viralen Proteine beteiligt sind, die die Transkription fördern könnten. Beobachtungen weisen unter anderem darauf hin, dass früh auftretende Transkriptionsvorgänge an nicht-integrierter DNA stattfinden^{200,201}.

Mit dem Auftreten dieser Proteine ändert sich die Transkriptionsaktivität am Provirusgenom. Ursache hierfür ist die Transkriptions-stabilisierende Funktion des Tat Proteins. Durch seine Bindung an ein Element mit ausgeprägter Sekundärstruktur im Bereich des 5'-LTR Promotors, der sogenannten *transactivation-responsive region* (TAR)²⁰²⁻²⁰⁵, wird die Transkription um das bis zu 100-fache gesteigert. Zusätzlich ist das Tat Protein an der Umlagerung von Nukleosomen beteiligt, die dazu führen, dass der virale LTR-Promotor für die Proteine des Transkriptionsapparates zugänglich wird²⁰⁶⁻²⁰⁸. Interaktionen von Tat mit den zellulären Proteinen Sp1 und TBP konnten ebenfalls nachgewiesen werden^{209,210}.

Ein weiterer Kontrollmechanismus bei der Synthese der viralen Proteine basiert auf der Aktivität des Rev Proteins. Nachdem es zu einer Tat-abhängigen Steigerung der Transkription am viralen LTR-Promotor gekom-

men ist treten die bereits erwähnten unterschiedlichen RNA-Spezies auf: mehrfach gespleißte, einfach gespleißte und ungespleißte mRNA-Moleküle, wobei die Anzahl an mehrfach bzw. komplett gespleißten RNAs zunächst überwiegt. Rev (*regulator of expression of virion proteins*) besitzt, bedingt durch die Anwesenheit eines Kernlokalisierungs- (NLS)²¹¹⁻²¹⁴ sowie eines Kernexportsignals (NES)²¹⁵⁻²¹⁸, die Funktion eines *shuttle*-Proteins und kann zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln^{216,218-220}. Im Zellkern ist es in der Lage an das sogenannte *Rev-responsive element* (RRE) zu binden²²¹⁻²²⁵, ein RNA-Element einfach bzw. nicht-komplett gespleißter und ungespleißter viraler RNA-Spezies²²⁶⁻²²⁹, und so deren Kernexport und Translation zu fördern^{224,230,231}. Der Rev-abhängige Export dieser viralen mRNAs stellt den Übergang von der frühen zur späten Phase der Virusreplikation, also von der Expression der akzessorischen Proteine Tat, Rev und Nef zu den Strukturproteinen Gag und Env dar.

1.5.5 **Bildung der Viruspartikel und Virusreifung**

Der Zusammenbau der einzelnen Virusbestandteile zu einem Viruspartikel findet an der Zellmembran der infizierten Zelle statt und wird durch das virale Polyprotein Gag kontrolliert. Hierbei besitzen die einzelnen Proteindomänen des Gag-Polyproteins unterschiedliche Funktionen, die allesamt für den Zusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel notwendig sind. Das Matrixprotein (MA) vermittelt die Bindung des Gag-Polyproteins an die Membran. Die Morphologie des Partikels wird durch das Kapsidprotein (CA) bestimmt. Für die Bindung des viralen Genoms ist das Nukleokapsidprotein (NC) verantwortlich. Und das am C-Terminus lokalisierte Protein p6 besitzt Einfluss auf den Freisetzungsprozess (*budding*) der Viruspartikel²³²⁻²³⁴.

Während des Zusammenbaus laufen all diese Einzelschritte simultan ab. Gag-Polyproteine wandern nach ihrer Synthese in Form von Mono- bzw. Dimeren zu Membranregionen, welche Cholesterol und Sphingolipide beinhalten, sogenannte *lipid rafts*²³⁵⁻²³⁸. Da als Bindungspartner der Gag-Polyproteine zelluläre Transportproteine identifiziert wurden, ist eine Beteiligung der zytoplasmatischen Transportmaschinerie wahrscheinlich²³⁹⁻²⁴³. An der Plasmamembran angekommen interagieren die Gag-Polyproteine mit den anderen Bestandteilen der späteren Viruspartikel. Es bilden sich die Verbindungen zwischen den Matrixproteinanteilen und der Membran, der viralen RNA und den NC-Anteilen sowie zwischen den Gag-Proteinen untereinander²⁴⁴⁻²⁴⁶. Das Env-Protein, welches unabhängig vom Gag-Polyprotein zur Plasmamembran gelangt, interagiert mit seinem zytoplasmatischen Anteil im gp41 mit dem Matrixanteil des Gag-Polyproteins. Auch die Einbindung des Env-Proteins in Membranregionen, an welchen der virale Zusammenbau stattfindet, wird durch den zytoplasmatischen Teil des gp41 gewährleistet²⁴⁷⁻²⁵⁰.

Neben den Strukturproteinen und den viralen Enzymen lassen sich noch weitere virale, aber auch zelluläre Bestandteile innerhalb der Viruspartikel identifizieren. So sind geringe Mengen an Vif-, Vpr- und Nef-Proteinen in den Virionen vorhanden^{251,252}. An zellulären Proteinen lassen sich zum Beispiel die membranständigen ICAM-1 und HLA-II Proteine, oder zytoplasmatische Proteine wie Aktin bzw. Aktin-bindende oder RNA-bindende Proteine detektieren²⁵³.

Die Gag-Polyproteine formen während ihrer Zusammenlagerung und der Assoziation mit den anderen viralen und zellulären Bestandteilen eine Gitter-ähnliche Struktur unterhalb der *lipid rafts*. Diese Polymerisierung in einen Gitter-ähnlichen Verband stellt einen Gegensatz zum späteren Knospungsprozess dar, bei dem sich die Plasmamembran ausstülpfen und abschnürren muss. Aus diesem Grund knospen die Viruspartikel bereits zu einem Zeitpunkt, bei welchem die Gag-Polymerisierung noch nicht vollständig abgeschlossen ist²⁵⁴. Am Knospungsprozess beteiligt ist der zelluläre ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) Komplex^{233,255–259}, welcher in der Zelle unter anderem für die Knospung von Vesikeln in multivesikuläre Strukturen oder die Zytokinese verantwortlich ist^{255,256,258,260–262}.

Im Anschluss an das Abschnüren der Viruspartikel erfolgt die Reifung, die durch die proteolytische Spaltung der Polyproteine eingeleitet und kontrolliert wird. Das virale Gag bzw. Gag-Pro-Pol Polyprotein wird an insgesamt zehn unterschiedlichen Stellen gespalten, wodurch die Einzelproteine MA, CA, NC, p6, IN, PR und RT gebildet werden²⁶³. Die zeitliche Kontrolle der Spaltung ergibt sich aus unterschiedlichen Prozessierungsraten, die den unterschiedlichen Spaltstellen inhärent sind und wodurch sie sich in drei Kategorien einteilen lassen: hoch, mittel und niedrig²⁶⁴. Eine hohe Prozessierungsrate findet sich bei der Spaltstelle zwischen dem NC-Protein und p6. Die Spaltstellen p1-p6 und MA-CA besitzen mittlere, und die Spaltstellen NC-p1 und CA-p2 niedrige Prozessierungsraten.

Infolge der Spaltung der Polyproteine kommt es zu weitreichenden Umlagerungsprozessen innerhalb der Partikel und zur Ausbildung des Viruskerns (siehe Abbildung 3). Das Env-Protein auf der Oberfläche der Viruspartikel erhält sein fusogene Aktivität^{265,266}. Das Matrixprotein bleibt mit der Innenseite der Hüllmembran assoziiert und formt eine innere Hülle, die allerdings unvollständig ist. Das Kapsidprotein bildet den Viruskern aus, der an den Enden an die aus Matrixproteinen bestehende Hülle stößt^{267,268}. Im Inneren des Kapsids formt sich das Nukleokapsid bestehend aus NC-Proteinen, RNA-Genom, RT-, IN-, p6- und p7-Proteinen²⁶³. Hierbei kommt es zur Stabilisierung des dimeren RNA-Genoms und zur Assoziation der zellulären tRNA^{Lys} Primer an das Genom^{269,270}. Das Ergebnis dieser Umlagerungsprozesse sind reife Viruspartikel, die in der Lage sind neue Wirtszellen zu infizieren.

Mit Hilfe von Proteaseinhibitoren lässt sich die Reifung der Viruspartikel verhindern.

Proteaseinhibitoren (PIs), wie Atazanavir, Ritonavir oder Saquinavir wirken, indem sie die Prozessierung des Gag- bzw. Gag-Pol-Polyproteins und somit die Bildung reifer Viruspartikel verhindern. Alle bisherigen Proteaseinhibitoren ähneln sich chemisch, wodurch Resistenzentwicklungen häufig mehrere PIs betreffen (Kreuzresistenzen).

1.6 Ablauf der Infektion mit HI-Viren: Ein Prozess in drei Abschnitten

Zum Zeitpunkt dieser Publikation wird die Zahl der mit HIV-infizierten Personen im Jahr 2012 weltweit auf 35,3 Millionen (32,2 bis 38,8 Mio.) angegeben²⁷¹. 80% der Infektionen, also circa 28,2 Mio., gehen auf sexuelle Übertragungswege zurück. Bei den übrigen 20% handelt es sich um perkutane, intravenöse, *in utero* oder *post*

partum Übertragungen des HI-Erregers. Während das Infektionsrisiko bei den verschiedenen Übertragungsrouten (sexuell, intravenös, perkutan) unterschiedlich ist, folgt der Krankheitsverlauf und das Auftreten viraler und wirtsspezifischer Marker immer dem gleichen Schema, wobei der zeitliche Ablauf unterschiedlich sein kann. Insgesamt lässt sich die Infektion mit dem HI-Virus in drei große Phasen unterteilen: eine akute Phase, eine chronische bzw. asymptomatische Phase, auch Latenzphase genannt, und eine symptomatische Phase (Abbildung 4).

1.6.1 Die akute Phase

Als 'akute Phase' der Virusinfektion bezeichnet man die ersten vier Wochen nach Übertragung des Virus (Abbildung 4). Bei der Übertragung gelangen freie und Zell-assoziierte Viruspartikel in den Organismus, die hinsichtlich ihrer Genetik heterogen sind und die viralen Quasispezies des Donors repräsentieren. In 80% aller heterosexuellen HIV-Übertragungen, 60% aller Übertragungen innerhalb der Gruppe der MSM (*men who have sex with men*) und 40% aller intravenösen Übertragungen ist ein einzelnes Viruspartikel für die erfolgreiche Infektion verantwortlich^{121,272–276}. Hierbei sind die Hauptangriffsziele des Virus CD4⁺ T-Zellen und Langerhans' Zellen sowie zum Teil dendritische Zellen^{277–279}. Im Gegensatz zu Ergebnissen von *in vitro* Untersuchungen besitzen CD4⁺ T-Zellen hierbei keinen aktivierten sondern einen ruhenden Phänotyp mit eher geringer Korezeptorexpression^{280,281}. Die Übertragungsrates von HIV ist mit 0,0005 für heterosexuell rezeptiven, 0,001 für heterosexuell insertiven und 0,01 für homosexuellen Geschlechtsverkehr gering (Angaben je Sexualverkehr)^{282–288}.

Während der ersten Tage der Infektion, der sogenannten Eklipse-Phase (Abbildung 5), lassen sich keine Viruspartikel in der Peripherie nachweisen^{121,289}. Die gesamte Virusreplikation läuft zu diesem Zeitpunkt lokal am Ort des Viruseintritts ab^{290–293}. Zwar gelangt das Virus bereits früh in weiter entfernt

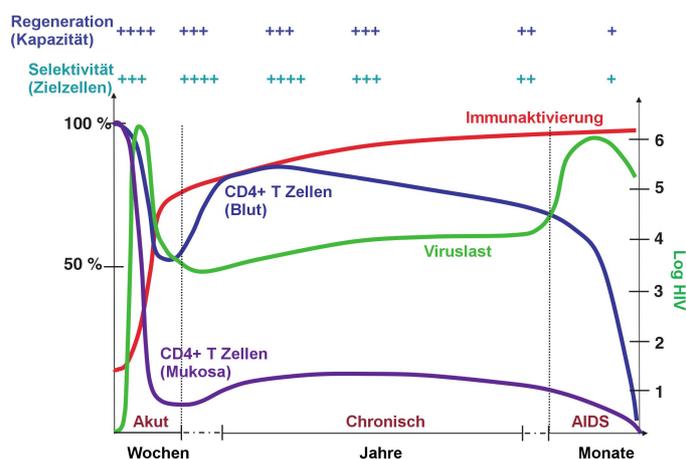


Abbildung 4. Phasen der HIV-Infektion. Verändert nach Grossmann *et al.* (2006)⁵⁷⁸. Zu Beginn der Infektion mit dem HI-Virus beobachtet man eine Phase, in welcher die Viruslast stark ansteigt und innerhalb von circa zwei Wochen ihren Höhenpunkt erreicht. Zeitversetzt mit dem Anstieg der Viruslast treten erste Immunantworten auf, die während des gesamten Krankheitsverlaufes detektierbar bleiben. Bedingt durch die starke Virusreplikation nimmt die Anzahl CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Mukosa (vor allem Darmmukosa) in diesem als 'akute Phase' bezeichneten Zeitraum stark ab. Auch die Anzahl CD4⁺ T-Zellen im Blut nimmt während dieser Phase ab. Während der 'chronischen Phase' sinkt die Viruslast auf ein niedrigeres, und im Anschluss nahezu konstantes Niveau. Die Anzahl CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Mukosa erholt sich kaum. Einen leichten Anstieg beobachtet man hingegen innerhalb der Peripherie. Jedoch kommt es während der gesamten chronischen Phase zu einer fortwährenden Reduktion CD4⁺ T-Zellen. Der Wechsel in die 'AIDS Phase' ist gekennzeichnet durch einen starken Abfall CD4⁺ T-Zellen im Blut sowie einem weiteren Absinken mukosaler CD4⁺ T-Zellen, bedingt durch einen erneuten Anstieg der Virusreplikation.

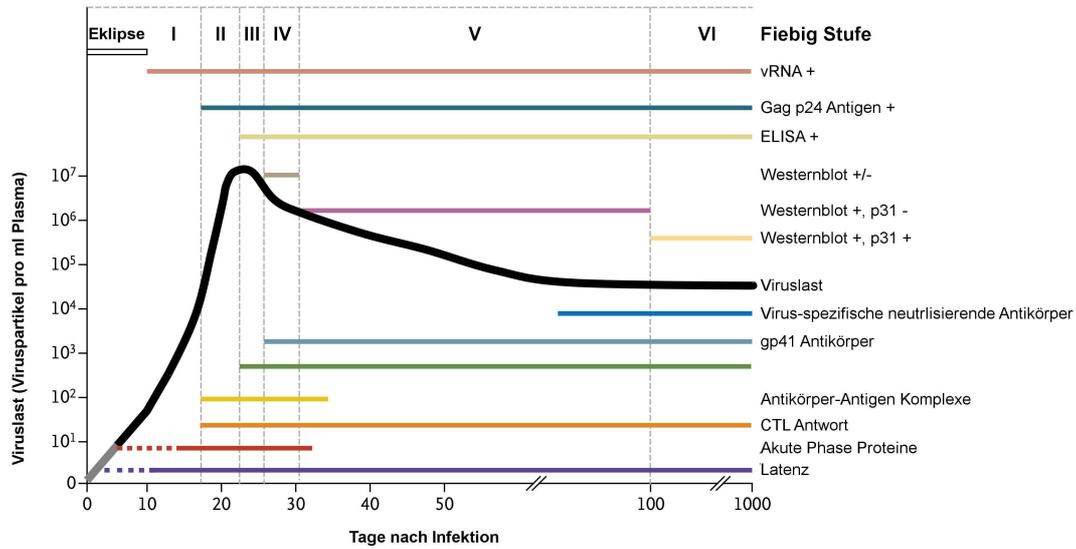


Abbildung 5. Immunologische bzw. serologische Parameter im zeitlichen Verlauf der akuten Phase einer HIV-Infektion. Die einzelnen Parameter sind entsprechend ihrer Messbarkeit während der akuten Phase einer HIV-Infektion aufgetragen. Basis des Graphen stellt die Viruslast dar, die als 'Viruspartikel pro ml Plasma' dargestellt ist. Entsprechend der immunologischen und serologischen Parameter ist die akute Phase in die insgesamt sechs Fiebig Stufen eingeteilt. Abbildung verändert nach Cohen *et al.* (2011)⁵⁸⁰.

liegende lymphatische Gewebe, die Virusmenge reicht in dieser Phase jedoch nicht aus um in den Geweben eine Infektion zu etablieren²⁹⁴⁻²⁹⁸. Bedingt durch die Infektion lässt sich zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der CD4⁺ T-Zellen im Blut feststellen, welcher durch früh auftretende Mediatoren des angeborenen Immunsystems begründet ist²⁹¹. Durch das Einwandern von T-Zellen wird die lokale Infektion zudem unterstützt²⁹⁹.

Die andauernde Replikation am Ursprungsort der Infektion produziert kontinuierlich Viruspartikel, sodass die Anzahl infizierter Zellen in distalen lymphatischen Geweben steigt. Ist ein kritischer Schwellenwert erreicht, so sind die infizierten Zellen in der Lage auch dort die Infektion aufrecht zu erhalten. Dies ist nach circa fünf bis sechs Tagen nach Infektion (*post-infection*, p.i.) der Fall²⁹⁷. Ab diesem Moment lässt sich das Virus auch in entfernt liegenden lymphatischen Geweben feststellen. Die Darmmukosa ist als größtes immunologisches Organ des Körpers ab diesem Zeitpunkt Hauptreplikationsort des Virus^{290,300-303}.

Nach circa zehn Tagen lassen sich zum ersten Mal Viruspartikel im Blut nachweisen. Mittels hochsensitiven PCR-Methoden können ein bis fünf Kopien viraler RNA pro Milliliter Blut nachgewiesen werden³⁰⁴. Das Detektionslimit klinischer PCR-Anwendungen liegt bei circa 50 Kopien/ml Blut³⁰⁵.

Die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen sinkt innerhalb von drei Wochen im Blut und in den Lymphknoten. Im Darm ist der Verlust an CD4⁺ T-Zellen mit bis zu 80% am größten^{290,291,293,306,307}. Der Rückgang der CD4⁺ T-Zellen geht hauptsächlich auf zytopathische Effekte der Virusreplikation (Zytolyse) und die zytolytischen Aktivitäten des Immunsystems zurück²⁹¹. Mit dem Verlust der CD4⁺ T-Zellen nimmt zudem die Virusmenge im Blut ab, welche

nach circa 14 bis 21 Tagen p.i. im Makaken (SIV) und 21 bis 28 Tagen p.i. im Menschen (HIV) ihren Höhepunkt erreicht hat (Abbildung 5)³⁰⁸.

Die erste immunologische Reaktion des Wirtes auf die HIV-Infektion ist die Freisetzung sogenannter akute-Phase-Proteine, wie zum Beispiel dem Protein Serum Amyloid A (SAA), welches noch vor der Viruslast (VL) oder dem Auftreten von Zytokinen im Plasma nachweisbar ist³⁰⁹. Im Anschluss an die ersten akute-Phase-Proteine lassen sich eine Vielzahl unterschiedlicher Zytokine im Plasma nachweisen, darunter IFN α , IFN γ , IL-10, IL-15, IL-18, IL-22 oder TNF α ³¹⁰. Das Auftreten und Ansteigen der Zytokine verläuft in dieser frühen Phase fast gleichzeitig ab, weshalb man hier vom sogenannten Zytokinsturm (*cytokine storm*) spricht. Einige dieser früh auftretenden Zytokine, wie zum Beispiel Typ I Interferone (IFN), sind in der Lage die Virusreplikation zu inhibieren³¹¹. Die große Menge an freigesetzten Zytokinen und deren hohe Konzentration im Plasma führt jedoch zur Förderung der viralen Replikation und zu den später beobachtbaren Schädigungen des Immunsystems, was auch Vergleiche mit anderen viralen Infektionen zeigen^{312,313}.

Frühe zelluläre Reaktionen auf eine HIV-Infektion sind unter anderem die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und dendritischen Zellen (DCs). Bereits vor dem Erreichen des VL-Höhepunktes lassen sich gesteigerte NK-Zellaktivitäten messen³¹⁴⁻³¹⁶. Zur Aktivität der NK-Zellen gehört die Lyse infizierter Zellen mittels Perforinen und Granzymen sowie die Produktion und Ausschüttung von Chemokinen. Der NK-Zellaktivität wirkt HIV über einen Mechanismus entgegen, bei dem es zur verminderten Bildung von Liganden für NK-Zell-Rezeptoren auf infizierten Zellen kommt³¹⁷.

Dendritische Zellen (DCs) spielen ebenfalls früh während der HIV-Infektion eine wichtige Rolle, wobei sie entgegen ihrer eigentlich pathogen-abwehrenden Aufgabe hauptsächlich die Infektion fördern. Aufgrund der weiten Verbreitung dendritischer Zellen entlang mukosaler Oberflächen und der Expression sowohl des Rezeptors als auch beider Korezeptoren³¹⁸ sowie verschiedener alternativer Rezeptoren von HIV³¹⁹⁻³²¹ stellen DCs einen Zelltyp dar, welcher früh mit den Viruspartikeln interagieren kann³²². Zwar können dendritische Zellen Viruspartikel mit Hilfe der unterschiedlichen Rezeptoren aufnehmen, die Virusreplikation innerhalb der dendritischen Zellen ist jedoch stark inhibiert. Für die Inhibition der viralen Replikation in DCs sind unter anderem zelluläre Restriktionsfaktoren wie zum Beispiel APOBEC3G, TRIM5 α oder SAMHD1 verantwortlich (vgl. Abschnitt 1.5.2)³²³⁻³²⁶.

Als Antwort auf die Aufnahme von HIV-Partikeln sind DCs in der Lage Typ I IFNs zu sezernieren^{327,328}, welche die Virusreplikation inhibieren^{311,329}. Gleichzeitig können aufgenommene bzw. gebundene Viruspartikel über sogenannte immunologische bzw. virale Synapsen an andere Zellen weitergegeben werden und so zu deren Infektion führen^{112,330,331}. Zwischen der Bindung der Partikel bis zur Trans-Infektion anderer Zielzellen können einige Tage liegen.

Bei einigen Zytokinen, darunter zum Beispiel IL-12, kommt es während der akuten Phase zu einer Hemmung der Sekretion^{332,333}. Verantwortlich für die Hemmung sind die kleinen Vesikel, die sich während der Apoptose von Zellen mittels Exozytose abschnüren, sogenannte apoptotische Mikropartikel. Sie befinden sich, neben ande-

ren zellulären Faktoren und Botenstoffen, in großer Menge während der akuten Phase im Plasma. Durch die verminderte Zytokinsekretion bleibt unter anderem die Aktivierung von NK- oder das Auslösen einer Th1-basierten Immunantwort aus³³².

Kurz vor dem Höhepunkt der Viruslast treten zum ersten Mal HIV-spezifische zytotoxische T-Zellen (CD8⁺ T-Zellen, CTLs) im Plasma auf³³⁴⁻³³⁷. Die aufkommende CD8⁺ T-Zell-Antwort ist in der Lage die virale Replikation des *founder virus* einzudämmen, wodurch es zum Abfallen der Viruslast kommt³³⁸. Während die Viruslast im Blut zurück geht steigt die Konzentration der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und erreicht circa ein bis zwei Wochen nach dem VL-Maximum ihren Höhepunkt. Nun treten, ausgelöst durch den Selektionsdruck der CD8⁺ T-Zell-Antwort, die ersten viralen Mutationen auf^{276,339}. Nur ein kleiner Anteil der Mutationen geht auf frühe Immunantworten des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen) zurück oder stellt Reversionen dar, die durch das Wegfallen des Selektionsdrucks des Donors möglich werden. Der Großteil der Mutationen betrifft die Epitope der HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und erzeugt Fluchtmutanten.

Während der nächsten zwölf bis 20 Wochen fällt die Viruslast kontinuierlich, bis sie einen Wert erreicht hat, bei dem virale Replikation und Immunantwort in einem ausbalanciertem Verhältnis vorliegen: dem *viral set point*^{178,340,341}.

1.6.2 Die asymptomatische Phase der HIV-Infektion

Kennzeichen der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion ist die stabile Viruslast im Plasma von Patienten in Abwesenheit von pathologischen Symptomen und opportunistischen Infektionen. Der viralen Replikation wirken humorale und zelluläre Immunantworten entgegen, deren Zusammenspiel diese Phase begründen (Abbildung 4).

Während HIV-spezifische CD8⁺ T-Zellen bereits während der akuten Phase auftreten (vgl. Abschnitt 1.6.1), sind die ersten neutralisierenden Antikörper (nABs) nach frühestens zwölf Wochen p.i. im Plasma detektierbar³⁴²⁻³⁴⁴. Nicht-neutralisierende HIV-spezifische Antikörper (nnABs) lassen sich hingegen bereits circa zwei bis drei Wochen p.i. im Blut nachweisen³⁴⁵. Hierbei handelt es sich zunächst um Immunkomplexe, also Antigen-gebundene Antikörper. Freie Antikörper, in dieser frühen Phase meist zunächst gegen das Oberflächenprotein gp41 gerichtet, befinden sich circa eine Woche später im Blut. Nicht-neutralisierende Antikörper gegen das zweite Oberflächenprotein von HIV, gp120, findet man erst weitere zwei Wochen später im Plasma, nach circa fünf bis sechs Wochen nach der Infektion. Einen messbaren Einfluss auf den Verlauf der Virusinfektion besitzen diese frühen nicht-neutralisierenden Antikörper jedoch nicht³⁴⁵, auch wenn einige Untersuchungen antivirale Aktivitäten der Antikörper während der akuten Phase nachgewiesen haben³⁴⁶⁻³⁴⁸.

Die Entwicklung neutralisierender Antikörper erzeugt, vergleichbar mit der Situation während der CTL-Antwort, einen Selektionsdruck auf die entsprechenden viralen Spezies, welcher zur Bildung von Fluchtmutanten und so zu neuen viralen Spezies führt^{342,343}. Breit-neutralisierende Antikörper (bnABs), welche meist gegen hoch konservierte Epitope gerichtet sind und dadurch eine Vielzahl unterschiedlicher Virusisolate neutralisieren

können, treten, wenn überhaupt, erst sehr spät während der Infektion auf. Nach ungefähr 20 bis 30 Monaten lassen sich diese in Infizierten finden^{345,349–351}.

Trotz des Aufkommens und der Etablierung verschiedener Immunantworten während der akuten und asymptomatischen Phase kommt es zu einer sukzessiven Progression der Infektion, welche durch den fortdauernden Verlust der CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen^{352,353} und damit einhergehenden opportunistischen Infektionen gekennzeichnet ist. Hauptursache für den Verlust der T-Zell-Populationen ist die chronische Aktivierung des Immunsystems, bei der eine gesteigerte Expression unterschiedlicher Zytokine messbar ist³⁵⁴. Eine Ursache für die chronische Aktivierung des Immunsystems liegt in der frühen Schädigung der Darmmukosa²⁹³ (vgl. Abschnitt 1.6.1), wodurch vermehrt mikrobielle Stoffe wie zum Beispiel Lipopolysaccharide (LPS) in den Blutkreislauf gelangen³⁰³.

Zusätzlich führt die HIV-Replikation auch auf direktem Weg zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine. Einzelsträngige RNA-Moleküle von HIV binden an die *Toll-like*-Rezeptoren 7 und 8 (TLR7/8) und führen so zur Freisetzung von Typ I Interferonen bei plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs)^{328,355–357}. Dabei ist zu beachten, dass HIV hauptsächlich unreife pDCs infiziert, die im Gegensatz zu reifen pDCs keinen refraktären Status ausbilden und somit nach deren Aktivierung kontinuierlich Interferone sezernieren^{358–360}. CD4⁺ T-Zellen sind in der Lage DNA-Intermediate des HIV-Genoms zu detektieren, was zur Produktion von IFN- β und IL-1 β führt³⁶¹. Insgesamt lässt sich beobachten, dass eine Vielzahl Interferon-induzierbarer Gene (ISGs) in Lymphozyten HIV-Infizierter exprimiert werden^{362,363}.

Die chronische Aktivierung führt zu einer Reihe von Fehlfunktionen bei B- und T-Zellen sowie zu Veränderungen in verschiedenen lymphatischen Geweben. Auf den Oberflächen von T-Zellen kommt es zur verstärkten Expression inhibitorisch-wirkender Rezeptoren wie PD-1 oder CTLA-4, und so zum Verlust der jeweiligen Zellfunktion^{364–366}. In Lymphknoten lassen sich strukturelle Veränderungen wie zum Beispiel das Auftreten von Fibrosen erkennen, wodurch es zu Störungen im T-Zell-Wachstum kommt^{367–369}. Erhöhte Proliferations- und Differenzierungsaktivitäten bei B-Zellen korrelieren mit Fehlfunktionen dieser Zellen^{370–372}. Und auch bei CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen kommt es zu Störungen aufgrund der chronischen Immunaktivierung^{373–387}.

1.6.3 Symptomatische Infektionsphase

Die symptomatische Phase einer HIV-Infektion ist gekennzeichnet durch das Auftreten unterschiedlicher opportunistischer Infektionen sowie zellulärer Veränderungen, die durch die weitreichende Schädigung des Immunsystems möglich werden. In dieser Phase der Infektion sind die Funktionen des Immunsystems so stark gestört, dass eine erfolgreiche Pathogenabwehr nicht mehr stattfinden kann. Vormahls harmlose bakterielle und virale Infektion, die bei gesunden Menschen schnell aus dem Organismus entfernt werden, können sich ausbreiten und ohne entsprechende Behandlung tödlich verlaufen. Neben bakteriellen und viralen Infektionen treten auch verschiedene Tumorerkrankungen auf, die in Zusammenhang mit der HIV-Infektion stehen (*AIDS-defining malignancies*), darunter Kaposi's Sarkome, Non-Hodgkin's Lymphome oder zervikale Karzinome.

Die für die Etablierung der opportunistischen Infektionen ausschlaggebende Immunschädigung ist der Verlust der CD4⁺ T-Zellen. Ohne antiretrovirale Therapie (ART) sinkt die CD4⁺ Zahl kontinuierlich während der chronischen Phase der Infektion. Wird dabei ein kritischer Schwellenwert unterschritten, so sind die verbleibenden T-Helferzellen nicht mehr in der Lage ihre Funktion innerhalb des Immunsystems vollumfänglich auszuführen, wodurch sich virale oder bakterielle Infektionen fast ungehindert im Organismus ausbreiten können.

1.7 Rhesusaffen und das simiane Immundefizienzvirus: ein Modell

Die Verwendung verschiedener Affenarten und deren entsprechender SIV-Isolate als Modellsystem für HIV basiert auf einer Vielzahl von Ähnlichkeiten zwischen den beiden Virustypen und den durch sie hervorgerufenen Krankheitsbildern. SIV verwendet wie HIV das Oberflächenmolekül CD4 als Rezeptor sowie CCR5 bzw. CXCR4 als Korezeptor während der Adsorption^{42,388-391}. Große Ähnlichkeiten existieren auch auf Genomebene³⁹²⁻³⁹⁴ sowie beim Ablauf und der Regulation der viralen Proteinbiosynthese³⁹⁵⁻³⁹⁷. Und letztendlich führt auch die SIV-Infektion von nicht-natürlichen Wirten zur schweren Immundefizienz (AIDS) mit tödlichem Ausgang^{42,44,398}. Diese Gemeinsamkeiten führten dazu, dass die Infektion von vor allem Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) mit SIV heute das Standardmodell zur Untersuchung der Pathogenese sowie der Austestung von Vakzinen und antiretroviralen Therapeutika geworden ist.

Insgesamt existieren zwei Gruppen von Rhesusaffen, die sich aufgrund ihrer geografischen Herkunft voneinander unterscheiden lassen: Rhesusaffen indischen und chinesischen Ursprungs. Zu den Rhesusaffen chinesischen Ursprungs zählen die Arten *Macaca mulatta vestita*, *M. m. lasiota*, *M. m. sanctijohannis* und *M. m. brevicauda*. Indische Rhesusaffen umfassen die Arten *M. m. mulatta* und *M. m. villosa*. Neben Rhesusaffen bilden Langschwanzmakaken (*Macaca fascicularis*) und der Südliche Schweinsaffe (*Macaca nemestrina*) das Krankheitsbild AIDS nach einer Infektion mit SIV aus. In der Forschung spielen sie allerdings nur eine untergeordnete Rolle.

Zwischen den beiden Gruppen lassen sich virologische und immunologische Disparitäten in Folge einer SIV-Infektion feststellen. Im Vergleich zur Infektion chinesischer Rhesusaffen zeigen Rhesusaffen indischen Ursprungs einen erhöhten Spitzenwert der Viruslast während der akuten Phase³⁹⁹, eine höhere Viruslast während der asymptomatischen Phase⁴⁰⁰ sowie eine kürzere Lebensdauer⁴⁰¹.

Auf immunologischer Ebene zeichnen sich indische Rhesusaffen durch ein geringeres CD4:CD8 Verhältnis, eine geringere humorale Immunantwort und eine erhöhte Abnahme an CD4⁺ CCR5⁺ T-Zellen innerhalb der Darmmukosa aus³⁹⁹. Insgesamt ähnelt somit die Pathogenese SIV-infizierter Rhesusaffen chinesischen Ursprungs stärker der von unbehandelten HIV-1 Infizierten. Aufgrund der besseren immunologischen Charakterisierung der indischen Rhesusaffen wird jedoch nach wie vor hauptsächlich diese Affenart in Studien eingesetzt.

1.8 Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I beim Rhesusaffen

Wie beim Menschen, so existieren auch beim Rhesusaffen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I, welche mit einem langsameren Krankheitsverlauf assoziiert sind. Während die MHC Klasse I Moleküle des Menschen unter dem Begriff 'HLA' (humanes Leukozytenantigen) bekannt sind, werden die einzelnen MHC Klasse I Moleküle des Rhesusaffen als 'Mamu' bezeichnet. MHC Klasse I Moleküle befinden sich auf der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen. Sie stellen Peptidrezeptoren da, welche in der Lage sind prozessierte zytoplasmatische Peptide mit einer Länge von meist acht bis zehn Aminosäuren zu binden und T-Zellen zu präsentieren. Erkannt werden die gebundenen Antigene von den T-Zellrezeptoren (TCR) der CD8⁺ T-Zellen. Die Bindung der MHCI:Antigen-Komplexe an den TCR aktiviert die zytotoxische T-Zelle, welche daraufhin die Zielzelle, also jene Zelle, welche das Antigen präsentiert hat, lysiert. Nicht jedes prozessierte Antigen wird bei diesem Prozess von jedem MHC I Molekül gebunden. Die MHC I Moleküle besitzen spezifische, genetisch determinierte Eigenschaften die das Repertoire an Antigenen, welche vom MHC Klasse I Protein gebunden werden können, beschränken. Auf die besondere Bedeutung der CD8⁺ T-Zellen während der HIV/SIV-Infektion, und im besonderen Maße während der akuten Phase, wurden bereits in Abschnitt 1.6.1 hingewiesen.

Im Bezug auf die genetisch Vielfalt besitzen Rhesusaffen ein im Vergleich zum Menschen größeres Repertoire an MHC Klasse I Molekülen, welches durch Genduplikationen, Deletionen und Reorganisationsprozesse entstanden ist⁴⁰². Während im Menschen pro Haplotyp lediglich ein HLA-A, -B oder -C Gen exprimiert wird, findet man beim Rhesusaffen bis zu drei exprimierte Mamu-A und maximal 19 exprimierte Mamu-B Gene pro Haplotyp⁴⁰²⁻⁴⁰⁶. Dabei können die verschiedenen Mamu-A/-B Gene eines Haplotypen unterschiedlich stark expri-

SIV Protein	Aminosäuresequenz	Epitopbezeichnung
Env	CAPPGYAL	Env_CL8
	CAPPGYALL	Env_CL9
	SSPPSYFQT	Env_ST9
	TVPWPNASL	Env_TL9
Gag	LAPVPIPF	Gag_LF8
	LSPRTLNAW	Gag_LW9
	QNPIPVGNI	Gag_QI9
	CTPYDINQM	Gag_CM9
Pol	SGPKTNIIV	Pol_SV9 ₆₉₂
	QVPKFHLPV	Pol_SV9
	STPPLVRLV	Pol_SV9 ₆₂₁
	LGPHYTPKIV	Pol LV10
Tat	TPESANL	Tat_TL8
Vif	QVPSLQYLA	Vif_QA9
Vpx	IPPGNSGEETI	Vpx_II11

Tabelle 1. SIVmac239-spezifische Mamu-A*01 Epitope, identifiziert mittels ELISpot. Darstellung aus Allen *et al.* (2001)⁴¹⁶.

miert werden, sodass eine Einteilung in *major* und *minor* Transkripte möglich ist⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁹. Die Expression kann hierbei extrem niedrig sein und im Bereich von 1% (gemessen an den *major* Transkripten) liegen. Diese unterschiedliche Expressionsstärke ist in diesem Maße ebenfalls nicht beim Menschen zu finden.

Der Mamu-Typ A*01 ist im Rhesusaffen mit einem verlangsamten Krankheitsverlauf assoziiert und unter allen bekannten Mamu-Typen am besten untersucht⁴¹⁰⁻⁴¹³. Er gehört zu der Gruppe der Mamu-A Allele mit hoher Transkriptionsrate (*majors*)⁴¹⁴, dessen protektive Wirkung mit großer Wahrscheinlichkeit auf der spezifischen Bindeeigenschaft basiert. So konnte gezeigt werden dass die CTL-Antwort Mamu-A*01 positiver Tiere hauptsächlich von Epitopen stimuliert wird, welche an Mamu-A*01 binden⁴¹⁵. Gleichzeitig ist das Mamu-A*01 Molekül in der Lage mindestens 14 unterschiedliche Epitope zu binden und damit eine breite CTL-Antwort in Gang zu setzen⁴¹⁶. Die identifizierten Epitope sind in Tabelle 3 dargestellt⁴¹⁶. Neben Mamu-A*01 existieren weitere Mamu-A und -B Allele, welche in der Lage sind die SIV-Infektion zu kontrollieren und den Krankheitsverlauf zu verlangsamen, zum Beispiel Mamu-B*08, -B*17 oder B*29^{410,411}.

1.9 Attenuierte SI- und HI-Viren

Als 'attenuiert' bezeichnet man Viren, welche im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp-Virus eine verringerte Virulenz besitzen. Die Attenuierung der Viren kann durch unterschiedliche Maßnahmen erreicht werden, wie zum Beispiel eine *in vitro* Kultivierung der Viren über einen längeren Zeitraum, die Kultivierung der Viren in wirtsfremden Zellen oder molekularbiologische Veränderungen wie die Deletion verschiedener Bereiche des viralen Genoms. Da attenuierte Viren trotz der im Vergleich zu den Wildtyp-Viren geringeren Virulenz einen langanhaltenden Immunschutz im Wirt induzieren, eignen sich diese Viren als Impfstoff.

Im Fall von HIV wurde früh über den Einsatz von attenuierten Viren, welche zuvor erfolgreich zur Immunisierung gegen zum Beispiel Pocken, Polio oder Masern eingesetzt wurden, nachgedacht. Einer der ersten Molekularklone eines attenuierten SI-Virus wurde 1989 beschrieben. Hierbei handelte es sich um ein Virus isoliert aus Rhesusaffen des 'New England Regional Primate Research Center' (NERPRC) mit der Bezeichnung SIV_{mac1A11}, welches im untersuchten Zeitraum von sieben Monaten in intravenös (i.v.) infizierten Rhesusaffen nicht zur typischen Immundefizienz führte⁴¹⁷. Gleichzeitig konnten Antikörper, darunter auch neutralisierende, im Blut der Affen detektiert werden. Knapp ein Jahr später folgte die Veröffentlichung des ersten Impfversuchs basierend auf diesem Molekularklon⁴¹⁸. Die der Belastung vorangegangene Infektion der Rhesusaffen mit SIV_{mac1A11} führte jedoch zu keinem protektiven Schutz. Lediglich der Krankheitsverlauf wurde durch die Impfung verzögert. In späteren Untersuchungen, bei denen sowohl die Infektionsroute als auch die Menge an eingesetztem Virus verändert wurden, konnte eine protektive Wirkung des attenuierten SIV_{mac1A11} nachgewiesen werden⁴¹⁹. Die Ursache für die Attenuierung des Virus, Veränderungen in der Gensequenz von Env, Nef und Vpr, wurde 1992 veröffentlicht⁴²⁰.

Im gleichen Zeitraum erschien eine weitere Publikation, die Ergebnisse zur Infektion von Rhesusaffen mit attenuiertem SIV_{mac239} Virus präsentierte⁴²¹. Die Grundlage für die Attenuierung dieses Virus waren Veränderungen im *nef* Gen, darunter ein Molekularklon mit internem Stop-Kodon (SIV_{mac239} *nef*-stop) sowie ein Klon mit einer

182 bp umspannenden Deletion (SIV_{mac239} Δ nef). Es konnte gezeigt werden, dass das Nef-Protein *in vitro* entbehrlich ist und keinerlei Einfluss auf die Virusreplikation besitzt. Das Fehlen des Proteins *in vivo* führte jedoch zu verminderten Viruslasten im Blut von Rhesusaffen und zum Ausbleiben jeglicher pathologischer Veränderungen⁴²¹.

Aufgrund der geringen Gefahr von Reversionen wurde der SIV_{mac239} Δ nef Moleklarklon in späteren Experimenten als Impfvirus eingesetzt. Als erste Infektionsstudie zu diesem Virus wurden die Ergebnisse von Daniel und Kollegen publiziert⁴²². Hierbei wurden die mit dem Δ nef Virus infizierten Affen aus dem zwei Jahre zuvor durchgeführten Versuch von Kestler⁴²¹ mit Wildtyp SIV_{mac239} bzw. Wildtyp SIV_{mac251} belastet. Bei allen belasteten Affen (n = 4) konnte keine Infektion nachgewiesen werden.

Die Resultate dieser ersten Versuche von Marthas^{418,419} sowie Daniel und Kollegen^{421,422} legten den Grundstein für zahlreiche weitere Untersuchungen mit attenuierten SI-Viren. Bei den Versuchen wurden verschiedene Parameter bezüglich deren Einfluss auf die protektive Wirkung der attenuierten Viren hin überprüft. So gilt es heute als bewiesen, dass der Grad der Attenuierung der Impfviren das Ausmaß des Schutzes direkt beeinflusst und stark attenuierte Viren einen deutlich geringeren Schutz vermitteln^{423,424}. Die für den Schutz notwendige Inkubationsdauer attenuierter Viren konnte auf 21 Tage reduziert werden⁴²⁵⁻⁴²⁷, wobei die Dosis an eingesetztem Impfvirus ebenfalls den Schutz und den Infektionsverlauf beeinflusst⁴²⁸. Schutz zeigen geimpfte Tiere zudem nicht nur gegenüber freiem Virus, sondern auch gegenüber einer Infektion mit infizierten Zellen⁴²⁹. Dabei ist der Schutz nicht auf eine bestimmte Infektionsroute beschränkt^{430,431} und auch gegenüber Belastungen mit heterologen Viren wirksam⁴³¹⁻⁴³³.

Die Zusammenhänge zwischen Attenuierung, Schutz und pathogenem Potential lässt die Verwendung attenuierter Viren als Vakzine jedoch unrealistisch erscheinen. Zwar vermitteln leicht attenuierte Viren einen ausreichenden Schutz gegenüber Infektionen mit Wildtypviren, sie sind jedoch gleichzeitig, aufgrund der nur geringfügigen Änderung im genetischen Material, besonders anfällig für Reversionen und damit unbrauchbar als Vakzine⁴³⁴⁻⁴³⁸. Die Chance, die attenuierte SI-Viren bieten, liegt jedoch auf anderer Ebene: der Identifikation schutzvermittelnder Korrelate. Der Schutz, den attenuierte Viren induzieren, gilt als der effektivste unter allen bisher getesteten Vakzinen. Keine der bisher getesteten Vakzinen erreichte einen vergleichbaren Wirkungsgrad. Würde es gelingen die entsprechenden Korrelate, die für den durch attenuierte SI-Viren aufgebauten Schutz verantwortlich sind, zu identifizieren, so könnten diese Erkenntnisse für die Konzeption und das Design entsprechender Impfstoffe verwendet werden^{439,440}.

Bisher jedoch ist die Grundlage für den Schutz attenuierter SI-Viren nicht eindeutig aufgeklärt. In Betracht kommen zum einen immunologische Faktoren oder Parameter, welche vom Impfvirus bestimmt werden und bei denen das Immunsystem nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ein solcher Parameter ist zum Beispiel die Infektion wichtiger Zellreservoirs, die durch das attenuierte Impfvirus besetzt und so gegenüber nachfolgenden Infektionen (Superinfektionen) resistent werden⁴⁴¹.

Auf immunologischer Seite sind in der Vergangenheit bereits einige Faktoren ausgeschlossen worden. So sind neutralisierende Antikörper in verschiedenen Studien nachweislich nicht für den Schutz vakzinierter Affen verantwortlich^{425,431,442-445}. Zytotoxische T-Zellen scheinen in einigen Studien für den beobachteten Schutz verantwortlich zu sein^{430,446-448}, wobei auch hier Untersuchungen mit gegenteiliger Aussage existieren⁴⁴⁹. Ein direkter Einfluss unterschiedlicher Zytokine, ausgeschüttet durch Lymphozyten, konnte ebenfalls nicht festgestellt werden⁴⁵⁰.

Bisher durchgeführte Studien mit unterschiedlich stark attenuierten SI- und HI-Viren schließen meist einen auf neutralisierenden Antikörpern basierenden Schutz aus.

Die vielversprechenden Ergebnisse der ersten Untersuchungen mit attenuierten SI-Viren förderten die Isolierung bzw. Generierung weiterer attenuierter Molekularklone und deren Untersuchungen im Tiermodell. Basierend auf dem Molekularklon SIV_{mac239} entstanden Klone mit unterschiedlich langen Deletionen in *nef*, *vpr*, *vpu* sowie dem *negative regulatory element* (NRE) bzw. 3'-LTR.

Ein vielfach in Studien verwendeter Molekularklon wurde 1995 von Almond und Kollegen isoliert⁴²⁹. Bei diesem als SIV_{mac} C8 Klon bezeichneten Klon basiert die Attenuation auf einer 12 bp langen Deletion im *nef* Gen, welche innerhalb des *open reading frame* (ORF) liegt. Die Deletion führt somit zu einem um vier Aminosäure verkürzten Nef-Protein. Die mit diesem Virus vakzinieren Langschwanzmakaken (n = 8) zeigten während einer 39 bis 49 Wochen später erfolgten Belastung mit zellfreiem (n = 4) bzw. zell-assoziierten Virus (n = 4) allesamt eine sterile Immunität. Dieser Schutz konnte auch dann aufgebaut werden, wenn der Zeitraum zwischen Vakzinierung und Belastung deutlich verkürzt wurde, wie die Studien von Norley (1996) sowie die Studie von Stebbings (2004) zeigten^{425,427}. Beide Studien schlossen Antikörper-basierte Immunantworten als Grund für die beobachtete sterile Immunität aus.

Während der 1995 durchgeführten Studie konnten nur geringe Titer neutralisierender und bindender Antikörper in den vakzinieren Tieren detektiert werden⁴²⁹. Diese Titer erschienen, auch im Vergleich zu anderen Studien⁴⁵¹, zu gering um eine Begründung für den beobachteten Schutz zu sein. Die schnelle zeitliche Folge von Impfung und Belastung in der Studie von Norley und Stebbings, bei der lediglich zehn bzw. drei Wochen zwischen der Infektion mit dem C8 Virus und der Belastung mit SIV_{mac} J5 lagen, war zu kurz damit entsprechende Antikörper in den Tieren gebildet werden konnten⁴²⁷. Hinzu kamen Untersuchungen, bei denen Serum von geschützten SIV_{mac} C8 infizierten Tieren auf naive Tiere (n = 2) übertragen wurde. Keines der Tiere, denen ein Tag später SIV_{mac} J5 appliziert wurde, war gegenüber der Belastung geschützt⁴⁵². Und letztendlich zeigten auch Studien, bei denen chimäre SIV Klone als Belastungsvirus verwendet wurden, dass eine auf dem Env Protein basierte humorale Immunantwort als Ursache für den Schutz nicht in Frage kommt⁴³⁰.

Die Klone SIV_{mac239} Δ2, SIV_{mac239} Δ3 und SIV_{mac239} Δ4 stellen unterschiedliche stark attenuierte SI-Viren dar, wobei der Attenuierungsgrad vom Δ2 Virus bis zum Δ4 Virus zunimmt (Δ2 < Δ3 < Δ4). Der als Δ3 bezeichnete Molekularklon besitzt zwei große Deletionen von 101 und 172 bp innerhalb des *vpr* Gens und der 3'-LTR. Von der 3'-LTR-Deletion sind sowohl das *nef* Gen als auch das NRE betroffen, weshalb dieser Molekularklon trotz

lediglich zweier Deletionen einen dreifach deletierten Klon darstellt⁴⁵³. Die Studien von Wyand und Kollegen, welche dieses Virus als Impfvirus verwendeten, zeigten einen im Vergleich zum C8 Virus deutlich reduzierten Schutz, der abhängig von der Inkubationsphase des Impfvirus war⁴²⁴.

Neben SI-Viren wurden auch attenuierte HI-Viren erzeugt, die im Schimpansenmodell auf deren Schutzwirkung hin untersucht wurden. Zwei dieser Impfviren waren die Isolate HIVΔ3 und HIVΔ4, welche HIV-1 HXB2 Viren mit Deletionen in *vpr*, *nef*, *vpu* und 3'-LTR darstellen. Gegenüber der Belastung mit HIV-1 IIIB konnte bei Verwendung dieser stark attenuierten HI-Viren keinerlei protektiver Schutz festgestellt werden. Die Studie zeigte jedoch, dass ein mit pNL4-3 Wildtyp Virus infizierter und mit HIV-1 IIIB belasteter Schimpanse (n = 2) geschützt war.

Die meisten Impfstudien basierend auf attenuierten SI- bzw. HI-Viren schließen humorale Immantworten als Hauptgrund für die beobachtete sterile Immunität der Rhesusaffen und Schimpansen weitgehend aus. Somit rücken zunehmend zelluläre Immunantworten, wie zytotoxische T-Zellen (CTLs), und Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen (Abschnitt 1.10), in den Vordergrund.

Phase	Studienobjekt	Studienziel	Anzahl Teilnehmer	Zeitraum
Phase 0 (prä-klinische Phase)	verschiedene Modelltiere wie z. B. Mäuse, Hasen oder auch Rhesusaffen	Bestimmung der Effektivität der Vakzinkandidaten im Tiermodell. Hierzu zählen unter anderem Screeningstudien.		
Phase I	Menschen mit meist geringem Risiko einer HIV-Infektion.	Evaluierung der Sicherheit der Vakzinkandidaten. Gleichzeitig können Vakzindosis, Administrationsroute und Verstoffwechslung in dieser Phase ausgetestet werden.	20-100	12-18 Monate
Phase II	Menschen mit unterschiedlichem Risiko gegenüber der Infektion mit HIV.	Validierung der Sicherheit der Vakzine sowie der Administrationsschema. Erste Untersuchungen zur Induktion der entsprechenden Immunantworten können durchgeführt werden (Effektivität der Vakzinkandidaten).	mehrere Hundert	bis zu 2 Jahre
Phase III	Menschen mit hohem Risiko sich mit HIV zu infizieren.	Effektivitätsstudie zur Bestimmung des Vakzinschutzes.	Tausende	3-5 Jahre
Phase IV		Studien zur Sicherheit, Effektivität sowie Dosis und Administration. Phase IV Studien werden nach der Zulassung initiiert.		

Tabelle 2. Phasen klinischer Studien. Es existieren vier Phasen klinischer Studien (I-IV), wobei die Phase IV Studien betrifft, welche bereits nach der Zulassung erfolgen. Die Phasen II und III lassen sich durch die Zusätze a und b weiter unterteilen. Klinische Studien der Phase IIa sind initiale Studien zur Effektivität (Pilotstudien). Phase IIb Studien bezeichnet man auch als Schlüssel- oder Zulassungsstudie (*pivotal trial*). In dieser Phase wird die Effektivität der Vakzine nachgewiesen, wobei dies noch nicht mit Probanden geschehen muss, die die spätere Anwendergruppe (Patientengruppe) darstellen. Phase IIIa umfasst die ersten Effektivitätsstudien in der späteren Patientengruppe. Zusätzlich können spezielle Patientengruppen einbezogen werden (sekundäre Erkrankungen, chronische Leiden etc.). In die klinische Phase IIb fallen Studien, die der weiteren Datenerhebung dienen.

1.10 Ein Blick über attenuierte Viren hinaus:

Bisherige Ansätze der HIV-Impfstoffentwicklung

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden insgesamt sechs HIV-1 Impfstudien der klinischen Phase IIb bzw. III beim Menschen durchgeführt (Tabelle 2 und 3). Den ersten beiden dieser Studien, welche im Jahr 1998 gestartet wurden, gingen zahlreiche Studien der Phasen I und II sowie Studien in Affen und anderen Modelltieren voraus. Begleitet wurden all diese Studien von drei unterschiedlichen, sich ablösenden Bestrebungen und Paradigmen: (1) der Annahme, dass eine auf der humoralen Immunantwort basierten Vakzine ausreichenden Schutz vor einer Infektion mit HIV vermittelt, (2) der Meinung, dass einzig das zelluläre Immunsystem in der Lage sei, protektiv gegenüber einer Infektion zu wirken, und (3) dem heute gültigen Paradigma, dass Komponenten sowohl des humoralen als auch zellulären Immunsystems für den Schutz vor einer HIV-Infektion notwendig sind. Zu den Studien, die den entsprechenden Paradigmenwechsel einleiteten, gehören die ersten Tierstudien von 1987^{454,455}, die Ergebnisse der VaxGen Studien 2003^{456,457} sowie das Ergebnis der STEP Studie 2007⁴⁵⁸.

Studie	Jahr	Vakzine	Phase	Versuchsgruppe	Ort	Ergebnisse
Vax004	1998-2003	AIDSVAX B/B gp120 in alum	III	MSM sowie Frauen mit erhöhtem Risiko (z. B. Prostituierte)	USA, Europa	keine Wirksamkeit der Vakzine nachgewiesen
Vax003	1999-2003	AIDSVAX B/E gp120 in alum	III	IDUs	Thailand	keine Wirksamkeit der Vakzine nachgewiesen
HVTN 502	2004-2007	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef B	IIb	MSM sowie heterosexuelle Frauen und Männer	USA	keine Wirksamkeit der Vakzine nachgewiesen höhere Infektionsraten innerhalb der vakzinieren Personengruppe aufgrund negativer Interimsergebnisse abgebrochen
RV144	2003-2009	ALVAC-HIV vCP1521 und AIDSVAX B/E rgp120 in alum	III	diverse Risikogruppen	Thailand	31,2% Wirksamkeit nach 42 Monaten, 60% nach 12 Monaten der Vakzinierung keine Wirksamkeit auf VL (Plasma) oder CD4 ⁺ Zellzahl
HVTN 503	2007-2007	MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef B	IIb	heterosexuelle Frauen und Männer	Südafrika	keine Wirksamkeit der Vakzine nachgewiesen aufgrund negativer Interimsergebnisse von HVTN 502 sowie 503 abgebrochen
HVTN 505	2009-2013	DNA sowie rAd5 (A, B, C)	IIb	MSM mit einem Antikörper-Titer von < 1:18 gegenüber Ad5	USA	keine Wirksamkeit der Vakzine nachgewiesen aufgrund negativer Interimsergebnissen abgebrochen

Tabelle 3. HIV-1 Impfstudien der Phase IIb und III, durchgeführt bis zum Jahr 2013. Verändert nach Excler *et al.* (2014)⁵⁷⁷.

Die ersten Tierstudien von 1987 zeigten, dass das Oberflächenprotein von HIV-1, appliziert entweder in Form eines das gesamte Env-Protein umfassenden gp160 oder lediglich die Oberflächenkomponente gp120, in der Lage ist die Bildung von HIV-spezifischen Antikörpern zu induzieren^{454,455}. Zusammen mit dem Wissen über existierende Impfstoffe führte diese Erkenntnis zu der Meinung, dass Antikörper für den Schutz vor einer HIV-Infektion ausreichend sind. Neben rein Protein-basierten Vakzinen wurden Vektor-basierte Vakzinen und attenuierte SI-Viren in unterschiedlichen Impfreimen getestet.

Die ersten Tests Protein-basierter Vakzinkandidaten wurden zum Großteil unter Verwendung von Laborstämmen durchgeführt. Zwar zeigten die Studien, dass die Vakzinen sowohl sicher als auch immunogen waren, die Tatsache jedoch, dass zwischen laboradaptierten Virusstämmen und Primärisolaten beachtliche genetische Unterschiede bestehen⁴⁵⁹, führte zum vorläufigen Stopp dieser Studien. Erst 1998 erreichte die bereits früh entwickelte Vakzine der Firma VaxGen die klinische Phase III (Tabelle 2). Die Ergebnisse dieses bivalenten gp120 Impfstoffs mit dem Namen AIDSVAX wurden 2003 veröffentlicht. In beiden Wirksamkeitsstudien (Vax003 und Vax004, Tabelle 3) wurde deutlich, dass der Impfstoff keinerlei Einfluss auf die HIV-Infektion hat^{456,457}.

Vektor-basierte Vakzinen bieten gegenüber Protein-basierten Vakzinen den Vorteil, dass hier die Präsentation der Antigene auf gleichem Wege wie bei natürlichen Infektionen verläuft. Anfängliche Versuche wurden unter Verwendung des Vacciniavirus als Vektor durchgeführt und zeigten, dass es nach der Impfung zur Induktion HIV-spezifischer CTL-Antworten kommt⁴⁶⁰. Im Gegensatz zu den Protein-basierten Vakzinen kam es jedoch nicht zur Bildung HIV-spezifischer Antikörper⁴⁶⁰. In der Folge wurden deshalb beide Strategien, Protein- und Vektor-basierte Vakzinkandidaten, in Form eines sogenannten *Prime-Boost*-Regime miteinander kombiniert. Das Ziel: sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunantwort gegen HIV zu generieren.

Während Vektor-basierte Vakzinkandidaten häufig zum *Priming* eingesetzt wurden, dienten Proteine dem darauf folgenden *Boost*. Wie zuvor prognostiziert kam es zur Bildung HIV-spezifischer Antikörper sowie spezifischer CD8⁺ T-Zellen^{461,462}. Die Verwendung viraler Vektoren als Grundlage eines Impfstoffes ist jedoch nicht unproblematisch. Zum einen ist die Verwendung von replizierenden Vektoren in immunsupprimierten Personen kontraindiziert, da mit Krankheitsausbrüchen zu rechnen ist. Zum anderen birgt die Verwendung viraler Vektoren die Gefahr, dass sich in Personen, welche bereits in Kontakt mit dem als Vektor verwendeten Virus gekommen sind und in dessen Folge bereits Immunantworten gegen dieses Virus (Vektor) gebildet haben, kein ausreichender Schutz gegen die eigentlichen Impfantigene etablieren kann. Während die Sicherheit der Vektoren durch die Verwendung von attenuierten Viren als Vektoren weitestgehend reduziert werden kann, spielen vorherrschende Seroprävalenzen gegenüber den Vektoren nach wie vor eine wichtige Rolle.

Als Ersatz zum Vacciniavirus kamen attenuierte Pockenviren wie der New York-Stamm des Vacciniavirus (NYVAC), das modifizierte Vaccinia Ankara Virus (MVA) oder aviäre Pockenviren (Canarypoxvektoren, wie zum Beispiel der unter dem Handelsnamen ALVAC bekannte Vektor) zum Einsatz^{463,464}. In unterschiedlichen Studien waren alle diese Vektoren in der Lage HIV-spezifische CTL- sowie Antikörperantworten zu induzieren.

Eine weitere Gruppe an viralen Vektoren, die bei der Übertragung und Expression von Antigenen bei Vakzinen besondere Beachtung gefunden haben, sind Adenovirusvektoren. Eigentlich entwickelt für die Genübertragung bei auf genetischen Defekten basierenden Krankheiten induzieren diese Vektoren eine breite und potente Immunantwort. Diese Eigenschaft, nachteilig bei der Heilung genetischer Defekte, machte sie zu besonders attraktiven Hilfsmitteln bei der Impfstoffentwicklung⁴⁶⁵. Im Jahr 2001 veröffentlichte die Firma Merck und dessen Mitarbeiter die erste Studie zu Adenovirusvektoren im Rhesusaffen⁴⁶⁶. Der von Merck bis zu dieser Zeit besonders erfolgreich getestete Vektor war ein Adenovirusvektor basierend auf dem humanen Adenovirus 5, welcher im Vergleich zu Pockenvirusvektoren oder reinen DNA-Vakzinen bessere humorale und zelluläre Immunantworten generierte^{467,468}. Im Jahr 2005 wurde die auf diesem Vektor basierende Vakzine (MRKAd5 HIV-1 gag/pol/nef) innerhalb einer Studie der klinischen Phase IIb getestet: der sogenannten STEP Studie. Bei dieser Studie handelte es sich um eine Wirksamkeitsstudie, bei der der Schutz der Vakzine in Gebieten bestimmt werden sollte, in denen die Prävalenz des HIV-1 Subtyps mit dem bei der Vakzine verwendeten Subtyps übereinstimmt (Subtyp B, homologe Schutzwirkung). Zur Testung der heterologen Schutzwirkung wurde die gleiche Vakzine Anfang 2007 in Südafrika (hohe Prävalenz des HIV-1 Subtyps C, Phambili Studie) eingesetzt. Beide Studien wurden Ende 2007 aufgrund negativer Zwischenergebnisse vorzeitig beendet, bei denen innerhalb der Impfgruppe eine erhöhte Infektion mit HIV-1 festgestellt wurde^{458,469–471}.

Neben den replikationskompetenten Vektor-basierten Vakzinkandidaten traten mit den ersten Ergebnissen von 1989 auch attenuierte SI-Viren in den Fokus der Impfstoffentwicklung (vgl. Abschnitt 1.9)^{417–419,422}. Auch diese Viren replizieren in abgeschwächter Weise aktiv im Organismus, induzieren humorale und zelluläre Immunantworten und in geimpften Tieren einen Schutz der, je nach Grad der Attenuation, bis zur sterilen Immunität reichen kann. Gestützt wurde diese Beobachtung zusätzlich durch die Entdeckung einer Patientengruppe, der 'Sydney Blood Bank Cohort' (SBBC), deren Mitglieder sich über Blutprodukte mit einem attenuierten HI-Virus infizierten und keinerlei Anzeichen einer Pathogenese aufwiesen⁴⁷². In darauffolgenden Experimenten mit Rhesusaffen konnte jedoch gezeigt werden, dass es auch im Fall einer Infektion mit attenuiertem SIV zur Ausbildung von AIDS kommt^{434,436}. Und auch bei Patienten der SBBC zeigten sich im späteren Verlauf Anzeichen einer beginnenden HIV-Pathogenese⁴⁷³. Aus diesem Grund gelten attenuierte HI-Viren heute als ungeeignet was deren Verwendung als Vakzine anbelangt. Zur Erforschung protektiver Immunantworten sind sie jedoch von großer Bedeutung (vgl. Abschnitt 1.9).

Eine Alternative zu attenuierten Viren bzw. Vektoren stellen DNA Vakzinen dar, bei denen Virusprotein-kodierende Plasmide in die Haut oder den Muskel appliziert werden. Die Expression der Plasmide im Zielgewebe führt zur Bildung der Antigene, die daraufhin das Immunsystem stimulieren können. Die erste Generation an DNA-Vakzinen wurde im Rhesusaffen getestet und war erfolgreich bei der Erzeugung von sowohl zellulären als auch humoralen Immunantworten gegen HIV⁴⁷⁴. Protektive Wirkungen konnten jedoch zunächst nicht festgestellt werden^{475,476}.

Die Steigerung der Wirksamkeit von DNA-Vakzinen wurde seitdem auf unterschiedlichen Wegen versucht. Neben der parallelen Gabe von Zytokinen⁴⁷⁷⁻⁴⁸⁰ wurden unterschiedliche Applikationsrouten sowie *Prime-Boost*-Ansätze ausgetestet⁴⁸¹⁻⁴⁸⁸. Die klinische Phase IIb erreichte bisher lediglich eine der DNA Vakzinen als Teil eines *Prime-Boost*-Regime mit Adenovirusvektor *Boost* (HVTN 505, Tabelle 4). Im April 2013 wurde diese Studie allerdings aufgrund negativer Interimsergebnisse gestoppt⁴⁸⁹.

Die bisher erfolgreichste Wirksamkeitsstudie der Phase III im Menschen war die sogenannte Thai Studie, auch bekannt unter der Abkürzung 'RV144'. Fast gleichzeitig mit der STEP Studie initiiert, wurden die ersten Ergebnisse dieser *Prime-Boost*-Vakzine zwei Jahre nach dem Abbruch der STEP und Phambili Studie veröffentlicht⁴⁹⁰. Die Vakzine stellte eine Kombination zweier bereits bekannter und getrennt voneinander getesteter Vakzinen dar: der ALVAC-HIV vCP1521 Vakzine, einem genetisch veränderten Canarypoxvektor, welcher für das HIV-1 Protein gp120 (Subtyp E) und einem *string*-Peptid bestehend aus dem Transmembranteil des gp41, Gag und Pro kodiert (Subtyp B)^{491,492}, sowie der AIDSVAX B/E Vakzine, einer Mixtur bestehend aus den gp120-Proteinen des Subtyps B und E isoliert aus CHO (*Chinese hamster ovary*) Zellen^{456,457}. Die RV144 Studie umfasste insgesamt über 16.000 Probanden und wurde in Thailand durchgeführt, einem Gebiet mit hoher Prävalenz des HIV-1 Subtyps E. Analysen zeigten für die Vakzine eine Effektivität von 60,5% nach einem Jahr, die jedoch nach dreieinhalb Jahren auf einen Wert von 31,2% sank⁴⁹³.

Neuere Vakzinkonzepte und Vektoren werden derzeit im Tiermodell getestet und berücksichtigen die Erkenntnisse der bis heute durchgeführten und analysierten Studien. Ein Ansatz konzentriert sich hierbei auf die Verwendung von Zytomegalieviren (CMV). Die Hypothese: Vakzinen, welche eine ausreichend große Effektorzellpopulation am Infektionsort hervorrufen, sind in der Lage Viren und virusinfizierte Zellen bereits am Ort der Infektion effektiv zu bekämpfen und können so einen protektiven Schutz vermitteln. Der Versuch mit genetisch veränderten (SIV-kodierenden) CMV Viren des Rhesusaffen schützende Immunantworten zu erzeugen, gelang der Gruppe um Louis Picker im Jahr 2009⁴⁹⁴. Der Vorteil von CMV Viren liegt in deren Apathogenität in immunkompetenten Wirten sowie deren stetiger Replikation im Wirt, welche fortlaufend das Immunsystem stimuliert und so für die Aufrechterhaltung einer stabilen Effektorzellpopulation sorgt. Gleichzeitig besteht bei CMV die Möglichkeit der Superinfektion, wodurch diese Vakzine auch in CMV⁺ Individuen angewendet werden kann⁴⁹⁵⁻⁴⁹⁸.

Ergebnisse einer völlig anderen Impfstrategie, bei der das Ziel nicht darin bestand die Infektion des Wirtes mit SIV/HIV zu verhindern sondern die pathogene Infektion in eine apathogene Infektion umzuwandeln, wurden 2012 veröffentlicht⁴⁹⁹. Die Strategie dieser Studie: regulatorische T-Zellen als Folge der 'Vakzinierung' zu stimulieren, welche die durch die HIV- bzw. SIV-Infektion bedingte Aktivierung des Immunsystems eindämmen und so die Infektion bzw. deren Ausbreitung verhindern. Die Stimulation regulatorischer T-Zellen wurde durch die gleichzeitige Gabe von SIV-Antigenen, in Form von inaktivierten SIV_{mac239} Partikeln, und *Lactobacillus plantarum*, einem natürlich vorkommendem Darmbakterium, erreicht. Die Verwendung von Lactobakterien zur Immunisierung ist dabei nicht neu. So wurden Lactobakterien bereits als Transportvektoren zur Expression von Anti-

genen an mukosalen Oberflächen oder zur Vermittlung von Toleranzreaktionen bei allergischen Reaktionen oder Gastroenteritiden getestet^{500–502}.

Bei 15 von insgesamt 16 intrarektal (i.r.) mit SIV_{mac239} infizierten Rhesusaffen chinesischen Ursprungs führte die intragastrische (i.g.) Impfung mit der Mischung aus inaktivierten SIV-Partikeln und *L. plantarum* zu einer sterilen Immunität. Bei einer intravenösen Infektion mit SIV_{mac239} konnten zwar geringe Mengen an Virus im Plasma von vier Affen (n = 4) detektiert werden, die Viruslast sank jedoch kurz darauf unterhalb des Detektionslimits. Als Korrelate für den beobachteten Schutz bzw. die Kontrolle der Infektion wurden CD8⁺ regulatorische T-Zellen (T_{reg}) identifiziert⁴⁹⁹.

1.11 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist die Aufklärung des Mechanismus, welcher für den Schutz von mit attenuierten SI-Viren infizierten Rhesusaffen verantwortlich ist. Im Fokus hierbei steht die Hypothese zur Besetzung der Zielzellen („kritischer Nischen“)⁴⁴¹ sowie die Hypothese, dass Komponenten des Immunsystems für den Schutz der Tiere verantwortlich sind. Mit Hilfe nicht-nukleosidischer Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs) soll die Replikation eines speziellen, attenuierten SIV Molekularklons, der bei der Infektion verwendet wurde und eine Art Impfvirus darstellt, vor sowie während der Belastung in einigen der geimpften Tiere unterdrückt werden. Die Replikation des Belastungsvirus soll aufgrund der Spezifität der NNRTIs von dem Inhibitor nicht beeinträchtigt werden. Sollte die Replikation des attenuierten Virus einen direkten Einfluss auf den Schutz der Tiere haben, so wie in der Publikation von Sharpe und Kollegen postuliert⁴⁴¹, so sollten die mit dem attenuierten Virus infizierten (vakzinierten) und den NNRTIs behandelten Tiere keinen Schutz vor einer Wildtypbelastung aufweisen. Sollte der Schutz der Affen jedoch nicht durch die Replikation des attenuierten Virus vermittelt werden, so müsste zwischen den geimpften und ART-behandelten sowie den geimpften und ART-unbehandelten Tieren keinerlei Unterschied existieren. In diesem Fall kommen immunologische Faktoren (humorale sowie zelluläre Immunantworten) als Schutzmechanismus in Betracht.

Bei der Analyse humoraler Immunantworten sollen vor allem bindende sowie neutralisierende und die Zellyse induzierende Antikörper untersucht werden, da diese bereits in der Vergangenheit als potentiell schutzvermittelnd identifiziert wurden. So konnte in einer Vielzahl von Studien die protektive Wirkung neutralisierender Antikörper demonstriert werden⁵⁰³⁻⁵⁰⁹. SIV-spezifische IgG Antikörper, welche die Lyse von infizierten Zellen induzieren, sind ebenfalls seit dem Ende der 80er Jahre bekannt und wurden immer wieder im Kontext einer schützenden Immunantwort diskutiert⁵¹⁰⁻⁵¹⁸. Aufgrund unterschiedlicher Studien rückte dieser Arm des Immunsystems in den letzten Jahren wieder verstärkt in den Fokus der Forschung^{519,520}.

Bei der Betrachtung der zellulären Immunantwort sollen vor allem CTL-Antworten im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen. Neben der Analyse SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen sollen unterschiedliche T-Zell-Population näher untersucht und bestimmt werden. Ausgangspunkt dieser Analysen sind Publikationen, bei denen der in immunisierten Rhesusaffen induzierte Schutz auf bestimmte Effektor-T-Zell-Populationen zurückzuführen war^{494,521,522}. Da die zelluläre Immunantwort unter anderem vom MHC Klasse I-Typ der Rhesusaffen abhängt, soll dieser ebenfalls festgestellt werden.

Da Zytokinantworten eine weitere wichtige immunologische Komponente darstellen, sollen diese ebenfalls während dieser Studie analysiert werden. Hierbei soll der immunologisch besonders interessante Zeitraum unmittelbar nach der Belastung mit dem Wildtypvirus im Fokus stehen.

Die geplanten Analysen sollen letztendlich dazu dienen, die Suche nach dem Schutzmechanismus attenuierter SI-Viren näher einzugrenzen und mögliche Immunkorrelate, induziert durch die Infektion mit dem attenuierten Virus, zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen, Bakterien, Reagenzien und Geräte

Zellen	Kulturmedium
C8166	RPMI-1640 mit 300 mg/l Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% fötalem Kälberserum
CEM.NK ^R -CCR5	RPMI-1640 mit 300 mg/l Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 10% fötalem Kälberserum
Rhesus-PBMCs	RPMI-1640 mit 300 mg/l Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 20% fötalem Kälberserum (+ IL-2/ Stimulanz)
humane PBMCs	RPMI-1640 mit 300 mg/l Glutamin, versetzt mit 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 20% fötalem Kälberserum (+ IL-2/ Stimulanz)
Reagenzien für Zellkulturmedien	Hersteller/ Zusammensetzung
DMEM mit 4,5 g/l Glukose	PAA (Velizy-Villacoublay, Frankreich), Katalog Nr. E15-883
RPMI 1640 mit Glutamin sowie Phenolrot	PAA (Velizy-Villacoublay, Frankreich), Katalog Nr. E15-885
100-fach Penicillin/ Streptomycin	PAA (Velizy-Villacoublay, Frankreich), Katalog Nr. P11-010
Fötales Bovines Serum (FBS) Superior	Biochrom AG (Berlin, Deutschland), Katalog Nr. S 0615
Bakterien	Hersteller/ Zusammensetzung
E. coli TOP10	Invitrogen
Reagenzien für die Bakterienkultivierung	Hersteller/ Zusammensetzung
LB-Medium	1% Bacto-Hefe-Extrakt, 1% NaCl in A. bidest, pH 7,0
SOC-Medium	Invitrogen
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kits	Hersteller/ Zusammensetzung
TOPO TA Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), Katalog Nr. 450030
CloneJET PCR Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Katalog Nr. K1232
RNeasy Plus Mini Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland), Katalog Nr. 74134, 74136
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland), Katalog Nr. 12362
Plasmid Mini Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland), Katalog Nr. 12123, 12125
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland), Katalog Nr. 27104, 27106
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Katalog Nr. K0502, K0503
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Katalog Nr. K0691, K0692
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN (Hilden, Deutschland), Katalog Nr. 28704, 28706

MATERIAL UND METHODEN

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit

Applied Biosystems (Foster City, California, USA), Katalog Nr. 4337455, 4337456, 4337457, 4337958

MILLIPLEX MAP Non-Human Primate Cytokine Panel - Premixed 23 Plex

Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA), Katalog Nr. MPXPCYTO40KPX23

MILLIPLEX MAP Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel - Premixed 23 Plex

Merck Millipore (Billerica, Massachusetts, USA), Katalog Nr. PCYTMG-40K-PX23

High Pure Viral RNA Kit

Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland), Katalog Nr. 11858882001

Pierce BCA Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA), Katalog Nr. 23225, 23227

Antikörper

CD8-PerCP Klon SK1

BD Bioscience (Erembodegem, Belgien), Katalog Nr. 345774

CD4-APCCy7 Klon OKT4

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 317418

CD3-A700 Klon SP34-2

BD Bioscience (Erembodegem, Belgien), Katalog Nr. 557917

CD197-BV421 Klon G043H7

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 353207

TNF- α -FITC Klon MAb11

BD Bioscience (Erembodegem, Belgien), Katalog Nr. 552889

IFN- γ -APC Klon 4S.B3

BD Bioscience (Erembodegem, Belgien), Katalog Nr. 551385

CD69-PE Klon FN50

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 310906

CD28-Biotin Klon 15E8

Miltenyi (Bergisch Gladbach, Germany), Katalog Nr. 130-092-955

Streptavidin-PECy7

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 405206

HIV-1 2F5 Antikörper

Polymun Scientific Immunbiologische Forschung GmbH (Wien, Österreich), Katalog Nr. AB001

HIV-1 p24 AG3.0

eigene Produktion (Sanders-Beer *et al.*, 2012)⁵²³

anti-human IgG Anti-Human IgG (γ -chain specific)-Peroxidase antibody produced in goat

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA), Katalog Nr. A6029-1ML

anti-mouse IgG Anti-Mouse IgG (γ -chain specific)-Peroxidase antibody produced in goat

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA), Katalog Nr. A3673-1ML

VSV-G (P5D4)

Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA), Katalog Nr. sc-66180

HA-Tag (6E2)

Cell Signaling (Danvers, MA, USA), Katalog Nr. 2367

myc-Tag Antikörper

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA)

β -Actin Antikörper, monoklonaler anti- β -Actin Antikörper produziert in Maus, Klon AC-74

SIGMA-ALDRICH (St. Louis, MO, USA), Katalog Nr. A5316

LEAF CD28 Antikörper

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 302913

LEAF CD49d Antikörper

BioLegend (San Diego, CA, USA), Katalog Nr. 304309

Verbrauchsmaterialien

complete Protease Inhibitor Cocktail
Tablets in glass vials

Hersteller/ Zusammensetzung

Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland), Katalog Nr. 11697498001, 11836145001

MATERIAL UND METHODEN

Nunc MaxiSorp 96-Loch-Platten, flachboden	affymetrix (eBioscience, San Diego, Kalifornien, USA), Katalog Nr. 44- 2404-21
o-Phenylenediamin Dihydrochlorid (OPD) Tabletten	SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA), Katalog Nr. P1063
Phosphate-Citrat Puffer Tabletten	SIGMA (Saint Louis, Missouri, USA), Katalog Nr. P4809
Wasserstoffperoxid 30 % (100 Vol.)	Merck (Darmstadt, Deutschland), Katalog Nr. 1.07210.1000
Perhydrol EMSURE ISO zur Analyse 25%Schwefelsäure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Rezepte

ACK Puffer

6-fach SDS-PAGE Probenpuffer

2-fach SDS-PAGE Probenpuffer

TAE-Puffer

RIPA-Puffer

PBS

PBS-Milchpulver

PBST

PBST-Milchpulver

Hersteller/ Zusammensetzung

0,15 M Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat, 0,1 mM Ethylendiamin-tetraessigsäure, pH 7,2 bis 7,4, 0,2 µm filtriert

350 mM Tris-Cl/ SDS (pH 6,8), 10% Natriumdodecylsulfat (SDS), 30% Glycerin, 0,6% β-Mercaptoethanol, 0,17 mM Bromphenolblau Natriumsalz, 0,6 M DTT

50 mM Tris (pH 6,8), 1,2% SDS, 30% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 0,026 mM Bromphenolblau Natriumsalz

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,2

1% Nonidet NP-40 1% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 0,15 M Natriumchlorid, 0,01 M Natriumphosphat (pH 7,2), 2 mM EDTA, 50 mM Natriumfluorid, 0,2 M Natriumvanadat

123 mM NaCl, 2,7 mM Kaliumchlorid (KCL), 10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat, 2 mM Kalium-Di-Hydrogenphosphat, pH 7,0

PBS + entsprechender Menge Magermilchpulver (2-5%)

PBS + entsprechendes Volumen Tween-20 (0,05-0,1%)

PBST + entsprechender Menge Magermilchpulver (2-5%)

Geräte

Z2 COULTER COUNTER, Analyzer

BD LSR II

BD FACS Calibur

Stratagene Mx3000P

Stratagene Mx3005P

PCR Cycler PTC-200

Heraeus Multifuge 1S-R

Eppendorf Tischzentrifuge 5415 D

Feinwaage TE

Sub-Cell GT Agarose Gel

Electrophoresis System

Mini-Protean

Electrophoresis

Gene Pulser XCell + Shock Pod

Horizontalschüttler GFL 3016

Hersteller/ Zusammensetzung

Beckman Coulter (Brea, California, USA), Katalog Nr. 6605700

BD Bioscience, San Jose, CA, USA

BD Bioscience, San Jose, CA, USA

Stratagene, (La Jolla, CA, USA)

Stratagene, (La Jolla, CA, USA)

MJ Research, Quebec, Kanada

Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Satorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland

BioRad, Hercules, USA

BioRad, Hercules, USA

BioRad, Hercules, USA

BioRad, Hercules, USA

GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Kryo-Einfrierboxen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Magnetrührer IKA RTC	IKA Labortechnik GmbH, Staufen im Breisgau, Deutschland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA
pH-Meter	Metrohm, Filderstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Pipetus Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Herrenberg, Deutschland
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, USA
Ultrazentrifuge Optima L100K	Beckman Coulter, Fullerton, USA
UV-Transilluminator	BioView, Billerica, USA
Vortex Mixer	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland

Programme und Datenbanken

Antiviral Drug Resistance Analysis (ADRA)

HIV Drug Resistance Database

Immuno Polymorphism Database (IPD)-Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Datenbank

Geneious Pro 5.5.7

FlowJo FACS Software

Stratagene MxPro - Mx3005P v4.10 Build 389, Schema 85

GraphPad Prism 5 for Windows, Version 5.01

BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.0.9.0

FACSDiva Software

Multiwell Plate Manager (MPM) Software

FACSComp Software

CellQuest Pro Software

Hersteller/ Internetadresse

<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ADRA/adra2.html>

<http://www.hivdb.stanford.edu/>

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/>

Biomatters Ltd (Auckland, Neuseeland)

Tree Star, Inc. (Ashland, OR, USA)

Stratagene, (La Jolla, CA, USA)

GraphPad Software, Inc. (San Diego, California, USA)

BD Bioscience (San Jose, CA, USA)

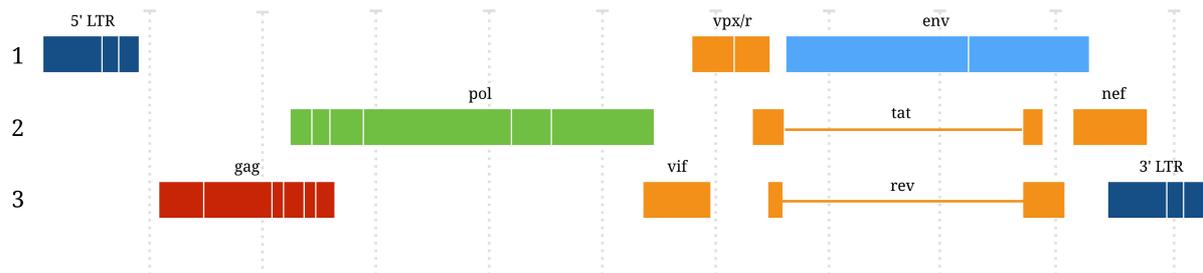
2.2 Impf- und Belastungsvirus

Impfvirus. Als Impfvirus wurde ein auf dem Molekularklon SIV_{mac239} (GenBank M33262) attenuiertes Virus verwendet. Die Attenuation wurde durch eine Deletion im *nef* Gen erreicht. Hierbei handelte es sich um die von Kestler *et al.* beschriebene 182 bp lange Deletion, welche um ein Nukleotid verkürzt wurde (181 bp Deletion)⁴²¹. Die Sensitivität gegenüber Reverse Transkriptase (RT) Inhibitoren wurde durch einen Austausch des RT Gens erreicht. Hierbei wurde die Reverse Transkriptase des SIV_{mac239} Klons durch die des HIV-1 HXBII Klons ersetzt⁵²⁴. Ausgangspunkt der Klonierungsarbeiten war der Molekularklon RT-SHIV, welcher freundlicher Weise von Klaus Überla bereitgestellt wurde. Die Einführung der Δ *nef* Deletion wurde von Oliver Hohn durchgeführt⁵²⁵. Die genetische Karte des Konstruktes ist in Abbildung 6 dargestellt. Die Klonierungsstrategie ist der Arbeit von Hohn zu entnehmen⁵²⁵.

Belastungsvirus. Es wurde eine homologe Belastung mit dem Wildtypvirus SIV_{mac239} (GenBank M33262) durchgeführt (Abbildung 6).

SIV_{mac239} (Belastungsvirus/ Wildtyp)

ORF



RT-SHIV Δ *nef* (Impfvirus/ attenuiertes Virus mit RT-Austausch)

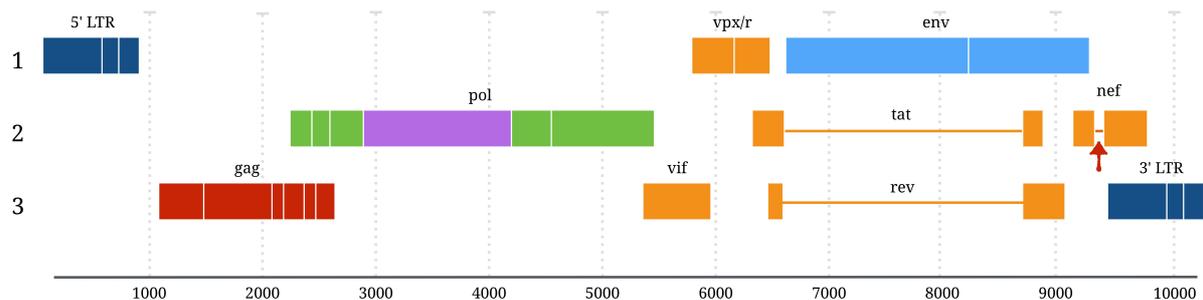


Abbildung 6. Darstellung des Genoms des Belastungsvirus (SIV_{mac239}) sowie des attenuierten Impfvirus (RT-SHIV Δ *nef*). Die beiden Genome unterscheiden sich durch den im RT-SHIV Δ *nef* Virus vorhandenen Austausch des RT-Gens sowie der Deletion in *nef*. Die *nef*-Deletion ist durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Das Gen *gag* (*group-specific antigen*) kodiert für die Proteine der Matrix (p17, MA), des Kapsids (p27, CA), des Nukleokapsids (p7, NC) sowie für die Proteine p2, p1 und p6. Die Proteine Reverse Transkriptase (RT), Integrase (IN) und Protease (PR) werden vom *pol* Gen kodiert. Die genetischen Informationen für Gp120 und gp41 befinden sich im *env* Gen.

2.3 Versuchstiere, Vakzinierung, antiretrovirale Therapie, Belastung sowie Probenentnahme

Haltung der Tiere. Alle Versuchstiere wurden im Versuchstierhaus des Paul-Ehrlich-Instituts (PEI, Langen) entsprechend des geltenden Tierschutzgesetzes (TierSchG) gehalten. Ebenso fanden alle Eingriffe am Tier in den Räumen des PEI statt. Für alle infizierten Tiere galt zudem die Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV).

Infektion der Tiere mit dem RT-SHIV Δnef Virus. Acht der insgesamt 16 Versuchstiere (Rhesusaffe, *Macaca mulatta*) wurden zu Beginn des Versuches mit $2,0 \times 10^6$ TCID₅₀ des attenuierten Virus RT-SHIV Δnef , vorhanden in 1 ml Volumen, intravenös (i.v.) infiziert. Die Anzucht der Viren zur Herstellung des Virusstocks erfolgte in Rhesus-PBMCs.

Antiretrovirale Behandlung. 40 Wochen nach der Infektion erfolgte eine Behandlung von vier der RT-SHIV Δnef infizierten und vier nicht infizierten Tiere mit 4 mg/kg Nevirapin (Viramune®, Boehringer Ingelheim). Die Bestimmung der Nevirapinkonzentration im Plasma der Affen erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC). Aufgrund einer zu geringen Nevirapinkonzentration während der ersten Wochen der antiretroviralen Therapie (ART) wurde die Nevirapingabe in Woche 42 zunächst auf 7 mg/kg erhöht und in Woche 44 auf Efavirenz (Sustiva®, Bristol-Myers Squibb) umgestellt. Die Efavirenztherapie wurde mit einer Dosis von 10 mg/kg begonnen und in Woche 47 auf 20 mg/kg erhöht. Mit der Gabe in Woche 51 wurde die antiretrovirale nach insgesamt 12 Therapiewochen beendet.

Infektion der Tiere mit dem SIV_{mac239} Wildtyp Virus. In Woche 48 wurden alle 16 Versuchstiere mit 100 MID50 SIV_{mac239} inokuliert. Die Inokulation erfolgte intravenös. Die Herstellung des verwendeten Virusstocks bzw. Anzucht der Viren erfolgte in Rhesus-PBMCs.

Blutungen und Probenentnahme. Zur Blut- sowie Gewebeentnahme wurden die Rhesusaffen narkotisiert. Die Zeitpunkte der Blut- und Gewebeentnahmen sind der Abbildung 7 zu entnehmen. Die Blutentnahme erfolgte in BD Vacutainer Röhrchen, welche mit Natriumcitrat (Tri-Natriumcitrat/ Pyridoxal 50-Phosphat/ Tris) als Antikoagulator beschichtet waren.

Aufarbeitung der Blutproben. Nach der Entnahme wurden die Blutproben bis zur Separation (ca. 16 Stunden nach Entnahme) auf Eis gelagert. Die Separation der Blutproben erfolgte mittels Ficoll Histopaque-1077 Hybri-Max (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Das Protokoll der Separation ist in Abschnitt 2.7 wiedergegeben.

Lagerung separierter Blutproben. Nach der Separation von Plasma und Blutzellen (PBMCs) wurden die Proben entweder direkt für sich anschließende Analysen verwendet, oder für spätere Analysen bei -20 bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert. Zellen wurden zu diesem Zweck nach der Zellzahlbestimmung abzentrifugiert, in entsprechenden Aliquots in Cryo-SFM (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) aufgenommen, bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Plasmaproben wurden ebenfalls für anschließende Analysen entsprechend aliquotiert und bei -20 oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Tötung der Tiere. In Woche 64 wurden alle Tiere des Versuchs euthanasiert. Die Euthanasie umfasste zusätzlich eine finale Blutung (siehe Abbildung 7).

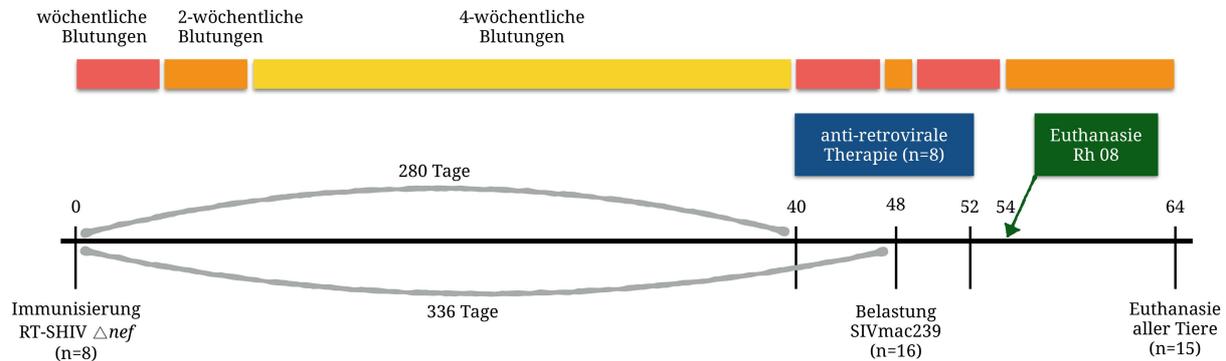


Abbildung 7. Schematische Darstellung des Studiendesigns. Acht der insgesamt 16 Rhesusaffen (*M. mulatta*) wurden zu Beginn der Studie mit dem attenuierten Virus RT-SHIV Δnef infiziert. Nach 280 Tagen (40 Woche) wurden vier der acht RT-SHIV Δnef infizierten Affen und vier Kontrolltiere für insgesamt 12 Wochen mittels NNRTIs behandelt. Während der Behandlung in Woche 48 (366 Tage nach Infektion mit dem attenuierten Virus) wurden alle 16 Versuchstiere mit SIVmac239 belastet. Der Infektionsverlauf wurde für weitere 16 Wochen beobachtet. In regelmäßigen Abständen (wöchentlich, 2-wöchentlich bzw. 4-wöchentlich) wurden Blutproben genommen (Plasma, PBMCs).

2.4 Bestimmungen des viralen Proteins p24

Virustiter wurden mit Hilfe eines p24 Assays in der Einheit ng/ml bestimmt. Der Assay wurde im 96-Loch Format durchgeführt.

p24 Assay. Die Beschichtung der Platten erfolgte mittels 50 μ l pro Loch Ag3.0 Antikörper (eigene Herstellung⁵²³) in Citratpuffer. Dieser wurde entsprechend der zuvor bestimmten optimalen Verdünnungsstufe eingesetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten blockiert (PBS, 2% Milchpulver, 200 μ l pro Loch, eine Stunde bei 37 °C), mit Hilfe von Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen und die Proben auf die Platte aufgetragen. Die Proben wurden zuvor durch 0,2% Tween-20 inaktiviert und eine Verdünnungsreihe erstellt, wobei Blockierlösung (PBS, 2% Milchpulver) für die Verdünnungen verwendet wurde. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe eines p24-Standards erstellt. 50 μ l Probe bzw. Standard pro Loch wurden für eine Stunde bei 37 °C auf der Platte inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und der Primärantikörper (p24 ELISA: 50 μ l pro Loch HIV-1 Pool-Plasma; p27 ELISA: 50 μ l pro Loch SIV Plasma) in der vorher entsprechend getesteten Verdünnung (in PBS, 2% Milchpulver, 0,05% Tween-20) aufgetragen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschriff mit Waschpuffer wurden die Platten mit Sekundärantikörper beschickt (50 μ l pro Loch, anti-human IgG HRP-gekoppelter Antikörper, 1:1.000 Verdünnung in PBS, 2% Milchpulver, 0,05% Tween-20) und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Auch dieser Antikörper wurde anschließend mittels Waschpuffer von den Platten gewaschen. Durch die Auftragung von 50 μ l pro Loch Substrat (100 ml Citratpuffer, pH 5,6, 60 mg OPD, 40 μ l H₂O₂) wurde die Farbreaktion in Gang gesetzt und durch die Zugabe von 12,5 μ l 25% H₂SO₄ gestoppt. Der Farbumschlag wurde am Photometer (MultiScan GO, Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 492 und 650 nm detektiert.

2.5 Bestimmung der Viruskonzentration in Plasmaproben

Isolation viraler RNA aus Plasma. Aus den Plasmaproben wurde virale RNA mit Hilfe des High Pure Viral RNA Kit (Roche, Penzberg, Deutschland) isoliert. Hierfür wurden 800 µl Plasma mit Puffer (inklusive Carrier-RNA) gemischt und auf die entsprechenden Filterröhrchen gegeben. Nach einer Zentrifugation wurden die Filterröhrchen gewaschen und Inhibitoren mit Hilfe eines speziellen Puffers entfernt. Eluiert wurde die im Filter gebundene RNA in 80 µl Elutionspuffer. Die Bestimmung der Viruskonzentration erfolgte direkt im Anschluss an die Isolation viraler RNA. Überschüssige Volumina wurden bei -80 °C gelagert.

Bestimmung der Viruskonzentration. Die Viruskonzentration wurde mittels der quantitativen real-time PCR bestimmt. Hierbei kamen SIV *gag* spezifische Primer (AVF: CTA GTG GTG GAA ACA GGA ACA; AVR: TGT TCT CGG GCT TAA TGG CA) sowie Sonde (AVP: [6FAM] CCA ACA GCA CCA TCT AGC GGC AGA GGT [TAMRA]) zum Einsatz. Die verwendeten Polymerasen sowie Puffer entstammten aus dem QuantiFast RT Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Ein PCR-Ansatz bestand aus: 1-fach QuantiFast RT-PCR Master Mix, 0,2 µM Primer (AVF bzw. AVR), 0,2 µM Sonde (AVP) sowie 0,25 µl QuantiFast RT Mix. Innerhalb des QuantiFast RT-PCR Master Mixes sind bereits eine HotStartTaq Plus DNA Polymerase, RT-PCR Puffer, dNTP Mix sowie Rox (Referenzfarbstoff) enthalten. Der QuantiFast RT Mix besteht aus den beiden RTs Omniscript Reverse Transcriptase und Sensiscript Reverse Transkriptase. Die Durchführung der RT-qPCR erfolgte an einem Stratgene Mx3000 bzw. Mx3005 Cycler mit folgenden Parametern: (1) Schritt der Reversen Transkription (10 Minuten bei 50 °C), (2) Aktivierung der HotStart Polymerase (5 Minuten bei 95 °C), (3) 2-Schritt-Zyklus der Amplifikation (10 Sekunden bei 95 °C, 30 Sekunden bei 60 °C, 40 Zyklen).

2.6 SIV_{mac239} bzw. RT-SHIV Δ*nef* spezifisches PCR Setup

Primersequenz und -bindestellen. Zur Identifikation und Unterscheidung von SIV_{mac239} Wildtyp und RT-SHIV Δ*nef* wurden verschiedene Primer kreiert, welche im Bereich des *nef* Gens binden. Die Unterscheidung zwischen Wildtyp und Δ*nef* Virus konnte auf unterschiedliche Weise gesehen: (1) aufgrund der Länge des amplifizierten Fragments, oder (2) aufgrund des Vorhandenseins bzw. Ausbleibens eines PCR-Produktes (Bindung eines der beiden Primer innerhalb der Deletion). Die Primersequenzen sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Primerbindestellen sind in Abbildung 8 dargestellt. Im Falle von quantitativen real-time PCR-Ansätzen kam zudem eine Sonde zum

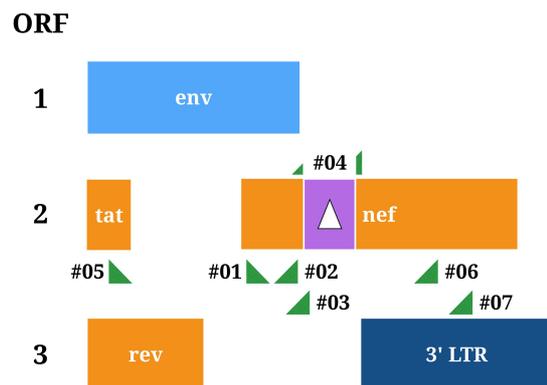


Abbildung 8. Bindungsstellen der Primer zur Identifizierung und Unterscheidung von SIV_{mac239} Wildtyp sowie RT-SHIV Δ*nef*. Primer 1 und 5 stellen *forward* Primer dar, Primer 2-4 sowie 6 und 7 *reverse* Primer.

Einsatz, welche im *nef* Gen bindet (*nef*-Sonde: [6FAM] TCT GGA GAT CTG CGA CAG AGA CTC TT [BHQ1]).

PCR. Zur Detektion von Belastungs- oder Impfvirus wurden Standard-PCR-Reaktionen angesetzt. Diese Ansätze bestanden aus einer gepufferten Lösung (DreamTaq oder Pfu Puffer, beide von Fermentas) mit jeweils 200 µM dNTPs, je 0,2 µM Primern, und 1 U Polymerase (DreamTaq oder Pfu Polymerase, beide von Fermentas). Ein PCR-Zyklus bestand aus den folgenden Einzelschritten: (1) 95 °C für 1 Minute, (2) 53 °C für 1 Minute, und (3) 72 °C für 30-60 Sekunden. Die PCR-Reaktion wurde durch eine Inkubation für 3 Minuten bei 95 °C eingeleitet. Ausgewertet wurde die PCR-Reaktion mittels Agarosegel und GelRed.

Real-time PCR (qPCR). Real-time PCR Ansätze wurden mit der Polymerase AmpliTaq GOLD (Applied Biosystems) angesetzt. Ein Ansatz bestand hierbei aus einer gepufferten Lösung (0,05 M Kaliumchlorid, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM Magnesiumchlorid) versetzt mit jeweils 252 µM dNTPs, je 0,2 µM Primern, 0,2 µM Sonde, und 1 U AmpliTaq GOLD

Polymerase. Einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 8 Minuten folgte der PCR-Zyklus bestehend aus den Schritten (1) 95 °C für 1 Minute, (2) 55 °C für 1 Minute, und (3) 72 °C für 30 Sekunden. Dieser Zyklus wurde 40-50 Mal in einem Stratagene Mx3000 oder Mx3005 real-time Cycler der Firma Agilent Technologies wiederholt. Die Auswertung wurde mittels MxPro Software durchgeführt.

Primer		Sequenz
SIV Δ <i>nef</i> 1	for	AGC TAT TTC CAT GAG GCG GT
SIV Δ <i>nef</i> 2	rev	TCA CAA GAG AGT GAG CTC AA
SIV Δ <i>nef</i> 3	rev	CTG ATT GTA TTT CTG TCC CTC AC
SIV Δ <i>nef</i> 4	rev	AAA TGA GAC ACT GTC C
SIV Δ <i>nef</i> 5	for	CGG TGG CAA CAG CTC CTG GCC TTG GCA GAT
SIV Δ <i>nef</i> 6	rev	GGG TCA TCC CAC TGG GAA GTT TGA GCT GGA TGC
SIV Δ <i>nef</i> 7	rev	CAT AAG TGT AGG CCA GAG TTG GAT C

Tabelle 4. Darstellung der Primer zur Identifikation und Unterscheidung von SIV_{mac239} Wildtyp und RT-SHIV Δ *nef* Viren. Primer 3 überlappt mit dem Genbereich, welcher im RT-SHIV Δ *nef* Virus deletiert ist und erzeugt somit nur Amplifikate des Wildtypvirus. Primer 4 ist eine Verbindung der Gensequenz vor und nach der Deletion des RT-SHIV Δ *nef* und erzeugt nur beim *nef*-deletierten (attenuierten) Virus Amplifikate. Alle anderen Primer erzeugen sowohl beim Wildtyp- als auch beim attenuierten Virus Amplifikate. Die Diskriminierung erfolgt hier über die Fragmentlänge des Amplifikats.

2.7 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen

Die Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurden in einem 50 ml Falcon 15 ml Ficoll Histopaque-1077 Hybri-Max (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit bis zu 20 ml Vollblut überschichtet und für 30 Minuten bei 800 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abgezogen und zelluläre Bestandteile durch eine erneute Zentrifugation für 20 Minuten bei 1600 g entfernt. Periphere mononukleäre Blutzellen wurden in Form des sogenannten PBMC-Ringes, welcher nach der Ficoll-Zentrifugation unterhalb des Plasmas entstand, in ein frisches 50 ml Falconröhrchen überführt, mittels PBS auf 50 ml aufgefüllt und für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Es folgte eine Waschschritt, bei dem die Zellen in PBS resuspendiert und für 10 bis 15 Minuten bei 200 g zentrifugiert wurden. Even-

tuelle Verunreinigungen durch Erythrozyten wurden mit Hilfe von ACK-Puffer (0,15 M Ammoniumchlorid, 10 mM Kaliumhydrogencarbonat, 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure, pH 7,2 bis 7,4, 0,2 µm filtriert) entfernt. Hierfür wurden die isolierten Zellen im Anschluss an den Waschschrift in 20 ml bis 30 ml ACK-Puffer resuspendiert und für maximal 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Volumen mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und die Zellen für 10 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Reinigungsschritt mit 50 ml PBS.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe des Coulter Counter Z2 in einem kleinen Volumen RPMI-1640 Kulturmedium durchgeführt und die Zellen im Anschluss in entsprechenden Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert oder für entsprechende Analysen verwendet.

2.8 Detektion von Provirus mittels Ko-Kultur

Ko-Kultur. Neben der Untersuchung der Plasmaproben mittels real-time PCR zur Bestimmung der Viruslast wurden Ko-Kulturen von isolierten Rhesus-PBMCs mit C8166 Zellen angesetzt. Hierbei wurden $5,0 \times 10^6$ Rhesus-PBMCs mit der gleichen Anzahl an C8166 Zellen gemischt und in Kulturmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 300 mg/l Glutamin) inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Zellen zur Proviruslastbestimmung entnommen. Gleichzeitig wurden die Ko-Kulturen auf das Vorhandensein von Synzytien untersucht und frisches Medium hinzugefügt. Die Kultivierung der Ko-Kulturen wurde bei einem positiven Ergebnis (positiver Nachweis von Provirus), bzw. nach maximal fünf Wochen beendet.

DNA-Isolation. Zur Gewinnung zellulärer DNA wurden die Zellproben zunächst aus den Ko-Kulturen entnommen, mittels PBS gewaschen und als Pellet mittels dreimaligem Einfrieren aufgeschlossen. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellbestandteile in PCR-Puffer (0,05 M Kaliumchlorid, 0,01 M Tris-HCl, pH 8,3, 1,5 mM Magnesiumchlorid), welcher mit 0,2 mg/ml Proteinase K versetzt wurde. Das Lysat wurde für drei Stunden bei 60 °C sowie 40 Minuten bei 95 °C inkubiert. Insgesamt 3 µl des Lysats wurden für den Nachweis proviraler DNA im Lysat verwendet.

PCR. Der Nachweis proviraler DNA erfolgte mittels PCR-Reaktion. Hierfür wurden 3 µl Lysat in gepufferter Lösung aufgenommen und jeweils 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM Primer (SIV Δnef 1 zusammen mit SIV Δnef 6 oder alternative Primerkombinationen, siehe Tabelle 4), und 1 U Polymerase hinzugefügt. Ein PCR-Zyklus bestand aus einem Denaturierungsschritt (eine Minute, 95 °C), einem Annealing- (eine Minute, 58 °C) sowie einem Elongationsschritt (30 Sekunden, 72 °C). Die Analyse der PCR wurde mit Hilfe eines Agarosegels durchgeführt.

Agarosegelelektrophorese. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden mittels Agarosegel der Größe nach aufgetrennt und mittels UV-Transilluminator analysiert. Hierfür wurden Gele mit entsprechenden Agaroseanteilen (1,0 bis 2,0 %) sowie GelRed (10.000-fach GelRed, Biotium, Hayward, CA, USA) angefertigt. Den PCR-Ansätzen wurde vor dem Gelauftrag Ladepuffer (6-fach Ladepuffer, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) hinzugefügt. Je nach Gelgröße wurden entsprechende Spannungen angelegt (70-100 V) und die Fragmente für 45-60 Minuten getrennt (Power Supplies von Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Analyse mittels UV-Transilluminator. Die Analyse wurde durch die Wahl der Primer während der PCR-Reaktion möglich, wobei die amplifizierten Fragmente in jedem Fall nef Fragmente repräsentieren. Die Diskriminierung von Impf- und Belastungsvirus erfolgte über die Fragmentlänge.

2.9 Herstellung von Zelllysaten für anschließende PCR-Analysen

Dieses Verfahren dient der Freisetzung von DNA aus Zellen (Zellkultur) für eine anschließende Analyse mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) bzw. quantitative real-time PCR (qPCR). Die Zellen lagen hierfür in der Regel im 96-Loch Format vor und wurden zunächst abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Anschließend folgte die Lyse der Zellen durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen. Auf den letzten Auftauschritt folgte die Zugabe von 100 µl PCR-Puffer (0,5 M Kaliumchlorid, 0,1 M Tris-HCl, 0,015 M Magnesiumchlorid-Hexahydrat, pH 8,3, 0,45 µm steril filtriert), welcher mit 0,2 mg/ml Proteinase-K (Invitrogen) versetzt wurde, pro Loch sowie eine Inkubation bei 60 °C für drei Stunden, gefolgt von einer Inkubation bei 95 °C für 40 Minuten zur Inaktivierung der Proteinase. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20 °C.

2.10 Mamu-Typisierung

Der Mamu-Genotyp der Rhesusaffen wurde mittels Sequenzierung bestimmt. Ausgangsmaterial waren kryokonservierte PBMCs. Der experimentelle Verlauf bis zur Sequenzierung gliederte sich in folgende Teilschritte: (1) RNA-Isolation mittels RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN), (2) cDNA-Synthese durch Verwendung des RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas), (3) Amplifikation der Mamu-A bzw. Mamu-B Gensequenzen mittels gruppenspezifischer Primer, (4) Aufreinigung und Klonierung der Amplifikate in Vektoren, (5) Transformation von E. coli TOP10 mit den Sequenzierungsvektoren und anschließender Plattenausstrich, (6) Kolonie-PCR zur Identifikation positiver Klone, (7) Minipräparation positiver Klone, und (8) Sequenzierung positiver Klone.

RNA-Isolation. Zu den noch unaufgetauten, kryokonservierten PBMCs wurde der im Kit der Firma QIAGEN (RNeasy Plus Mini Kit) enthaltene Lysepuffer gegeben, wodurch die Zellen bereits während des Auftauens lysiert und RNasen durch die denaturierenden Eigenschaften des Puffer inaktiviert wurden. Die Homogenisierung erfolgte mittels QIAshredder Säulen. Die in den Lysaten enthaltene DNA wurde mittels gDNA Eliminator Säulen entfernt. Anschließend wurden die Lysate auf Silizium-haltige Säulen aufgetragen, welche die RNA binden. Gelöst wurde die RNA im entsprechenden Elutionspuffer, welcher ebenfalls Bestandteil des Kits war.

cDNA Synthese. Mittels des cDNA Synthese Kits der Firma Fermentas (RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit) lassen sich pro Ansatz maximal 5 µg RNA in einzelsträngige cDNA umschreiben. Hierfür wurde die RNA aus der vorangegangenen Isolation mit Oligo (dT)₁₈ Primern gemischt und für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert. Anschließend wurden der im Kit enthaltenen Reaktionspuffer, RiboLock RNase Inhibitor, dNTP Mix sowie die RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugefügt und für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 5 Minuten bei 70 °C.

Amplifikation der Mamu-A/B Gene. Zur Amplifikation der im cDNA Pool enthaltenen Mamu-A bzw. Mamu-B Gensequenzen wurden gruppenspezifische Primer eingesetzt (Mamu-A Primer: GAT GGC GCC CCG AAC CCT CCT CCT GG und GGC CTC GCA GTC CCA CAC AA; Mamu-B Primer: GAT GGC GCC CCG AAC CCT CCT CCT G und GCT TTG CAG AAA GAG ATG CCA GAG)⁵²⁶. Ein PCR-Ansatz bestand aus einer gepufferten Lösung (Pfu Puffer, Fermentas) mit jeweils 200 µM dNTPs, jeweils 0,2 µM Primern, und 1 U Polymerase (Pfu Polymerase, Fermentas). Die Parameter des PCR-Zyklus bestanden aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von einem 30 Mal wiederholten Zyklus bestehend aus den folgenden Einzelschritten: (1) 95 °C für 30 Sekunden, (2) 60 °C für 1 Minute 12 Sekunden, und (3) 72 °C für 2 Minuten 30 Sekunden. Abschließend wurde 10 Minuten bei 72 °C inkubiert.

Aufreinigung der Amplifikate und Klonierung. Die Produkte aus der Mamu-A bzw. Mamu-B spezifischen PCR wurden anschließend über ein Agarosegel auf Basis ihrer Größe kontrolliert und aufgereinigt. Hierfür wurde ein 1,0%iges Agarosegel verwendet, welches GelRed (Biotium) beinhaltet. Positive Banden wurden ausgeschnitten und mittels GeneJET Gel Extraction Kit (Fermentas) extrahiert. Es folgte die Klonierung der Fragmente in einen Vektor, wobei hier zwei unterschiedliche Sequenzierungsvektoren verwendet wurden: pJET1.2 (Fermentas) bzw. pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen). Die Klonierungsreaktion bestand aus den jeweiligen PCR-Fragmenten, den Vektoren und im Falle des pJET1.2 Systems einer zusätzlichen T4 DNA Ligase.

Transformation von E. coli TOP10. 1-2 µl der Ligationsansätze wurden verwendet, um 50 µl elektrokompetente E. coli TOP10 Bakterien zu transformieren. Hierfür wurden die Ligationsansätze zusammen mit den Bakterien in Gene Pulser Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) gegeben und ein entsprechender elektronischer Impuls mittels MicroPulser Elektroporator (Bio-Rad) angelegt. Anschließend wurden die Bakterien nach Zugabe von 400 µl SOB Medium (Invitrogen) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Kleinere Volumina der Bakterienlösung wurden für die Plattenausstriche auf Selektionsplatten (LB-Amp-Agar: 20 g/l Agarose, 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,1 mg/ml Ampicillin) verwendet. Positive Klone konnten nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C analysiert werden.

Kolonie-PCR. Einzelne Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR auf deren Inhalt (Insert, Mamu-A/B) überprüft. Jeweils eine Kolonie wurde zu diesem Zweck in 10 µl ddH₂O resuspendiert und 5 µl für die entsprechende Kolonie-PCR eingesetzt. Die restlichen 5 µl wurden zum Animpfen von Mini-Kulturen (5 ml LB-Amp Medium, 10 g/l NaCl, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,1 mg/ml Ampicillin) verwendet, welche über Nacht bei 37 °C inkubierten. Für die Kolonie-PCR wurde die Taq Polymerase der Firma Fermentas (DreamTaq) verwendet. Ein Kolonie-PCR-Ansatz bestand aus (1)

Minipräparation. Minipräparationen wurden mit Hilfe des GeneJET Plasmid Mini Kits (Fermentas) durchgeführt. Hierbei wurden 3,5 ml der Bakterienkultur für die Minipräparation, 500 µl zur Langzeitlagerung und 1 ml zum Animpfen einer Maxi-Kultur verwendet. Die aus der Minipräparation gewonnene DNA wurde in 30 µl ddH₂O resuspendiert.

Sequenzierung. Alle Sequenzierungen wurde mit Hilfe des BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Sanger-Sequenzierungsreaktion wurde standardmäßig mit einem Kom-

plättvolumen von 10 µl angesetzt. Darin enthalten waren ABI-Reaktionspuffer, 1 µl BigDye v3.1, 0,5 µM Sequenzierungsprimer und 150-300 ng Plasmid-DNA. Das Sequenzierungsprogramm am Thermocycler bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für drei Minuten, gefolgt von insgesamt 25 Zyklen bestehend aus: (1) drei Sekunden bei 95 °C und (2) 10 Sekunden bei 52-60 °C (Primer-spezifisch), und (3) vier Minuten bei 60 °C. Anschließend erfolgte die Reinigung der Sequenzierungsprodukte sowie deren elektrophoretische Auftrennung mittels ABI Prism 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Die Analyse der Sequenzierungen wurde mittels Geneious Software (Biomatters) durchgeführt.

2.11 Detektion antiretroviraler Substanzen in Plasmaproben

HPLC. Der Nachweis antiretroviraler Substanzen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde am Universitätsklinikum Würzburg durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden 1,2 ml Plasmaproben (siehe Abschnitt 2.7) auf Trockeneis versendet.

Biologischer Nachweis. Der biologische Nachweis von antiretroviralen Substanzen in Plasmaproben basiert auf der Infektion von C8166 Zellen durch das HIV-1 HXBII Wildtypvirus im 96-Loch Format. Hierfür wurden zunächst Verdünnungen von Plasmaproben zusammen mit Virusverdünnung, welche zuvor austitriert wurden, auf eine 96-Loch aufgebracht. Das Gesamtvolumen von Plasma und Virus betrug 100 µl. Zusätzlich wurden Standards an retroviralen Inhibitoren (Efavirenz bzw. Nevirapin) angesetzt und ebenfalls zusammen mit Virus in einem Gesamtvolumen von 100 µl auf die Platten aufgetragen. Virus und Plasmen bzw. Standards wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor die Zellen ($2,5 \times 10^4$ Zellen, 100 µl pro Loch) hinzugefügt wurden. Die Platten wurden anschließend für 72 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der dreitägigen Inkubation wurden die Platten für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Durch dreimaliges Einfrieren wurden die Zellen lysiert, wonach pro Loch 100 µl Proteinase-K-haltige Pufferlösung (0,5 M Kaliumchlorid, 0,1 M Tris-HCl, 0,015 M Magnesiumchlorid-Hexahydrat, pH 8,3, 0,45 µM steril filtriert, 0,2 mg/ml Proteinase-K) hinzugegeben und für 3 Stunden bei 60 °C inkubiert wurde. Inaktiviert wurde die Proteinase-K durch eine 40 minütige Inkubation bei 95 °C. Bis zur Durchführung der PCR wurden die Platten bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrationen inhibitorisch wirkender Substanzen in den Plasmaproben wurden mittels qPCR bestimmt. Hierbei diente das HIV-1 *env* Gen als Template (vorwärts Primer: GGA GCA GCA GGA AGC ACT ATG G; rückwärts Primer: CCC CAG ACT GTG AGT TGC AAC A; Sonde: [6FAM] TGA CGC TGA CGG TAC AGG CCA GAC A [BBQ]). Ein PCR-Ansatz bestand aus den folgenden Einzelkomponenten: 3 µl Probe (Template), 1 U AmpliTaq GOLD Polymerase (Applied Biosystems), 0,252 mM dNTPs, 0,2 µM Primer (for/rev) bzw. Sonde und Rox. Es wurden insgesamt 50 PCR-Zyklen durchgeführt, beginnend mit einer initialen Denaturierung für acht Minuten bei 95 °C, gefolgt von dem Zyklus bestehend aus den Schritten: (1) eine Minute, 95 °C, (2) eine Minute, 53 °C und (3) 30 Sekunden, 72 °C.

Auswertung. Für die Auswertung wurden die jeweiligen Ct-Werte unter Verwendung der MxPro Software (Agilent Technologies, Stratagene) bestimmt. Ansätze ohne Inhibitoren gaben hierbei die maximale Konzentration an proviraler DNA an. Ansätze ohne Inhibitoren und ohne aktives Virus (Verwendung von hitzeinaktiviertem Virus) dienten der Bestimmung des oberen Grenzwertes, ab welchem eine Probe als negativ – also ohne jegliche Virusreplikation – gewertet wurde.

2.12 Identifikation von Fluchtmutanten

Proben zur Identifikation von Fluchtmutanten. Für die Analyse von Virusisolaten zur Detektion von Fluchtmutanten wurden Lymphknotenbiopsien der Affen aus der Woche 64 verwendet. Die Entnahme der Gewebeproben ist in Abschnitt 2.3 beschrieben. Nach der Entnahme der Gewebe wurden diese bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gehalten.

Isolation von PBMCs aus Gewebeproben. Die Isolation von PBMCs aus Gewebeproben wurde mit Hilfe des MACS Systems (gentleMACS Dissociator, Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Gewebeproben in Serum-freiem Medium in MACS „C“ Röhrchen gegeben und das bereits vorinstallierte Programm des Herstellers zur Dissoziation von Lymphknotengewebe verwendet. Anschließend wurden die Zellsuspensionen mittels 0,45 µm Zellsieb filtriert und in Kulturmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 300 mg/l Glutamin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) überführt und in diesem bis zur Weiterverarbeitung gelagert bzw. kultiviert.

Ko-Kultur. Ko-Kulturen wurden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 2.8 angesetzt. Die Infektion der Zellen bzw. das Vorhandensein von Virus wurde durch das Auftreten von Synzytien bzw. durch PCR-Analysen (Abschnitt 2.6) bestimmt.

Zellyse und DNA Gewinnung. Die Zellyse der Zellen und die damit verbundene Freisetzung von DNA wurde entsprechend der Darstellungen in Abschnitt 2.9 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Zellaufschluss durch dreimaliges Einfrieren/ Auftauen sowie einen Verdau der im Ly-sat vorhandenen Proteine mittels Proteinase K.

Sequenzierung. Die Sequenzierung der isolierten DNA wurde mit Hilfe der in Tabelle 5 dargestellten Primer durchgeführt. Die Sequenzierungsreaktion wurde wie in Abschnitt 2.10 beschrieben angesetzt und durchgeführt.

Datenanalyse. Die Analyse der Sequenzierungen erfolgte mit Hilfe der Software Geneious (Biomatters) sowie der 'HIV Drug Resistance

Primer		Sequenz
SHIV RT1	for	TAG CCC TAT TGA GAC TGT ACC AG
SHIV RT2	rev	CAA CAG ATG TTG TCT CAG CTC CTC
SHIV RT3	for	GTA GCA TGA CAA AAA TCT TAG AGC CT
SHIV RT4	rev	CTG CTT CTG TAT TTC TGC TAT TAA GTC
SHIV RT5	for	CAC TAA CAG AAG AAG CAG AGC T
SHIV RT6	rev	GAT TCC AGC ACT GAC TAA TTT ATC TAC

Tabelle 5. Darstellung der Primer zur Identifikation von Fluchtmutanten. Durch die Primer können drei sich überlappende Fragmente amplifiziert werden, welche den Bereich zwischen Kodon 60 und 320 der Reversen Transkriptase von HIV-1 (HXB2) umfassen. In diesem Bereich liegen alle bekannten Mutationen, welche zur Resistenzbildung gegenüber Nevirapin bzw. Efavirenz beitragen.

Database' der Stanford Universität. Hierfür wurden zunächst die sich an ihren Enden überschneidenden Gensequenzen zusammengefügt und anschließend mit Hilfe der Datenbank abgeglichen.

2.13 Verstärkung der Infektion mittels Zentrifugation (Spinoculation)

Bei der Infektion von Zellen mittels Zentrifugation wurde sich an das Protokoll von O'Doherty *et al.*⁵²⁷ gehalten. Hierbei wurden $2,0 \times 10^5$ Zellen pro Loch in eine 96-Loch Platte ausgesät und eine entsprechende Menge Virusüberstand hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellkulturplatten für 120 Minuten bei 1.200 g und 25 °C zentrifugiert. Eine zusätzliche Verstärkung der Infektion wurde durch die Zugabe von 8,0 g/ml Polybrene vor der Zentrifugation erreicht^{528,529}. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen mittels Medium gewaschen und entsprechend der sich anschließenden Analyse weiterbehandelt.

2.14 Antikörper ELISA

Durchführung des ELISAs. Zum Beschichten wurden die 96-Loch Platten (Nunc MaxiSorp) zunächst mit 100 µl pro Loch PBS gewaschen und anschließend mit jeweils 50 µl pro Loch des entsprechenden Protein- bzw. Viruslysats in PBS bzw. Carbonatpuffer beschickt, mit Folie verschlossen über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurden die beschichteten Platten dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µl pro Loch Blockierpuffer (PBS, 2% Magermilch) aufgetragen und die Platten bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren dreimaligen Waschschrift (ELISA-Waschpuffer: PBS, 0,05% Tween-20) folgte die Auftragung der Plasmaproben in entsprechenden Verdünnungstufen. Hierbei wurden die Verdünnungen in Probenverdünnungspuffer (PBS, 2% Magermilch) angesetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von einer Stunde bei 37 °C. Nach der Inkubation mit den Plasmaverdünnungen wurde erneut dreimalig mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem mit Meerrettichperoxidase-(HRP)-gekoppelten anti-humanen Ig-spezifischen Sekundärantikörper (1:1.000 Verdünnung, 50 µl pro Loch, Sigma) für eine Stunde bei 37 °C. Im Anschluss wurden die Platten erneut dreimalig mittels ELISA-Waschpuffer gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl pro Loch OPD-Substrat (60 mg Tablette aufgelöst in 100 ml Phosphat-Citrat Puffer plus 40 µl H₂O₂) gestartet und mit Hilfe von 12,5 µl pro Loch 25%iger Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung erfolgte am Photometer (Multiscan GO, Thermo Fisher Scientific) bei 492 und 650 nm.

Austestung der optimalen Proteinkonzentration zur Beschichtung. Für die Bestimmung der optimalen Menge an Protein für das Beschichten der ELISA Platten wurden diese mit unterschiedlichen Verdünnungen an Proteinlysate (Proteinkonzentration im Bereich von 5 bis 10 mg/ml) beschichtet. Bei den Proteinlysaten handelte es sich um naive bzw. mit SIV_{mac239} (Wildtyp) infizierte C8166 Zellen oder Viruspräparationen (reine Viruslysate). Die Durchführung des Antigen-ELISAs entsprach der Darstellung oben.

Herstellung von Antigenlysaten. Während der ELISAs kamen unterschiedliche Antigene zur Anwendung: (1) SIV-Antigene aus Lysaten infizierter Zellen, und (2) reine SIV-Antigene aus Lysaten und Virusüberständen (Überstände infizierter Zellen). Lysate infizierter Zellen wurden hergestellt indem die Zellen zunächst abzenti-

fugiert und mit Hilfe von PBS gewaschen wurden, und anschließend in Radioimmunoprecipitations-Assay-(RIPA)-Puffer (inklusive Roche Complete Proteinaseinhibitoren) aufgenommen und lysiert wurden. Für die Herstellung reiner Viruslysate wurden Überstände infizierter Zellen (C8166) zunächst abgenommen und durch zweimalige Ultrazentrifugation (erster Zentrifugationsschritt diente der Verringerung des Volumens, zweiter Zentrifugationsschritt diente der Reinigung mittels Sucrosegradient) aufgearbeitet. Zum Schluss wurden die Viruspellets in PBS aufgenommen, welchem 0,2% IGPAL zugesetzt wurde.

Bestimmung der Proteinkonzentration. Proteinkonzentrationen wurden mittels Pierce BCA Protein Assay Kit im 96-Loch Format ermittelt. Hierfür wurden jeweils 25 µl eines Standards sowie der zu messenden Probe auf eine 96-Loch Platte aufgetragen. Anschließend wurden 200 µl der BCA Lösung (Lösung A und B im Verhältnis 50:1) hinzugegeben, für 30 Sekunden bei auf einem Orbitalshaker gemischt und anschließend 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vor der Messung der Platte im Photometer (562 nm) wurde die Platte auf Raumtemperatur heruntergekühlt. Alle Misch- und Inkubations- und Messschritte wurden automatisiert am MultiScan GO (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

2.15 Aviditäts-ELISA

Die Aviditäts-ELISAs entsprachen im Aufbau dem in Abschnitt 2.14 dargestellten Protokoll. Die Bestimmung der Avidität erfolgte durch eine zusätzliche Inkubation der bereits mit Antigen und Plasmaprobe behandelten Platten mit Harnstoff (Urea). Hierbei wurde mit PBS-gepufferten Urealösungen unterschiedlicher Konzentration gearbeitet, welche für eine Stunde bei 37 °C auf den Platten belassen wurden. Anschließend wurde die Urealösung von den Platten gewaschen und der ELISA entsprechend Abschnitt 2.14 mit Sekundärantikörper und Färbelösung behandelt. Die Farbreaktion wurde mittels MultiScan GO (Thermo Fisher Scientific) bei 492 und 620 nm detektiert. Die Berechnung des Aviditätsindex (%AI) wurde mit Hilfe der folgenden Formel berechnet⁵³⁰:

$$AI\% = (\text{Signal}_{\text{mit Harnstoffbehandlung}} / \text{Signal}_{\text{ohne Harnstoffbehandlung}}) * 100$$

2.16 Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität

Die Bestimmung der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC) wurde mit Hilfe eines modifizierten 'rapid and fluorometric antibody-dependent cellular cytotoxicity assay' (kurz: RFADCC) durchgeführt⁵³¹. Dieser Assay basiert auf der doppelten Färbung geeigneter, Virus-infizierter bzw. Antigen-beschichteter Zielzellen mittels Membran- und Zytoplasmafarbstoffen. Anschließend werden diese doppelt gefärbten Zielzellen zusammen mit Plasma und Effektorzellen (NK-Zellen) inkubiert. Die Abnahme an doppelt gefärbten Zielzellen (verglichen mit der Abnahme an doppelt gefärbten, nicht-infizierter bzw. beschichteter Zielzellen) entspricht der ADCC-Aktivität des Plasmas.

Durchführung. Als Zielzellen wurden CEM.NK^R-CCR5 eingesetzt, welche mit SIV_{mac251} mittels Spinoculation (siehe Abschnitt 2.13) infiziert und für vier Tage bei 37 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden. Im Anschluss an die Inkubation wurde sowohl das Zytoplasma (CSFE) als auch die Membran (CellVue Maroon,

eBioscience, San Diego, CA, USA) der Zielzellen gefärbt. Insgesamt 4.000 Zielzellen pro Loch wurden zusammen mit den Plasmaproben (1:100-Verdünnung) sowie 200.000 frisch isolierten humanen PBMCs (aus 'buffy coat', siehe Abschnitt 2.7) auf eine 96-Loch Platte aufgetragen und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mittels 0,5 % Paraformaldehyd fixiert und bis zur Analyse am BD Calibur bei 4 °C gelagert.

Analyse mittels Durchflusszytometer. Die Analyse der Proben erfolgte am BD Calibur, die Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe der FlowJo Software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) durchgeführt. Hierfür wurde der Anteil doppelt-positiver bzw. einfach-positiver Zielzellen bestimmt. Die Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität wurde abschließend mit den folgenden Formeln berechnet: (1) Bestimmung des Anteils lysierter Zellen in den Proben (Detektion Membranfärbung-positiver, CFSE-negativer Zielzellen), (2) % ADCC = $\% \text{Lyse}_{\text{mit Plasma}} - \% \text{Lyse}_{\text{ohne Plasma}}$.

2.17 Detektion neutralisierender Antikörper

Durchführung. Zur Detektion neutralisierender Antikörper (nAbs) wurden zunächst Nunc MaxiSorp 384-Loch Platten mittels Ag3.0 Antikörper (eigene Herstellung⁵²³) in Carbonatpuffer über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am Folgetag wurden die 384-Loch Platten mittels PBS gewaschen und durch eine Inkubation von einer Stunde mit 70% Ethanol sterilisiert. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen (PBS), mit den Plasmaproben (10 µl, 1:20 Verdünnung) sowie einem entsprechenden Virusstock (hier: SIV_{mac251}, 20 µl, 1:40 bis 1:87.480-Verdünnung) beschickt, und für eine Stunde bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Anschließend wurden 2.000 Zellen (C8166) pro Well hinzugefügt und dabei das Volumen pro Well verdoppelt. Zellen, Plasma und Virus wurden anschließend für sieben Tage bei 37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach der Inkubation wurden Zellen und Virus durch Zugabe von Tween-20 (0,2% Endkonzentration) lysiert, der Überstand entfernt und die Platten mittels Waschpuffer (PBS, 0,05% Tween-20) gewaschen. Als Primärantikörper wurde gepooltes Plasma HIV-positiver Patienten verwendet, welches zuvor getestet und autitriert wurde. Das Plasma wurde in der entsprechenden optimalen Konzentration und einem Volumen pro Well von 20 µl (Verdünnung erstellt in PBS, 2% Milchpulver, 0,05% Tween-20) eingesetzt und für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Vor und nach der Inkubation (37 °C, 45 Minuten) mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-human IgG HRP-gekoppelter Sekundärantikörper, 1:1000 Verdünnung in PBS, 2% Milchpulver, 0,05% Tween-20, Sigma) wurden die Platten mittels Waschpuffer gewaschen. Detektiert wurden die HRP-gekoppelten Antikörper durch Zugabe von 20 µl Substrat (60 mg OPD (Sigma) gelöst in 100 ml Citratpuffer, pH 5,6 plus 40 µl H₂O₂) pro Loch. Nach erfolgreichem Farbumschlag wurde die Reaktion mit 20 µl 5% H₂SO₄ gestoppt und bei 492 und 620 nm gemessen (MultiScan GO, Thermo Fisher Scientific).

Analyse. Die Neutralisationsaktivität der Plasmaproben wurden über die Berechnung der viralen Titer durchgeführt. Hierfür wurden die viralen Titer bestimmt und die Neutralisation mittels folgender Formel berechnet: Neutralisationsaktivität = $\text{Titer}_{\text{ohne Plasma}} / \text{Titer}_{\text{mit Plasma}}$.

2.18 Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Plasmaproben

Verschiedene Zytokine wurden in den Plasmaproben der Rhesusaffen quantifiziert. Hierfür wurden die Affen zunächst wie in Abschnitt 2.3 geblutet und die Blutproben entsprechend Abschnitt 2.7 aufgearbeitet. Plasmaproben, welche für spätere Zytokinanalysen verwendet werden sollten, wurden entsprechend aliquotiert bei -80 °C gelagert. Vor der Quantifizierung der Zytokine wurden die Proben auf Eis aufgetaut und mittels 0,2% Tween-20 inaktiviert. Bis zur Auftragung auf die Platten wurden die Proben auf Eis gehalten.

Multiplex Assay. Die Zytokinbestimmungen wurden mit Hilfe des Milliplex Map Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel Kits (Millipore) durchgeführt. Hierbei wurden bereits fertig gemischte Beads zur Detektion von insgesamt 23 Zytokinen eingesetzt (siehe Tabelle 4). Zunächst wurden die Platten mittels Assay Puffer äquilibriert und anschließend die Proben bzw. Standards sowie die Serummatrix und die bereits fertig gemischten Antikörperimmobilisierten Beads aufgetragen. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4 °C und 1.000 rpm auf einem Orbitalshaker.

Am Folgetag wurden die Platten zweimalig gewaschen und Detektionsantikörper (Non-Human Primate Cytokine Detection Antibodies, Millipore) hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur und 1.000 rpm auf einem Orbitalshaker inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Detektionsantikörper wurde ohne weiteren Waschschrift direkt das Phycoerythrin-konjugierte Streptavidin (SA) hinzugegeben und für 30 Minuten bei gleichen Einstellungen weiter inkubiert. Anschließend wurden die Platten zweimalig gewaschen und die Beads in 150 µl pro Loch Sheath Fluid für fünf Minuten auf einem Orbitalshaker resuspendiert.

Bead-Name (Analyt)	Bead-Region
anti-G-CSF	18
anti-GM-CSF	14
anti-IFN γ	20
anti-IL-1 β	46
anti-IL-1ra	42
anti-IL-2	33
anti-IL-4	53
anti-IL-5	55
anti-IL-6	57
anti-IL-8	63
anti-IL-10	35
anti-IL-12/23 (p40)	74
anti-IL-13	44
anti-IL-15	37
anti-IL-17A	39
anti-IL-18	78
anti-MCP-1	67
anti-MIP-1 β	73
anti-MIP-1 α	65
anti-sCD40L	38
anti-TGF α	15
anti-TNF α	72
anti-VEGF	76

Tabelle 6. Beads 'Milliplex Map Non-Human Primate Cytokine Magnetic Bead Panel Kits' (Millipore). Darstellung der Beads, welche Bestandteile der bereits fertig gemischten Beads-Lösung sind, sowie Darstellung der entsprechenden Bead-Regionen im Luminex Reader.

Analyse. Die Detektion der Beads wurde mittels Luminex Reader (Bio-Rad) durchgeführt. Es wurden 50 Beads pro Bead Set analysiert. Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration wurde die '5-Parameter Non-Linear Regression Curve-Fitting' (kurz: 5-PL) Methode verwendet.

2.19 Quantifizierung SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Zur Quantifizierung SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden kryokonservierte PBMCs verwendet. Pro Färbung wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen verwendet, welche in 100 μ l FACS-PBS (PBS, 1,0% BSA, 0,1% NaN₃) resuspendiert wurden. Anschließend wurden die Antikörper (CD3-A700, CD4-APC, CD8-PerCP; alle von BD) sowie die Tetramere (Class I iTAg MHC Tetramere, CM9-Peptide, Beckman Coulter) hinzugefügt. Das durch die Antikörper hinzugefügte Volumen wurde zuvor von den 100 μ l FACS-PBS abgezogen, sodass ein Endvolumen von 100 μ l nicht überschritten wurde. Es folgte ein Inkubationsschritt für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen zweimalig mittels 1 ml FACS-PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift erfolgte die Fixierung der Zellen durch Zugabe von 200 μ l FACS-PBS, 0,5% Paraformaldehyd für eine Stunde bei 4 °C. Mittels BD LSR II und FlowJo (Treestar) wurde die Populationsgröße der CD3⁺ CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen bestimmt.

Gatingstrategie. Die Gatingstrategie gliederte sich in die folgenden Schritte: (1) Auftrennung der Zellen im 'Forward Scatter' (FSC) und 'Side Scatter' (SSC), (2) Bestimmung der CD3⁺ T-Zell Population, (3) Auftrennung der CD3⁺ T-Zell Population in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Populationen, und (4) Bestimmung der CD4⁺ Tetramer⁺ bzw. CD8⁺ Tetramer⁺ T-Zellen. Pro Probe wurden mindestens 100.000 Ereignisse im Zytometer eingemessen.

2.20 IFN- γ ELISpot

Die Frequenz der Zellen, welche nach einer Stimulation mit Antigenen Interferon- γ sezernieren, wurden mit Hilfe des IFN- γ ELISpot Assays bestimmt. Hierfür wurden zunächst die Nitrocellulose-Membranen von MultiScreen HTS 96-Loch Platten (Merck Millipore) mittels 70% Ethanol aktiviert. Die Aktivierung wurde mit 15 μ l für nicht mehr als zwei Minuten durchgeführt. Anschließend wurden die Platten sechs Mal mit PBS gewaschen und 250 ng pro Loch des Adsorptionsantikörpers (anti-human/monkey Interferon- γ mAb GZ-4, Mabtech) aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Platten für 30 Minuten mit Komplettmedium (RPMI-1640, 300 mg/l Glutamin, 10% FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin) blockiert. Frisch isolierte Rhesus-PBMCs wurden zunächst für eine Stunde im Inkubator ruhen gelassen und anschließend $2,0 \times 10^5$ PBMCs zusammen mit entsprechenden Antigenen in Kulturmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin, 300 mg/l Glutamin) auf die Platten aufgebracht. Als Positivkontrolle wurde 100 ng pro Loch PWM verwendet. Die Gesamtmenge an eingesetzten SIV-Antigenen betrug 250 ng pro Loch. Zusätzlich wurde 10 U/ml IL-2 eingesetzt. Das Gesamtvolumen pro Loch betrug 150 μ l. Nach einer Inkubation von 18 Stunden bei 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit wurden die Zellen samt Medium von den Platten entfernt und die Platten sechs Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten zusammen mit

100 µl pro Loch biotinyliertem anti-humanen Interferon-γ mAb (7-B6-1, Mabtech) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1 µg/ml (PBS, 0,5% FCS) eingesetzt. Nach der Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper, sowie einem sechsfachen Waschschrift mit jeweils 200 µl PBS, wurde 100 µl Streptavidin-ALP (Konzentration von 1 µg/ml verdünnt in PBS, 0,5% FCS, Mabtech) aufgetragen und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten sechsfachen Waschschrift mit 200 µl PBS wurde pro Loch 100 µl Färbelösung (AP Conjugate Substrate Kit der Firma Bio-Rad: 100 µl NBT, 100 µl BCIP, 400 µl 25 x Puffer und 9,6 ml ddH₂O) aufgetragen. Die Färbelösung wurde je nach Bedingung bis zu einer Stunde auf den Platten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung der Membranen wurde gestoppt, indem die Platten ausgiebig mit ddH₂O gewaschen wurden. Zur Auswertung der Platten wurden die Membranen bei Raumtemperatur getrocknet.

Analyse. Die Auswertung der Platten wurde mit Hilfe des ELISpot-Readers (AID Diagnostika GmbH) durchgeführt.

2.21 Bestimmung der Antikörperspezifitäten

Die Spezifitäten der IgG Antikörper in Plasmaproben der Affen wurden mit Hilfe des Westernblot bestimmt. Hierfür wurden Proteine von SIV mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Durch Inkubation der Membranen mit Plasmaproben, in welchen sich SIV-spezifische Antikörper befanden, und anti-humanen IgG HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers wurden die entsprechenden SIV-Proteine detektiert und so die Antikörperspezifitäten der Plasmen bestimmt.

Herstellung der SIV Proteinlysate. Die Herstellung der Proteinlysate entsprach dem im Abschnitt 2.14 dargestellten Protokoll. Zur Anwendung kamen ausschließlich Lysate hergestellt durch die Lyse infizierter bzw. naiver C8166 Zellen.

SDS-PAGE. Zur Auftrennung der Proteinlysate wurden denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Ein Polyacrylamidgel war zusammengesetzt aus einem 8%igem Trenngel (8% Polyacrylamid, 0,375 M Tris, pH 8,8, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,1% APS, 1 µl/ml TEMED) sowie einem darüber liegenden 5%igem Sammelgel (5% Polyacrylamid, 0,125 M Tris, pH 6,8, 0,1% Natriumdodecylsulfat, 0,1% APS, 1 µl/ml TEMED). Die Proteine wurden in entsprechenden Elektrophoresekammern (Bio-Rad), gefüllt mit SDS-Laufpuffer (Bio-Rad), für circa eine Stunde bei 160 V aufgetrennt.

Westernblot. Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurde auf Nitrocellulosemembranen übertragen. Hierfür wurden die Gele zunächst für 10 Minuten in Transferpuffer (Bio-Rad), versetzt mit 20% Ethanol, equilibriert. Anschließend folgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran im Semi-Dry-Verfahren unter Verwendung von Power Supplies der Firma Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Für die Übertragung wurde eine Spannung von 50 mA für circa eine Stunde angelegt. Im Anschluss wurden die Membranen in PBS mit 5% Milchpulver für eine Stunde blockiert und über Nacht bei 4 °C mit den entsprechenden Plasmaverdünnungen inkubiert. Am Folgetag wurden die Membranen gewaschen (PBS, 0,1 % Tween-20) und mit entsprechenden Se-

kundärantikörpern (anti-human IgG HRP-gekoppelt, 1:2.000 Verdünnung, Sigma) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte nach einem erneuten Waschschrift (PBS, 0,1% Tween-20) mittels Westernblot Detektionsreagenz der Firma Pierce (Pierce ECL Western Blotting Substrate). Die Chemielumineszenz wurde am ChemoCam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH) detektiert.

Austestung der optimalen Proteinmenge. Für die Bestimmung der optimalen Proteinmenge (Zelllysate) zur Bestimmung der Antikörperspezifitäten wurden unterschiedliche Proteinlysateverdünnungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot detektiert (siehe oben). Als Primärantikörper zur Detektion der SIV Proteine wurde eine bekannt SIV-positive Plasmaprobe eingesetzt. Die Proteinkonzentration mit dem optimalen Signal-Hintergrund-Verhältnis wurde anschließend für die Untersuchungen zu den Antikörperspezifitäten verwendet.

Austestung der optimalen Plasmaverdünnung. Auch für die Plasmen wurden zunächst die optimalen Verdünnungen bestimmt. Hiefür wurden die Lysate in der zuvor Bestimmten optimalen Konzentration mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Westernblot wurden unterschiedliche Plasmaverdünnungen als Primärantikörper ausgetestet. Die Vorgehensweise der SDS-PAGE sowie des Westernblot sind dem Absatz oben zu entnehmen. Die Plasmaverdünnung mit dem optimalen Signal-Hintergrund-Verhältnis wurde anschließend für alle weiteren Untersuchungen zur Antikörperspezifität verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Mamu-Typisierung der Rhesusaffen

Da MHC Klasse I Moleküle, welche sich auf der Oberfläche aller kernhaltiger Zellen befinden und Antigene CD8⁺ T-Zellen präsentieren, einen großen Einfluss auf den Krankheitsverlauf nach einer HIV- bzw. SIV-Infektion besitzen, wurden alle 16 Rhesusaffen einer entsprechenden genetischen Analyse unterzogen. Dabei sollten die Genotypen der exprimierten Mamu-A und -B Allele identifiziert werden. Hierfür wurde RNA aus Rhesus-PBMCs isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend sequenziert. Bei der Klonierung in entsprechende Sequenzierungsvektoren wurden Mamu-A bzw. Mamu-B spezifische Primer verwendet. Die Analyse der Sequenzen erfolgte durch einen Abgleich mit der 'Immuno Polymorphism Database' (IPD-MHC) Datenbank.

Die Ergebnisse der Mamu-Typisierung sind in Tabelle 7 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass alle Rhesusaffen bezüglich ihres Mamu-A-Genotyps stark homogen waren. Bei allen Tieren ließ sich das stark exprimierte Mamu-A*01 Allel nachweisen, welches mit einem langsamen Krankheitsverlauf assoziiert ist. Für alle weiteren Mamu-A Allele, die bei den Tieren nachgewiesen werden konnten, ist kein besonderer Einfluss auf den Krankheitsverlauf nach SIV_{mac239} Infektion bekannt.

Betreffend des Mamu-B-Genotyps erschienen die unterschiedlichen Rhesusaffen deutlich heterogener. Hier ließen sich keine Allele finden, die mit einem schnelleren oder langsameren Krankheitsverlauf verbunden sind.

Rhesus	Mamu-A	Mamu-B	
01	*01	*12	
02	*01	*04	*07 *72
03	*01	*04	*47 *67
04	*01	*04	*47 *57
05	*01	*04	*56 *68
06	*01	*02	*02 *58
07	*01		*05 *29
08	*01	*02	*68
09	*01		*07 *98
10	*01		*38 *74
11	*01	*03	*07 *13
12	*01		*36 *45
13	*01		*02
14	*01	*04	*30 *56
15	*01		*02
16	*01		*38 *58

Tabelle 7. Mamu-Typisierung der Rhesusaffen. Zur Bestimmung des Mamu-Typs wurde RNA aus den Rhesus-PBMCs isoliert, in cDNA umgeschrieben und über eine Klonierung in einen Sequenzierungsvektor vereinzelt. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Mamu-A bzw. Mamu-B spezifischen Primern durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte durch einen Abgleich mit der IPD-MHC Datenbank. Allele mit protektiver Wirkung (langsamerer Krankheitsverlauf nach SIV_{mac239} Infektion) sind kursiv dargestellt. Allele, die mit einem schnelleren Krankheitsverlauf assoziiert sind, konnten nicht detektiert werden.

ERGEBNISSE

Gruppe	Symbol	Rhesus	RT-SHIV Δnef	ART	SIVmac239
			Impfphase: 0-48 wpi	40-51 wpi*	Belastungsphase: 48-64 wpi
Impfgruppe	A	Rh 01-04	+	+	+
	B	Rh 05-08	+	-	+
Kontrollgruppe	C	Rh 09-12	-	+	+
	D	Rh 13-16	-	-	+

Tabelle 8. Bezeichnung der Rhesusaffen der Studie. Affen der Gattung *Macaca mulatta* (Indische Rhesusaffen) wurden in vier Gruppen mit je vier Tiere aufgeteilt. Die Tiere der Gruppe A und B wurden in Woche 0 mit dem RT-SHIV Δnef Virus infiziert ('vakziniert'). Beide Kontrollgruppen (C und D) blieben zu diesem Zeitpunkt noch unbehandelt. In den Wochen 40 bis einschließlich 51 wurden die Tiere der Gruppe A und C mit Nevirapin bzw. Efavirenz (NNRTIs, ART) behandelt. Alle Tiere wurden schließlich in Woche 48 mit dem Wildtypvirus belastet. * 4 mg/kg Nevirapin (40-42 wpi), 7 mg/kg Nevirapin (42-44 wpi), 10 mg/kg Efavirenz (44-47 wpi), 20 mg/kg Efavirenz (47-51 wpi).

3.2 Immunisierungsphase: Infektion mit RT-SHIV Δnef

Mittels real-time PCR und Kokultur konnte die erfolgreiche Infektion aller Rhesusaffen der Impfgruppen A und B mit dem RT-SHIV Δnef Virus nachgewiesen werden.

Drei bis vier Wochen nach Infektion der Tiere der Gruppe A und B (Rh 01 bis Rh 08, Tabelle 8) mit dem RT-SHIV Δnef Virus konnte Virus im Plasma aller Tiere nachgewiesen werden, was einer erfolgreichen Infektion entspricht. Die nachgewiesene Viruslast war jedoch in allen Fällen äußerst gering und überschritt nur knapp das Detektionslimit (Abbildung 9). Bereits sechs Wochen (Min = 4 w, Max = 13 w) nach dem ersten Nachweis viraler RNA im Plasma lag die Viruslast wieder unterhalb des Detektionslimits.

Aufgrund der geringen Replikation des Virus und der damit verbundenen schlechten Nachweisbarkeit im Plasma wurden zusätzlich bei jeder Abnahme Kokulturen der isolierten PBMCs mit C8166 Zellen angesetzt (1:1-Verhältnis). Das Impfvirus konnte so, analog zum Nachweis mittels real-time PCR, zu Beginn der Studie in

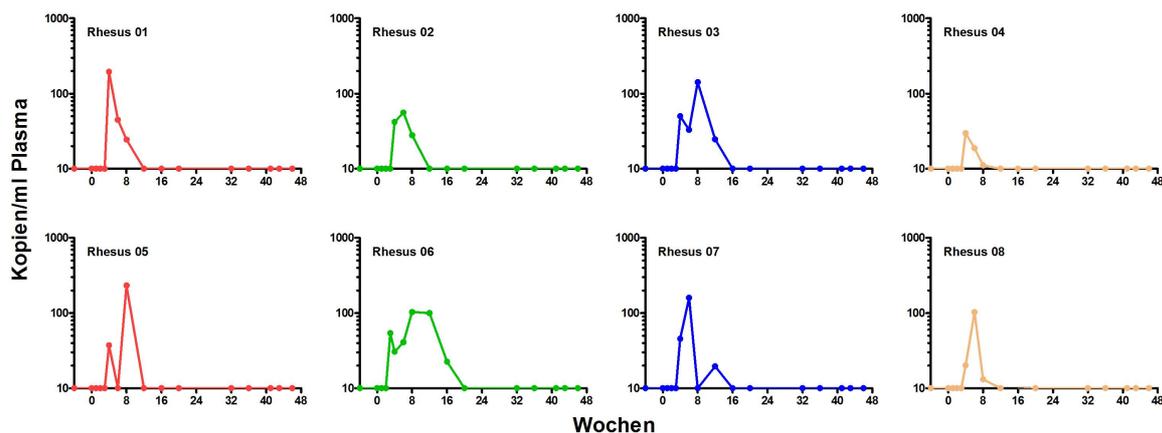


Abbildung 9. Bestimmung der Viruslast in den Tieren 01 bis 08 nach Infektion mit dem Impfvirus RT-SHIV Δnef (0-46 wpi). Dargestellt sind die Viruslasten ausgedrückt in virale Kopien pro ml Plasma (logarithmische Skalierung). Die Bestimmung viraler RNA erfolgte mittels reverser Transkriptions-real-time PCR (RT-qPCR) in einem Schritt.

allen Affen der Gruppe A und B detektiert werden. Jedoch auch mit dieser Methode verschwand das positive Signal in der zweiten Hälfte der Impfphase.

SIV-spezifische Antikörper lassen sich nach der Infektion mit dem RT-SHIV Δnef Virus in allen vakzinierten Tieren nachweisen.

Die ersten SIV-spezifischen IgG Antikörper traten vier Wochen nach Infektion mit dem Impfvirus (Min = 4 wpi, Max = 6 wpi) in beiden Impfgruppen auf (Abbildung 10). Darauffolgend konnte ein Anstieg der Antikörperkonzentration festgestellt werden, dem sich eine stabile Phase, die bis zur Belastung der Affen in Woche 48 reichte, anschloss (Tabelle 9). Dieses Grundmuster der Antikörperantwort war bei allen Affen zu beobachten, während sich der Titer der IgG Antikörper zwischen einzelnen Affen unterschied.

Die Rhesusaffen 02, 04 und 07 zeigten zusammen die stärksten Antikörperantworten (Median = \log_{10} 23.061, Min = \log_{10} 10.580, Max = \log_{10} 85.236) gemessen an der Menge vorhandener IgG Antikörper im Plasma zwischen den Wochen 25 und 48, gefolgt von den Affen 01, 03 und 05 (Median = \log_{10} 3.300,5, Min = \log_{10} 1.117, Max = \log_{10} 9.629). Die geringste Menge an Antikörpern innerhalb der Impfphase (Woche 25 bis 48) wiesen die Affen 06 und 08 auf (Median = \log_{10} 543,5, Min = \log_{10} 81, Max = \log_{10} 3.534).

SIV-spezifische IgG Antikörper gegen das RT-SHIV Δnef Virus sind zum Ende der Impfphase gegen Env und Gag gerichtet.

Zur Bestimmung der Spezifität der IgG Antikörper wurden Westernblotanalysen durchgeführt, bei denen SIV-Protein in Form von mit SIV_{mac239}-infizierten C8166 Zelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVDF) übertragen wurde. Zur Detektion der SIV-Proteine wurde das Affenplasma in zuvor ausgetesteten Verdünnungen eingesetzt (Abbildung 11). Die in der Impfphase nachgewiesenen SIV-

Rh	Titer SIV-spezifischer IgG Antikörper			Avidität SIV-spezifischer IgG Antikörper*			Titer neutralisierender Antikörper		
	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min
01	2252	4862	1117	24,5%	47%	16%	37	81	10
02	18305	62054	10580	32%	45%	20%	185	729	36
03	2547	7564	1246	25,5%	42%	20%	12	47	10
04	29699	61075	9733	33,5%	44%	24%	421	2878	140
05	5694	9629	886	31%	37%	24%	81	320	27
06	648	2349	144	30%	56%	20%	10	36	10
07	17907	85236	646	18,5%	28%	15%	320	959	16
08	383	3534	73	31,5%	56%	17%	10	16	10

Tabelle 9. Untersuchungen der humoralen Immunantwort vor der Belastung der Affen 01 bis 08. Dargestellt sind die Ergebnisse IgG bindender Antikörper und ihrer entsprechenden Aviditäten sowie die nachgewiesenen Titer neutralisierender Antikörper für die Affen 01 bis 08 im Zeitraum von Woche 16 bis 48 nach Infektion mit dem Impfvirus RT-SHIV Δnef . * %AI = (Signal mit Urea / Signal ohne Urea) * 100

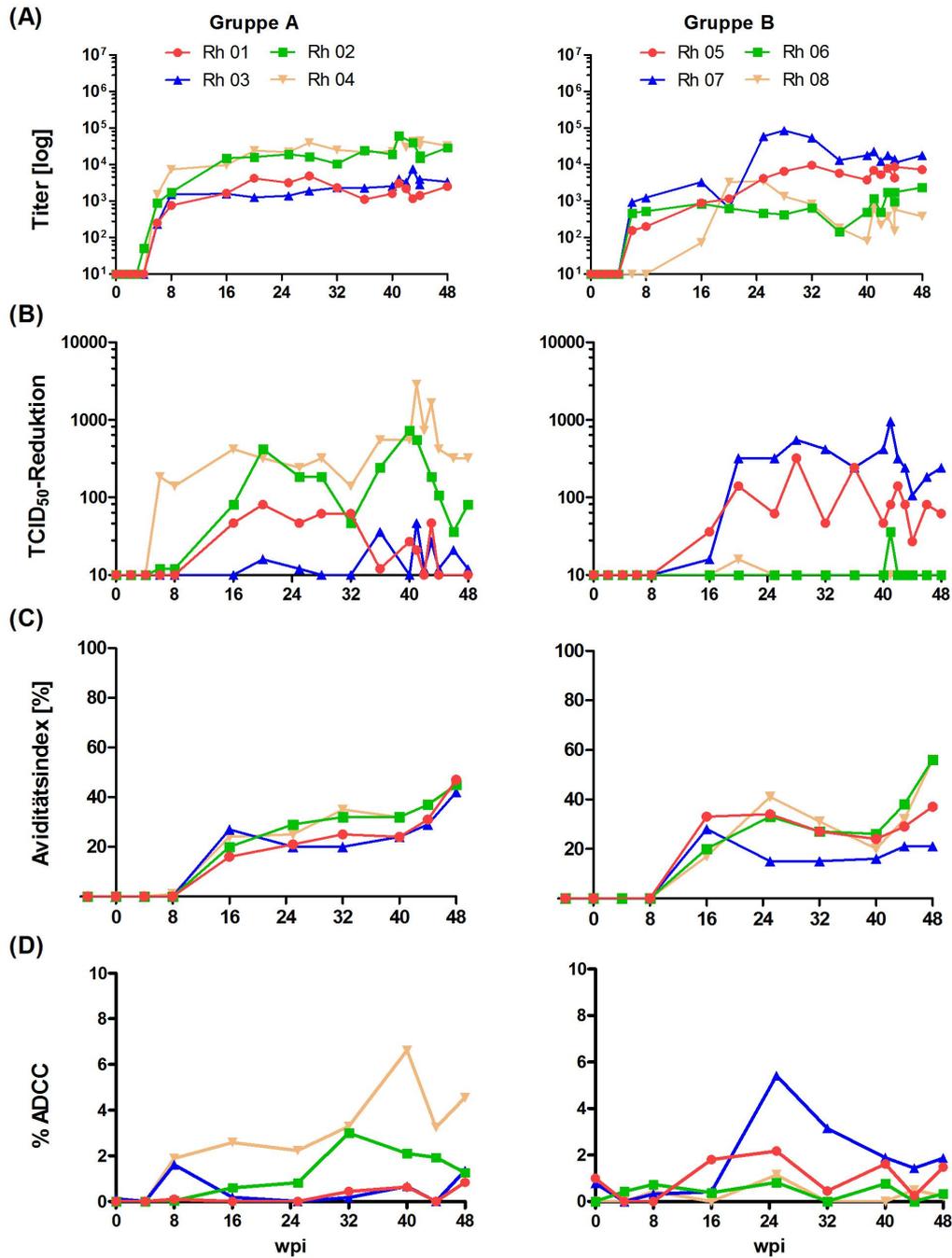


Abbildung 10. Antikörper-basierte Immunantworten der Affen Rh 01 bis Rh 08 während der Immunisierungsphase von Woche 0 bis Woche 48. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Plasmaanalysen aus der Immunisierungsphase (0-48 wpi). Gezeigt sind die Ergebnisse der Analyse bindender IgG-Antikörper (A), SIVmac251-neutralisierender Antikörper (B), zur Analyse der IgG-Antikörperavidität (C) sowie der Fähigkeit der Antikörper die Zelllyse zu vermitteln (D). Die Darstellung der Ergebnisse des gesamten Studienverlaufs (0-64 wpi) sind im entsprechenden Ergebnisteil zu finden (Abschnitt 3.4).

spezifischen IgG Antikörper konnten in sieben von acht Affen das Oberflächenprotein Env detektieren (Tabelle 12). Das Gag Protein p27 wurde ebenfalls durch das Plasma von sieben von acht Affen detektiert. In der Summe war die Antikörperspezifität zum Zeitpunkt der Belastung somit auf Proteine von *env* und *gag* beschränkt. Keines der Tiere zeigte hier eine breite Spezifität. Für Rhesus 08 konnten keine Antikörper gegen SIV mit dieser Methode nachgewiesen werden.

Zeitversetzt zur Entstehung SIV-bindender IgG Antikörper kommt es zur Antikörperreifung, welche durch einen Anstieg der Antikörperaviditäten gekennzeichnet ist.

Während Antikörper zu Beginn einer Infektion zunächst eine geringe Avidität zu ihren Antigenen besitzen, kommt es im Laufe der Infektion zur sogenannten Antikörperreifung, bei der die Bindungsstärke der Antikörper zu ihren Antigenen zunimmt. Dies ließ sich auch bei den Affen nach der Infektion mit dem RT-SHIV Δnef Virus feststellen (Tabelle 9, Abbildung 10). Auch hier besaßen die ab Woche 8 aufkommenden Antikörper im Plasma der Tiere zunächst schwache Aviditäten. Zwischen Woche 8 und 16 (Median = 16 wpi) nach Infektion traten die ersten Aviditätssteigerungen auf. Von Woche 25 bis 40 nach Infektion blieb die Avidität der Antikörper auf einem stabilen Wert von im Mittel 25,5% (Min = 15%, Max = 41%).

Neutralisierende Antikörper konnten während der Impfphase im Plasma aller Tiere der Impfgruppen nachgewiesen werden.

Die Bestimmung neutralisierender Antikörper im Plasma der Rhesusaffen erfolgte über die Messung der 50% *tissue culture infectious dose* (TCID₅₀) bzw. der Reduktion selbiger in Anwesenheit des Rhesusplasmas.

So konnte im Plasma aller Affen der Gruppen A und B neutralisierende Antikörper detektiert werden (Tabelle 9, Abbildung 10). Fünf der acht Affen zeigten bis zur Woche 8 neutralisierende Antikörper im Plasma, welche

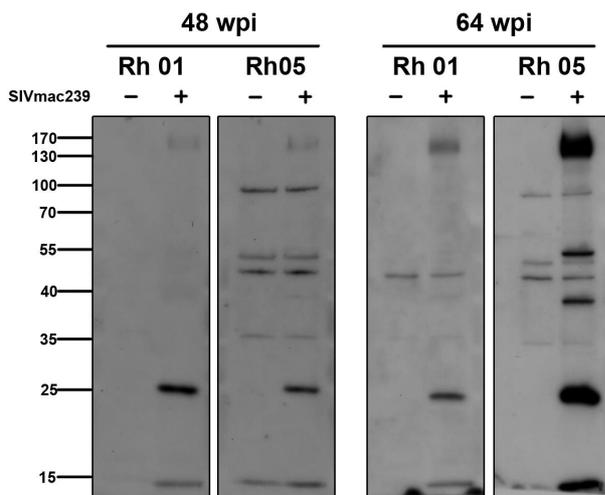


Abbildung 11. Bestimmung der Spezifität Virus-spezifischer IgG Antikörper im Plasma der Affen 01 und 05 zum Zeitpunkt der Belastung (48 wpi) sowie 16 Wochen nach Belastung (64 wpi). Diese Abbildung zeigt beispielhaft für die Affen Rh 01 sowie Rh 05 das Ergebnis zur Analyse der IgG-Antikörper-Spezifität. Mit Hilfe aufgetrennter SIV-Proteine (SDS-PAGE), welche auf eine Membran übertragen (Westernblot) und mit Affenplasma inkubiert wurden, konnte die Spezifität der IgG-Antikörper bestimmt werden (siehe Abschnitt 2.21). Als SIV-Proteinquelle diente Lysat von mit SIVmac239 infizierten C8166 Zellen (SIVmac239⁺). Der Hintergrund wurde mittels Lysat nicht-infizierter C8166 Zellen bestimmt (SIVmac239⁻).

mit Ausnahme von Rhesus 01 in allen Fällen während der gesamten Impfphase nachweisbar blieben. Im Falle von Rhesus 01 fiel die Messung in den Wochen 42, 44 und 48 negativ aus.

Für Rhesus 03 und Rhesus 08 konnten erste neutralisierende Antikörper in Woche 16 detektiert werden. Rhesus 03 zeigte im weiteren Verlauf der Impfphase immer wieder Zeitpunkte, an denen keinerlei neutralisierende Antikörper detektierbar waren. Für Rhesus 08 stellt die Messung in Woche 16 sogar die einzige dar, bei der neutralisierende Antikörper detektiert wurden.

Im Plasma des Rhesusaffen Nummer 06 konnten neutralisierender Antikörper erst in Woche 41 nachgewiesen werden. Diese sehr späte Entwicklung neutralisierender Antikörper war bereits in der darauffolgenden Messung in Woche 42 wieder verschwunden. Bis zur Belastung in Woche 48 zeigte dieser Affe keinerlei neutralisierender Antikörper mehr.

Neben bindenden und neutralisierenden IgG Antikörpern ließen sich außerdem Antikörper im Plasma der Affen der Gruppen A und B detektieren, welche in der Lage waren die Zelllyse zu induzieren.

Antikörper können neben ihrer Aktivität zur Virusneutralisation auch noch die Fähigkeit zur Induktion der Lyse infizierter Zellen besitzen. Hierfür binden IgG Antikörper an Antigene, die auf den Oberflächen infizierter Zellen exprimiert werden. Der konstante Fc-Anteil der Antikörper kann in der Folge von NK-Zellen gebunden werden. Die gebundene NK-Zelle wird aktiviert und lysiert im Anschluss die mit den Antikörpern markierte Zelle.

Die Untersuchungen des Rhesusplasmas wurden mit Hilfe von CEM.NK^R-CCR5 Zellen durchgeführt, einer NK-Zelllinie, welche in Abwesenheit entsprechender Antikörper resistent gegenüber der Lyse durch NK-Zellen ist. Diese Zellen wurden durch Spinokulation mit SIV_{mac239} infiziert, gefärbt und anschließend mit Plasma und frisch isolierten PBMCs inkubiert. Als Negativkontrolle dienten nicht-infizierte Zielzellen.

Die Rhesusaffen 01, 03, 06 und 08 zeigten vor der Belastung (0-48 wpi) nur eine äußerst geringe ADCC-Aktivität von maximal 1,6% (Tabelle 9, Abbildung 10, 12). Dieser Maximalwert wurde zudem nur bei einer einzigen Probe bestimmt. Teilweise lag die Fähigkeit der Antikörper die Lyse infizierter Zellen zu vermitteln bei 0%.

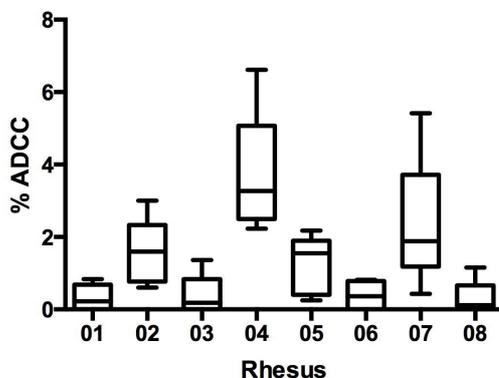


Abbildung 12. Vergleich der ADCC-Antwort in den Tieren der Gruppen A und B vor der Belastung mit dem Wildtypvirus (0-48 wpi). Dargestellt ist der Median sowie das 5 und 95% Perzentil aller Messpunkte im Analysezeitraum. Die Berechnung der Messpunkte erfolgte durch die auf Seite 58 dargestellten Formel.

Eine mittlere ADCC-Aktivität zeigte das Plasma der Affen 02 und 05, mit einem Maximum von 3,0%. Die höchste ADCC-Aktivität des Plasmas konnte in den Affen 04 und 07 detektiert werden. Hier wurden Werte von maximal 6,62% detektiert.

Während bindende und in den meisten der Affen auch neutralisierende Antikörper zum Zeitpunkt der Belastung im Plasma der Tiere vorhanden waren, zeigten Rhesus 01, 06 und 08 kaum ADCC-vermittelnde Antikörper zu diesem Zeitpunkt (% ADCC in allen drei Tieren unter 1%). Die stärkste Antwort von über 4% zeigte das Plasma von Rhesus 04 zum Zeitpunkt der Belastung (48 wpi).

Im Blut aller vakzinierten Affen ließen sich zum Zeitpunkt der Belastung IFN- γ sezernierende T-Zellen nachweisen.

Die zelluläre Immunantwort wurde während der Studie unter anderem mit Hilfe des Interferon- γ (IFN- γ) ELISpot Assay gemessen. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte Rhesus-PBMCs in mit anti-IFN- γ Antikörpern beschichtete Zellkulturplatten gegeben und mittels Peptidpools (15-mere) stimuliert. Die Detektion des von den PBMCs sezernierten und von den anti-IFN- γ Antikörpern gebundenem IFN- γ gelang mittels BCIP/NBT-Substrat (ALP-gekoppelte Sekundärantikörper).

Innerhalb der Impfphase von Woche 0 bis Woche 48 nach Infektion mit dem RT-SHIV Δnef Virus konnte in den Tieren 01 bis 08 eine SIV-spezifische T-Zell-Antwort gegen die Peptide von Gag und Env detektiert werden (Abbildung 14). Die Anzahl gemessener Spots pro 10^6 Zellen schwankte zwischen den einzelnen Abnahmen deutlich.

Zum Zeitpunkt der Belastung wurde die Sekretion von IFN- γ als Antwort auf die Stimulation mit Peptiden von Gag, Pol, Tat und Rev nachgewiesen. Die Proteine Env und Nef konnten aufgrund der geringen PBMC-Menge zu diesem Zeitpunkt nicht getestet werden. Rhesusaffe Nummer 06 zeigte zu diesem Zeitpunkt die größte Anzahl IFN- γ^+ T-Zellen. Rhesus 04, 05, 07 und 08 bewegen sich, bezogen auf die bei ihnen detektierten Spots, im Mittelfeld der Affen. Die geringsten T-Zell-Antworten nach Peptidstimulation zeigten die Affen 01 bis 03.

Da zu diesem Zeitpunkt ein großes Spektrum an SIV-Proteinen ausgetestet wurde, ist zudem eine Aussage über die Breite der T-Zell-Antwort möglich (Abbildung 13). Alle Affen mit Ausnahme von Rhesus 07 zeigten zum Zeitpunkt der Belastung IFN- γ^+ sezernierende T-Zellen gegen alle getesteten Peptidpools (Gag, Pol, Tat und Rev). Rhesus 06 zeigte potente T-Zell-Antworten gegen alle vier getesteten SIV-Proteine, der größte Anteil davon gegen Tat. Auch bei den Affen 01 und 03 betrug der Anteil Tat-spezifischer IFN- γ sezernierender T-Zellen mehr als 30% gemessen an der Gesamt-T-Zell-Antwort in diesem Assay. Einen großen Anteil Pol-spezifischer IFN- γ^+ T-Zellen wurde bei den Affen 03, 05 und 08 detektiert. Gag-spezifische T-Zellen überwogen bei den Affen 01, 02, 04, 05, 07 und 08.

ERGEBNISSE

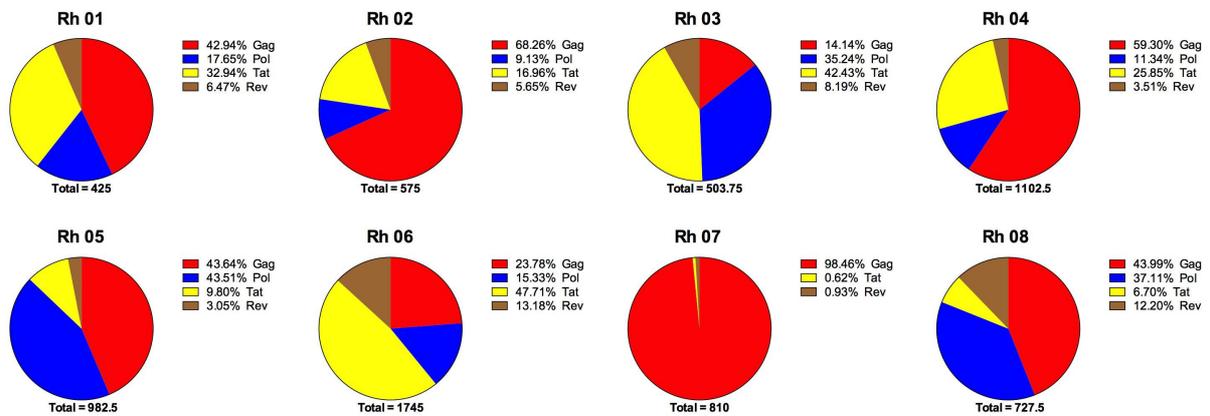


Abbildung 13. Anteil Protein-spezifischer IFN- γ ⁺ T-Zellen der Affen 01 bis 08 zum Zeitpunkt der Belastung in Woche 48. Zum Zeitpunkt der Belastung wurden Peptidpools der SIV-Proteine Gag, Pol, Tat und Rev im ELISpot Assay eingesetzt um die Anzahl IFN- γ sezernierender T-Zellen zu bestimmen. Hier dargestellt sind die jeweiligen Anteile IFN- γ sezernierender T-Zellen nach Stimulation mit entsprechenden SIV-Proteinen bezogen auf die Gesamtmenge IFN- γ ⁺ T-Zellen in den jeweiligen Affen. Die Gesamtmenge an Spots pro 10⁶ Zellen sind unter den Diagrammen angegeben (Total). Protein-spezifische Prozentangaben finden sich innerhalb der jeweiligen Legende.

Trotz der Infektion mit dem RT-SHIV Δ nef Virus konnten keine Anzeichen einer Pathogenese in den Rhesusaffen beobachtet werden.

Während der Impfphase von Woche 0 bis Woche 48 konnten keinerlei Symptome einer SIV-Infektion an den Affen festgestellt werden. Diese Beobachtung ist zurückzuführen auf die Attenuation des Virus und lässt sich zudem durch die geringe Replikationsaktivität erklären, die mittels real-time PCR während der Immunisierungsphase detektiert wurde (Abbildung 9).

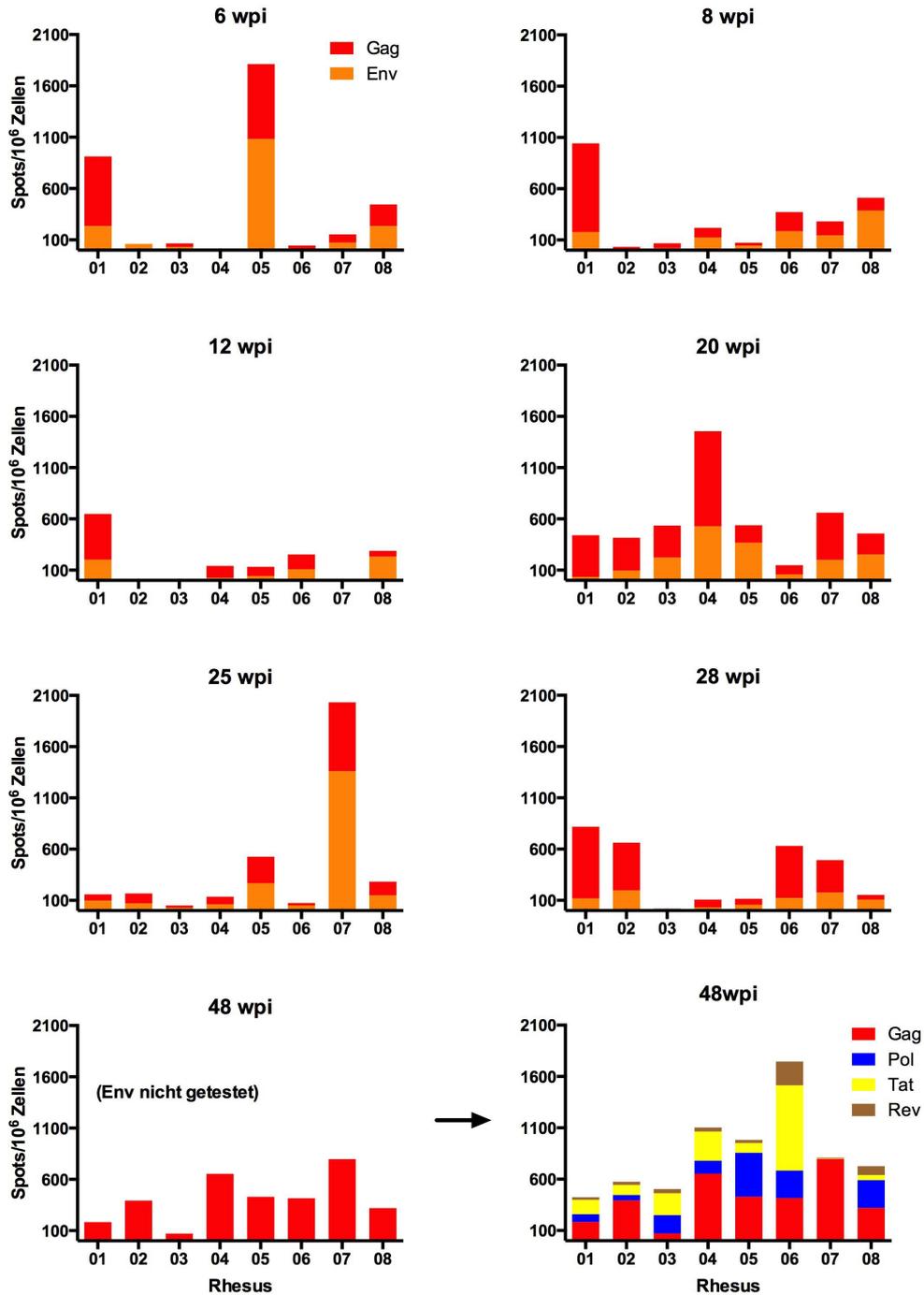


Abbildung 14. Untersuchung der zellulären Immunantwort nach Infektion mit dem RT-SHIV Δ nef Virus mittels IFN- γ ELISpot Assay. Darstellung der Summe der erhaltenen Spots pro 10⁶ Zellen. Die Analysen wurden durchgeführt mittels Peptidpools (15-mere) bestehend aus überlappenden Peptiden und 2,0 * 10⁵ frisch isolierten Rhesus-PBMCs. Die Graphen zeigen die Ergebnisse für die Wochen vor der Belastung (0-48 wpi). Während der Wochen 0-48 wurden ausschließlich Gag und Env Peptide getestet. In Woche 48 wurde Env aus den Analysen ausgeschlossen, hingegen Pol, Tat und Rev eingeschlossen. Die Ergebnisse der Proben aus Woche 48 sind zur besseren Vergleichbarkeit zweimal dargestellt.

3.3 Inhibition der viralen Replikation des RT-SHIV Δnef Virus: Phase der antiretrovirale Therapie

Während der Wochen 40 bis 51 wurde die Replikation des Impfvirus RT-SHIV Δnef mit Hilfe zweier antiretroviraler Therapeutika inhibiert (Behandlungszeitraum insgesamt 12 Wochen). Bei den antiretroviral wirkenden Medikamenten handelte es sich um die zur Therapie humaner HIV-1 Infektionen eingesetzten Medikamente Nevirapin (NVP, Viramune®) und Efavirenz (EFV, Sustiva®). Die Inhibition mittels dieser beiden nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs) wurde durch den Austausch des Reversen Transkriptase Gens des SIV Δnef mit dem RT-Gen von HIV-1 möglich.

Bei allen Rhesusaffen, die in den Wochen 40 bis 51 mit antiretroviralen Substanzen behandelt wurden, ließen sich diese mittels HPLC nachweisen.

Der Nachweis der antiretroviralen Medikation erfolgte zum einen mittels HPLC, durchgeführt am Universitätsklinikum Würzburg. Die HPLC-Analysen zeigten, dass sowohl Nevirapin als auch Efavirenz im Blut der Tiere nachweisbar war (Tabelle 10). Die pharmakologisch wirksamen Konzentrationen, die für eine Therapie im Menschen empfohlen werden, liegen für Nevirapin bei mehr als 3.400 ng/ml und für Efavirenz bei 1.000 bis 4.000 ng/ml⁵³². Während der Nevirapin- wie auch der Efavirenzbehandlung wurden diese Plasmakonzentration bei den Tieren nicht erreicht. Auch nach der Erhöhung der Nevirapin- und Efavirenzdosis in Woche 42 bzw. 47 des Versuchs konnten solch hohe Plasmakonzentrationen nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis der Inhibition des Impfvirus allein aufgrund einer im Plasma der Tiere ausreichenden Menge an NNRTIs war somit nicht gegeben.

Die Konzentration an Nevirapin bzw. Efavirenz im Plasma der ART-behandelten Affen der Gruppe A und C war ausreichend, um die *in vitro* Replikation des RT-SHIV Δnef Virus vollständig zu inhibieren.

Da durch die Erhöhung der Nevirapin- bzw. Efavirenzgabe auf 7 bzw. 20 mg/kg Körpergewicht nicht die erforderlichen Plasmakonzentrationen erreicht wurden, wurde die inhibitorische Aktivität des Plasmas mit Hilfe ei-

Rh	Nevirapin (ng/ml)		Efavirenz (ng/ml)			
	42 wpi	43 wpi	45 wpi	48 wpi	50 wpi	52 wpi*
01	446	875	270	425	207	221
02	128	885	120	248	97	68
03	99	140	236	502	398	244
04	104	174	268	350	36	20
09	392	332	267	569	250	634
10	199	108	188	598	n.d.	674
11	1306	695	375	178	63	832
12	1069	624	384	709	51	572

Tabelle 10. Bestimmung der Konzentration von Nevirapin und Efavirenz im Plasma der Rhesusaffen der Gruppe A und C. Die Bestimmung der Konzentration an Nevirapin (NVP, Viramune®) bzw. Efavirenz (EFV, Sustiva®) während der Behandlungsphasen in den Wochen 40 bis einschließlich 43 bzw. 44 bis einschließlich 51 erfolgte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) am Universitätsklinikum Würzburg. *Blutentnahme erfolgte nach dem letzten Tag der Behandlung (entspricht 1. Tag in Woche 52 pi).

nes *in vitro* Assays nachgewiesen. Hierfür wurden zunächst die Dosis-Wirkungs-Kurven beider NNRTIs aufgezeichnet (Abbildung 15 A). Für Nevirapin ließ sich ein IC_{50} von 70 ng/ml (MW = 266,3 g/mol; 0,263 μ M) und für Efavirenz von 0,9 ng/ml (MW = 315,67 g/mol; 2,85 nM) bei Einsatz von HIV-1 bestimmen. Beide Werte lagen damit in guter Näherung zu in anderen Publikationen bestimmten IC_{50} -Werten von 0,5 μ M bis 0,1 μ M für NVP und 1,6 nM für EFV^{524,533}. Im Vergleich zu Nevirapin konnte für Efavirenz eine circa 80-fach stärkere Aktivität mit diesem Assay nachgewiesen werden. Der IC_{50} -Wert für NVP bei Einsatz des RT-SHIV Δnef Virus lag bei 200 ng/ml (0,751 μ M).

Im nächsten Schritt wurde die spezifische Inhibition des RT-SHIV Δnef Virus im Vergleich zum SIV_{mac239} Wildtypvirus getestet. Diese Analyse wurde mit den Plasmaproben der Affen aus Woche 48, also während der Behandlung mit 20 mg/kg EFV, durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass das Plasma der Tiere der Gruppe A und C die Replikation des RT-SHIV Δnef inhibierte (Abbildung 15 B). Plasmaproben der Gruppen A und C, eingesetzt in einer 1:5 Verdünnung, zeigten zusammen eine Inhibition des RT-SHIV Δnef Virus von 86% (Min = 75%, Max = 93,5%), wohingegen die Replikation des SIV_{mac239} Virus nicht gehemmt wurde (Median = 6,4%, Min = 0%, Max = 26,3%).

Zusätzlich zu den Ergebnissen der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie den Spezifitätstests wurden unterschiedliche Plasmaverdünnungen auf deren replikationsinhibierende Aktivität hin überprüft (Abbildung 15 C). Aus diesen Analysen ging hervor, dass die Plasmen der Affen der Gruppe A und C die Virusreplikation auch bis zu einer Verdünnung von 1:10 fast vollständig unterdrückten (Median = 87,8% Min = 76%, Max = 98,2%), wohingegen die Plasmen der ART-unbehandelten Affen (Gruppen B und D) auch bei der geringsten Verdünnungsstufe von 1:5 keinen Einfluss auf die Virusvermehrung besaßen. Die schwächste Inhibition der RT-SHIV Δnef Replikation wurde in Affe 11 detektiert.

Die Ergebnisse dieser Analysen zeigen, dass die Nevirapin- bzw. Efavirenzkonzentration im Plasma der Affen 01 bis 04 ausreichend war, um die Replikation des RT-SHIV Δnef Virus zu inhibieren.

Sequenzanalysen des Reversen Transkriptase Gens zeigten keinerlei Hinweise auf die Entstehung von Fluchtmutanten durch die Behandlung mit den NNRTIs.

Um auch die Entstehung von Fluchtmutanten gegenüber den eingesetzten NNRTIs auszuschließen, wurde versucht das Reverse Transkriptase-Gen zu sequenzieren. Hierfür wurde virale RNA bzw. DNA des RT-SHIV Δnef Virus aus den Affen 01 bis 04, welche die antiretrovirale Therapie innerhalb der Wochen 40 bis einschließlich 51 erhalten hatten, isoliert. Aufgrund der geringen Viruslast, bedingt durch die Attenuation des Virus und die Wirkung der NNRTIs, gelang die Isolation des RT-Gens lediglich bei einem Affen (Rh 04, Lymphknotenbiopsie aus Woche 52 wpi). Rhesus 02 zeigte keinerlei Nukleinsäuren des RT-SHIV Δnef Virus (Tabelle 11). Zwar gelang es bei Rh 01 das RT-SHIV Δnef Virus durch Kokultur anzuziehen, aufgrund der Kultivierung in Zellkultur ohne NNRTI bestand jedoch die Möglichkeit der Reversion von Mutationen.

Die Sequenzierung des RT-Gens von RT-SHIV Δnef wurde in einem Bereich zwischen Kodon 60 und 320 durchgeführt, da Mutationen in Folge einer Nevirapin- bzw. Efavirenzbehandlung in diesem Bereich auftreten.

ERGEBNISSE

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe der 'HIV Drug Resistance Database' der Stanford Universität auf das Vorhandensein von Mutation hin untersucht. Zwar fanden sich Mutationen im untersuchten Bereich (K122E, G196R, F214L, A272P und K277R), keine dieser Mutationen hatte jedoch einen Einfluss auf die Suszeptibilität des Virus gegenüber den eingesetzten NNRTIs.

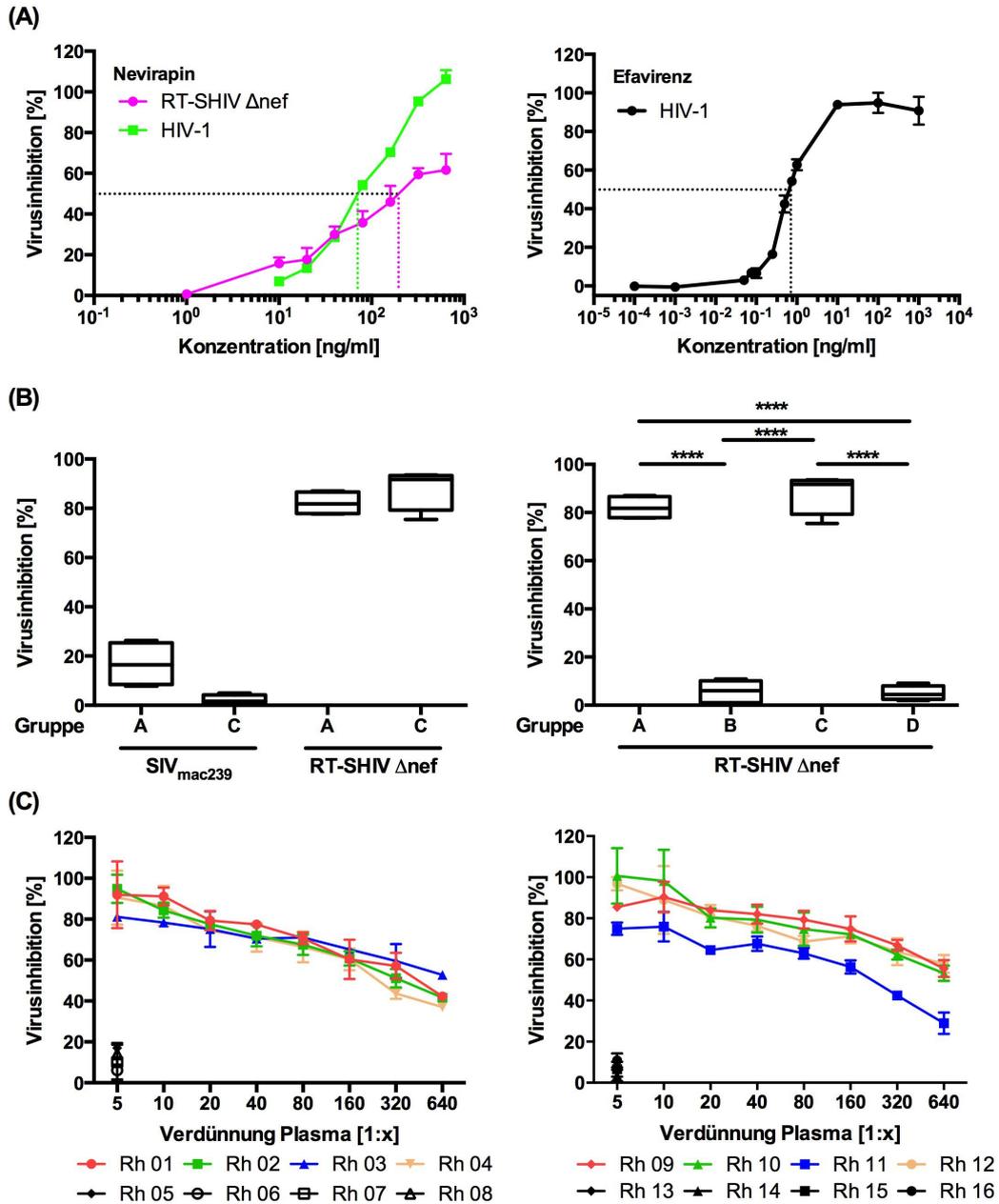


Abbildung 15. Nachweis der inhibitorischen Aktivität von Nevirapin und Efavirenz im Plasma der Rhesusaffen. Die Bestimmung der Virusinhibition wurde über die Bestimmung proviraler DNA mittels real-time PCR durchgeführt. (A) Dosis-Wirkungs-Kurven von Nevirapin (NVP, A) und Efavirenz (EFV, B) in Abwesenheit von Plasma, durchgeführt mit HIV-1 (pNL4-3) bzw. RT-SHIV Δnef. (B) Nachweis der Sensitivität des RT-SHIV Δnef Virus gegenüber den im Plasma der Affen vorhandenen NNRTIs. Als Maximalwert der Virusreplikation dienten Proben ohne Plasma und ohne NNRTI (0% Virusinhibition). Als Minimalwert (100% Inhibition) galt hitzeinaktiviertes Virus. Plasmaproben entstammen aus der Woche der Belastung (20 mg/kg Efavirenz). Auswertung mittels Mann-Whitney Test. (C) Bestimmung der Virusinhibition bei gleichzeitiger Titration der Affenplasmen. Die Analyse zeigt die inhibitorische Aktivität der Plasmaproben aus Woche 48 pi (Belastungswoche). Der Maximalwert der Virusreplikation (0% Inhibition) wurde analog zu (A) bestimmt.

3.4 Belastungsphase: Infektion mit SIV_{mac239}

Alle Affen des Versuchs wurden 48 Wochen nach der Infektion mit dem RT-SHIV Δnef Virus mit dem SIV_{mac239} Wildtypvirus belastet.

In Woche 48 nach Infektion mit dem Impfvirus wurden alle 16 Rhesusaffen mit dem SIV_{mac239} Wildtypvirus intravenös (i.v.) belastet. Für alle Affen mit Ausnahme von Rhesus 01 aus Gruppe A und Rhesus 06 aus Gruppe B konnte virale RNA nach der Infektion mit dem SIV_{mac239} Virus im Plasma detektiert werden (Abbildung 16 A). Da für die Bestimmung der Viruslast *gag*-spezifische Primer eingesetzt wurden, erfolgte die Spezifizierung, also die Bestimmung des entsprechenden Virusisolats (SIV_{mac239} bzw. RT-SHIV Δnef), mit Hilfe einer zweiten PCR basierend auf Virustyp-spezifischen Primern.

Der Effekt der RT-SHIV Δnef Infektion der Tiere der Gruppen A und B lässt sich bezogen auf die Viruslast an zwei Punkten deutlich erkennen: (1) der Reduktion von Viruspartikeln im Plasma während der akuten Phase (Viruspeak, Abbildung 16 A, B) sowie (2) der Fähigkeit der Tiere die Virusreplikation im Anschluss an den Viruspeak zu kontrollieren und unterhalb des Detektionslimits zu drücken (Abbildung 16 A). Der Viruspeak gemessen in den Tieren der Impfgruppen war mit \log_{10} 4,25 Kopien/ml (Min = \log_{10} 3,1 Kopien/ml, Max = \log_{10} 5,1 Kopien/ml) um \log_{10} 2,4 Kopien/ml geringer als in den Kontrolltieren (Min = \log_{10} 5,7 Kopien/ml, Max = \log_{10} 6,9 Kopien/ml, Median = \log_{10} 6,65 Kopien/ml). Im Anschluss an den Viruspeak ließ sich virale RNA bei drei Tieren (Rh 02, 07 und 08) im Plasma feststellen. Bei Rhesus 02 gelang der Nachweis viraler RNA im Plasma in Woche 56 und 62. Rhesus 07 zeigte einen zweiten Anstieg der Viruslast in Woche 54, ebenso wie Rhesus 08. Dieses Muster, das plötzliche Auftreten und kurz darauf wieder Verschwinden viraler RNA im Plasma, bezeichnet man in der Regel als virale *blips*. Rhesus 08 wurde in Woche 54 aufgrund einer nicht mit der SIV-Infektion assoziierten Erkrankung eingeschläfert.

Die Viruslast in den Kontrolltieren war ab Woche 54 (sechs Wochen nach Belastung) mit \log_{10} 3,8 Kopien/ml (Min = \log_{10} 2,9 Kopien/ml, Max = \log_{10} 4,6 Kopien/ml) für Gruppe C und \log_{10} 3,7 Kopien/ml (Min = \log_{10} 1,0 Kopien/ml, Max = \log_{10} 6,0 Kopien/ml) für Gruppe D identisch, wobei sich ein Affe der Gruppe (Rh 14) durch seine Fähigkeit die Virusreplikation auf Werte unterhalb des Detektionslimits zu drücken unterschied (Abbildung 16 C).

Somit zeigen die Ergebnisse zur Viruslast nach der Belastung deutlich, dass die Tiere beider Impfgruppen in der Lage waren die Wildtypinfektion zu kontrollieren. Im Falle zweier Affen kann aufgrund des kompletten Fehlens viraler RNA im Plasma von einer sterilen Immunität gesprochen werden. Die SIV_{mac239} Infektion schien sich in diesen Tieren nicht etabliert zu haben. Das die Infektion mit dem Wildtypvirus erfolgreich war, zeigen die Messwerte der Viruslast bei den Kontrollgruppen. Auch hier war ein Affe in der Lage, die Virusreplikation zu kontrollieren. Die Höhe der Viruslast und der Zeitpunkt, bei welchem die Viruslast im Plasma auf ein nicht detektierbares Niveau fiel, lassen jedoch eine Unterscheidung zu den Affen der Impfgruppen zu.

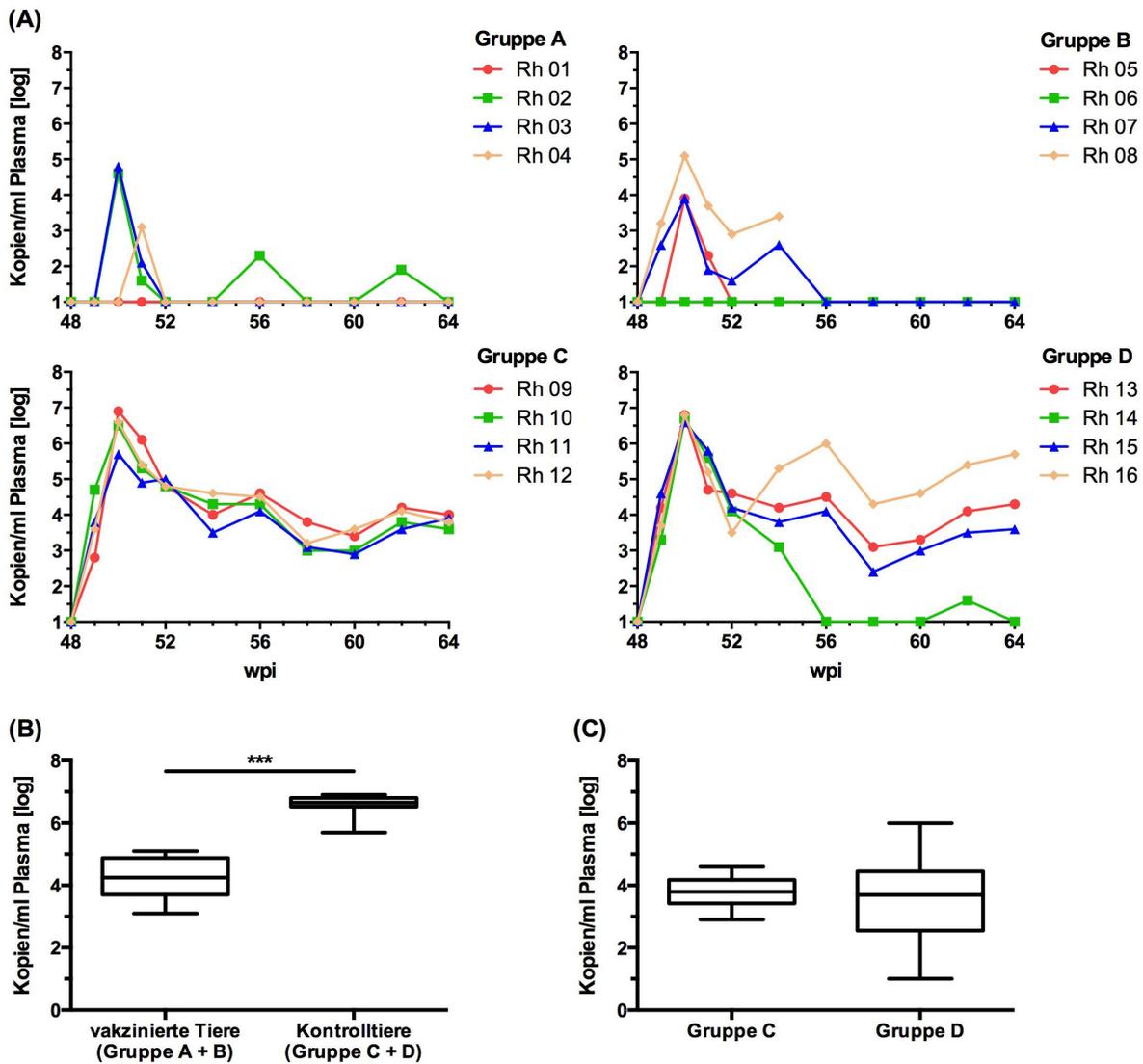


Abbildung 16. Bestimmung der Viruslast nach der Infektion mit dem SIV mac239 Wildtypvirus in Woche 48 pi. (A) Viruslastbestimmung mittels *gag*-spezifischer Primer. (B) Betrachtung der maximalen Viruslast im Plasma gemessen in den Tieren der Gruppe A und B (vakziniert) sowie der Gruppe C und D (Kontrollgruppen). Statistische Auswertung mittels Mann-Whitney-Test ($\alpha = 0,05$). (C) Darstellung des Viruslastniveaus der Gruppen C und D in den Wochen 54 bis 64 pi.

Da sich die Affen der beiden Impfgruppen bezüglich der Viruslast nicht voneinander unterscheiden kann bereits zu diesem Zeitpunkt daraus geschlossen werden, dass die NNRTI-Behandlung der Wochen 40 bis 51 keinen Einfluss auf den Schutz der Tiere hatte. Somit kann die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, nämlich die Frage ob die Replikation des Impfvirus maßgeblich am Schutz der Tiere beteiligt ist, verneint werden. ART-behandelte Affen (Rh 01 bis 04) und ART-unbehandelte Affen (Rh 05 bis Rh 08) sind weder anhand des Viruspeaks, noch

anhand der Wirksamkeit (je drei Virus-kontrollierende Tiere sowie ein Tier mit steriler Immunität in beiden Gruppen) voneinander zu unterscheiden.

Die Suche nach proviraler DNA bzw. viraler RNA fand auch in Lymphknotenbiopsien sowie mit Hilfe von Kokultur-Experimenten statt.

Da virale RNA im Plasma einiger Tieren nicht nachgewiesen werden konnte, wurden in Woche 4 nach Belastung Lymphknoten aus allen Affen entfernt und anschließend auf das Vorhandensein proviraler DNA und viraler RNA hin untersucht. Um auch kleinste Virusmengen zu detektieren wurden zusätzlich Kokulturen mit den aus den Lymphknoten isolierten Zellen sowie C8166 Zellen angesetzt.

Auf Provirusenebene konnte das Impfvirus RT-SHIV Δnef in den Lymphknoten aller Affen außer Nr. 02, 06 und 08 auch noch 52 Wochen nach der Infektion nachgewiesen werden (Tabelle 11). Die Detektion von proviraler DNA des Wildtyps SIV_{mac239} gelang in allen Affen außer Rhesus Nr. 01 und 06.

Virale RNA des Impfvirus konnte in keinem Affen detektiert werden. RNA des Belastungsvirus fand sich hingegen in allen Tieren, außer Rhesus 01 und 06.

Diese Ergebnisse unterstützen die Resultate der Messungen zur Viruslast. Der als sterile Immunität bezeichnete Schutz der Affen 01 und 06 wird durch das Fehlen von Nukleinsäuren des Wildtyps in den Lymphknotenproben bestätigt. Ebenso wird die Infektion aller anderen Affen der Impfgruppen bestätigt. Rhesus 08, der Affe mit der höchsten Viruslast, zeigte als einziger auf allen drei untersuchten Ebenen (provirale DNA, Kokultur-DNA, virale RNA) positive Ergebnisse. Bemerkenswert: Bei Rhesus 06 konnte sowohl das Belastungs- wie auch das Impfvirus nicht nachgewiesen werden. Während das Fehlen jeglicher-Nukleinsäure des Wildtypvirus mit den Viruslastdaten vereinbar ist und diese bestätigt, stehen die Ergebnisse bezüglich des Impfvirus im Gegensatz zu den Daten der Viruslastbestimmung (Seite 66, Abbildung 9).

Rh	provirale DNA				virale RNA	
	Lymphknoten		Kokultur		Lymphknoten	
	RT-SHIV	SIV _{mac239}	RT-SHIV	SIV _{mac239}	RT-SHIV	SIV _{mac239}
01	+	-	+	-	-	-
02	-	-	-	+	-	+
03	+	-	-	+	-	+
04	+	-	-	+	-	+
05	+	-	-	+	-	+
06	-	-	-	-	-	-
07	+	-	+	+	-	+
08	-	+	-	+	-	+

Tabelle 11. Detektion proviraler DNA und viraler RNA in Lymphknoten. Die Entnahme der Lymphknoten erfolgte in Woche 4 nach Belastung mit SIV_{mac239} (52 wpi).

In den meisten vakzinierten Affen konnte eine Steigerung des IgG Antikörpertiters nachgewiesen werden. Eine *de novo* SIV-spezifische IgG Antikörperantwort wurde in den Kontrollaffen gemessen.

Bei allen vakzinierten Affen, bei denen die Detektion viraler RNA im Plasma möglich war, ließ sich eine starke anamnestiche Immunantwort detektieren (Abbildung 17). Der IgG Antikörpertiter stieg in diesen Tieren rapide auf einen Wert, der vergleichbar war mit den Werten gemessen im Plasma der Kontrolltiere (Abbildung 18 A). Unterschiedlich hingegen war der Zeitpunkt des Auftretens des IgG Antikörperpeaks. Bei den vakzinierten Tieren trat dieser im Mittel sieben Wochen nach der Belastung mit dem Wildtypvirus auf (Abbildung 18 B, Min = 3 wpc, Max = 12 wpc). Der Maximalwert der IgG Titer der Kontrolltiere (ohne Rhesus 16) wurde in Woche 16 nach Belastung (Min = 12 wpc, Max = 16 wpc) detektiert.

Die beiden geschützten Rhesusaffen 01 und 06 zeigten keinerlei anamnestiche Reaktion nach Woche 48. Bei diesen Tieren blieb der IgG Titer stabil bei im Mittel \log_{10} 1.031 (Min = \log_{10} 389, Max = \log_{10} 2.485).

Bei Rhesus 16, der Affe mit der höchsten Viruslast innerhalb der beiden Kontrollgruppen, konnten erst zur Woche 64 IgG Antikörper detektiert werden. Aufgrund des Studienendes in Woche 64 kann hier keine Aussage über die mögliche maximale Höhe des Antikörpertiters getroffen werden.

Auch diese Ergebnisse bestätigen die Resultate zur Viruslast. Die beiden geschützten Tiere erfahren aufgrund der verhinderten Infektion mit dem Wildtypvirus keinen Anstieg der Antikörperantwort. Bei allen anderen Tieren der Impfgruppen kommt es zu einer Verstärkung, die im Mittel mit der Antikörperantwort der Kontrolltiere iden-

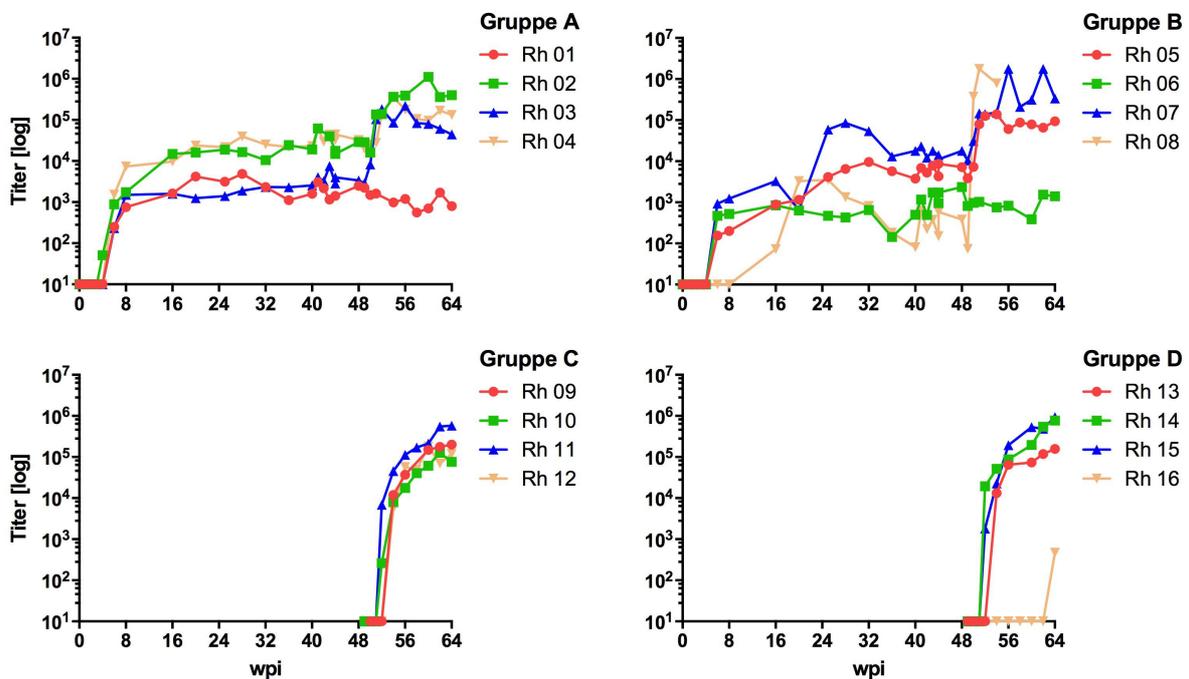


Abbildung 17. SIV-spezifische IgG Antikörperantworten der Rhesusaffen während der Studie (0-64 wpi). Dargestellt sind die jeweiligen IgG Antikörpertiter der Affen, aufgeteilt in die Gruppen A bis D. Bestimmung der Antikörpertiter mittels ELISA gegen SIV-Gesamtprotein. Die Messung der Kontrolltiere begann mit der Belastung der Tiere in Woche 48.

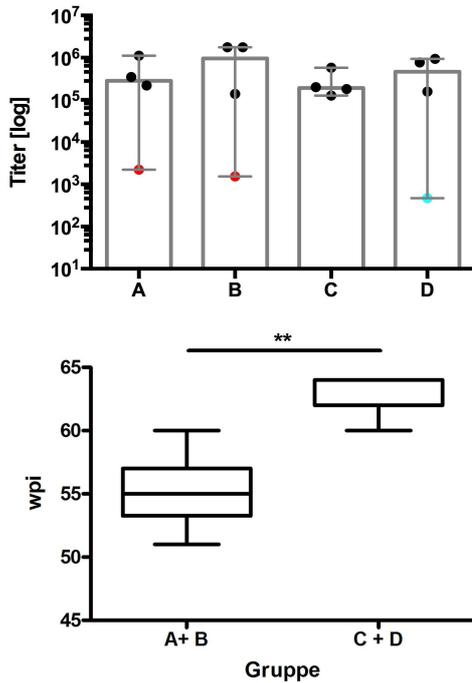


Abbildung 18. Maximalwerte der SIV-spezifischen IgG Antikörpertiter nach Infektion mit SIVmac239 in Woche 48 pi. (A) Maximalwerte der Tiere der Gruppe A, B, C und D. Die beiden geschützten Tiere Rh 01 und 06 sind rot hervorgehoben, Rh 16 türkis. (B) Darstellung des Auftretens des IgG Antikörperpeaks. Rhesus 01, 06 und 16 sind bei dieser Analyse ausgenommen, da diese Tiere keine Steigerung der IgG Antikörpertiter zeigten. Statistische Analyse mittels Mann-Whitney-Test ($\alpha = 0,05$, $p = 0,0017$).

tisch ist. Einzig Rhesus 16 zeigt einen abweichenden Verlauf bezüglich des Antikörpertiters, welcher jedoch im Einklang mit den Beobachtungen zur Viruslast steht.

Die Spezifität der IgG Antikörper im Plasma der vakzinierten Affen veränderte sich in Folge der Belastung nur geringfügig. In den Affen der Kontrollgruppen entwickelten sich Antikörper gegen fast alle getesteten SIV-Proteine.

Während der Impfphase waren die Antikörperspezifitäten, gemessen in den Affen 01 bis 08, auf Env und Gag beschränkt (Tabelle 12). Nach der Belastung mit SIV_{mac239} in Woche 48 kam es zu geringfügigen Änderungen der Spezifität. Antikörper im Plasma von sechs von acht Affen waren nach der Belastung in der Lage das Gag-Protein p55 zu detektieren. Das Plasma eines Affen, Rhesus 04, detektierte zudem p66 (*pol*). Bei den geschützten Affen, Rhesus 01 und 06, war keinerlei Erweiterung der Antikörperspezifität zu beobachten. Diese Beobachtung ist konsistent mit dem Ausbleiben einer Steigerung (*Boost*) des Antikörpertiters (Abbildung 17).

Die Plasmaproben der Kontrollaffen zeigten 16 Wochen nach Belastung eine breite Antikörperspezifität (Tabelle 12). Das Plasma aller Kontrolltiere war in der Lage die Oberflächenproteine Env, Strukturproteine (p55, p27) sowie Proteine von Pol (p66, p31) zu detektieren. Die Unterschiede in der Spezifität der Antikörper zwischen den Affen der Kontrollgruppen C und D waren marginal.

ERGEBNISSE

		Rhesus															
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
pre-challenge	Env*	+	+	+	+	+	+	+	-								
	gp80	-	-	-	-	-	-	-	-								
	p66	-	-	-	-	-	-	-	-								
	p55	-	-	-	-	-	-	-	-								
	p31	-	-	-	-	-	-	-	-								
	p27	+	+	+	+	+	+	+	+								
post-challenge	Env*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	gp80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
	p66	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	p55	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	p31	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	p27	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Tabelle 12. Spezifität der IgG Antikörper im Plasma der Rhesusaffen während der Immunisierungsphase (0-48 wpi) sowie nach der Belastung (64 wpi). Die Analyse zur Spezifität des Plasmas erfolgte mittels Westernblotstrips, auf welchen SIVmac239-Proteine (infizierte C8166 Zellen) aufgetragen wurden. Die Hintergrundbestimmung erfolgte parallel durch Strips mit C8166 Lysat nicht-infizierter Zellen. [-] Protein nicht detektiert; [+] Protein detektiert; [leer], kein Test durchgeführt. *Aufgrund der Verwendung infizierter C8166 Zellen wurden hier Env-detektierende Antikörper nachgewiesen (keine Differenzierung in gp41 bzw. gp120).

Diese Beobachtungen passen zu dem bereits bekannten Muster, bei welchem die Tiere der Impfgruppen aufgrund der Attenuierung des RT-SHIV Δnef Virus reduzierte Viruslasten (Abbildung 9) sowie abgeschwächte Immunantworten (Abbildung 17, 19, 20) aufweisen. Durch die effektive Kontrolle des Wildtypvirus nach Belastung und der damit verbundenen geringeren Stimulation des Immunsystems blieb auch die Spezifität des Plasmas der Tiere der Impfgruppe gering.

In den Kontrolltieren ließen sich früh erste Reifungserscheinungen der SIV-spezifischen IgG Antikörper feststellen. Die Affen der beiden Impfgruppen zeigten ein heterogenes Bild.

Die Avidität SIV-spezifischer IgG Antikörper stieg in den Kontrollgruppen parallel zum ersten Auftreten der IgG Antikörperantwort zwischen Woche 49 und 52 (Abbildung 19). Bis zum Ende des Versuchs in Woche 64 ließ sich ein kontinuierlicher Anstieg der Avidität bei allen Rhesusaffen, ausgenommen Affe Nr. 16, detektieren.

Bei den Affen der Impfgruppen A und B ließen sich sowohl Steigerungen, als auch ein Absinken der Avidität der Antikörper nach der Belastung detektieren. Während die Aviditäten der Antikörper bei Rhesus 04, 05 und 07 stiegen, fielen sie bei Rhesus 01 und 08. Rhesus 02, 03 und 06 zeigten hier keinerlei Änderungen.

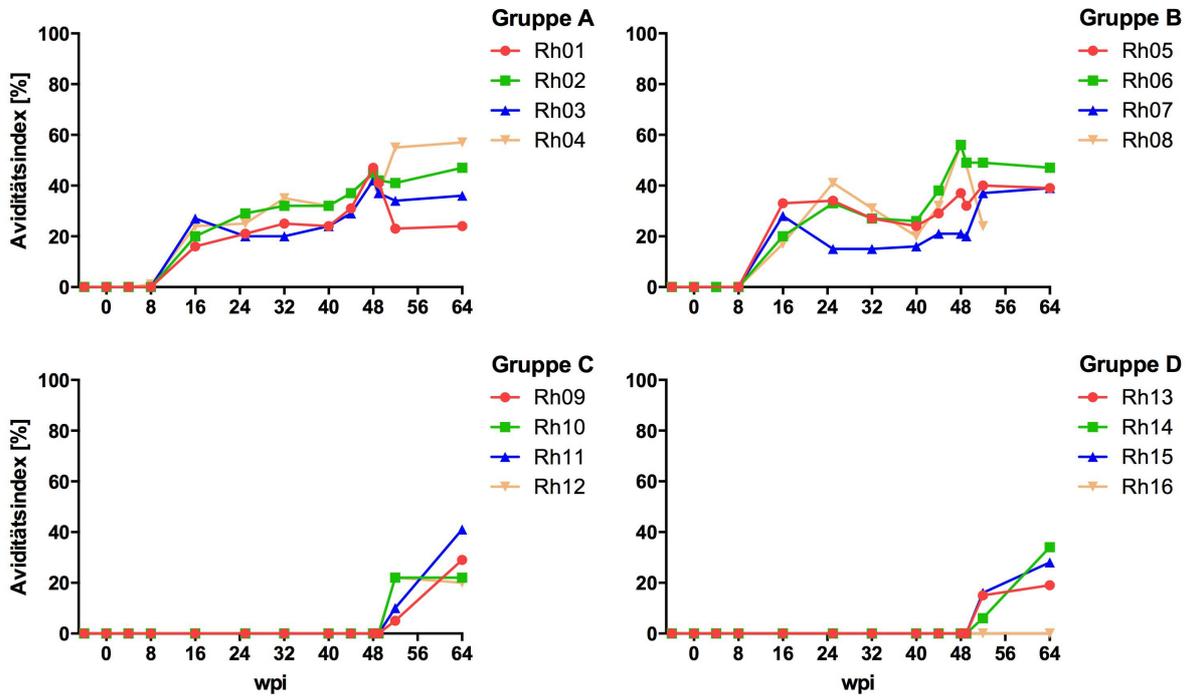


Abbildung 19. Bestimmung der Avidität SIV-spezifischer IgG Antikörper im Plasma der Rhesusaffen. Angabe des Aviditätsindex der SIV-spezifischen IgG Antikörper in Prozent ($AI\% = (OD_{8M\ Urea} / OD_{PBS}) * 100$). Die Bestimmung der Avidität erfolgte mittels SIV-spezifischem IgG ELISA unter Verwendung einer 8 M Harnstofflösung.

Bei einigen der vakzinierten Tiere konnte eine Steigerung der virushemmenden Aktivität des Plasmas beobachtet werden. Bei den Kontrolltieren ließen sich ab der 3. Woche nach Infektion neutralisierende Antikörper detektieren.

Bei fast allen Tieren der Impfgruppen konnte nach der Belastung ein Anstieg der virusneutralisierenden Aktivität des Plasmas festgestellt werden, vergleichbar mit dem anamnestic Anstieg SIV-bindender IgG Antikörper (Abbildung 17, 20). Lediglich die beiden geschützten Tiere, Rhesus 01 und 06, zeigten in der Folge der Belastung keine solche Steigerung. Auch das Plasma von Rhesus 16 zeigte keine virusneutralisierende Aktivität, was jedoch im Gegensatz zu Rhesus 01 und 06 durch den generell niedrigen IgG Antikörpertiter zu erklären ist (Abbildung 17). Die Maximalwerte der Kontrolltiere und der Tiere der Impfgruppe waren, bis auf die erwähnten Ausnahmen, nahezu identisch (Abbildung 21).

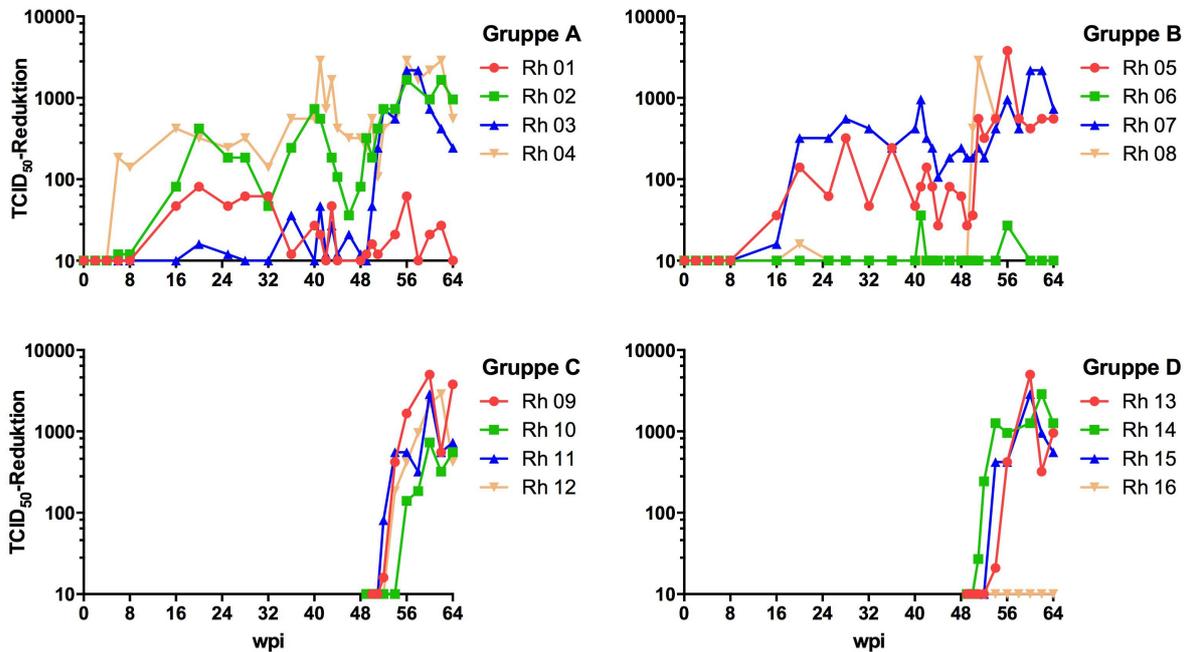


Abbildung 20. Neutralisierende Antikörper im Plasma der Rhesusaffen. Die Neutralisierungsaktivität wurde dargestellt durch die Reduktion des TCID₅₀ ('tissue culture infectious dose, 50%'), welcher mittels p24 ELISA mit und ohne Plasma bestimmt wurde. Je stärker die Reduktion des Virustiters umso stärker ist die inhibierende Wirkung des Plasmas.

In den meisten Tieren der Impfgruppen wurde nach der Belastung eine Verstärkung der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität detektiert. Und auch in den Kontrolltieren entwickelte sich, als Antwort auf die Belastung, eine potente ADCC-Antwort.

Bereits vor der Belastung konnten im Plasma der vakzinierten Tiere Antikörper detektiert werden, welche in der Lage waren die Zytolyse infizierter Zellen zu vermitteln (Abbildung 22 sowie Seite 70). Nach der Belastung wurde in allen Tieren außer Rhesus 01 und 06 eine Verstärkung dieser Fähigkeit nachgewiesen. Dabei lag der

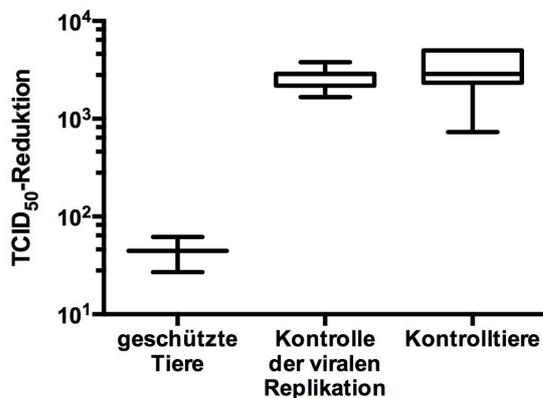


Abbildung 21. Maximale Titer virusneutralisierender Antikörper im Plasma der Tiere 01 bis 15 nach Infektion mit SIV_{mac239} (48-64 wpi). Die virusneutralisierende Aktivität wurde als Reduktion der TCID₅₀ ('tissue culture infectious dose, 50%') bestimmt. Für die Darstellung wurden die Affen entsprechend ihres Schutzes in drei Gruppen eingeteilt: (1) eine geschützte Gruppe (Rh 01 und 06), (2) Tiere, welche die Replikation des Wildtypvirus kontrollieren konnten (Rh 02-05, 07, 08 und 14) und (3) die restlichen Tiere der Kontrollgruppen C und D (Rh 09-13 und 15). Rhesus 16 wurde aufgrund unterschiedlicher Auffälligkeiten aus dieser Analyse ausgeschlossen.

Spitzenwert bei 8,8% ADCC für Rhesus 04. Im Mittel induzierte das Plasma der Tiere der Impfgruppe (ohne Rh 01 und 06) die Lyse von 4,8% der infizierten Zellen im gesamten Zeitraum der Belastung (Woche 49 bis 64). Die geschützten Tiere 01 und 06 zeigten keinerlei Verstärkung der ADCC-Antwort innerhalb der Belastungsphase, was konsistent ist mit dem Ausbleiben einer Steigerung bzw. Verstärkung anderer Messwerte der humoralen Immunantwort.

Bei den Kontrolltieren war das Plasma aller Tiere in der Lage die Zellyse infizierter Zellen zu induzieren. Im Mittel konnten ADCC-vermittelnde Antikörper in den Gruppen C und D zwei Wochen nach der Belastung (50 wpi) detektiert werden. Die gemessenen Spitzenwerte lagen bei 9,7% (Rh 14), wobei nicht klar ist ob dieser Wert eine weitere Steigerung erfahren hätte, da alle Spitzenwerte in Woche 64 detektiert wurden. Verglichen mit den Tieren der Gruppen A und B unterschieden sich die Maximalwerte somit im entsprechenden Analysezeitraum nicht (Abbildung 23).

Auch an diesen Messwerten wird deutlich: Das Impfvirus RT-SHIV Δnef induzierte aufgrund seiner Attenuation nur einen Bruchteil der Immunantworten (hier: ADCC), welche das Wildtypvirus induzierte. Zusätzlich zeigten die geschützten Tiere erneut keinerlei Verstärkung der entsprechenden Immunantwort, im Vergleich zu den nicht geschützten aber Virus-kontrollierenden Tieren der Gruppen A und B. Die Kontrolltiere entwickelten in allen Fällen mit Ausnahme von Rhesus 16 potente ADCC-Antworten.

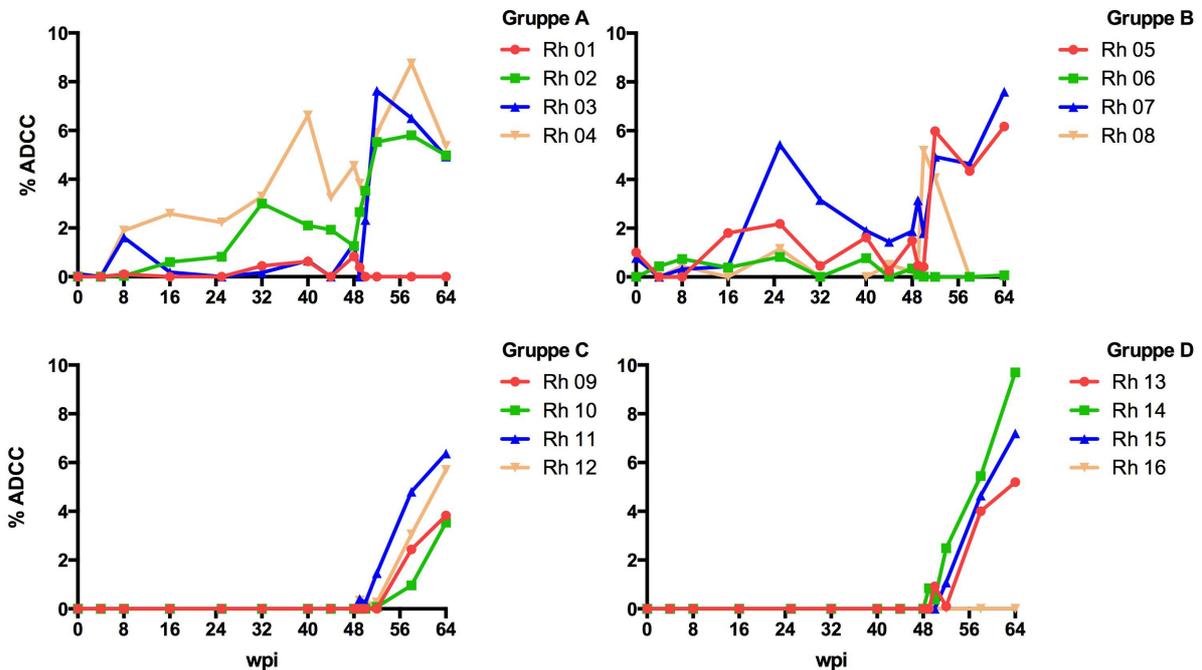


Abbildung 22. Bestimmung der Fähigkeit des Plasmas zur Vermittlung einer Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC). Die Bestimmung der Antikörper-abhängigen Zellyse erfolgt mittels Zytometer. Hierbei wurde der Prozentsatz lysierter Zellen in Anwesenheit von infizierten und nicht-infizierten Ziellzellen (Kontrolle) bestimmt. Die Graphen geben die jeweiligen Ergebnisse nach Abzug der Kontrollwerte wieder.

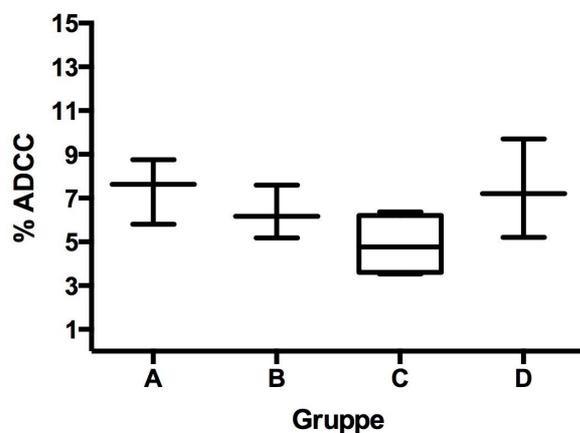


Abbildung 23. Betrachtung des Spitzenwertes der Antikörper-abhängigen Zell-vermittelten Zytotoxizität (ADCC) nach Belastung in den Gruppen A bis D. Ausgenommen sind die Affen 01, 06 und 16, welche keine bzw. keine Verstärkung der ADCC Antwort nach der Infektion mit dem Wildtypvirus zeigen. Dargestellt ist die jeweilige Differenz von der Abnahme der doppelt positiven Zellpopulation bei Verwendung infizierter und nicht-infizierter Zielzellen (SIV_{mac239} infizierte CEM.NK^R-CCR5 Zellen).

Die Sekretion von IFN- γ konnte bei den T-Zellen fast aller geschützten Tiere sowie bei fast allen Tieren der Kontrollgruppen durch eine Vielzahl von SIV Proteinen induziert werden.

Bei der Bestimmung von SIV-spezifischen IFN- γ sezernierenden T-Zellen während der Impfphase (Woche 0 bis 48) wurde deutlich, dass die T-Zellen der geschützten Tiere zum Zeitpunkt der Belastung auf eine Vielzahl von Peptiden reagieren (Abbildung 13, 14). Tiere, bei denen nach der Infektion mit dem Wildtypvirus virale blips auftraten, zeigten zum Zeitpunkt der Belastung in Woche 48 fast ausschließlich gegen Gag-Peptide eine potente Immunantwort im ELISpot (Abbildung 24).

Nach der Belastung verschwanden diese Tendenzen. Bei den Affen 01 und 06 ließen sich nur geringfügige Steigerungen der Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen feststellen (Abbildung 24, 30). Dies ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der humoralen Immunantwort. Auch dort zeigten die geschützten Affen aufgrund der verhinderten SIV_{mac239}-Infektion keine Verstärkungen der Immunantworten. Während Rhesus 06 weiterhin alle Charakteristika einer breiten T-Zell-Antwort bei diesen Untersuchungen zeigte, dominierte bei Rhesus 01 in Woche 64 die Gag-spezifische T-Zell-Antwort mit über 80% (gemessen an der Gesamt-T-Zell-Antwort, Abbildung 25).

Alle anderen Affen der beiden Impfgruppen, die imstande waren die SIV_{mac239}-Infektion zu kontrollieren, zeigten eine deutliche Steigerung in der Anzahl SIV-spezifischer IFN- γ sezernierender T-Zellen. Dabei scheint die Anzahl IFN- γ ⁺ T-Zellen mit dem Beginn der Belastungsphase zu steigen und bis zur Woche 64 wieder auf einen erhöhten, im Vergleich zu den Wochen 50 und 52 jedoch reduzierten Wert zu sinken. Bezüglich der breite der T-Zell-Antworten fällt innerhalb der Impfgruppen neben Rhesus 01 noch Rhesus 07 auf, welcher bei der letzten Abnahme in Woche 64 eine deutlich breitere T-Zell-Antwort aufweist als vor der Belastung (Abbildung 13, 25).

Die Affen der Kontrollgruppen zeigten nach der Belastung IFN- γ sezernierende T-Zellen in einem Bereich, der mit den Tieren der Impfgruppen A und B vergleichbar ist. Beachtenswert ist innerhalb der Kontrollgruppen Rhesus 14. Dieser Affe zeigte zuvor bereits die Kontrolle der Virusreplikation (Abbildung 16). In Woche 64 ähnelt die bei diesem Affen festgestellte Verteilung IFN- γ sezernierender T-Zellen im ELISpot der Verteilung, die

bei den geschützten bzw. gut die Virusreplikation kontrollierenden Affen der Impfgruppen in Woche 48 (sowie Woche 64 für Rhesus 06) festgestellt wurde.

Bei Rhesus 13 wurde eine ungewöhnliche Verteilung IFN- γ sezernierender T-Zellen detektiert. Rund 73% IFN- γ^+ T-Zellen waren hier Rev-spezifisch. Bei allen anderen Affen der Kontrollgruppe dominierte die Gag-spezifische T-Zell-Antwort (Abbildung 25).

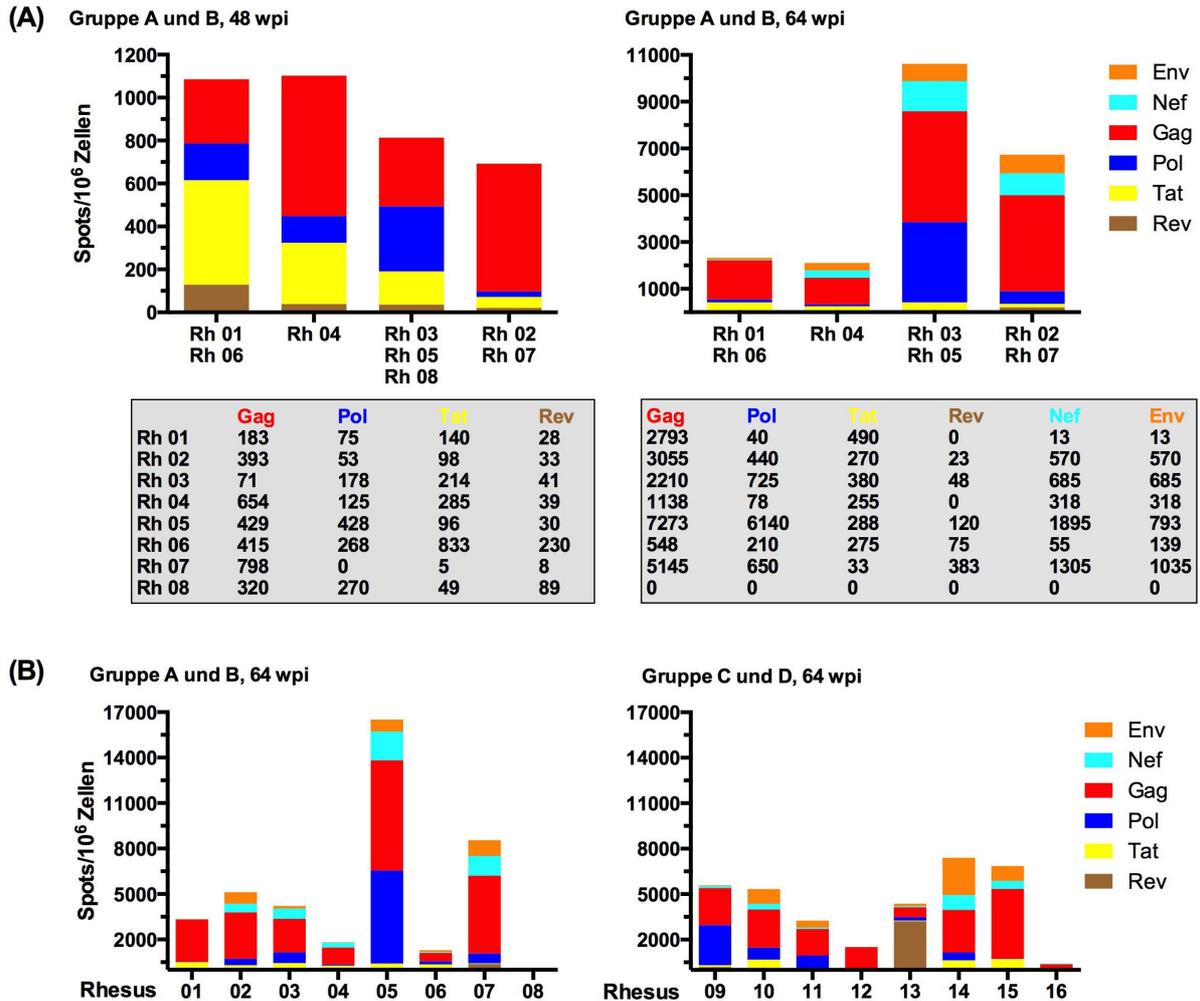


Abbildung 24. Messung IFN- γ sezernierender T-Zellen nach Stimulation mit SIV-Peptiden (IFN- γ ELISpot Assay). (A) Betrachtung der Gruppen A und B zum Zeitpunkt der Belastung (48. Woche) sowie 16 Wochen nach Belastung. Darstellung IFN- γ sezernierender T-Zellen pro 10^6 Rhesus PBMCs. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von Rhesus PBMCs erfolgte die Stimulierung in Woche 48 durch Peptide von lediglich vier Proteinen (Gag, Pol, Tat und Rev). Die Tabelle gibt die Mittelwerte der Anzahl der Spots pro 10^6 PBMCs an ($n = 2$). (B) Gegenüberstellung der Ergebnisse der Gruppen A, B, C und D aus Woche 64 (16 Wochen nach Belastung). Rhesus 08 wurde in Woche 54 euthanasiert und ist in der Analyse nicht vorhanden. Darstellung der Mittelwerte IFN- γ sezernierender T-Zellen pro 10^6 PBMCs ($n = 2$).

ERGEBNISSE

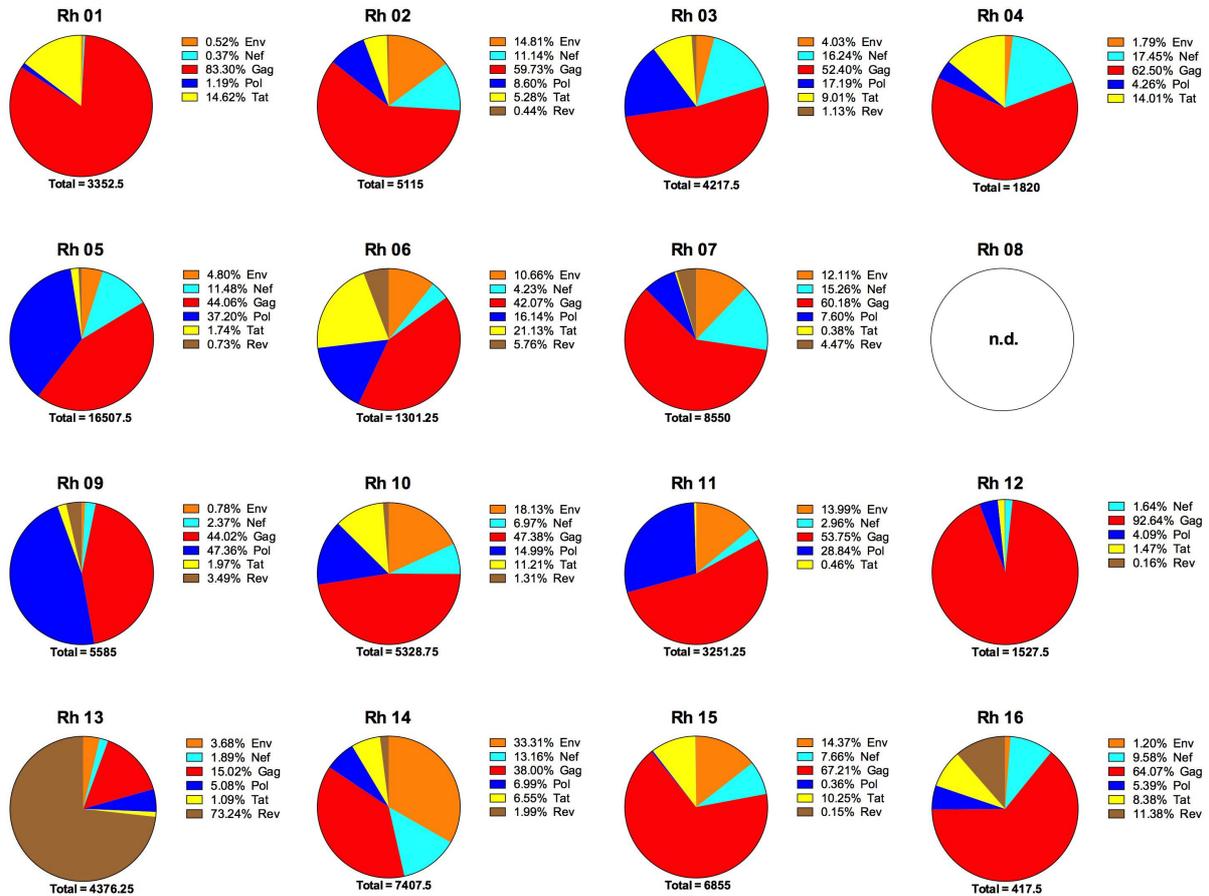


Abbildung 25. Darstellung der Spezifitäten IFN- γ sezernierender T-Zellen der Affen 01 bis 16 in Woche 64. Hier dargestellt sind die jeweiligen Anteile IFN- γ sezernierender T-Zellen nach Stimulation mit entsprechenden SIV-Proteinen bezogen auf die Gesamtmenge IFN- γ ⁺ T-Zellen in den jeweiligen Affen. Die Gesamtmenge an Spots pro 10^6 Zellen sind unter den Diagrammen angegeben (Total). Protein-spezifische Prozentangaben finden sich innerhalb der jeweiligen Legende.

Komplett geschützte Tiere besaßen zum Zeitpunkt der Belastung einen hohen und weniger gut geschützte Tiere einen niedrigen Anteil SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

Da alle Rhesusaffen der Studie Mamu-A*01⁺ waren, konnte bei der Analyse der T-Zell-basierten Immunantworten auf Mamu-A*01 Tetramere zurückgegriffen werden. Zum Einsatz kamen Mamu-A*01 Tetramere, welche das CM9-Peptid (Gag) mit der Aminosäuresequenz CTPYDINQM gebunden hatten und zudem mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert waren. Dieser MHC I:CM9-Komplex wird von CM9-spezifischen T-Zellrezeptoren (TCRs) CD8⁺ T-Zellen erkannt und gebunden. Durch den fluoreszierenden Farbstoff lassen sich die gebundenen T-Zellen im Zytometer detektieren und der Anteil Tetramer⁺ Zellen innerhalb der T-Zellpopulationen bestimmen.

Fast alle Tiere der Impfgruppen A und B zeigten in dieser Weise gefärbte CD8⁺ T-Zellen, wobei der Anteil an Tetramer⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺ T-Zellpopulationen unterschiedlich war (Abbildung 27 A). Rhesus 02, 05,

07 und 08 zeigten einen sehr niedrigen Anteil Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen von maximal 0,05%. Rhesus 03, 04 und 06 wiesen Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellpopulationen von maximal 0,2% und Rhesus 01 von 0,6% auf. Trotz der Unterschiede ist zu beachten, dass die geschützten Affen 01 und 06 einen im Vergleich zu den das Wildtypvirus kontrollierenden Tieren hohen Anteil Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen besaßen. Auch unter den Wildtypvirus kontrollierenden Affen zeigten die Affen, welche die Virusreplikation besonders effektiv kontrollieren konnten (Affen 03 bis 05 und 08), einen größeren Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zell-Anteil als die restlichen Tiere der Gruppen A und B (Rh 02 und 07).

Nach der Belastung änderte sich diese Verteilung: Die geschützten Rhesusaffen 01 und 06 besaßen drei Wochen nach der Belastung (51 wpi) nicht mehr die höchsten Anteile Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Impfgruppe, und in den Kontrollgruppen stiegen die Anteile der entsprechenden Zellpopulation (Abbildung 27 B). In Woche 16 nach Belastung (64 wpi) war der Anteil Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen in der Gruppe D im Mittel am höchsten, gefolgt von Gruppe A und Gruppe C (Abbildung 27 C). Die Affen der Gruppe B zeigten den geringsten Anteil Te-

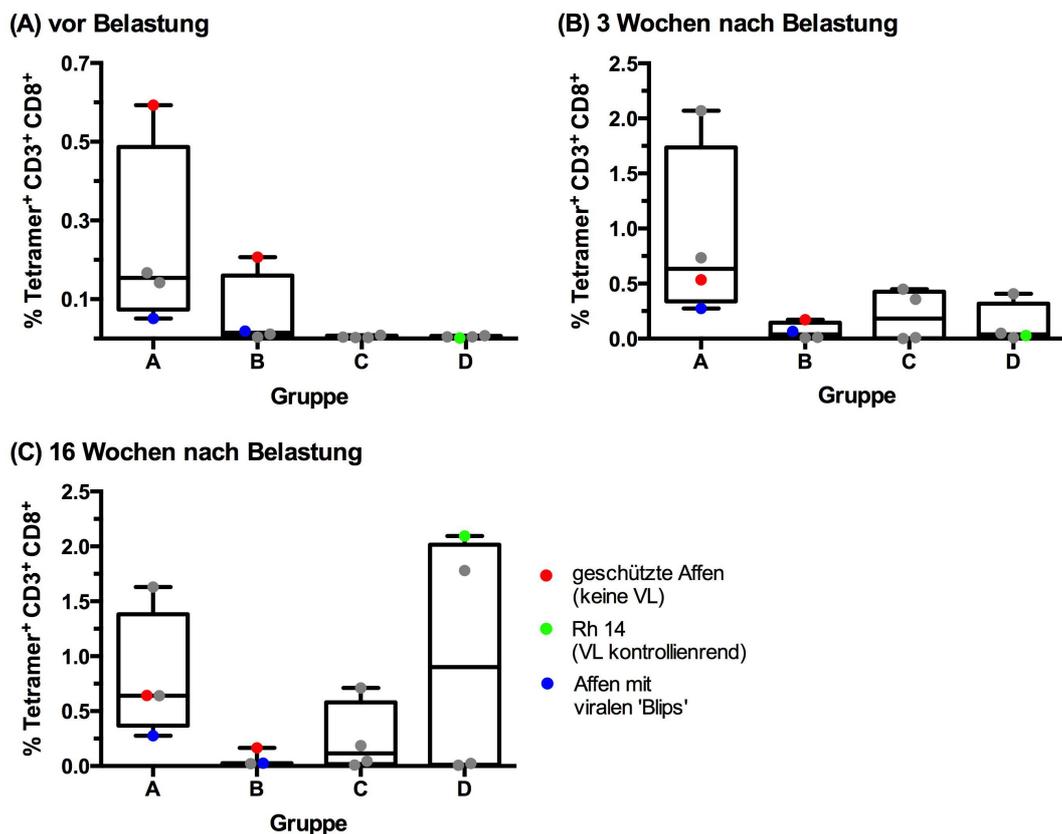


Abbildung 27. Bestimmung der CM9-spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulation in den Wochen vor der Belastung (48 wpi) sowie in den Wochen 51 und 64 (drei bzw. 16 Wochen nach Belastung). Tiere, bei denen während der Belastungsphase kein Virus im Plasma nachweisbar war, sind rot hervorgehoben. Tiere der Impfgruppen, welche virale *blips* aufwiesen, sind blau dargestellt. Der Virus-kontrollierende Affe der Kontrollgruppe D ist in Form des grünen Punktes symbolisiert. Durch graue Punkte sind alles restlichen Tiere gekennzeichnet.

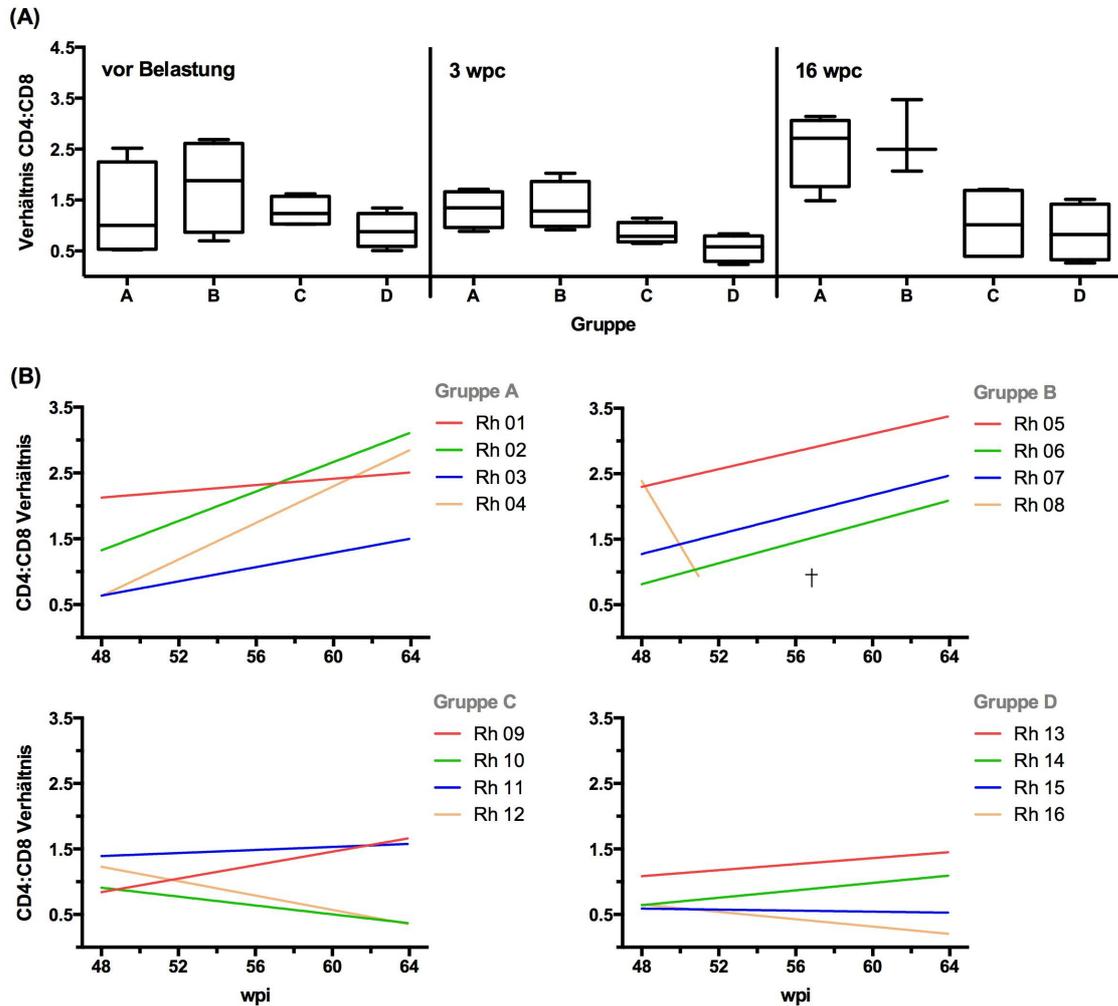


Abbildung 26. Verhältnis $CD4^+$ T-Zellen zu $CD8^+$ T-Zellen als Marker der SIV Pathogenese. (A) Darstellung des CD4:CD8 Verhältnisses als Median der Gruppen A, B, C und D vor und nach der Belastung. (B) Berechnung der Steigung des CD4:CD8 Verhältnisses in den einzelnen Affen. Darstellung der jeweiligen Regressionsgeraden berechnet durch Analysen in Woche 48, 51 und 64.

tramer⁺ $CD8^+$ T-Zellen, wobei der geschützte Affe 06 hier die höchste T-Zell-Antwort aufwies. Rhesus 14, der Affe der Kontrollgruppe D, welcher in der Lage war das Virus zu kontrollieren und die Viruslast ab Woche 56 unter das Detektionslimit zu drücken, zeigte die größte Tetramer⁺ $CD8^+$ T-Zellpopulation innerhalb beider Kontrollgruppen. Somit scheint eine Tendenz bei einigen Affen beobachtbar zu sein, bei der der Schutz bzw. die Kontrolle gegenüber der Wildtypbelastung mit dem Anteil SIV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen korreliert.

Die Rhesusaffen der Kontrollgruppen zeigten deutliche Zeichen eines Voranschreitens der HIV-Infektion, während bei den Tieren der beiden Impfgruppen keine solche Anzeichen zu erkennen waren.

Das Voranschreiten der SIV-Infektion innerhalb der Affen der Kontrollgruppen C und D konnte auch anhand des Verhältnisses von $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen nachvollzogen werden. Zu Beginn der Belastung konnte ein

CD4:CD8-Verhältnis von im Mittel 1,4 für die Gruppen A und B und 1,0 für die Gruppen C und D detektiert werden (Abbildung 26). Nach Belastung stieg das Verhältnis in den Impfgruppen (1,2 bis 2,5), während es in den Kontrollgruppen leicht sank (0,7 bis 0,8). Der Anstieg des Quotienten ist ein allgemeiner Hinweis auf eine Infektion. Das Absinken des Quotienten unter einen Wert von 1,0 kann ein Hinweis auf das Voranschreiten einer HIV/SIV-Infektion sein.

Bei einem Großteil der analysierten Zytokine lassen sich keine Unterschiede zwischen den Tieren der Impf- und der Kontrollgruppen feststellen.

Neben der Bestimmung der zellulären und humoralen Immunantwort kann auch die Bestimmung unterschiedlicher Botenstoffe (Zytokine) Aufschluss über eventuelle Schutzmechanismen geben. Im Falle von HIV bzw. SIV ist bekannt, dass es in Folge der Infektion zu einem sogenannten Zytokinsturm kommt, welcher sich in den ersten Wochen nach Infektion im Plasma detektieren lässt (Abschnitt 1.6.1).

Die Bestimmung der Zytokine im Plasma der Tiere dieser Studie wurde mit Hilfe eines Multiplex-Assay bzw. IFN- α ELISA durchgeführt. Dabei wurden neben IFN- α die in Tabelle 6 dargestellten Zytokine bestimmt. Die

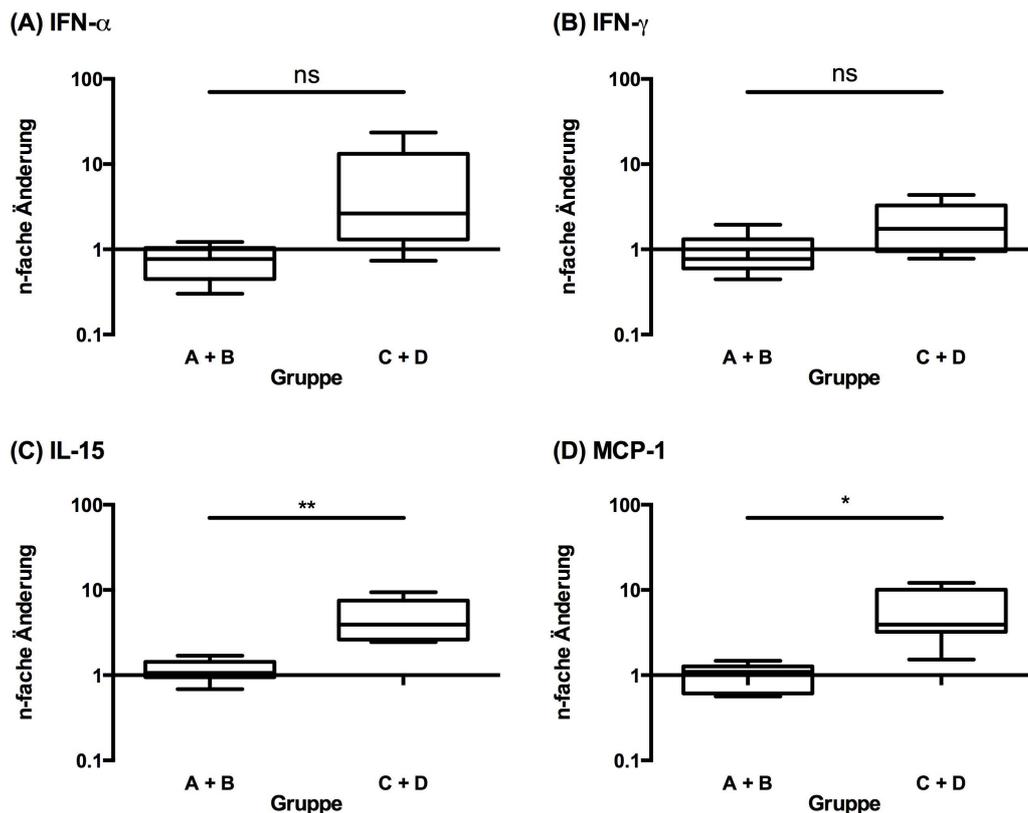


Abbildung 28. Analyse der Änderungen der Zytokinkonzentrationen von IFN- α , IFN- γ , IL-15 und MCP-1 im Plasma der Rhesusaffen. Darstellung der Änderung der Plasmakonzentration der entsprechenden Zytokine in Woche 50 (2. Woche nach Belastung) im Vergleich zu Woche 48. Statistische Analysen mittels t Test. (C) $p = 0,0054$, (D) $p = 0,0105$. ns, nicht signifikant.

Gesamtauswertung, dargestellt als n-fache Änderung der Zytokinkonzentration im Plasma der Affen nach Belastung (49-52 wpi, entspricht 1. bis 4. Woche nach Belastung), ist dem Anhang zu entnehmen.

In der Summe zeigten nur wenige Zytokine Auffälligkeiten. Bei den meisten Zytokinkonzentrationen lässt sich kein Unterschied zwischen den Tieren der einzelnen Gruppen ausmachen. Die vier Zytokine, deren Konzentration im Plasma zwischen den Tieren der Impf- und Kontrollgruppen unterschiedlich erscheinen, sind IFN- α , IFN- γ , IL-15 und MCP-1. Bei allen vier Zytokinen scheint die Änderung der Konzentration im Plasma der Tiere der Kontrollgruppen in Woche 50 deutlich größer zu sein, als bei den Tieren der Impfgruppen. Dies ist konsistent mit der gängigen Theorie, nach der es parallel zum Anstieg der Viruslast im Plasma zum Anstieg unterschiedlicher Zytokine kommt (Abschnitt 1.6.1). Tiefergehende Analysen zeigen jedoch, dass es sich bei lediglich zwei Zytokinen, IL-15 und MCP-1, um signifikante Unterschiede handelt (Abbildung 28). Für die Zytokine IFN- α und IFN- γ konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

3.5 Ergebnisüberblick

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der durchgeführten Analysen zur humoralen und zellulären Immunantwort. Dabei lässt sich folgendes bezüglich des durch das attenuierte Virus aufgebauten Schutzes feststellen: Die antiretrovirale Therapie mittels NNRTIs besaß keinen Einfluss auf den Schutz der mit dem attenuierten Virus infizierten Tiere. Dies zeigen die Ergebnisse zur Viruslast nach Belastung mit dem SIV_{mac239} Wildtypvirus (Abbildung 16). Dort ist ein deutlich verminderter Viruspeak sowie die Fähigkeit das Virus zu kontrollieren in allen geimpften Tieren zu erkennen, unabhängig von der Behandlung mit den entsprechenden NNRTIs (nur Gruppe A). Das Vorhandensein zweier Tiere mit steriler Immunität, welche sich auf beide Impfgruppen verteilen, ist ebenfalls ein Hinweis dafür, dass die Replikation des Impfvirus für den Schutz der Tiere vor einer homologen Wildtypvirusinfektion nicht notwendig ist.

Das die antiretrovirale Therapie trotz der nicht nachweisbaren Viruslast zum Zeitpunkt der Belastung erfolgreich und in der Lage war das Impfvirus zu unterdrücken, zeigen die entsprechenden *in vitro* Messungen basierend auf dem Plasma der Affen aus dem Behandlungszeitraum (Abbildung 15). Es konnte die Spezifität der antiretroviralen Therapeutika nachgewiesen werden, welche ausschließlich die Replikation des RT-SHIV Δ nef Virus, nicht jedoch die des Wildtypvirus SIV_{mac239} inhibieren. Zusätzlich konnte mit Hilfe von Titrationsreihen nachgewiesen werden, dass die in den Tieren erzielte Plasmakonzentration in der Lage war das Impfvirus zu unterdrücken, woraus geschlussfolgert werden kann, dass es auch *in vivo* zur Inhibition des Impfvirus gekommen sein muss. Für die Entstehung von Fluchtmutanten während der Behandlungsphase gab es keine Hinweise.

Humorale bzw. durch Antikörper-vermittelte Immunantworten, gemessen mit Hilfe unterschiedlicher IgG ELISAs (Abbildung 17, 19, 20), ADCC (Abbildung 22) oder Westernblotanalysen (Tabelle 12) korrelieren nicht mit der Fähigkeit der Tiere die Infektion mit dem Wildtypvirus zu verhindern oder zu kontrollieren. Im Gegenteil: Tiere, bei denen die Belastung mit dem Wildtypvirus nicht zur Infektion führte, zeigten im Anschluss an die Belastung auch keine Steigerungen entsprechender Immunantworten. Im Vergleich zu den Tieren der Impfgruppe, welche in der Lage waren das Virus zu kontrollieren, konnte keine Steigerung des IgG Titers, der IgG Avidität, der Fähigkeit zur Neutralisierung des Virus oder zur Lyse infizierter Zellen detektiert werden.

Bei der Analyse der zellulären Immunantwort ließ sich hingegen eine Auffälligkeit feststellen: Hier wiesen die komplett geschützten Tiere jeweils den größten Anteil SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Belastung auf. Eine Steigerung dieser CM9-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort konnte in diesen Tieren in Folge der Belastung nicht festgestellt werden, was deren sterile Immunität bestätigt.

Die Kontrolltiere zeigten mit Ausnahme eines Rhesusaffen allesamt einen nach einer SIV-Infektion erwarteten Infektionsverlauf, verbunden mit dem Aufkommen humoraler sowie zellulärer Immunantworten, der Detektion verschiedener Zytokine im Plasma und der Umkehr des Verhältnisses von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen.

ERGEBNISSE

Rh	Impfphase									Belastungsphase										
	Viruslast	IgG Total	IgG Spezifität	IgG Avidität	neutralisierende IgG	ADCC	ELISpot (breite)	Tetramerfärbung	CD4:CD8 Ratio	Viruslast	Lymphknoten	IgG Total	IgG Spezifität	IgG Avidität	neutralisierende IgG	ADCC	ELISpot (breite)	Tetramerfärbung	CD4:CD8 Ratio	Zytokinprofile
01	+	++	+	+	+	-	+++	++	++	-	SHIV	-	-	-	-	-	-	+	++	(-)
02	+	+++	+	+	++	+	-	-	+	+	SIV	+	+	+	+	+	+	-	+++	(-)
03	+	++	+	+	+	-	+	+	-	+	beide	+	+	+	+	++	+	+	++	(-)
04	+	+++	+	+	++	++	++	+	-	+	beide	+	++	++	+	+	+	++	+++	(-)
05	+	++	+	+	++	+	+	-	++	+	beide	+	+	+	+	+	++	-	+++	(-)
06	+	+	+	+	+	-	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	(-)
07	+	+++	+	+	++	++	-	-	+	+	beide	+	+	++	+	+	+	-	++	(-)
08	+	+	+	+	+	-	+	-	++	+	SIV	+	+	-	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	(-)
09										+	n.d.	+	+++	+	+	+	-	-	+	(+)
10										+	n.d.	+	+++	+	+	+	+	++	-	(+)
11										+	n.d.	+	+++	+	+	+	-	-	+	(+)
12										+	n.d.	+	+++	+	+	+	-	+	-	(+)
13										+	n.d.	+	+++	+	+	+	-	-	+	(+)
14										+	n.d.	+	+++	+	+	+	++	++	+	(+)
15										+	n.d.	+	+++	+	+	+	++	++	-	(+)
16										+	n.d.	-	+++	-	-	-	-	-	--	(+)

Tabelle 13. Zusammenstellung der Ergebnisse der Analysen zur humoralen und zellulären Immunantwort im Verlauf der Studie. Dargestellt sind alle während des Versuch durchgeführten Analysen der humoralen bzw. Antikörper-vermittelten Immunantwort sowie der zellulären Immunantwort. Die Ergebnisse sind entsprechend der Studie in Impf- und Belastungsphase unterteilt. Die Stärke der jeweiligen Immunantworten ist durch Plus- und Minussymbole wiedergegeben, wobei '+++' der stärksten und '-' keiner messbaren Immunantwort entspricht. Die Bewertung bezieht sich hierbei lediglich auf die entsprechenden Analysen (intra-Assay-Vergleichbarkeit). Immunantworten, welche für die geschützten bzw. potent das Wildtypvirus kontrollierenden Tiere charakteristisch erscheinen, sind rot bzw. blau gekennzeichnet. Die Daten der Zytokinmessungen sind in Klammern gesetzt, da die Aussage nur auf einige Zytokine zutrifft. SIV, SIV mac239 (Belastungsvirus); SHIV, RT-SHIV Δnef (Impfvirus); beide, SIVmac239 sowie RT-SHIV Δnef ; n.d., nicht detektiert. Rot hinterlegt sind die beiden geschützten Rhesusaffen, blau hinterlegt Rhesus 04 (potente Kontrolle des Wildtypvirus) sowie Rhesus 14 (Tier der Kontrollgruppe, welcher in der Lage war die Wildtypbelastung zu kontrollieren).

4 Diskussion

Bis zum heutigen Zeitpunkt zeigen Versuche an mit attenuierten SI-Viren infizierten Rhesusaffen den bisher besten Schutz vor Infektionen mit Wildtypviren. Die meisten humanen Vakzinkandidaten, welche die klinische Phase II erreichten (Tabelle 2, 3), konnten kein vergleichbares Maß an Effektivität erzielen. Die bisher erfolgreichste Studie der Phase II/III, RV144, zeigte nur eine Effektivität von ca. 31,2% nach dreieinhalb Jahren (60,5% nach einem Jahr).

Bei der hier durchgeführten Studie zeigten 25% der Tiere (zwei von acht) eine sterile Immunität. Auf vier der acht Tiere (50%) trifft die Beschreibung einer transienten Infektion zu (Abbildung 29). Zwei Tiere scheinen die Infektion mit dem Wildtypvirus dauerhaft kontrollieren zu können, wobei im Anschluss an die Belastung zu mehreren Zeitpunkten der Nachweis viraler RNA im Plasma möglich war. Somit unterscheidet sich der hier beobachtete Schutz der Tiere, hervorgerufen durch die Infektion mit dem attenuierten RT-SHIV Δnef Virus, von den Effektivitätsraten anderer Studien. Ein Vergleich ist möglich, da die Ursache für die Attenuation des Virus eine bekannte und zuvor bereits mehrfach verwendete Deletion im *nef* Gen ist. In den initialen Versuchen von Daniel *et al.* zeigten 100% der Tiere eine sterile Immunität ($n = 4$ SIV_{mac} Δnef^+ Rhesusaffen)⁴²². Die Studie von Ruth Connor zeigte 1998 eine Resistenz der Affen gegenüber einer SIV_{mac251} Infektion, welche abhängig war von der Inkubationsdauer des SIV_{mac} Δnef . Die Schutzwirkung des Virus lag bei 0% nach fünf Wochen, 50% nach zehn Wochen und betrug 100%, wenn die Tiere 15 Wochen nach der Infektion mit SIV_{mac} Δnef mit SIV_{mac251} belastet wurden⁴⁴⁴. Selbst die Applikation von SIV_{mac} Δnef über die Tonsillen führte in 60% der Fälle zu einer sterilen Immunität⁵³⁴.

Der Austausch der Reversen Transkriptase, welcher im hier verwendeten attenuierten Virus vorliegt, kann als zusätzliche Attenuierung angesehen werden. Auch wenn die humane Reverse Transkriptase die Funktion der simianen Reversen Transkriptase aufgrund großer Ähnlichkeiten übernehmen kann, die virale Fitness des chimären RT-SHIV-Virus scheint dennoch *in vivo* beeinträchtigt zu sein.

Sterile Immunität

- vollständiger Schutz vor einer möglichen HIV/SIV Infektion
- zu keinem Zeitpunkt ist der Nachweis von HIV/SIV möglich
- die Verbreitung des Virus auf andere Individuen ist nicht möglich

Transiente Infektion

- Nachweis einer Infektion ist möglich, jedoch lassen sich Immunantworten finden, welche in der Lage sind infizierte Zellen zu bekämpfen
- der Krankheitsverlauf ist aufgrund der Fähigkeit des Individuums zur Kontrolle der Virusreplikation verzögert
- der Nachweis von HIV/SIV zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion ist nicht möglich
- eine Serokonversion (Nachweis HIV/SIV-spezifischer Antikörper) kann, muss jedoch nicht auftreten
- die Übertragung von Virus ist, wenn überhaupt, nur innerhalb eines begrenzten Zeitfensters möglich

Dauerhafte Kontrolle der Infektion

- kein Virusnachweis oder Nachweis geringer Mengen viraler RNA in Blutproben (Viruslast) über einen sehr langen Zeitraum
- kein Verlust der CD4⁺ T-Zellen detektierbar
- keine Progression zur Immundefizienz (AIDS)
- Serokonversion ist messbar
- die Übertragung des Virus ist reduziert bzw. stark vermindert

Abbildung 29. Die drei möglichen Ergebniskategorien von Vakzinstudien. Verändert nach 'HIV Vaccine Trials Network (HVTN)', www.hvtn.org.

Im Vergleich zu anderen Studien lag die gemessene Viruslast für das *nef*-deletierte Virus jedoch durchaus in einem zu erwartenden Bereich. Bei der Studie von Kestler und Kollegen gelang erst ab einer Menge von mehr als 10^6 Rhesus-PBMCs der Nachweis des attenuierten Virus, und dies auch nur bei einigen wenigen Messungen. Ein Viruspeak zu Beginn der Infektionsphase, wie für Wildtyp-SIV bzw. -HIV üblich, konnte hier ebenfalls nicht festgestellt werden⁴²¹. Die geringe Virusreplikation wurde durch Untersuchungen von Lymphknotenbiopsien ein Jahr nach der Infektion gestützt. Bei den SIV_{mac} Δ *nef* infizierten Affen konnten keine Veränderungen der Lymphknoten festgestellt werden, noch war es möglich virale DNA in den Gewebeproben nachzuweisen^{421,422}. Höhere Viruslasten nach einer Infektion mit dem SIV_{mac} Δ *nef* Virus konnten in der Studie von Ruth Connor detektiert werden⁴⁴⁴. Hier konnte virale RNA im Plasma nach sieben Tagen mittels *branched DNA assay* detektiert und ein Viruspeak nach sieben bis zwölf Tagen festgestellt werden. Insgesamt bewegte sich die in dieser Studie beobachtete Replikation des RT-SHIV Δ *nef* somit im unteren, aber normalen Bereich für ein Virus mit 182 bp *nef*-Deletion.

Trotz der geringen und teilweise nicht nachweisbaren Viruslast gibt es Hinweise auf eine geringe (basale) Virusreplikation. Sowohl in der Studie von Kestler als auch in der hier durchgeführten Studie konnte kontinuierlich über den gesamten Zeitraum der Impfphase eine potente humorale Immunantwort detektiert werden⁴²¹. In der Studie von Daniel konnten noch zweieinhalb Jahre nach der Infektion mit dem SIV_{mac} Δ *nef* sowohl bindende als auch neutralisierende Antikörper gegen SIV im Plasma der Affen nachgewiesen werden⁴²².

Für die Beantwortung der Fragestellung, ob die Replikation des attenuierten Virus für den Schutz gegenüber einer Wildtypinfektion notwendig – wenn nicht sogar essentiell ist, war es erforderlich die Replikation des RT-SHIV Δ *nef* Virus in den Tieren einer der beiden Impfgruppen um den Zeitpunkt der Belastung herum zu inhibieren. Aufgrund der geringen Virusreplikation, die unterhalb des Detektionslimits lag, war ein direkter Nachweis der erfolgreichen Behandlung mit Nevirapin bzw. Efavirenz über die Bestimmung der Viruslast im Plasma nicht möglich. Die mittels HPLC durchgeführten Bestimmungen der NNRTI-Konzentrationen im Plasma zeigten, dass die entsprechenden Konzentrationen in einigen Affen deutlich unter den für Menschen empfohlenen pharmakologischen Konzentrationen lagen. Zuvor durchgeführte Studien im Affen zeigten, dass die Gabe von 60 mg/kg Efavirenz zu einer maximalen Plasmakonzentration von 5,7 μ M (\sim 1,8 μ g/ml) führt⁵³⁵. Des Weiteren wurde die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC_{50}) in verschiedenen Experimenten untersucht. Für Nevirapin wurden Konzentrationen ermittelt, die im Bereich von 0,5 μ M (RT-SHIV) bis \sim 0,1 μ M (HIV-1) lagen^{524,533}. Für Efavirenz lag die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) zwischen 5,9 nM bzw. 1,86 ng/ml (RT-SHIV) und 1,6 nM bzw. 0,51 ng/ml (HIV-1)^{533,535}.

Die Erhöhung bzw. der Wechsel von Nevirapin zum potenteren Reverse Transkriptase-Inhibitor Efavirenz führten nicht zu Konzentrationen, die alleine aufgrund der daraus resultierenden Plasmakonzentrationen eine ausreichende Inhibition nahelegten. Aus diesem Grund wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, welche die Inhibition des RT-SHIV Δ *nef* Virus zeigen sollten. Die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven von Nevirapin und Efavirenz machten deutlich, dass die Methode im entsprechenden Messbereich reproduzierbare und schlüssi-

ge Ergebnisse lieferte und sich somit zur Messung der Virusinhibition *in vitro* eignete. Für die Inhibition des RT-SHIV Δnef Virus war, wie auch schon andere Publikationen zeigten, eine höhere Nevirapin- bzw. Efavirenzkonzentration notwendig. Plasmaproben aus dem Behandlungszeitraum zeigten, dass eine maximale Inhibition *in vitro* bis zu einer Verdünnung von 1:10 bei Einsatz des RT-SHIV Δnef und bis zu einer Verdünnung von 1:40 bis 1:80 beim Einsatz von HIV-1 möglich war. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Replikation des Impfvirus innerhalb der Wochen 44 und 52 erfolgreich inhibiert werden konnte.

Der in beiden Impfgruppen gleichermaßen festgestellte Schutz der Tiere gegenüber einer homologen Wildtypvirusinfektion zeigte, dass die Suppression der Replikation des Impfvirus keinen Einfluss auf den Schutz der Tiere hatte. In den Tieren, die einer antiretroviralen Therapie unterzogen wurden, wurde der gleiche Anteil geschützter Tiere festgestellt. Auch der Verlauf der Wildtypvirusinfektion in den sechs infizierten Tieren, welche das Wildtypvirus später kontrollierten (je drei Tiere pro Impfgruppe), bestätigt dies. Viruslastmaximum und Dauer der Nachweisbarkeit des Wildtypvirus waren hier nahezu identisch.

Bei der späteren Analyse der Lymphknoten fiel auf, dass für drei Tiere (ein Tier aus Impfgruppe A und zwei Tiere aus Impfgruppe B) keinerlei Nukleinsäure des RT-SHIV Δnef Virus nachgewiesen werden konnte. Diese Beobachtung lässt jedoch keine Rückschlüsse auf eine vollständige Entfernung des Impfvirus aus dem Organismus zu. Zum einen würde dies der Messungen der Antikörper- oder auch T-Zell-Antworten widersprechen, zum anderen handelt es sich bei der Analyse der Lymphknoten um Stichproben. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere Lymphknotenbiopsien positive Nachweise für das Vorhandensein des Impfvirus geliefert hätten. Des Weiteren wurden während dieser Studie keinerlei Biopsien der Darmmukosa durchgeführt. Da diese jedoch ein wichtiger Replikationsort von SIV und HIV sind, ist ein Nachweis des Impfvirus an diesen Orten nicht unwahrscheinlich²⁹⁰.

Bei der von Sharp formulierten Hypothese zur Wirkweise attenuierter Viren ist die Besetzung wichtiger Replikationsorte von HIV (kritischer Nischen) mit der Replikationsfähigkeit der Impfviren gekoppelt⁴⁴¹. Die Replikation ist notwendig, um die Besetzung auf Dauer aufrecht zu erhalten und/oder um neu entstandene, nicht-infizierte Zielzellen (vornehmlich aktivierte CD4⁺ CCR5⁺ T-Zellen) sofort zu infizieren. Die Aufrechterhaltung dieser kritischen Nische, verbunden mit der potentiellen Infektion suszeptibler Zielzellen, wurde durch die antiretrovirale Therapie der Affen der Impfgruppe A unterbrochen. Trotzdem blieb der Schutz der Tiere, auch nach achtwöchiger NNRTI-Behandlung, erhalten. Aufgrund dieser Ergebnisse muss die schutzvermittelnde Aktivität auf immunologischer Seite gesucht werden.

Nichtsdestotrotz, Eigenschaften des attenuierten Virus bestimmen maßgeblich den späteren Schutz, auch wenn dessen aktive Replikation kurz vor und während der Infektion mit Wildtypvirus nicht notwendig ist. Verschiedene Publikation belegen, dass mit zunehmender Stärke der Attenuation die Schutzwirkung abnimmt^{423,444,536}.

Auf dieser Beobachtung begründet sich unter anderem die sogenannte *Threshold Theorie*⁵³⁷. Diese verbindet die Replikationsfähigkeit eines (attenuierten) Virus mit dem durch das Virus induzierten Schutz. Davon ausgehend müssen Viren, so sie einen protektiven Schutz induzieren sollen, ein gewisses Maß an Replikation während der frühen (akuten) Phase der Infektion aufweisen. Diese ist notwendig, um spezifische Immunantworten zu ge-

nerieren, welche daraufhin in der Lage sind die Replikation des attenuierten Virus meist unterhalb des Detektionslimits zu drücken. Ist das Immunsystem zu schwach oder noch nicht voll ausgereift, wie beispielsweise die Versuche mit juvenilen Makaken zeigen⁴³⁴, oder das attenuierte Virus nur schwach attenuiert, so kann das Virus eine Schwelle erreichen, bei der es zu pathologischen Veränderungen (Krankheitsausbruch) kommt. Ist die Attenuation hingegen zu stark, so wird eine Immunantwort induziert, die in der Folge zu schwach ist um eine Infektion mit pathogenen Viren zu verhindern⁵³⁸.

Die Replikation des während dieser Studie verwendeten Impfvirus war zwar gering, jedoch ausreichend um sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten zu generieren, welche die Replikation des Impfvirus dauerhaft unterhalb des Detektionslimits drückten. Zusätzlich ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der wöchentlichen Blutentnahme der Versuchstiere der eigentlich Viruspeak, also die maximale virale Replikation des Impfvirus, nicht erfasst wurde⁵³⁹. Die maximale Virusreplikation kann somit höher gelegen haben als durch die Messungen erfasst. Insgesamt passen diese Beobachtungen zu den Kriterien der *Threshold* Theorie und weisen ebenfalls auf eine wichtige Rolle des Immunsystems hin. Die Replikation des Impfvirus ist hierbei nur insofern wichtig, als sie für die Etablierung einer potenten und viruskontrollierenden Immunantwort notwendig ist.

Auf immunologischer Seite können verschiedene Komponenten des Immunsystems für den Schutz der Tiere verantwortlich sein. Auf humoraler Ebene sind dies unter anderem neutralisierende Antikörper oder Antikörper, welche in der Lage sind die Zelllyse infizierter Zellen zu induzieren. Auf zellulärer Ebene können vor allem zytotoxische T-Zellen (CTLs) und NK-Zellen Virusinfektionen verhindern bzw. eindämmen.

Das neutralisierende Antikörper für den Schutz attenuierter Viren nicht verantwortlich sind bzw. nur eine untergeordnete Rolle spielen, zeigten bereits unterschiedlichen Studien der Vergangenheit. Hierbei wurde unter anderem Plasma von mit SIV_{mac} C8 infizierten und gegenüber einer Wildtypbelastung geschützten Rhesusaffen^{452,540} auf naive Rhesusaffen übertragen. Diese passiv immunisierten Rhesusaffen zeigten, im Gegensatz zu den geschützten Rhesusaffen aus welchen das Plasma entnommen wurde, keinen Schutz gegenüber einer Belastung mit Wildtypviren⁴⁴³.

Trotz dieser negativen Ergebnisse wird der Einfluss bindender bzw. neutralisierender Antikörper kontrovers diskutiert. Verantwortlich hierfür sind Studien an Rhesusaffen, die einen protektiven oder den Krankheitsverlauf beeinflussenden Effekt nach passiver Immunisierung festgestellt haben. In der Studie von Clements und Kollegen konnte nach passiver Immunisierung eine protektive Wirkung in zwei von vier Rhesusaffen (immunisiert mit SIV_{17E-C1} und belastet mit SIV_{ΔB670}) detektiert werden⁵⁴¹. Die Studie von van Rompay belegt, dass die Gabe von anti-SIV IgG Antikörpern Neugeborene vor einer Infektion (oral) mit SIV_{mac251} schützt⁵⁴². Eine therapeutische Gabe von anti-SIV IgG Antikörpern nach der Infektion (hier: drei Wochen) hatte keinerlei Einfluss auf den Krankheitsverlauf⁵⁴².

Die therapeutische Gabe von anti-SIV IgG Antikörpern wurde zudem in der Studie von Haigwood untersucht⁵⁴³. Im Unterschied zur Studie von van Rompay wurde jedoch ein kürzerer Zeitabstand zwischen der Belastung und der Gabe der Antikörper gewählt, was einen positiven Einfluss der Antikörper auf die Infektion wahr-

scheinlicher machte, da sich die Infektion kurz nach der Belastung noch nicht vollständig etabliert hatte. Zusätzlich wurde die Gabe der Antikörper wiederholt. Hierbei konnte, wie erwartet, ein positiver Einfluss der anti-SIV Antikörpergabe festgestellt werden. In Woche 67 nach Belastung zeigten vier von sechs Affen keinerlei Anzeichen einer mit der SIV-Infektion assoziierten Erkrankung, während neun von zehn Kontrollaffen deutliche Symptome aufwiesen⁵⁴³.

Studien mit chimären Virusisolaten (SHIVs) waren ebenfalls in der Lage protektive Effekte bindender bzw. neutralisierender Antikörper nachzuweisen. John Mascola und Kollegen veröffentlichten Studien, bei denen sowohl nach intravaginaler als auch intravenöser Belastung mit dem chimären SI-Virus SHIV_{89,6PD} Effektivitätsraten von 57% und 25% erzielt wurden^{544,545}.

In der Studie von Shibata und Kollegen wurde Plasma HIV-infizierter Schimpansen auf Schweinsaffen übertragen. Nach der Belastung mit SHIV_{DH12}, einem chimären SI-Virusisolat mit dem Oberflächenprotein von HIV-1_{DH12}, zeigten zwei von zwei Affen, bei denen die Menge an SHIV_{DH12} der Menge an verabreichten HIV-1 virusneutralisierenden IgG Antikörpern angepasst wurde, einen kompletten Schutz⁵⁰³. Geringere Effektivitätsraten wurden erzielt, wenn die Menge verabreichter HIV-1 neutralisierender IgG Antikörper unterhalb einer *ex vivo* bestimmten effektiven Menge lag⁵⁰³.

Der in der Studie von Haigwood und Kollegen festgestellte Effekt SIV-spezifischer IgG Antikörper konnte in der Studie von Foresman und Kollegen, hier mit Hilfe des SHIV-Modells, nicht reproduziert werden. Auch eine kurz nach der subkutanen Belastung der Tiere erfolgte Gabe anti-HIV spezifischer IgG Antikörper führte zu keinerlei protektivem Schutz oder den Krankheitsverlauf modulierendem Effekt⁵⁴⁶.

In der hier durchgeführten Studie konnte, analog zu den Studien von Almond und Kollegen⁴⁴³, kein protektiver Einfluss neutralisierender anti-SIV spezifischer IgG Antikörper nachgewiesen werden. Die beiden Rhesusaffen mit steriler Immunität (Rh 01 und Rh 06) zeigten weder besonders hohe Titer virusneutralisierender noch virusbindender IgG Antikörper. Im Gegenteil: Die IgG Antikörper von Rhesus 06 zeigten die geringste virusneutralisierende Aktivität und auch deren Gesamtmenge lag, verglichen mit den anderen Tieren der Gruppen A und B, im unteren Bereich. Ähnliches galt für Rhesus 01, dessen Antikörper jedoch eine höhere Neutralisationsaktivität aufwiesen.

Charakteristisch für beide Affen mit steriler Immunität ist das Ausbleiben jeglicher anamnesticcher Immunantworten. Weder die Menge, noch deren virusneutralisierenden Eigenschaften nahmen nach der Belastung zu, im Gegensatz zu allen anderen Affen der Gruppen A und B. Dieses Ausbleiben anamnesticcher Immunantworten bei Tieren, welche keine Hinweise auf eine Infektion nach Belastung aufweisen, ist jedoch nicht ungewöhnlich. So konnten auch in der Studie von Foresman keinerlei *de novo* anti-HIV IgG Antikörper detektiert werden⁵⁴⁶.

Die Messungen der Antikörpertiter sowie deren virusneutralisierender Aktivität sind insofern bemerkenswert, da in dieser Studie mit einem homologen Virusisolat belastet wurde. Das Impfvirus und das Belastungsvirus unterschieden sich lediglich in der Reversen Transkriptase (HIV \leftrightarrow SIV) sowie im Nef Protein (Δ Nef \leftrightarrow Nef). Die Konkruenz der beiden Viren in Bezug auf ihre Oberflächenproteine hätte die Bildung virusneutralisierender An-

tikörper besonders wahrscheinlich gemacht. Diese Vermutung basiert auf den Beobachtungen bei z. B. HIV-Infizierten, bei welchen sich nach einiger Zeit neutralisierende Antikörper nachweisen lassen. Diese Antikörper zeigen jedoch nur ein begrenztes Spektrum, d. h. sie sind meist nur gegen das initial infizierende Virus wirksam. Erst spät im Infektionsverlauf lassen sich neutralisierende Antikörper finden, die gegen unterschiedliche (heterologe) Virusisolate wirksam sind⁵⁴⁷⁻⁵⁴⁹.

Negativ auf die Bildung neutralisierender Antikörper wirkte sich jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit die geringe Replikationsaktivität des Impfvirus aus, welche für die Antikörperreifung sowie für die Bildung neutralisierender Antikörper notwendig ist. Hierbei ist auffällig, dass der IgG Antikörpertiter mit der Fähigkeit zur Virusneutralisation assoziiert ist und mit steigendem Titer auch die Neutralisationsaktivität zunimmt. Da der Antikörpertiter als indirekten Hinweis auf die Virusreplikation angesehen werden kann, welche sich hier mittels real-time PCR nicht ermitteln ließ, kann daraus geschlussfolgert werden, dass die Bildung neutralisierender Antikörper von der Replikation des Impfvirus abhängig ist bzw. beeinflusst wird.

Ebenfalls keinen Einfluss auf den Schutz der Tiere hatte in dieser Studie die durch SIV-spezifische IgG Antikörper vermittelte Lyse infizierter Zellen. Auch hier zeigten die beiden komplett geschützten Tiere die geringste Aktivität im entsprechenden Assay. Nach der Belastung kam es zu keiner anamnesticen Immunantwort, welche bei allen anderen Tieren der Impfgruppe zu beobachten war. Einfluss auf die während der Analysen bestimmte Stärke der ADCC-Antwort hat unter anderem der Infektionsgrad der eingesetzten Zielzellen (hier: CEM.NK^R-CCR5). Es ist anzumerken, dass aufgrund der hier eingesetzten Methode Schwankungen des Infektionsgrades nicht auszuschließen waren. Somit können die tatsächlichen ADCC-Antworten teilweise höher als die hier bestimmten gelegen haben. Das Verhältnis der ADCC-Antworten der Affen untereinander, bei welchem die komplett geschützten Affen im Vergleich zu allen anderen Affen der Gruppen A und B nur geringe ADCC-Aktivität aufwiesen, ist hiervon jedoch nicht beeinflusst.

Das eine potente ADCC-Antwort Schutz vor einer Infektion vermitteln kann zeigte unter anderem die Studie von Alpert⁵¹⁹. Hierbei wurden Rhesusmakakken mit dem attenuierten SIV_{mac239} Δnef Virus infiziert und anschließend mit homologen oder heterologen Virusisolaten intravenös oder intravaginal belastet. Untersucht werden sollte zum einen die Fähigkeit der durch das attenuierte Virus induzierten Antikörper vor einer heterologen Belastung mit neutralisations-resistenten Viren zu schützen. Zum anderen sollte der Einfluss der Zeit zwischen der Infektion mit dem attenuierten Virus und der Belastung untersucht werden. Die Ergebnisse demonstrierten, dass die in den Tieren induzierten Antikörper in der Lage waren eine Infektion mit neutralisationsresistenten Viren zu verhindern. Diese Fähigkeit der Antikörper stieg je später die Belastung durchgeführt wurde, was eine Antikörperreifung begünstigte. Zudem korrelierte der Grad der ADCC-Antwort mit der Fähigkeit des Impfvirus zur Replikation.

Bisherige Untersuchungen weisen somit auf einen wichtigen Einfluss der viralen Replikation hin, die jedoch nicht zum Zeitpunkt der Belastung notwendig ist, wie die hier durchgeführte Studie zeigt, sondern zur Aktivierung des Immunsystems während der Immunisierungsphase. Je potenter das Impfvirus innerhalb der Immunisierungsphase repliziert, umso stärker und länger ist die antigenetische Stimulation des Immunsystems. Eine lan-

ganhaltende Aktivierung des Immunsystems führt aufgrund der Antikörperreifung zu hochaffinen Antikörpern mit breiterem Wirkungsspektrum, welche in der Lage sind homologe wie auch heterologe Viren bzw. Virusbestandteile zu binden und diese zu neutralisieren bzw. zu lysieren (im Fall infizierter Zellen).

Auffällig während dieser Studie waren die Ergebnisse zur Bestimmung der SIV-spezifischen T-Zellpopulationen. Die beiden komplett geschützten Affen besaßen zum Zeitpunkt der Belastung die größten Populationen CD8⁺ CM9-Tetramer⁺ T-Zellen. Nach der Belastung verschwand diese Tendenz und es kam zu keiner anamnestic CD8⁺ Immunantwort, was im Einklang mit der ebenfalls ausgebliebenen anamnestic humoralen Immunantwort war und durch die sterile Immunität der Tiere erklärt werden kann. Diese verhinderte die Infektion der Tiere nach der Belastung mit dem Wildtypvirus, wodurch eine Stimulation des Immunsystems (*Boost*) und somit entsprechende anamnestic Immunantworten ausblieben. In der Folge änderten sich die Anteile CM9-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen der geschützten Tiere während der gesamten Belastungsphase nicht. Anders bei den restlichen Tieren der Gruppen A und B sowie den Kontrolltieren: Drei von sechs Affen der Gruppen A und B sowie vier von acht Affen der Kontrollgruppen zeigten eine deutliche Steigerung CM9-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen.

Das Vorhandensein CM9-Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt der Belastung ist ein weiterer Hinweis auf die während der Immunisierungsphase kontinuierlich erfolgte Stimulation durch virale Antigene. Studien bei denen die Menge zytotoxischer T-Zellen bei HIV-Infizierten nach der Initiation einer antiretroviralen Therapie bestimmt wurden zeigten, dass es zu einer Abnahme von zytotoxischen T-Zellen im Blut kommt⁵⁵⁰. Circa drei Wochen nach der Initiation der antiretroviralen Therapie betrug die Halbwertszeit dieser Zellpopulation 45 Tage. Die auch neun Monate (336 Tage) nach der Infektion mit dem Impfvirus sowie knappe zwei Monate (56 Tage) nach Beginn der antiretroviralen Therapie immer noch messbaren Tetramer⁺ CD8⁺ T-Zellpopulationen lassen, wie auch schon die Messungen der Antikörpertiter bzw. -aviditäten, auf eine kontinuierliche Stimulation mit viralen Antigenen schließen.

Während bei den Untersuchungen der humoralen Immunantwort die Messungen zur Antikörperavidität eindeutig eine Antikörperreifung zeigten, wurde eine Reifung der CTL-Antwort während dieser Studie nicht bestimmt. Andere Studien verdeutlichen jedoch, dass es auch bei CTL-Antworten zu Reifungsprozessen kommen kann⁵⁵¹. Somit ist auch während dieser Studie von einer Reifung nicht nur der humoralen sondern auch der zellulären Immunantwort auszugehen. Besonders wichtig ist dieser Sachverhalt unter Beachtung des genetischen Hintergrunds der in der Studie verwendeten Rhesusaffen: Alle Rhesusaffen waren Mamu-A*01-positiv. Für diesen Genotyp des MHC Locus existieren verschiedene immundominante Epitope, wie zum Beispiel das CM9-(Gag₁₈₁₋₁₈₉) oder SL8-Peptid (Tat₂₈₋₃₅). Nach der Infektion mit dem Impfvirus ist somit eine Expansion Mamu-A*01:CM9/SL8-bindender T-Zellen wahrscheinlich, die in Folge der Reifung eine höhere Sensitivität sowie Affinität gegenüber dem CM9/SL8-Peptid besitzen. Dieser Expansions- und Reifungsprozess gilt jedoch nicht nur für die gut untersuchten Mamu-A*01 Epitope, sondern für alle Epitope, welche von CTLs erkannt werden und diese aktivieren. Der Gesamtanteil aller SIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen liegt somit höher als der hier bestimmte CM9-spezifische.

Trotz der Tatsache, dass bei dieser Studie sowohl intravenös immunisiert als auch belastet wurde, ist anzumerken dass die intravenöse Immunisierung mit attenuierten Viren auch Immunzellen innerhalb mukosaler Gewebe aktiviert⁵⁵². Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die natürliche Übertragung von SI- und HI-Viren, welche hauptsächlich über die Mukosa geschieht²⁹⁰⁻²⁹³. Des Weiteren ist, wie bereits erwähnt, die Replikation im Bereich der Mukosa des Darmes auch im Falle intravenöser Belastungen für die Etablierung der Infektion wichtig, da sich innerhalb der Darmmukosa der Großteil suszeptibler Zielzellen befindet^{290,300-303}.

Eine weitere Studie von Genescà und Kollegen zeigte einen direkten Einfluss von CD8⁺ T-Zellen auf den Schutz von mit SHIV_{89,6} immunisierten Rhesusaffen⁵⁵³. Hierbei konnte zudem gezeigt werden, dass es sich bei den durch das attenuierte Virus stimulierten CD8⁺ T-Zellen um polyfunktionale T-Zellen handelte, also solche T-Zellen, welche nach der Stimulation mehrere unterschiedliche Zytokine sekretieren. Die Kontrolltiere der Studie von Genescà zeigten innerhalb der Peripherie hauptsächlich monofunktionale T-Zellen.

Polyfunktionale T-Zellantworten lassen sich auch bei HIV-Infizierten detektieren, bei welchen es auch ohne antiretrovirale Therapie nicht zum Ausbruch der Krankheit kommt^{554,555}. Diese als *long-term non-progressors* (LTNPs) bezeichneten Personen zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, die Virusreplikation dauerhaft auf Werte unterhalb des Detektionslimits zu drücken. Vergleiche von Virusinfektionen mit ebenfalls chronischem Verlauf wie zum Beispiel EBV (Epstein-Barr-Virus oder Humanes-Herpes-Virus 4) oder CMV (Zytomegalievirus) zeigten zudem, dass sich die Eigenschaft der T-Zellen bei diesen Infektionen und die Eigenschaften der T-Zellen von LTNPs ähneln^{378,382}. In allen drei Fällen lassen sich T-Zellen detektieren, welche sowohl IFN- γ als auch IL-2 sezernieren. Während progressiver HIV-Infektionen fehlen meist IL-2 sezernierende T-Zellen. Wichtig für eine effektive Kontrolle ist somit nicht alleine die Quantität der T-Zellantwort sondern auch deren Qualität^{384,556}.

Die Funktionalität der T-Zellantworten wurde in dieser Studie nicht bestimmt. Grund hierfür war eine nicht ausreichende Menge an T-Zellen für die Analyse am Durchflusszytometer. Das Vorhandensein polyfunktionaler T-Zellen als Antwort auf die Infektion mit dem hier verwendeten attenuierten Impfvirus ist jedoch wahrscheinlich. Interessant hierbei wäre, ob die Menge polyfunktionaler T-Zellen mit dem beobachteten Schutz der Tiere der Impfgruppen korreliert.

Die Studie von Patrick Champagne zeigte deutlich, dass sich CTL-basierte Immunantworten nach der Infektion mit CMV von denen, welche durch eine HIV-Infektion induziert werden, unterscheiden³⁸². Dabei ist zu beachten, dass Zytomegalieviren zwar wie HI-Viren eine chronische Infektion etablieren, welche lebenslang im Körper nachweisbar ist, im Gegensatz zur Situation bei HIV ist das Immunsystem jedoch in der Lage die CMV-Infektion dauerhaft zu kontrollieren. Über 90% der CMV-Infektionen verlaufen asymptomatisch und eine Behandlung ist nur bei speziellen Personengruppen, wie zum Beispiel immunsuprimierten Personen, notwendig. Für die dauerhafte Kontrolle des CMV-Virus konnten vor allem zelluläre Immunantworten verantwortlich gemacht werden^{557,558}.

Die Arbeitsgruppe um Louis Picker entwickelte aus dieser Beobachtung einen Impfansatz, bei dem HIV-Proteine mittels CMV-Vektor in den Organismus eingebracht und exprimiert werden^{494,521,522}. Das Ziel: Eine Immun-

antwort gegen die im Vektor kodierten Proteine von HIV zu generieren, welche aufgrund des CMV-Hintergrunds der Immunantwort nach einer CMV-Infektion entspricht und zu einem Großteil aus Effektor-T-Zellen (T_{EM}) besteht. Analog zu den Beobachtungen bei CMV sollte diese T_{EM} -basierte Immunantwort in der Lage sein eine HIV-Infektion lokal am Eintrittsort zu kontrollieren und so eine systemische Ausbreitung verhindern.

Bisherige Studien im Affenmodell zeigten, dass die Immunisierung von Rhesusmakakken mit dieser Art von Vektor möglich ist und die gewünschte T_{EM} -basierte Immunantwort induziert, und dies auch bei bereits vorhandener CMV-Infektion (RhCMV⁺ Rhesusaffen)⁴⁹⁴. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass bei den RhCMV-SIV geimpften Tiere eine größere Anzahl wiederholter, intrarektaler Belastungen mit definierten Mengen an SIVmac239 notwendig waren, um die Tiere erfolgreich zu infizieren. Bei einigen der Tiere gab es zudem keinen Hinweis auf eine systemische Ausbreitung⁴⁹⁴. Spätere Studien weisen zudem auf eine vollständige Entfernung des Virus aus dem Organismus hin^{521,522}.

Zur nicht-zytolytischen Immunabwehr gehört unter anderem die durch Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems ausgelöste Zytokinantwort, welche bei den Tieren dieser Studie zum Zeitpunkt der Belastung sowie den darauf folgenden vier Wochen gemessen wurde. Anti-viral wirkende Zytokine sind nach ihrer Bindung an entsprechende Oberflächenrezeptoren in der Lage Signalkaskaden in Gang zu setzen, an dessen Ende die Hemmung der Virusreplikation und Ausbreitung der Viren steht. Zur wohl wichtigsten Zytokinantwort nach einer viralen Infektion zählt die Induktion von Interferon- α (IFN- α) und Interferon- β (IFN- β)⁵⁵⁹. Signifikante Unterschiede zwischen immunisierten, viruskontrollierenden Tieren und den Kontrolltieren konnte nur für zwei Zytokine festgestellt werden: Interleukin-15 (IL-15) und MCP-1 (*monocyte chemotactic protein 1*). Alle anderen im entsprechenden Zeitraum untersuchten Zytokine waren gemessen an ihrer Plasmakonzentration nahezu identisch oder nur marginal (nicht signifikant) unterschiedlich. Aufgrund des Analysezeitraums können lediglich Aussagen über die Änderungen der Zytokinkonzentrationen im Plasma zum Zeitpunkt und in Folge der Belastung mit dem Wildtypvirus SIV_{mac239} getroffen werden. Der Effekt der Infektion mit dem RT-SHIV Δnef Virus (bei den Tieren der Gruppe A und B) wurde hier nicht analysiert. Durch die hier durchgeführten Analysen hätten jedoch vorhandene Unterschiede im Zytokinlevel zwischen den geimpften und Kontrolltieren festgestellt werden können.

Im Kontext einer HIV-Infektion konnte für Interleukin-15 eine Verstärkung der Proliferation von Lymphozyten⁵⁶⁰⁻⁵⁶² sowie die Förderung der CTL-Expansion⁵⁶³ und Induktion der Perforinexpression⁵⁶² gezeigt werden. Zusätzlich kommt es in Folge von IL-15 zu einer Wiederherstellung der NK-Zell-Aktivität, welche bei HIV-Infizierten im Laufe der Infektion abnimmt⁵⁶⁴. Auch die Apoptose CD8⁺ T-Zellen ist durch IL-15 inhibiert⁵⁶⁵. Während einer Vakzinierung fördert IL-15 eine langanhaltende CTL-basierte Immunantwort⁵⁶⁶, und verstärkt die Aktivierung von HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie deren IFN- γ Produktion^{561,565}.

Die Hauptfunktion von MCP-1, auch CCL2 genannt, ist die Rekrutierung (Chemotaxis) von Leukozyten (Monozyten/ Makrophagen). Aufgrund der hohen Expression des MCP-1 Rezeptors bei CD4⁺ T-Zellen und Monozyten kommt es vor allem bei diesen Zellen zur MCP-1-bedingten Migration und somit zur Verbreitung von

HIV^{567,568}. Neben diesem die HIV-Infektion fördernden Einfluss von MCP-1 konnte jedoch auch ein inhibitorischer Effekt nachgewiesen werden⁵⁶⁹. Desweiteren führt MCP-1 zur Differenzierung von T_{h0}- zu T_{h2}-Zellen.

Für beide Zytokine wurde im Rahmen dieser Studie eine höhere Plasmakonzentration in den Kontrolltieren detektiert. Während IL-15 zelluläre Immunantworten unterstützt und so inhibitorisch auf die HIV-Replikation wirkt, kann MCP-1 als Zytokin mit hauptsächlich virus-fördernder Wirkung angesehen werden. Somit ergibt sich, was den Einfluss der Vakzinierung betrifft, kein einheitliches Bild. Hinzu kommt die große Anzahl an Zytokinen, bei denen kein signifikanter Unterschied zwischen den geimpften und den Kontrolltieren festgestellt werden konnte.

Verschiedene Faktoren können die Zytokinmessungen und erzielten Ergebnisse beeinflusst haben. Studienbedingt konnte das Blut der Affen erst circa 18 Stunden nach der Abnahme separiert werden. Bis zur Auftrennung in Leukozyten (PBMCs) und Plasma wurden die Vollblutproben in Citratröhrchen bei 4°C gelagert. Bezogen auf die Rahmenbedingungen dieser Studie sowie weitere Veröffentlichungen stellt dies die bestmögliche Probenlagerung dar, wobei eine zeitigere Aufarbeitung des Vollbluts generell vorzuziehen wäre⁵⁷⁰⁻⁵⁷².

Im Zuge dieser Studie konnte zum einen demonstriert werden, dass die Replikation attenuierter Viren für den Schutz von mit diesen Viren infizierten Rhesusaffen vor einer Wildtypvirusinfektion nicht notwendig ist. Aus der Vielzahl unterschiedlicher Immunantworten, die während dieser Studie analysiert wurden, konnte eine SIV-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort, bestimmt mit Hilfe von CM9-Tetrameren, mit dem Schutz der immunisierten Tiere in Verbindung gebracht werden. Nähere Untersuchungen sind jedoch notwendig, darunter unter anderem die Charakterisierung der in den Tieren vorherrschenden T-Zell-Populationen, um Korrelate des Schutzes eindeutig zu identifizieren.

Weiteren Untersuchungen, welche als Ziel die Identifizierung immunologischer Korrelate des Schutzes attenuierter Viren haben, können sich einer Vielzahl unterschiedlich attenuierter Impfviren bedienen. Interessant wäre es bei folgenden Studien weniger stark attenuierte Viren zu verwenden, wie beispielsweise das ebenfalls gut charakterisierte SIV_{mac} C8 Virus.

Da innerhalb dieser Studie der Einfluss neutralisierender Antikörper nicht im Zusammenhang mit dem Schutz der Tiere stand, sollte bei der Entwicklung effektiver HIV-Vakzine das Hauptaugenmerk auf die Induktion potenter Zell-basierter Immunantworten gelegt werden. Zusammen mit den Beobachtungen anderer Studien scheinen Zell-basierte Immunantworten in der Lage zu sein einkommende Viren bzw. infizierte Zellen effektiv zu bekämpfen und so die Infektion bereits zu Beginn, innerhalb des sogenannten *window of opportunity*, lokal zu begrenzen. Eine systemische Ausbreitung der Virusinfektion kann so möglicherweise verhindert werden. Wichtig hierbei scheint, dass bei der Entwicklung von HIV-Vakzinen der Infektionsrouten sowie den entsprechenden (*founder*)-Viren Rechnung getragen wird. Dabei stehen, ausgenommen der Infektion über direkten Blut-Blut-Kontakt wie zum Beispiel beim Drogengebrauch oder der Mutter-zu-Kind-Transmission, vor allem mukosale Transmissionen im Mittelpunkt. Antikörper-basierte Immunantworten, wie neutralisierende Antikörper oder die in letzter Zeit wieder verstärkt in den Fokus gerückte Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität

(ADCC), können diesen Arm des Immunsystem unterstützen und sollten aus diesem auch innerhalb einer HIV-Vakzine Berücksichtigung finden.

5 Schlussfolgerung

Die Erkenntnisse dieser Studie weisen bezüglich des Schutzmechanismus attenuierter Viren eindeutig auf einen immunologischen Mechanismus hin. Die Besetzung suszeptibler Zielzellen, für welche eine andauernde virale Replikation notwendig ist, konnte ohne Zweifel als Ursache für den beobachteten Schutz der Tiere dieser Studie ausgeschlossen werden. Zusätzlich gibt es, nicht nur in dieser Studie, Hinweise auf eine starke Beteiligung des zellulären Immunsystems. Diese Erkenntnisse rücken attenuierte Viren, welche seit langem zur Erforschung der HIV-Infektion und den damit verbundenen Immunantworten verwendet werden, erneut in den Fokus der HIV-Impfstoffentwicklung. Die Identifizierung der immunologischen Parameter, welche für den Schutz attenuierter Viren verantwortlich sind, kann in Zukunft wichtige Hinweise beim Design neuer HIV Impfstoffe liefern. Als eigentlicher Impfstoff scheiden attenuierten Viren nach wie vor aufgrund ihres vorhandenen pathogenen Potenzials aus.

Das zelluläre Immunsystem, mit seiner Eigenschaft auch infizierte Zellen zu bekämpfen, sollte nach wie vor von zukünftigen Impfstoffen angesprochen werden. Hierfür spricht diese Studie sowie die Untersuchungen mit RhCMV oder die generelle Fähigkeit zytotoxischer T-Zellen die Replikation von HIV/SIV während der akuten Phase der Infektion zu kontrollieren. Aufgrund der großen Bedeutung mukosaler Gewebe (besonders der Darmmukosa), sollten zukünftige Studien zum Schutz attenuierter Viren besonders dieses Gewebe berücksichtigen. Das attenuierte Viren auch nach einer intravenösen Infektion innerhalb der Darmmukosa wirken und dort Immunantworten induzieren und die Komposition an Immunzellen verändern, ist bereits nachgewiesen.

Die Ergebnisse der RV144 Studie, der Impfstudie mit den bisher erfolgreichsten Effektivitätsraten im Menschen, identifizierte als Schutzmechanismus bis heute zwar HIV-spezifische Antikörper, steht jedoch mit dieser Studie oder den Studien von Hansen und Kollegen nicht im Widerspruch. Auch Antikörper sind in der Lage die Zelllyse über NK-Zellen zu induzieren. Somit verbindet all diese Studien eine wichtige Eigenschaft: die Lyse infizierter Zellen. Neutralisierende Antikörper scheinen innerhalb dieser Studien keine oder nur eine untergeordnete Rolle gespielt zu haben.

Nach wie vor steht bei der Auswahl geeigneter Impfstoffe die Wahl der Virusproteine, welche zur Immunisierung verwendet werden, sowie des entsprechenden Vektors bzw. der Formulierung der Impfstoffe im Vordergrund. Attenuierte Viren bieten hier einen großen Vorteil: Zum einen handelt es sich bei attenuierten Viren um replikationskompetente Viren, welche die viralen Antigene über einen langen, wenn nicht sogar lebenslangen Zeitraum, exprimieren und so das Immunsystem stimulieren. Des weiteren besitzen attenuierten Viren fast das gesamte Genom des entsprechenden Virusisolats, wodurch eine breite Immunantwort induziert werden kann. Bei der RV144 Studie wurde ein nicht-replikationskompetenter Vektor verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die Effektivität des Impfstoffes mit der Zeit abnahm. Die Studie von Hansen und die hier durchgeführte Studie sind insofern vergleichbar, da in beiden Fällen replizierende Vektoren bzw. Viren eingesetzt wurden. In dieser Studie war das attenuierte Virus selbst in der Lage zu replizieren, in der Studie von Hansen wählte man einen

RhCMV Vektor, welcher lebenslang im Organismus repliziert. Beide Studien kennzeichnen sich dadurch aus, dass keine Abnahme der Effektivität festgestellt werden konnte, auch wenn der in dieser Studie durchgeführte Beobachtungszeitraum von lediglich 16 Wochen nach Belastung eher kurz ist. Die Eigenschaft einer stetigen, womöglich lebenslangen Replikation im Sinne einer andauernden Antigenpräsentation und somit fortdauernden Stimulation des Immunsystems scheint somit ein wichtiger Faktor bei der Etablierung und Aufrechterhaltung eines Immunschutzes zu sein, und die Replikation des Impfvirus ist nur in diesem Kontext notwendig und wichtig. Nur für sich betrachtet, d. h. auf viraler Ebene (wie zum Beispiel im Falle der retroviralen Interferenz oder der Besetzung von Zielzellen), ist die Replikation des Impfvirus irrelevant, wie auch diese Studie zeigte.

6 Zusammenfassung

In Tiermodellen induzieren attenuierte HIV/SIV-Viren einen außerordentlichen hohen Schutz gegenüber einer entsprechenden HIV- bzw. SIV-Wildtypvirusinfektion. Die zugrundeliegende Ursache ist bis heute nicht eindeutig geklärt. In Betracht kommen neben immunologischen auch virale Mechanismen.

Im Zentrum dieser Arbeit steht die im Jahr 1997 von Sharpe und Kollegen publizierte Hypothese, bei welcher durch das attenuierte Virus „besetzten“ Zielzellen eine zentrale Rolle spielen. Nach dieser Theorie verhindert die Besetzung dieser Zielzellen („kritischer Nischen“) eine anschließende Infektion mit Wildtypvirus. Die Replikation des attenuierten Virus ist bei diesem Prozess wichtig, da sie für die Aufrechterhaltung der Zielzellenbesetzung notwendig ist.

»In this model, the resident virus occupies a critical niche, and resistance to superinfection would be dependent upon the replication dynamics of this primary virus.«

Sharpe *et al.*, J. Gen. Virol., Vol. 78 (Pt 8), pp. 1923–7, Aug. 1997

Ziel dieser Arbeit war die Überprüfung dieser Theorie und die Analyse des Mechanismus, der für den Schutz von Rhesusaffen durch attenuierte SI-Viren verantwortlich ist.

Für diesen Zweck wurden insgesamt 16 Rhesusaffen indischen Ursprungs mit einem attenuierten SI-Virus infiziert, das sich durch zwei genetische Modifikationen vom SIV_{mac239} Wildtypvirus unterscheidet: (1) einer bekannten *nef*-Deletion, welche die Attenuierung des Virus begründet⁴²¹ sowie (2) dem Austausch der eigenen Reversen Transkriptase mit der von HIV-1⁵²⁵. Der Austausch der Reversen Transkriptase führt dazu, dass der als RT-SHIV Δ *nef* bezeichnete Moleklarklon sensitiv gegenüber nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Inhibitoren (NNRTIs) wird, da diese spezifisch an die Reverse Transkriptase von HIV-1, nicht aber von HIV-2 oder SIV binden.

Bei einigen der mit dem RT-SHIV Δ *nef* Virus immunisierten Tiere konnte durch den RT-Austausch die Replikation des Impfvirus zum Zeitpunkt der Belastung unterdrückt und die Hypothese zur Zielzellenbesetzung überprüft werden.

Die Daten der Viruslast zeigten deutlich den Einfluss der Infektion mit dem attenuierten Virus (Impfvirus). Dieser Einfluss war unabhängig von der Behandlung mit den antiretroviral-wirkenden Medikamenten, woraus geschlossen werden konnte, dass die Replikation des Impfvirus für den Schutz der Tiere nicht notwendig war und virale Parameter als Erklärung ausschieden.

Aus diesem Grund wurden im weiteren Verlauf der Studie verschiedene Komponenten des Immunsystems auf einen schutzvermittelnden Einfluss hin überprüft. Während auf der Ebene humoraler Immunantworten (bindende IgG Antikörper, Antikörperavidität, neutralisierende Antikörper oder die Zelllyse vermittelnde Antikörper) keinerlei Korrelationen mit dem Schutz der Tiere festgestellt werden konnte, zeigten die geschützten Tiere einen hohen Anteil SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen gegenüber den geimpften Tieren, die lediglich die Wildtypvirusre-

plikation kontrollieren konnten bzw. den Kontrolltieren, welche nicht mittels attenuiertem Virus geimpft waren. Vergleiche mit anderen Publikationen der jüngeren Zeit zeigen ebenfalls, dass die Induktion SIV-spezifischer CD8⁺ T-Zell-Antworten maßgeblich für den Schutz von mit SIV-infizierten Rhesusaffen verantwortlich sein kann^{494,521,522}.

Bei der Konzeption einer geeigneten HIV-Vakzine können somit attenuierte Viren nach wie vor wichtige Erkenntnisse liefern, insbesondere nachdem die hier durchgeführte Studie deutliche Hinweise für einen immunologisch begründeten Schutzmechanismus aufgezeigt hat. Ein wichtiges wenn nicht sogar essentielles Ziel eines HIV-Impfstoffes sollte nach den Ergebnissen dieser Studie die Induktion einer potenten CTL-basierten Immunantwort sein.

Summary

Thus far, attenuated viruses demonstrated the most successful protection against challenges with SIV, but despite major efforts, the mechanism of protection is still unknown. There are two possible candidates which need to be considered: On one hand, there are viral factors like “viral interference” or “superinfection resistance”^{573–575}. On the other hand, there is the immune system with its two major branches, the humoral and cellular immune response.

This work centers around a hypothesis published in 1997, which is based on the replication capacity of attenuated viruses⁴⁴¹. Here, the attenuated virus occupies critical target cells (critical niches), which are important for the establishment of an infection, leading to resistance to superinfection.

»In this model, the resident virus occupies a critical niche, and resistance to superinfection would be dependent upon the replication dynamics of this primary virus.«

Sharpe *et al.*, J. Gen. Virol., Vol. 78 (Pt 8), pp. 1923–7, Aug. 1997

The aim of this work was to analyze the mechanism of protection and to test if the replication of the attenuated virus is needed. If that should not be the case, correlates of protection have to be searched primarily on the side of the immune system.

Eight Rhesus macaques were infected with a live-attenuated virus based on SIV_{mac239}, including two major modifications: (1) a known deletion in the *nef* gene, which is responsible for the attenuation of the virus⁴²¹ and (2) the exchange of the SIV gene coding for the reverse transcriptase (RT) to the HIV-1 RT gene⁵²⁵. This exchange renders the virus susceptible to non-nucleotide reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), which are only effective against the RTs from HIV-1.

At the time of challenge, some of the vaccinated animals and some of the control animals were treated with NNRTIs, leading to an inhibition of the vaccine virus replication. Other vaccinated animals as well as control animals were left untreated.

As there was no difference in the virus load between the ART-treated and untreated vaccinated animals, the hypothesis that the replication of the vaccine is needed for protection was refuted. In the following, several different immune responses were checked for their influence towards protection. Humoral immune responses, like binding IgG antibodies, antibody avidity, neutralizing antibodies or antibodies able to induce the lysis of infected cells, were tested. None of these humoral immune responses correlated with the protection level seen in the animals.

While analyzing cellular immune responses, the completely protected animals showed higher levels of SIV-specific CD8⁺ T cells compared to the unprotected control animals and the partly protected animals, which in turn were able to control the replication of the wildtype virus. These data are consistent with other publications, in which replicating vectors were used to vaccinate monkeys and induced protective CTL responses.

SUMMARY

This study proved that the protection induced by live-attenuated viruses is not dependent on their replication capacity at the time of challenge. There is strong evidence for an immunological-based mechanism of protection, with a major focus on CTL responses. These results provide important clues for vaccine design and showed that attenuated viruses can be used to search for immune correlates leading to protection.

7 Literatur

1. Gottlieb, M. S. *et al.* Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**, 250-2 (1981).
2. Friedman-Kien, A. *et al.* Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **30**, 305-8 (1981).
3. Mildvan, D. *et al.* Persistent, generalized lymphadenopathy among homosexual males. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 249-51 (1982).
4. Gottlieb, M. S. *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1425-31 (1981).
5. Durack, D. T. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma in homosexual men. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1465-7 (1981).
6. Auerbach, D. M. *et al.* Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N. Engl. J. Med.* **306**, 248-52 (1982).
7. Centers of Disease Control. Prevention of acquired immune deficiency syndrome (AIDS): report of inter-agency recommendations. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **32**, 101-3 (1983).
8. Harris, C. *et al.* Immunodeficiency among female sexual partners of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - New York. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 697-8 (1983).
9. Ehrenkranz, N. *et al.* Pneumocystis carinii pneumonia among persons with hemophilia A. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 365-7 (1982).
10. Poon, M. *et al.* Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) among patients with hemophilia A. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 644-6, 652 (1982).
11. Ammann, A. *et al.* Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 652-4 (1982).
12. O'Reilly, R. *et al.* Unexplained immunodeficiency and opportunistic infections in infants--New York, New Jersey, California. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 665-7 (1982).
13. Barré-Sinoussi, F. *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-71 (1983).
14. Gallo, R. C. *et al.* Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 865-7 (1983).
15. Popovic, M., Sarngadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500 (1984).
16. Gazzard, B. G. *et al.* Clinical findings and serological evidence of HTLV-III infection in homosexual contacts of patients with AIDS and persistent generalised lymphadenopathy in London. *Lancet* **2**, 480-3 (1984).
17. Ho, D. D. *et al.* HTLV-III in the semen and blood of a healthy homosexual man. *Science* **226**, 451-3 (1984).
18. Groopman, J. E. *et al.* HTLV-III in saliva of people with AIDS-related complex and healthy homosexual men at risk for AIDS. *Science* **226**, 447-9 (1984).
19. Zagury, D. *et al.* HTLV-III in cells cultured from semen of two patients with AIDS. *Science* **226**, 449-51 (1984).
20. Gallo, R. C. *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**, 500-3 (1984).
21. Schüpbach, J. *et al.* Serological analysis of a subgroup of human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) associated with AIDS. *Science* **224**, 503-5 (1984).
22. Sarngadharan, M. G., Popovic, M., Bruch, L., Schüpbach, J. & Gallo, R. C. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses (HTLV-III) in the serum of patients with AIDS. *Science* **224**, 506-8 (1984).
23. Chiu, I. M. *et al.* Nucleotide sequence evidence for relationship of AIDS retrovirus to lentiviruses. *Nature* **317**, 366-8 (1985).
24. Levy, J. A. *et al.* Infection by the retrovirus associated with the acquired immunodeficiency syndrome. Clinical, biological, and molecular features. *Ann. Intern. Med.* **103**, 694-9 (1985).
25. Rabson, A. B. & Martin, M. A. Molecular organization of the AIDS retrovirus. *Cell* **40**, 477-80 (1985).
26. Gonda, M. A. *et al.* Sequence homology and morphologic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* **227**, 173-7 (1985).
27. Chang, S. Y., Bowman, B. H., Weiss, J. B., Garcia, R. E. & White, T. J. The origin of HIV-1 isolate HTLV-IIIB. *Nature* **363**, 466-9 (1993).
28. Chermann, J. C. *et al.* Discrepancies in AIDS virus data. *Nature* **351**, 277-8 (1991).
29. Guo, H. G. *et al.* Sequence analysis of original HIV-1. *Nature* **349**, 745-6 (1991).
30. Coffin, J. *et al.* Human immunodeficiency viruses. *Science* **232**, 697 (1986).
31. Vandepitte, J., Verwilghen, R. & Zachee, P. AIDS and cryptococcosis (Zaire, 1977). *Lancet* **1**, 925-6 (1983).
32. Offenstadt, G. *et al.* Multiple opportunistic infection due to AIDS in a previously healthy black woman from Zaire. *N. Engl. J. Med.* **308**, 775 (1983).
33. Ellrodt, A. *et al.* Isolation of human T-lymphotropic retrovirus (LAV) from Zairian married couple, one with AIDS, one with prodromes. *Lancet* **1**, 1383-5 (1984).
34. Piot, P. *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet* **2**, 65-9 (1984).

35. Brun-Vézinet, F. *et al.* Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. *Science* **226**, 453–6 (1984).
36. Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **31**, 507–8, 513–4 (1982).
37. Bygbjerg, I. C. AIDS in a Danish surgeon (Zaire, 1976). *Lancet* **1**, 925 (1983).
38. Clumeck, N., Mascart-Lemone, F., de Maubeuge, J., Brenez, D. & Marcelis, L. Acquired immune deficiency syndrome in Black Africans. *Lancet* **1**, 642 (1983).
39. Brunet, J. B. *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome in France. *Lancet* **1**, 700–1 (1983).
40. Henrickson, R. V. *et al.* Epidemic of acquired immunodeficiency in rhesus monkeys. *Lancet* **1**, 388–90 (1983).
41. Letvin, N. L. *et al.* Acquired immunodeficiency syndrome in a colony of macaque monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 2718–22 (1983).
42. Daniel, M. D. *et al.* Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**, 1201–4 (1985).
43. Kanki, P. J. *et al.* Serologic identification and characterization of a macaque T-lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. *Science* **228**, 1199–201 (1985).
44. Letvin, N. L. *et al.* Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STL-III. *Science* **230**, 71–3 (1985).
45. Chopra, H. C. & Mason, M. M. A new virus in a spontaneous mammary tumor of a rhesus monkey. *Cancer Res.* **30**, 2081–6 (1970).
46. Jensen, E. M., Zelljadt, I., Chopra, H. C. & Mason, M. M. Isolation and propagation of a virus from a spontaneous mammary carcinoma of a rhesus monkey. *Cancer Res.* **30**, 2388–93 (1970).
47. Kramarsky, B., Sarkar, N. H. & Moore, D. H. Ultrastructural comparison of a virus from a Rhesus-monkey mammary carcinoma with four oncogenic RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 1603–7 (1971).
48. Todaro, G. J. *et al.* Isolation and characterization of a new type D retrovirus from the asian primate, Presbytis obscurus (spectacled langur). *Virology* **84**, 189–94 (1978).
49. Daniel, M. D. *et al.* A new type D retrovirus isolated from macaques with an immunodeficiency syndrome. *Science* **223**, 602–5 (1984).
50. Kanki, P. J. *et al.* Antibodies to simian T-lymphotropic retrovirus type III in African green monkeys and recognition of STL-III viral proteins by AIDS and related sera. *Lancet* **1**, 1330–2 (1985).
51. Kanki, P. J., Alroy, J. & Essex, M. Isolation of T-lymphotropic retrovirus related to HTLV-III/LAV from wild-caught African green monkeys. *Science* **230**, 951–4 (1985).
52. Benveniste, R. E. *et al.* Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J. Virol.* **60**, 483–90 (1986).
53. Murphey-Corb, M. *et al.* Isolation of an HTLV-III-related retrovirus from macaques with simian AIDS and its possible origin in asymptomatic mangabeys. *Nature* **321**, 435–7 (1986).
54. Barin, F. *et al.* Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* **2**, 1387–9 (1985).
55. Clavel, F. *et al.* Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343–6 (1986).
56. Kanki, P. J. *et al.* New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* **232**, 238–43 (1986).
57. Hirsch, V. M., Olmsted, R. A., Murphey-Corb, M., Purcell, R. H. & Johnson, P. R. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389–92 (1989).
58. Gao, F. *et al.* Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**, 495–9 (1992).
59. Gao, F. *et al.* Genetic diversity of human immunodeficiency virus type 2: evidence for distinct sequence subtypes with differences in virus biology. *J. Virol.* **68**, 7433–47 (1994).
60. Chen, Z. *et al.* Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey t. *J. Virol.* **70**, 3617–27 (1996).
61. Chen, Z. *et al.* Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* **71**, 3953–60 (1997).
62. Apetrei, C. *et al.* Molecular epidemiology of simian immunodeficiency virus SIVsm in U.S. primate centers unravels the origin of SIVmac and SIVstm. *J. Virol.* **79**, 8991–9005 (2005).
63. Apetrei, C. *et al.* Kuru experiments triggered the emergence of pathogenic SIVmac. *AIDS* **20**, 317–21 (2006).
64. Peeters, M. *et al.* Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* **3**, 625–30 (1989).
65. Huet, T., Cheyner, R., Meyerhans, A., Roelants, G. & Wain-Hobson, S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* **345**, 356–9 (1990).
66. Santiago, M. L. *et al.* Foci of endemic simian immunodeficiency virus infection in wild-living eastern chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *J. Virol.* **77**, 7545–62 (2003).
67. Worobey, M. *et al.* Origin of AIDS: contaminated polio vaccine theory refuted. *Nature* **428**, 820 (2004).
68. Keele, B. F. *et al.* Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* **313**, 523–6 (2006).
69. Van Heuverswyn, F. *et al.* Genetic diversity and phylogeographic clustering of SIVcpzPtt in wild chimpanzees in Cameroon. *Virology* **368**, 155–71 (2007).
70. Rudicell, R. S. *et al.* Impact of simian immunodeficiency virus infection on chimpanzee population dynamics. *PLoS Pathog.* **6**, e1001116 (2010).

71. Corbet, S. *et al.* env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* **74**, 529–34 (2000).
72. Santiago, M. L. *et al.* SIVcpz in wild chimpanzees. *Science* **295**, 465 (2002).
73. Bailes, E. *et al.* Hybrid origin of SIV in chimpanzees. *Science* **300**, 1713 (2003).
74. Santiago, M. L. *et al.* Amplification of a complete simian immunodeficiency virus genome from fecal RNA of a wild chimpanzee. *J. Virol.* **77**, 2233–42 (2003).
75. Kaessmann, H., Wiebe, V. & Pääbo, S. Extensive nuclear DNA sequence diversity among chimpanzees. *Science* **286**, 1159–62 (1999).
76. Gao, F. *et al.* Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. *Nature* **397**, 436–41 (1999).
77. Korber, B. *et al.* Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789–96 (2000).
78. Worobey, M. *et al.* Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature* **455**, 661–4 (2008).
79. Vidal, N. *et al.* Unprecedented degree of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M genetic diversity in the Democratic Republic of Congo suggests that the HIV-1 pandemic originated in Central Africa. *J. Virol.* **74**, 10498–507 (2000).
80. Zhu, T. *et al.* An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**, 594–7 (1998).
81. Peeters, M. *et al.* Risk to human health from a plethora of simian immunodeficiency viruses in primate bushmeat. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 451–7 (2002).
82. Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. & Sharp, P. M. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607–14 (2000).
83. De Leys, R. *et al.* Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J. Virol.* **64**, 1207–16 (1990).
84. Ayoub, A. *et al.* HIV-1 group O infection in Cameroon, 1986 to 1998. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 466–7 (2001).
85. Wertheim, J. O. & Worobey, M. Dating the age of the SIV lineages that gave rise to HIV-1 and HIV-2. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000377 (2009).
86. Mourez, T., Simon, F. & Plantier, J.-C. Non-M variants of human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**, 448–61 (2013).
87. Peeters, M. *et al.* Characterization of a highly replicative intergroup M/O human immunodeficiency virus type 1 recombinant isolated from a Cameroonian patient. *J. Virol.* **73**, 7368–75 (1999).
88. Takehisa, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 intergroup (M/O) recombination in Cameroon. *J. Virol.* **73**, 6810–20 (1999).
89. Vergne, L. *et al.* Biological and genetic characteristics of HIV infections in Cameroon reveals dual group M and O infections and a correlation between SI-inducing phenotype of the predominant CRF02_AG variant and disease stage. *Virology* **310**, 254–66 (2003).
90. Vessière, A. *et al.* First evidence of a HIV-1 M/O recombinant form circulating outside Cameroon. *AIDS* **24**, 1079–82 (2010).
91. Simon, F. *et al.* Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.* **4**, 1032–7 (1998).
92. Plantier, J.-C. *et al.* A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat. Med.* **15**, 871–2 (2009).
93. Vallari, A. *et al.* Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. *J. Virol.* **85**, 1403–7 (2011).
94. Sauter, D. *et al.* HIV-1 Group P is unable to antagonize human tetherin by Vpu, Env or Nef. *Retrovirology* **8**, 103 (2011).
95. Robertson, D. L. *et al.* HIV-1 nomenclature proposal. *Science* **288**, 55–6 (2000).
96. Taylor, B. S. & Hammer, S. M. The challenge of HIV-1 subtype diversity. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1965–6 (2008).
97. Hemelaar, J., Gouws, E., Ghys, P. D. & Osmanov, S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000–2007. *AIDS* **25**, 679–89 (2011).
98. Eberle, J. & Gürtler, L. HIV types, groups, subtypes and recombinant forms: errors in replication, selection pressure and quasispecies. *Intervirology* **55**, 79–83 (2012).
99. Yamaguchi, J. *et al.* HIV type 2 intergroup recombinant identified in Cameroon. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **24**, 86–91 (2008).
100. Ibe, S. *et al.* HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **54**, 241–7 (2010).
101. Sharp, P. M. & Hahn, B. H. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **1**, a006841 (2011).
102. Ayoub, A. *et al.* Evidence for continuing cross-species transmission of SIVsmm to humans: characterization of a new HIV-2 lineage in rural Côte d’Ivoire. *AIDS* **27**, 2488–91 (2013).
103. Santiago, M. L. *et al.* Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercopithecus atys*) from the Tai Forest, Côte d’Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *J. Virol.* **79**, 12515–27 (2005).
104. Faria, N. R. *et al.* Phylogeographical footprint of colonial history in the global dispersal of human immunodeficiency virus type 2 group A. *J. Gen. Virol.* **93**, 889–99 (2012).
105. Tienen, C. Van *et al.* Two distinct epidemics: the rise of HIV-1 and decline of HIV-2 infection between 1990 and 2007 in rural Guinea-Bissau. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **53**, 640–7 (2010).
106. Casareale, D. *et al.* Establishment of retrovirus-, Epstein-Barr virus-positive B-lymphoblastoid cell lines derived from individuals at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *AIDS Res.* **1**, 253–70 (1984).
107. Casareale, D. *et al.* Prevalence of AIDS-associated retrovirus and antibodies among male homosexuals at risk for AIDS in Greenwich Village. *AIDS Res.* **1**, 407–21 (1984).

108. Kostianovsky, M., Kang, Y. H. & Grimley, P. M. Disseminated tubuloreticular inclusions in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ultrastruct. Pathol.* **4**, 331–6 (1983).
109. Epstein, L. G. *et al.* HTLV-III/LAV-like retrovirus particles in the brains of patients with AIDS encephalopathy. *AIDS Res.* **1**, 447–54 (1984).
110. Chertova, E. *et al.* Envelope glycoprotein incorporation, not shedding of surface envelope glycoprotein (gp120/SU), is the primary determinant of SU content of purified human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **76**, 5315–25 (2002).
111. Zhu, P. *et al.* Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847–52 (2006).
112. Geijtenbeek, T. B. *et al.* DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**, 587–97 (2000).
113. Saphire, A. C., Bobardt, M. D., Zhang, Z., David, G. & Galley, P. A. Syndecans serve as attachment receptors for human immunodeficiency virus type 1 on macrophages. *J. Virol.* **75**, 9187–200 (2001).
114. Arthos, J. *et al.* HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat. Immunol.* **9**, 301–9 (2008).
115. Cicala, C. *et al.* The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 20877–82 (2009).
116. Maddon, P. J. *et al.* The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* **47**, 333–48 (1986).
117. McDougal, J. S. *et al.* Binding of HTLV-III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science* **231**, 382–5 (1986).
118. Kwong, P. D. *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**, 648–59 (1998).
119. Chen, B. *et al.* Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature* **433**, 834–41 (2005).
120. Berger, E. A. *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature* **391**, 240 (1998).
121. Keele, B. F. *et al.* Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 7552–7 (2008).
122. Chan, D. C., Fass, D., Berger, J. M. & Kim, P. S. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263–73 (1997).
123. Melikyan, G. B. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* **5**, 111 (2008).
124. Lin, P.-F. *et al.* A small molecule HIV-1 inhibitor that targets the HIV-1 envelope and inhibits CD4 receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 11013–8 (2003).
125. Reimann, K. *et al.* A humanized form of a CD4-specific monoclonal antibody exhibits decreased antigenicity and prolonged plasma half-life in rhesus monkeys while retaining its unique biological and antiviral properties. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **13**, 933–43 (1997).
126. Dorr, P. *et al.* Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4721–32 (2005).
127. Lalezari, J. P. *et al.* Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2175–85 (2003).
128. Arhel, N. J. *et al.* HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J.* **26**, 3025–37 (2007).
129. Hulme, A. E., Perez, O. & Hope, T. J. Complementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 9975–80 (2011).
130. Yang, Y., Fricke, T. & Diaz-Griffero, F. Inhibition of reverse transcriptase activity increases stability of the HIV-1 core. *J. Virol.* **87**, 683–7 (2013).
131. Fassati, A. & Goff, S. P. Characterization of intracellular reverse transcription complexes of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **75**, 3626–35 (2001).
132. Nermut, M. V & Fassati, A. Structural analyses of purified human immunodeficiency virus type 1 intracellular reverse transcription complexes. *J. Virol.* **77**, 8196–206 (2003).
133. Iordanskiy, S., Berro, R., Altieri, M., Kashanchi, F. & Bukrinsky, M. Intracytoplasmic maturation of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription complexes determines their capacity to integrate into chromatin. *Retrovirology* **3**, 4 (2006).
134. Yamashita, M. & Emerman, M. Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *J. Virol.* **78**, 5670–8 (2004).
135. Dismuke, D. J. & Aiken, C. Evidence for a functional link between uncoating of the human immunodeficiency virus type 1 core and nuclear import of the viral preintegration complex. *J. Virol.* **80**, 3712–20 (2006).
136. Qi, M., Yang, R. & Aiken, C. Cyclophilin A-dependent restriction of human immunodeficiency virus type 1 capsid mutants for infection of nondividing cells. *J. Virol.* **82**, 12001–8 (2008).
137. Lee, K. *et al.* Flexible use of nuclear import pathways by HIV-1. *Cell Host Microbe* **7**, 221–33 (2010).
138. Feng, Y. X. *et al.* HIV-1 nucleocapsid protein induces “maturation” of dimeric retroviral RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 7577–81 (1996).
139. Zhang, W., Hwang, C. K., Hu, W., Gorelick, R. J. & Pathak, V. K. Zinc finger domain of murine leukemia virus nucleocapsid protein enhances the rate of viral DNA synthesis in vivo. *J. Virol.* **76**, 7473–84 (2002).
140. Buckman, J. S., Bosche, W. J. & Gorelick, R. J. Human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid zn(2+) fingers are required for efficient reverse transcription, initial integration processes, and protection of newly synthesized viral DNA. *J. Virol.* **77**, 1469–80 (2003).

141. Golinelli, M.-P. & Hughes, S. H. Secondary structure in the nucleic acid affects the rate of HIV-1 nucleocapsid-mediated strand annealing. *Biochemistry* **42**, 8153–62 (2003).
142. Houzet, L. *et al.* Nucleocapsid mutations turn HIV-1 into a DNA-containing virus. *Nucleic Acids Res.* **36**, 2311–9 (2008).
143. Thomas, J. a, Bosche, W. J., Shatzer, T. L., Johnson, D. G. & Gorelick, R. J. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein zinc fingers cause premature reverse transcription. *J. Virol.* **82**, 9318–28 (2008).
144. Selig, L. *et al.* Uracil DNA glycosylase specifically interacts with Vpr of both human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus of sooty mangabeys, but binding does not correlate with cell cycle arrest. *J. Virol.* **71**, 4842–6 (1997).
145. Mansky, L. M., Preveral, S., Selig, L., Benarous, R. & Benichou, S. The interaction of vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 In vivo mutation rate. *J. Virol.* **74**, 7039–47 (2000).
146. Chen, R., Le Rouzic, E., Kearney, J. a, Mansky, L. M. & Benichou, S. Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 28419–25 (2004).
147. Schröfelbauer, B., Yu, Q., Zeitlin, S. G. & Landau, N. R. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr induces the degradation of the UNG and SMUG uracil-DNA glycosylases. *J. Virol.* **79**, 10978–87 (2005).
148. Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J. M., Martin, M. A. & Craigie, R. Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J. Virol.* **69**, 2729–36 (1995).
149. Masuda, T., Planelles, V., Krogstad, P. & Chen, I. S. Genetic analysis of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the U3 att site: unusual phenotype of mutants in the zinc finger-like domain. *J. Virol.* **69**, 6687–96 (1995).
150. Leavitt, A. D., Robles, G., Alesandro, N. & Varmus, H. E. Human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants retain in vitro integrase activity yet fail to integrate viral DNA efficiently during infection. *J. Virol.* **70**, 721–8 (1996).
151. Wu, X. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 integrase protein promotes reverse transcription through specific interactions with the nucleoprotein reverse transcription complex. *J. Virol.* **73**, 2126–35 (1999).
152. Harrich, D., Ulich, C., García-Martínez, L. F. & Gaynor, R. B. Tat is required for efficient HIV-1 reverse transcription. *EMBO J.* **16**, 1224–35 (1997).
153. Kameoka, M. *et al.* The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) can promote placement of tRNA primer onto viral RNA and suppress later DNA polymerization in HIV-1 reverse transcription. *J. Virol.* **76**, 3637–45 (2002).
154. Henriët, S. *et al.* Vif is a RNA chaperone that could temporally regulate RNA dimerization and the early steps of HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5141–53 (2007).
155. Carr, J. M., Coolen, C., Davis, A. J., Burrell, C. J. & Li, P. Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) vif infectivity factor (Vif) is part of reverse transcription complexes and acts as an accessory factor for reverse transcription. *Virology* **372**, 147–56 (2008).
156. Liang, C. & Wainberg, M. A. The role of Tat in HIV-1 replication: an activator and/or a suppressor? *AIDS Rev.* **4**, 41–9 (2010).
157. Apolloni, A., Meredith, L. W., Suhrbier, A., Kiernan, R. & Harrich, D. The HIV-1 Tat protein stimulates reverse transcription in vitro. *Curr. HIV Res.* **5**, 473–83 (2007).
158. Zheng, Y. *et al.* Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* **78**, 6073–6 (2004).
159. Bishop, K. N., Holmes, R. K., Sheehy, A. M. & Malim, M. H. APOBEC-mediated editing of viral RNA. *Science* **305**, 645 (2004).
160. Frankel, W. N., Stoye, J. P., Taylor, B. A. & Coffin, J. M. Genetic analysis of endogenous xenotropic murine leukemia viruses: association with two common mouse mutations and the viral restriction locus Fv-1. *J. Virol.* **63**, 1763–74 (1989).
161. Best, S., Le Tissier, P., Towers, G. & Stoye, J. P. Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1. *Nature* **382**, 826–9 (1996).
162. Nisole, S., Lynch, C., Stoye, J. P. & Yap, M. W. A Trim5-cyclophilin A fusion protein found in owl monkey kidney cells can restrict HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 13324–8 (2004).
163. Sayah, D. M., Sokolskaja, E., Berthoux, L. & Luban, J. Cyclophilin A retrotransposition into TRIM5 explains owl monkey resistance to HIV-1. *Nature* **430**, 569–73 (2004).
164. Wilson, S. J. *et al.* Independent evolution of an antiviral TRIMCyp in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3557–62 (2008).
165. Stremlau, M. *et al.* The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* **427**, 848–53 (2004).
166. Stremlau, M. *et al.* Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 5514–9 (2006).
167. Wu, X., Anderson, J. L., Campbell, E. M., Joseph, A. M. & Hope, T. J. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5alpha restriction of HIV-1 reverse transcription and infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7465–70 (2006).
168. Brennan, G., Kozyrev, Y. & Hu, S.-L. TRIMCyp expression in Old World primates *Macaca nemestrina* and *Macaca fascicularis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3569–74 (2008).
169. Newman, R. M. *et al.* Evolution of a TRIM5-CypA splice isoform in old world monkeys. *PLoS Pathog.* **4**, e1000003 (2008).
170. Virgen, C. a, Kratovac, Z., Bieniasz, P. D. & Hatzioannou, T. Independent genesis of chimeric TRIM5-cyclophilin proteins in two primate species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 3563–8 (2008).

171. Yin, L. *et al.* High-resolution deep sequencing reveals biodiversity, population structure, and persistence of HIV-1 quasispecies within host ecosystems. *Retrovirology* **9**, 108 (2012).
172. Chibo, D. & Birch, C. Increasing diversity of Human Immunodeficiency Virus type 1 subtypes circulating in Australia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **28**, 578–83 (2012).
173. Shankarappa, R. *et al.* Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **73**, 10489–502 (1999).
174. Haase, a T. Population biology of HIV-1 infection: viral and CD4+ T cell demographics and dynamics in lymphatic tissues. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 625–56 (1999).
175. Bonhoeffer, S., Holmes, E. C. & Nowak, M. A. Causes of HIV diversity. *Nature* **376**, 125 (1995).
176. Coffin, J. M. HIV population dynamics in vivo: implications for genetic variation, pathogenesis, and therapy. *Science* **267**, 483–9 (1995).
177. Sydow, J. F. & Cramer, P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 732–9 (2009).
178. Ho, D. D. *et al.* Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123–6 (1995).
179. Weiss, K. K., Bambara, R. a & Kim, B. Mechanistic role of residue Gln151 in error prone DNA synthesis by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase (RT). Pre-steady state kinetic study of the Q151N HIV-1 RT mutant with increased fidelity. *J. Biol. Chem.* **277**, 22662–9 (2002).
180. Smyth, R. P., Davenport, M. P. & Mak, J. The origin of genetic diversity in HIV-1. *Virus Res.* **169**, 415–29 (2012).
181. Mansky, L. M. & Temin, H. M. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J. Virol.* **69**, 5087–94 (1995).
182. Mansky, L. M. Forward mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 in a T lymphoid cell line. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **12**, 307–14 (1996).
183. Boyer, J. C., Bebenek, K. & Kunkel, T. A. Unequal human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase error rates with RNA and DNA templates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 6919–23 (1992).
184. Yu, H., Jetzt, A. E., Ron, Y., Preston, B. D. & Dougherty, J. P. The nature of human immunodeficiency virus type 1 strand transfers. *J. Biol. Chem.* **273**, 28384–91 (1998).
185. Anderson, J. A., Bowman, E. H. & Hu, W. S. Retroviral recombination rates do not increase linearly with marker distance and are limited by the size of the recombining subpopulation. *J. Virol.* **72**, 1195–202 (1998).
186. Jetzt, A. E. *et al.* High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* **74**, 1234–40 (2000).
187. Zhang, J., Tang, L. Y., Li, T., Ma, Y. & Sapp, C. M. Most retroviral recombinations occur during minus-strand DNA synthesis. *J. Virol.* **74**, 2313–22 (2000).
188. Hu, W. S. & Temin, H. M. Retroviral recombination and reverse transcription. *Science* **250**, 1227–33 (1990).
189. Hu, W. S. & Temin, H. M. Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 1556–60 (1990).
190. Frost, S. D. W. *et al.* Neutralizing antibody responses drive the evolution of human immunodeficiency virus type 1 envelope during recent HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 18514–9 (2005).
191. Simon-Loriere, E. *et al.* Molecular mechanisms of recombination restriction in the envelope gene of the human immunodeficiency virus. *PLoS Pathog.* **5**, e1000418 (2009).
192. Young, F. E. The role of the FDA in the effort against AIDS. *Public Health Rep.* **103**, 242–5 (1988).
193. Cheng, Y. C., Dutschman, G. E., Bastow, K. F., Samgadharan, M. G. & Ting, R. Y. Human immunodeficiency virus reverse transcriptase. General properties and its interactions with nucleoside triphosphate analogs. *J. Biol. Chem.* **262**, 2187–9 (1987).
194. Balzarini, J., Herdewijn, P. & De Clercq, E. Differential patterns of intracellular metabolism of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxythymidine and 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine, two potent anti-human immunodeficiency virus compounds. *J. Biol. Chem.* **264**, 6127–33 (1989).
195. Richman, D. D. HIV chemotherapy. *Nature* **410**, 995–1001 (2001).
196. Tantillo, C. *et al.* Locations of anti-AIDS drug binding sites and resistance mutations in the three-dimensional structure of HIV-1 reverse transcriptase. Implications for mechanisms of drug inhibition and resistance. *J. Mol. Biol.* **243**, 369–87 (1994).
197. Kohlstaedt, L. a, Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. a & Steitz, T. a. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* **256**, 1783–90 (1992).
198. Witvrouw, M. *et al.* Activity of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors against HIV-2 and SIV. *AIDS* **13**, 1477–83 (1999).
199. Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J. & Baltimore, D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J. Virol.* **63**, 3708–13 (1989).
200. Yedavalli, V. S. R. K., Benkirane, M. & Jeang, K.-T. Tat and trans-activation-responsive (TAR) RNA-independent induction of HIV-1 long terminal repeat by human and murine cyclin T1 requires Sp1. *J. Biol. Chem.* **278**, 6404–10 (2003).
201. Wu, Y. & Marsh, J. W. Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA. *Science* **293**, 1503–6 (2001).
202. Berkhout, B., Silverman, R. H. & Jeang, K. T. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* **59**, 273–82 (1989).
203. Selby, M. J., Bain, E. S., Luciw, P. a & Peterlin, B. M. Structure, sequence, and position of the stem-loop in tar de-

- termine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. *Genes Dev.* **3**, 547–58 (1989).
204. Dingwall, C. *et al.* Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation-responsive region (TAR) RNA in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 6925–9 (1989).
205. Dingwall, C. *et al.* HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *EMBO J.* **9**, 4145–53 (1990).
206. Benkirane, M. *et al.* Activation of integrated provirus requires histone acetyltransferase. p300 and P/CAF are coactivators for HIV-1 Tat. *J. Biol. Chem.* **273**, 24898–905 (1998).
207. Marzio, G., Tyagi, M., Gutierrez, M. I. & Giacca, M. HIV-1 tat transactivator recruits p300 and CREB-binding protein histone acetyltransferases to the viral promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 13519–24 (1998).
208. Hottiger, M. O. & Nabel, G. J. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 Tat with the transcriptional coactivators p300 and CREB binding protein. *J. Virol.* **72**, 8252–6 (1998).
209. Jeang, K. T. *et al.* In vitro and in vivo binding of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and Sp1 transcription factor. *J. Virol.* **67**, 6224–33 (1993).
210. Kashanchi, F., Shibata, R., Ross, E. K., Brady, J. N. & Martin, M. a. Second-site long terminal repeat (LTR) revertants of replication-defective human immunodeficiency virus: effects of revertant TATA box motifs on virus infectivity, LTR-directed expression, in vitro RNA synthesis, and binding of basal transcription factors. *J. Virol.* **68**, 3298–307 (1994).
211. Kubota, S. *et al.* Functional similarity of HIV-1 rev and HTLV-1 rex proteins: identification of a new nucleolar-targeting signal in rev protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 963–70 (1989).
212. Cochrane, a W., Perkins, A. & Rosen, C. a. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J. Virol.* **64**, 881–5 (1990).
213. Venkatesh, L. K., Mohammed, S. & Chinnadurai, G. Functional domains of the HIV-1 rev gene required for trans-regulation and subcellular localization. *Virology* **176**, 39–47 (1990).
214. Böhnlein, E., Berger, J. & Hauber, J. Functional mapping of the human immunodeficiency virus type 1 Rev RNA binding domain: new insights into the domain structure of Rev and Rex. *J. Virol.* **65**, 7051–5 (1991).
215. Meyer, B. E., Meinkoth, J. L. & Malim, M. H. Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* **70**, 2350–9 (1996).
216. Meyer, B. E. & Malim, M. H. The HIV-1 Rev trans-activator shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.* **8**, 1538–47 (1994).
217. Stauber, R., Gaitanaris, G. a & Pavlakis, G. N. Analysis of trafficking of Rev and transdominant Rev proteins in living cells using green fluorescent protein fusions: transdominant Rev blocks the export of Rev from the nucleus to the cytoplasm. *Virology* **213**, 439–49 (1995).
218. Wolff, B., Cohen, G., Hauber, J., Meshcheryakova, D. & Rabeck, C. Nucleocytoplasmic transport of the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 is dependent on the activation domain of the protein. *Exp. Cell Res.* **217**, 31–41 (1995).
219. Richard, N., Iacampo, S. & Cochrane, A. HIV-1 Rev is capable of shuttling between the nucleus and cytoplasm. *Virology* **204**, 123–31 (1994).
220. Kalland, K. H., Szilvay, a M., Brokstad, K. a, Saetrevik, W. & Haukenes, G. The human immunodeficiency virus type 1 Rev protein shuttles between the cytoplasm and nuclear compartments. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 7436–44 (1994).
221. Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E. & Rusche, J. R. Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature* **342**, 816–9 (1989).
222. Zapp, M. L. & Green, M. R. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. *Nature* **342**, 714–6 (1989).
223. Heaphy, S. *et al.* HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell* **60**, 685–93 (1990).
224. Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V & Cullen, B. R. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**, 254–7 (1989).
225. Rosen, C. a, Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. a. Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 2071–5 (1988).
226. Malim, M. H. & Cullen, B. R. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**, 241–8 (1991).
227. Zapp, M. L., Hope, T. J., Parslow, T. G. & Green, M. R. Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7734–8 (1991).
228. McDonald, D., Hope, T. J. & Parslow, T. G. Posttranscriptional regulation by the human immunodeficiency virus type 1 Rev and human T-cell leukemia virus type I Rex proteins through a heterologous RNA binding site. *J. Virol.* **66**, 7232–8 (1992).
229. Mann, D. A. *et al.* A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J. Mol. Biol.* **241**, 193–207 (1994).
230. Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T. & Pavlakis, G. N. rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1495–9 (1989).
231. Feinberg, M. B., Jarrett, R. F., Aldovini, A., Gallo, R. C. & Wong-Staal, F. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. *Cell* **46**, 807–17 (1986).

232. Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M. & Sundquist, W. I. The structural biology of HIV assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 203–17 (2008).
233. Bieniasz, P. D. The cell biology of HIV-1 virion genesis. *Cell Host Microbe* **5**, 550–8 (2009).
234. D'Souza, V. & Summers, M. F. How retroviruses select their genomes. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 643–55 (2005).
235. Ono, A. & Freed, E. O. Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13925–30 (2001).
236. Ono, A. HIV-1 Assembly at the Plasma Membrane: Gag Trafficking and Localization. *Future Virol.* **4**, 241–257 (2009).
237. Kutluay, S. B. & Bieniasz, P. D. Analysis of the initiating events in HIV-1 particle assembly and genome packaging. *PLoS Pathog.* **6**, e1001200 (2010).
238. Jouvenet, N., Simon, S. M. & Bieniasz, P. D. Imaging the interaction of HIV-1 genomes and Gag during assembly of individual viral particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 19114–9 (2009).
239. Tang, Y. *et al.* Cellular motor protein KIF-4 associates with retroviral Gag. *J. Virol.* **73**, 10508–13 (1999).
240. Martinez, N. W., Xue, X., Berro, R. G., Kreitzer, G. & Resh, M. D. Kinesin KIF4 regulates intracellular trafficking and stability of the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. *J. Virol.* **82**, 9937–50 (2008).
241. Batonick, M. *et al.* Interaction of HIV-1 Gag with the clathrin-associated adaptor AP-2. *Virology* **342**, 190–200 (2005).
242. Dong, X. *et al.* AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly. *Cell* **120**, 663–74 (2005).
243. Camus, G. *et al.* The clathrin adaptor complex AP-1 binds HIV-1 and MLV Gag and facilitates their budding. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3193–203 (2007).
244. Chukkappalli, V., Oh, S. J. & Ono, A. Opposing mechanisms involving RNA and lipids regulate HIV-1 Gag membrane binding through the highly basic region of the matrix domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 1600–5 (2010).
245. Datta, S. A. K. *et al.* HIV-1 Gag extension: conformational changes require simultaneous interaction with membrane and nucleic acid. *J. Mol. Biol.* **406**, 205–14 (2011).
246. Jones, C. P., Datta, S. a K., Rein, A., Rouzina, I. & Musier-Forsyth, K. Matrix domain modulates HIV-1 Gag's nucleic acid chaperone activity via inositol phosphate binding. *J. Virol.* **85**, 1594–603 (2011).
247. Yu, X., Yuan, X., McLane, M. F., Lee, T. H. & Essex, M. Mutations in the cytoplasmic domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein impair the incorporation of Env proteins into mature virions. *J. Virol.* **67**, 213–21 (1993).
248. Cosson, P. Direct interaction between the envelope and matrix proteins of HIV-1. *EMBO J.* **15**, 5783–8 (1996).
249. Murakami, T. & Freed, E. O. Genetic evidence for an interaction between human immunodeficiency virus type 1 matrix and alpha-helix 2 of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **74**, 3548–54 (2000).
250. Wyma, D. J., Kotov, A. & Aiken, C. Evidence for a stable interaction of gp41 with Pr55(Gag) in immature human immunodeficiency virus type 1 particles. *J. Virol.* **74**, 9381–7 (2000).
251. Müller, B., Tessmer, U., Schubert, U. & Kräusslich, H. G. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein is incorporated into the virion in significantly smaller amounts than gag and is phosphorylated in infected cells. *J. Virol.* **74**, 9727–31 (2000).
252. Kondo, E., Mammano, F., Cohen, E. A. & Göttlinger, H. G. The p6gag domain of human immunodeficiency virus type 1 is sufficient for the incorporation of Vpr into heterologous viral particles. *J. Virol.* **69**, 2759–64 (1995).
253. Ott, D. E. Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev. Med. Virol.* **18**, 159–75 (2008).
254. Carlson, L.-A. *et al.* Cryo electron tomography of native HIV-1 budding sites. *PLoS Pathog.* **6**, e1001173 (2010).
255. Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. The ESCRT machinery: new functions in viral and cellular biology. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 195–9 (2009).
256. Hurley, J. H. & Hanson, P. I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–66 (2010).
257. Morita, E. & Sundquist, W. I. Retrovirus budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 395–425 (2004).
258. Peel, S., Macheboeuf, P., Martinelli, N. & Weissenhorn, W. Divergent pathways lead to ESCRT-III-catalyzed membrane fission. *Trends Biochem. Sci.* **36**, 199–210 (2011).
259. Usami, Y. *et al.* The ESCRT pathway and HIV-1 budding. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 181–4 (2009).
260. Carlton, J. G. & Martin-Serrano, J. Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery. *Science* **316**, 1908–12 (2007).
261. Elia, N., Sougrat, R., Spurlin, T. A., Hurley, J. H. & Lippincott-Schwartz, J. Dynamics of endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) machinery during cytokinesis and its role in abscission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4846–51 (2011).
262. Guizetti, J. *et al.* Cortical constriction during abscission involves helices of ESCRT-III-dependent filaments. *Science* **331**, 1616–20 (2011).
263. Hill, M., Tachedjian, G. & Mak, J. The packaging and maturation of the HIV-1 Pol proteins. *Curr. HIV Res.* **3**, 73–85 (2005).
264. Pettit, S. C. *et al.* The p2 domain of human immunodeficiency virus type 1 Gag regulates sequential proteolytic processing and is required to produce fully infectious virions. *J. Virol.* **68**, 8017–27 (1994).
265. Murakami, T., Ablan, S., Freed, E. O. & Tanaka, Y. Regulation of human immunodeficiency virus type 1 Env-mediated membrane fusion by viral protease activity. *J. Virol.* **78**, 1026–31 (2004).

266. Wyma, D. J. *et al.* Coupling of human immunodeficiency virus type 1 fusion to virion maturation: a novel role of the gp41 cytoplasmic tail. *J. Virol.* **78**, 3429–35 (2004).
267. Benjamin, J., Ganser-Pornillos, B. K., Tivol, W. F., Sundquist, W. I. & Jensen, G. J. Three-dimensional structure of HIV-1 virus-like particles by electron cryotomography. *J. Mol. Biol.* **346**, 577–88 (2005).
268. Briggs, J. a G. *et al.* The mechanism of HIV-1 core assembly: insights from three-dimensional reconstructions of authentic virions. *Structure* **14**, 15–20 (2006).
269. Moore, M. D. & Hu, W. S. HIV-1 RNA dimerization: It takes two to tango. *AIDS Rev.* **11**, 91–102 (2009).
270. Rein, A. Nucleic acid chaperone activity of retroviral Gag proteins. *RNA Biol.* **7**, 700–5 (2010).
271. UNAIDS, J. U. N. P. on H. *Global Report. UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013.* (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS), 2013).
272. Abrahams, M.-R. *et al.* Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-poisson distribution of transmitted variants. *J. Virol.* **83**, 3556–67 (2009).
273. Haaland, R. E. *et al.* Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1. *PLoS Pathog.* **5**, e1000274 (2009).
274. Keele, B. F. *et al.* Low-dose rectal inoculation of rhesus macaques by SIVsmE660 or SIVmac251 recapitulates human mucosal infection by HIV-1. *J. Exp. Med.* **206**, 1117–34 (2009).
275. Li, H. *et al.* High Multiplicity Infection by HIV-1 in Men Who Have Sex with Men. *PLoS Pathog.* **6**, e1000890 (2010).
276. Salazar-Gonzalez, J. F. *et al.* Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**, 1273–89 (2009).
277. Boggiano, C. & Littman, D. R. HIV's vagina travelogue. *Immunity* **26**, 145–7 (2007).
278. Hladik, F. *et al.* Initial events in establishing vaginal entry and infection by human immunodeficiency virus type-1. *Immunity* **26**, 257–70 (2007).
279. Lackner, A. a & Veazey, R. S. Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annu. Rev. Med.* **58**, 461–76 (2007).
280. Li, Q. *et al.* Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* **434**, 1148–52 (2005).
281. Zhang, Z. *et al.* Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science* **286**, 1353–7 (1999).
282. Wawer, M. J. *et al.* Rates of HIV-1 transmission per coital act, by stage of HIV-1 infection, in Rakai, Uganda. *J. Infect. Dis.* **191**, 1403–9 (2005).
283. De Vincenzi, I. A longitudinal study of human immunodeficiency virus transmission by heterosexual partners. European Study Group on Heterosexual Transmission of HIV. *N. Engl. J. Med.* **331**, 341–6 (1994).
284. Padian, N. S., Shiboski, S. C., Glass, S. O. & Vittinghoff, E. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in northern California: results from a ten-year study. *Am. J. Epidemiol.* **146**, 350–7 (1997).
285. Vittinghoff, E. *et al.* Per-contact risk of human immunodeficiency virus transmission between male sexual partners. *Am. J. Epidemiol.* **150**, 306–11 (1999).
286. Gray, R. H. *et al.* Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet* **357**, 1149–53 (2001).
287. Koblin, B. A. *et al.* Risk factors for HIV infection among men who have sex with men. *AIDS* **20**, 731–9 (2006).
288. Read, T. R. H., Hocking, J., Sinnott, V. & Hellard, M. Risk factors for incident HIV infection in men having sex with men: a case-control study. *Sex. Health* **4**, 35–9 (2007).
289. Lee, H. Y. *et al.* Modeling sequence evolution in acute HIV-1 infection. *J. Theor. Biol.* **261**, 341–60 (2009).
290. Brenchley, J. M. *et al.* CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 749–59 (2004).
291. Mattapallil, J. J. *et al.* Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* **434**, 1093–7 (2005).
292. Mehandru, S. *et al.* Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* **200**, 761–70 (2004).
293. Veazey, R. S. *et al.* Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science* **280**, 427–31 (1998).
294. Fokin, A. A., Robicsek, F. & Masters, T. N. Transport of viral-size particulate matter after intravenous versus intralymphatic entry. *Microcirculation* **7**, 357–65 (2000).
295. Hu, J., Gardner, M. B. & Miller, C. J. Simian immunodeficiency virus rapidly penetrates the cervicovaginal mucosa after intravaginal inoculation and infects intraepithelial dendritic cells. *J. Virol.* **74**, 6087–95 (2000).
296. Masurier, C. *et al.* Dendritic cells route human immunodeficiency virus to lymph nodes after vaginal or intravenous administration to mice. *J. Virol.* **72**, 7822–9 (1998).
297. Miller, C. J. *et al.* Propagation and dissemination of infection after vaginal transmission of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **79**, 9217–27 (2005).
298. Wang, Y. *et al.* Use of a replication-defective vector to track cells initially infected by SIV in vivo: infected mononuclear cells rapidly appear in the draining lymph node after intradermal inoculation of rhesus monkeys. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 1298–305 (2004).
299. Li, Q. *et al.* Glycerol monolaurate prevents mucosal SIV transmission. *Nature* **458**, 1034–8 (2009).
300. Cerf-Bensussan, N. & Guy-Grand, D. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol. Clin. North Am.* **20**, 549–76 (1991).
301. Kraehenbuhl, J. P. & Neutra, M. R. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol. Rev.* **72**, 853–79 (1992).

302. Brenchley, J. M. *et al.* Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* **112**, 2826–35 (2008).
303. Brenchley, J. M. *et al.* Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* **12**, 1365–71 (2006).
304. Palmer, S. *et al.* New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4531–6 (2003).
305. Damond, F. *et al.* Evaluation of an upgraded version of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 test for HIV-1 load quantification. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1413–6 (2010).
306. Mattapallil, J. J., Smit-McBride, Z., McChesney, M. & Dandekar, S. Intestinal intraepithelial lymphocytes are primed for gamma interferon and MIP-1beta expression and display antiviral cytotoxic activity despite severe CD4(+) T-cell depletion in primary simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **72**, 6421–9 (1998).
307. Gasper-Smith, N. *et al.* Induction of plasma (TRAIL), TNFR-2, Fas ligand, and plasma microparticles after human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmission: implications for HIV-1 vaccine design. *J. Virol.* **82**, 7700–10 (2008).
308. Lindbäck, S. *et al.* Viral dynamics in primary HIV-1 infection. Karolinska Institutet Primary HIV Infection Study Group. *AIDS* **14**, 2283–91 (2000).
309. Kramer, H. B. *et al.* Elevation of intact and proteolytic fragments of acute phase proteins constitutes the earliest systemic antiviral response in HIV-1 infection. *PLoS Pathog.* **6**, e1000893 (2010).
310. Stacey, A. R. *et al.* Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C virus infections. *J. Virol.* **83**, 3719–33 (2009).
311. Lapenta, C. *et al.* Type I interferon is a powerful inhibitor of in vivo HIV-1 infection and preserves human CD4(+) T cells from virus-induced depletion in SCID mice transplanted with human cells. *Virology* **263**, 78–88 (1999).
312. De Jong, M. D. *et al.* Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med.* **12**, 1203–7 (2006).
313. Cameron, M. J. *et al.* Interferon-mediated immunopathological events are associated with atypical innate and adaptive immune responses in patients with severe acute respiratory syndrome. *J. Virol.* **81**, 8692–706 (2007).
314. Alter, G. *et al.* Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **195**, 1452–60 (2007).
315. Borrow, P. & Bhardwaj, N. Innate immune responses in primary HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **3**, 36–44 (2008).
316. Clay, C. C. *et al.* Neuroinvasion of fluorescein-positive monocytes in acute simian immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **81**, 12040–8 (2007).
317. Ward, J. *et al.* HIV modulates the expression of ligands important in triggering natural killer cell cytotoxic responses on infected primary T-cell blasts. *Blood* **110**, 1207–14 (2007).
318. Sallusto, F. *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2760–9 (1998).
319. Turville, S. G. *et al.* Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat. Immunol.* **3**, 975–83 (2002).
320. Lambert, A. a, Gilbert, C., Richard, M., Beaulieu, A. D. & Tremblay, M. J. The C-type lectin surface receptor DCIR acts as a new attachment factor for HIV-1 in dendritic cells and contributes to trans- and cis-infection pathways. *Blood* **112**, 1299–307 (2008).
321. De Witte, L. *et al.* Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 19464–9 (2007).
322. Borrow, P. Innate immunity in acute HIV-1 infection. *Curr. Opin. HIV AIDS* **6**, 353–63 (2011).
323. Grütter, M. G. & Luban, J. TRIM5 structure, HIV-1 capsid recognition, and innate immune signaling. *Curr. Opin. Virol.* **2**, 142–50 (2012).
324. Pion, M. *et al.* APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **203**, 2887–93 (2006).
325. Bloch, N. *et al.* HIV type 1 infection of plasmacytoid and myeloid dendritic cells is restricted by high levels of SAMHD1 and cannot be counteracted by Vpx. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **30**, 195–203 (2014).
326. Battivelli, E. *et al.* Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *J. Virol.* **85**, 7828–35 (2011).
327. Sasai, M., Linehan, M. M. & Iwasaki, A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science* **329**, 1530–4 (2010).
328. Beignon, A. *et al.* Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* **115**, 3265–75 (2005).
329. Meylan, P. R., Guatelli, J. C., Munis, J. R., Richman, D. D. & Kornbluth, R. S. Mechanisms for the inhibition of HIV replication by interferons-alpha, -beta, and -gamma in primary human macrophages. *Virology* **193**, 138–48 (1993).
330. Cameron, P. U. *et al.* Dendritic cells exposed to human immunodeficiency virus type-1 transmit a vigorous cytopathic infection to CD4+ T cells. *Science* **257**, 383–7 (1992).
331. Pope, M. *et al.* Conjugates of dendritic cells and memory T lymphocytes from skin facilitate productive infection with HIV-1. *Cell* **78**, 389–98 (1994).
332. Frleta, D. *et al.* HIV-1 infection-induced apoptotic microparticles inhibit human DCs via CD44. *J. Clin. Invest.* **122**, 4685–97 (2012).
333. Miller, E. a *et al.* Plasma factors during chronic HIV-1 infection impair IL-12 secretion by myeloid dendritic cells via a virus-independent pathway. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **61**, 535–44 (2012).

334. Borrow, P., Lewicki, H., Hahn, B. H., Shaw, G. M. & Oldstone, M. B. Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **68**, 6103–10 (1994).
335. Koup, R. A. *et al.* Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**, 4650–5 (1994).
336. Wilson, J. D. *et al.* Direct visualization of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes during primary infection. *AIDS* **14**, 225–33 (2000).
337. Pantaleo, G. *et al.* Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* **370**, 463–7 (1994).
338. Goonetilleke, N. *et al.* The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* **206**, 1253–72 (2009).
339. Bernardin, F., Kong, D., Peddada, L., Baxter-Lowe, L. A. & Delwart, E. Human immunodeficiency virus mutations during the first month of infection are preferentially found in known cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *J. Virol.* **79**, 11523–8 (2005).
340. Schacker, T. W., Hughes, J. P., Shea, T., Coombs, R. W. & Corey, L. Biological and virologic characteristics of primary HIV infection. *Ann. Intern. Med.* **128**, 613–20 (1998).
341. Rodríguez, B. *et al.* Predictive value of plasma HIV RNA level on rate of CD4 T-cell decline in untreated HIV infection. *JAMA* **296**, 1498–506 (2006).
342. Wei, X. *et al.* Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**, 307–12 (2003).
343. Richman, D. D., Wrin, T., Little, S. J. & Petropoulos, C. J. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4144–9 (2003).
344. Gray, E. S. *et al.* Neutralizing antibody responses in acute human immunodeficiency virus type 1 subtype C infection. *J. Virol.* **81**, 6187–96 (2007).
345. Tomaras, G. D. *et al.* Initial B-cell responses to transmitted human immunodeficiency virus type 1: virion-binding immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies followed by plasma anti-gp41 antibodies with ineffective control of initial viremia. *J. Virol.* **82**, 12449–63 (2008).
346. Forthal, D. N., Landucci, G. & Daar, E. S. Antibody from patients with acute human immunodeficiency virus (HIV) infection inhibits primary strains of HIV type 1 in the presence of natural-killer effector cells. *J. Virol.* **75**, 6953–61 (2001).
347. Aasa-Chapman, M. M. I. *et al.* Detection of antibody-dependent complement-mediated inactivation of both autologous and heterologous virus in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* **79**, 2823–30 (2005).
348. Burrer, R., Haessig-Einius, S., Aubertin, A.-M. & Moog, C. Neutralizing as well as non-neutralizing polyclonal immunoglobulin (Ig)G from infected patients capture HIV-1 via antibodies directed against the principal immunodominant domain of gp41. *Virology* **333**, 102–13 (2005).
349. Gray, E. S. *et al.* Broad neutralization of human immunodeficiency virus type 1 mediated by plasma antibodies against the gp41 membrane proximal external region. *J. Virol.* **83**, 11265–74 (2009).
350. Stamatos, L., Morris, L., Burton, D. R. & Mascola, J. R. Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat. Med.* **15**, 866–70 (2009).
351. Shen, X. *et al.* In vivo gp41 antibodies targeting the 2F5 monoclonal antibody epitope mediate human immunodeficiency virus type 1 neutralization breadth. *J. Virol.* **83**, 3617–25 (2009).
352. Roederer, M., Dubs, J. G., Anderson, M. T., Raju, P. A. & Herzenberg, L. A. CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults. *J. Clin. Invest.* **95**, 2061–6 (1995).
353. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Sousa, A. E., Victorino, R. M. M. & Paul, W. E. CD4⁺ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med.* **8**, 319–23 (2002).
354. Neuhaus, J. *et al.* Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis.* **201**, 1788–95 (2010).
355. Fonteneau, J. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 activates plasmacytoid dendritic cells and concomitantly induces the bystander maturation of myeloid dendritic cells. *J. Virol.* **78**, 5223–32 (2004).
356. Hardy, A. W., Graham, D. R., Shearer, G. M. & Herbeuval, J.-P. HIV turns plasmacytoid dendritic cells (pDC) into TRAIL-expressing killer pDC and down-regulates HIV coreceptors by Toll-like receptor 7-induced IFN- α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17453–8 (2007).
357. Meier, A. *et al.* MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded Toll-like receptor ligands. *J. Virol.* **81**, 8180–91 (2007).
358. Björck, P. Dendritic cells exposed to herpes simplex virus in vivo do not produce IFN- α after rechallenge with virus in vitro and exhibit decreased T cell alloreactivity. *J. Immunol.* **172**, 5396–404 (2004).
359. Ito, T., Kanzler, H., Duramad, O., Cao, W. & Liu, Y.-J. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **107**, 2423–31 (2006).
360. O'Brien, M. *et al.* Spatiotemporal trafficking of HIV in human plasmacytoid dendritic cells defines a persistently IFN- α -producing and partially matured phenotype. *J. Clin. Invest.* **121**, 1088–101 (2011).
361. Doitsh, G. *et al.* Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell* **143**, 789–801 (2010).
362. Sedaghat, A. R. *et al.* Chronic CD4⁺ T-cell activation and depletion in human immunodeficiency virus type 1 infection: type I interferon-mediated disruption of T-cell dynamics. *J. Virol.* **82**, 1870–83 (2008).
363. Hyrcza, M. D. *et al.* Distinct transcriptional profiles in ex vivo CD4⁺ and CD8⁺ T cells are established early in human immunodeficiency virus type 1 infection and are characterized by a chronic interferon response as well as exten-

- sive transcriptional changes in CD8+ T cells. *J. Virol.* **81**, 3477–86 (2007).
364. Day, C. L. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* **443**, 350–4 (2006).
365. Trautmann, L. *et al.* Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nat. Med.* **12**, 1198–202 (2006).
366. Kaufmann, D. E. *et al.* Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction. *Nat. Immunol.* **8**, 1246–54 (2007).
367. Schacker, T. W. *et al.* Collagen deposition in HIV-1 infected lymphatic tissues and T cell homeostasis. *J. Clin. Invest.* **110**, 1133–9 (2002).
368. Estes, J. D. *et al.* Simian immunodeficiency virus-induced lymphatic tissue fibrosis is mediated by transforming growth factor beta 1-positive regulatory T cells and begins in early infection. *J. Infect. Dis.* **195**, 551–61 (2007).
369. Zeng, M. *et al.* Cumulative mechanisms of lymphoid tissue fibrosis and T cell depletion in HIV-1 and SIV infections. *J. Clin. Invest.* **121**, 998–1008 (2011).
370. Martínez-Maza, O., Crabb, E., Mitsuyasu, R. T., Fahey, J. L. & Giorgi, J. V. Infection with the human immunodeficiency virus (HIV) is associated with an in vivo increase in B lymphocyte activation and immaturity. *J. Immunol.* **138**, 3720–4 (1987).
371. Cagigi, A., Nilsson, A., De Milito, A. & Chiodi, F. B cell immunopathology during HIV-1 infection: lessons to learn for HIV-1 vaccine design. *Vaccine* **26**, 3016–25 (2008).
372. Moir, S. & Fauci, A. S. B cells in HIV infection and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 235–45 (2009).
373. Younes, S.-A. *et al.* HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J. Exp. Med.* **198**, 1909–22 (2003).
374. McNeil, A. C. *et al.* High-level HIV-1 viremia suppresses viral antigen-specific CD4(+) T cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 13878–83 (2001).
375. Kaufmann, D. E. *et al.* Limited durability of viral control following treated acute HIV infection. *PLoS Med.* **1**, e36 (2004).
376. Jansen, C. a *et al.* Analysis of the effect of highly active antiretroviral therapy during acute HIV-1 infection on HIV-specific CD4 T cell functions. *AIDS* **19**, 1145–54 (2005).
377. Jansen, C. a *et al.* Long-term highly active antiretroviral therapy in chronic HIV-1 infection: evidence for reconstitution of antiviral immunity. *Antivir. Ther.* **11**, 105–16 (2006).
378. Harari, A., Petitpierre, S., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Skewed representation of functionally distinct populations of virus-specific CD4 T cells in HIV-1-infected subjects with progressive disease: changes after antiretroviral therapy. *Blood* **103**, 966–72 (2004).
379. Harari, A., Vallelian, F., Meylan, P. R. & Pantaleo, G. Functional heterogeneity of memory CD4 T cell responses in different conditions of antigen exposure and persistence. *J. Immunol.* **174**, 1037–45 (2005).
380. Harari, A., Vallelian, F. & Pantaleo, G. Phenotypic heterogeneity of antigen-specific CD4 T cells under different conditions of antigen persistence and antigen load. *Eur. J. Immunol.* **34**, 3525–33 (2004).
381. Migueles, S. a *et al.* HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in non-progressors. *Nat. Immunol.* **3**, 1061–8 (2002).
382. Champagne, P. *et al.* Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* **410**, 106–11 (2001).
383. Betts, M. R. *et al.* Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte activity is inversely correlated with HIV type 1 viral load in HIV type 1-infected long-term survivors. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **15**, 1219–28 (1999).
384. Betts, M. R. *et al.* Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4(+) and CD8(+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol.* **75**, 11983–91 (2001).
385. Appay, V. *et al.* Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.* **8**, 379–85 (2002).
386. Van Baarle, D., Tsegaye, A., Miedema, F. & Akbar, A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. *Immunol. Lett.* **97**, 19–29 (2005).
387. Klein, M. R. *et al.* 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. *J. Exp. Med.* **181**, 1365–72 (1995).
388. Kannagi, M., Yetz, J. M. & Letvin, N. L. In vitro growth characteristics of simian T-lymphotropic virus type III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 7053–7 (1985).
389. Chen, Z., Zhou, P., Ho, D. D., Landau, N. R. & Marx, P. A. Genetically divergent strains of simian immunodeficiency virus use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* **71**, 2705–14 (1997).
390. Zhang, L. *et al.* In vivo distribution of the human immunodeficiency virus/simian immunodeficiency virus coreceptors: CXCR4, CCR3, and CCR5. *J. Virol.* **72**, 5035–45 (1998).
391. Chen, Z., Gettie, A., Ho, D. D. & Marx, P. a. Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in west Africa: a comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology* **246**, 113–24 (1998).
392. Chakrabarti, L. *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**, 543–7 (1987).
393. Hirsch, V., Riedel, N. & Mullins, J. I. The genome organization of STL-3 is similar to that of the AIDS virus except for a truncated transmembrane protein. *Cell* **49**, 307–19 (1987).
394. Franchini, G. *et al.* Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature* **328**, 539–43 (1987).

395. Sakai, H. *et al.* Complementation of the rev gene mutation among human and simian lentiviruses. *J. Virol.* **64**, 2202–7 (1990).
396. Malim, M. H. *et al.* Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8222–6 (1989).
397. Viglianti, G. A., Sharma, P. L. & Mullins, J. I. Simian immunodeficiency virus displays complex patterns of RNA splicing. *J. Virol.* **64**, 4207–16 (1990).
398. Baskin, G. B., Murphey-Corb, M., Watson, E. a. & Martin, L. N. Necropsy findings in rhesus monkeys experimentally infected with cultured simian immunodeficiency virus (SIV)/delta. *Vet. Pathol.* **25**, 456–67 (1988).
399. Ling, B. *et al.* SIV(mac) pathogenesis in rhesus macaques of Chinese and Indian origin compared with primary HIV infections in humans. *AIDS* **16**, 1489–96 (2002).
400. Burdo, T. H., Marcondes, M. C. G., Lanigan, C. M. S., Penedo, M. C. T. & Fox, H. S. Susceptibility of Chinese rhesus monkeys to SIV infection. *AIDS* **19**, 1704–6 (2005).
401. Cumont, M.-C. *et al.* Early divergence in lymphoid tissue apoptosis between pathogenic and nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections of nonhuman primates. *J. Virol.* **82**, 1175–84 (2008).
402. Daza-Vamenta, R., Glusman, G., Rowen, L., Guthrie, B. & Geraghty, D. E. Genetic divergence of the rhesus macaque major histocompatibility complex. *Genome Res.* **14**, 1501–15 (2004).
403. Doxiadis, G. G. M., de Groot, N., Otting, N., Blokhuis, J. H. & Bontrop, R. E. Genomic plasticity of the MHC class I A region in rhesus macaques: extensive haplotype diversity at the population level as revealed by microsatellites. *Immunogenetics* **63**, 73–83 (2011).
404. Doxiadis, G. G. M. *et al.* Compound evolutionary history of the rhesus macaque MHC class I B region revealed by microsatellite analysis and localization of retroviral sequences. *PLoS One* **4**, e4287 (2009).
405. Fukami-Kobayashi, K. *et al.* Genomic evolution of MHC class I region in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9230–4 (2005).
406. Otting, N. *et al.* Unparalleled complexity of the MHC class I region in rhesus macaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 1626–31 (2005).
407. Budde, M. L. *et al.* Characterization of Mauritian cynomolgus macaque major histocompatibility complex class I haplotypes by high-resolution pyrosequencing. *Immunogenetics* **62**, 773–80 (2010).
408. Otting, N. *et al.* A snapshot of the Mamu-B genes and their allelic repertoire in rhesus macaques of Chinese origin. *Immunogenetics* **60**, 507–14 (2008).
409. Wiseman, R. W. *et al.* Major histocompatibility complex genotyping with massively parallel pyrosequencing. *Nat. Med.* **15**, 1322–6 (2009).
410. O'Connor, D. H. *et al.* Major histocompatibility complex class I alleles associated with slow simian immunodeficiency virus disease progression bind epitopes recognized by dominant acute-phase cytotoxic-T-lymphocyte responses. *J. Virol.* **77**, 9029–40 (2003).
411. Yant, L. J. *et al.* The high-frequency major histocompatibility complex class I allele Mamu-B*17 is associated with control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication. *J. Virol.* **80**, 5074–7 (2006).
412. Mühl, T., Krawczak, M., Ten Haaf, P., Hunsmann, G. & Sauermaun, U. MHC class I alleles influence set-point viral load and survival time in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Immunol.* **169**, 3438–46 (2002).
413. Pal, R. *et al.* ALVAC-SIV-gag-pol-env-based vaccination and macaque major histocompatibility complex class I (A*01) delay simian immunodeficiency virus SIVmac-induced immunodeficiency. *J. Virol.* **76**, 292–302 (2002).
414. Otting, N. *et al.* MHC class I A region diversity and polymorphism in macaque species. *Immunogenetics* **59**, 367–75 (2007).
415. Mothé, B. R. *et al.* Dominance of CD8 responses specific for epitopes bound by a single major histocompatibility complex class I molecule during the acute phase of viral infection. *J. Virol.* **76**, 875–84 (2002).
416. Allen, T. M. *et al.* CD8(+) lymphocytes from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques recognize 14 different epitopes bound by the major histocompatibility complex class I molecule mamu-A*01: implications for vaccine design and testing. *J. Virol.* **75**, 738–49 (2001).
417. Marthas, M. L. *et al.* Rhesus macaques inoculated with molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *J. Med. Primatol.* **18**, 311–9 (1989).
418. Marthas, M. L. *et al.* Immunization with a live, attenuated simian immunodeficiency virus (SIV) prevents early disease but not infection in rhesus macaques challenged with pathogenic SIV. *J. Virol.* **64**, 3694–700 (1990).
419. Marthas, M. L. *et al.* Efficacy of live-attenuated and whole-inactivated simian immunodeficiency virus vaccines against vaginal challenge with virulent SIV. *J. Med. Primatol.* **21**, 99–107 (1992).
420. Luciw, P. A. *et al.* Genetic and biological comparisons of pathogenic and nonpathogenic molecular clones of simian immunodeficiency virus (SIVmac). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**, 395–402 (1992).
421. Kestler, H. W. *et al.* Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**, 651–62 (1991).
422. Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K. & Desrosiers, R. C. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**, 1938–41 (1992).
423. Lohman, B. L. *et al.* A partially attenuated simian immunodeficiency virus induces host immunity that correlates with resistance to pathogenic virus challenge. *J. Virol.* **68**, 7021–9 (1994).
424. Wyand, M. S., Manson, K. H., Garcia-Moll, M., Montefiori, D. & Desrosiers, R. C. Vaccine protection by a triple deletion mutant of simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **70**, 3724–33 (1996).

425. Norley, S., Beer, B., Binninger-Schinzl, D., Cosma, C. & Kurth, R. Protection from pathogenic SIVmac challenge following short-term infection with a nef-deficient attenuated virus. *Virology* **219**, 195–205 (1996).
426. Stahl-Hennig, C. *et al.* Rapid development of vaccine protection in macaques by live-attenuated simian immunodeficiency virus. *J. Gen. Virol.* **77** (Pt 12), 2969–81 (1996).
427. Stebbings, R. *et al.* Vaccination with live attenuated simian immunodeficiency virus for 21 days protects against superinfection. *Virology* **330**, 249–60 (2004).
428. Cranage, M. P. *et al.* In vivo resistance to simian immunodeficiency virus superinfection depends on attenuated virus dose. *J. Gen. Virol.* **79** (Pt 8), 1935–44 (1998).
429. Almond, N. *et al.* Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells. *Lancet* **345**, 1342–4 (1995).
430. Cranage, M. P. *et al.* Macaques infected with live attenuated SIVmac are protected against superinfection via the rectal mucosa. *Virology* **229**, 143–54 (1997).
431. Nilsson, C. *et al.* Live attenuated simian immunodeficiency virus (SIV)mac in macaques can induce protection against mucosal infection with SIVsm. *AIDS* **12**, 2261–70 (1998).
432. Reynolds, M. R. *et al.* Macaques vaccinated with live-attenuated SIV control replication of heterologous virus. *J. Exp. Med.* **205**, 2537–50 (2008).
433. Wyand, M. S. *et al.* Protection by live, attenuated simian immunodeficiency virus against heterologous challenge. *J. Virol.* **73**, 8356–63 (1999).
434. Baba, T. W. *et al.* Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. *Science* **267**, 1820–5 (1995).
435. Whatmore, A. M. *et al.* Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *J. Virol.* **69**, 5117–23 (1995).
436. Baba, T. W. *et al.* Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat. Med.* **5**, 194–203 (1999).
437. Sawai, E. T., Hamza, M. S., Ye, M., Shaw, K. E. & Luciw, P. A. Pathogenic conversion of live attenuated simian immunodeficiency virus vaccines is associated with expression of truncated Nef. *J. Virol.* **74**, 2038–45 (2000).
438. Hofmann-Lehmann, R. *et al.* Live attenuated, nef-deleted SIV is pathogenic in most adult macaques after prolonged observation. *AIDS* **17**, 157–66 (2003).
439. Johnson, R. P. & Desrosiers, R. C. Protective immunity induced by live attenuated simian immunodeficiency virus. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 436–43 (1998).
440. Almond, N. & Stott, J. Live attenuated SIV—a model of a vaccine for AIDS. *Immunol. Lett.* **66**, 167–70 (1999).
441. Sharpe, S. A., Whatmore, A. M., Hall, G. A. & Cranage, M. P. Macaques infected with attenuated simian immunodeficiency virus resist superinfection with virulence-revertant virus. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 8), 1923–7 (1997).
442. Bogers, W. M. *et al.* Protection from HIV-1 envelope-bearing chimeric simian immunodeficiency virus (SHIV) in rhesus macaques infected with attenuated SIV: consequences of challenge. *AIDS* **9**, F13–8 (1995).
443. Almond, N. *et al.* Mechanisms of protection induced by attenuated simian immunodeficiency virus. I. Protection cannot be transferred with immune serum. *J. Gen. Virol.* **78** (Pt 8), 1919–22 (1997).
444. Connor, R. I. *et al.* Temporal analyses of virus replication, immune responses, and efficacy in rhesus macaques immunized with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine. *J. Virol.* **72**, 7501–9 (1998).
445. Gundlach, B. R. *et al.* Env-independent protection induced by live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccines. *J. Virol.* **72**, 7846–51 (1998).
446. Dittmer, U. *et al.* Cellular immune response of rhesus monkeys infected with a partially attenuated nef deletion mutant of the simian immunodeficiency virus. *Virology* **212**, 392–7 (1995).
447. Johnson, R. P. *et al.* Induction of vigorous cytotoxic T-lymphocyte responses by live attenuated simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **71**, 7711–8 (1997).
448. Metzner, K. J. *et al.* Effects of in vivo CD8(+) T cell depletion on virus replication in rhesus macaques immunized with a live, attenuated simian immunodeficiency virus vaccine. *J. Exp. Med.* **191**, 1921–31 (2000).
449. Stebbings, R. *et al.* Mechanisms of protection induced by attenuated simian immunodeficiency virus. II. Lymphocyte depletion does not abrogate protection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1187–98 (1998).
450. Stebbings, R. J. *et al.* Mechanisms of protection induced by attenuated simian immunodeficiency virus. V. No Evidence for Lymphocyte-Regulated Cytokine Responses upon Rechallenge. *Virology* **296**, 338–53 (2002).
451. Mills, K. H. *et al.* Protection against SIV infection in macaques by immunization with inactivated virus from the BK28 molecular clone, but not with BK28-derived recombinant env and gag proteins. *J. Med. Primatol.* **21**, 50–8
452. Rud, E. W. *et al.* Molecular and biological characterization of simian immunodeficiency virus macaque strain 32H proviral clones containing nef size variants. *J. Gen. Virol.* **75** (Pt 3), 529–43 (1994).
453. Gibbs, J. S., Regier, D. a & Desrosiers, R. C. Construction and in vitro properties of SIVmac mutants with deletions in “nonessential” genes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**, 607–16 (1994).
454. Rusche, J. R. *et al.* Humoral immune response to the entire human immunodeficiency virus envelope glycoprotein made in insect cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 6924–8 (1987).
455. Arthur, L. O. *et al.* Serological responses in chimpanzees inoculated with human immunodeficiency virus glycoprotein (gp120) subunit vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8583–7 (1987).
456. Flynn, N. M. *et al.* Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J. Infect. Dis.* **191**, 654–65 (2005).
457. Pitisuttithum, P. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycopro-

- tein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J. Infect. Dis.* **194**, 1661–71 (2006).
458. Buchbinder, S. P. *et al.* Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **372**, 1881–93 (2008).
459. Moore, J. P. *et al.* Primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 are relatively resistant to neutralization by monoclonal antibodies to gp120, and their neutralization is not predicted by studies with monomeric gp120. *J. Virol.* **69**, 101–9 (1995).
460. Cooney, E. L. *et al.* Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* **337**, 567–72 (1991).
461. Graham, B. S. *et al.* Augmentation of human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody by priming with gp160 recombinant vaccinia and boosting with rgp160 in vaccinia-naïve adults. The NIAID AIDS Vaccine Clinical Trials Network. *J. Infect. Dis.* **167**, 533–7 (1993).
462. Cooney, E. L. *et al.* Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 1882–6 (1993).
463. Hanke, T. *et al.* Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations of modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. *J. Gen. Virol.* **79** (Pt 1), 83–90 (1998).
464. Cox, W. I., Tartaglia, J. & Paoletti, E. Induction of cytotoxic T lymphocytes by recombinant canarypox (ALVAC) and attenuated vaccinia (NYVAC) viruses expressing the HIV-1 envelope glycoprotein. *Virology* **195**, 845–50 (1993).
465. Lasaro, M. O. & Ertl, H. C. J. New insights on adenovirus as vaccine vectors. *Mol. Ther.* **17**, 1333–9 (2009).
466. Cohen, J. AIDS research. Merck reemerges with a bold AIDS vaccine effort. *Science* **292**, 24–5 (2001).
467. Shiver, J. W. & Emini, E. a. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu. Rev. Med.* **55**, 355–72 (2004).
468. Shiver, J. W. *et al.* Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature* **415**, 331–5 (2002).
469. Cohen, J. AIDS research. Promising AIDS vaccine's failure leaves field reeling. *Science* **318**, 28–9 (2007).
470. McElrath, M. J. *et al.* HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. *Lancet* **372**, 1894–905 (2008).
471. Duerr, A. *et al.* Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J. Infect. Dis.* **206**, 258–66 (2012).
472. Learnmont, J. *et al.* Long-term symptomless HIV-1 infection in recipients of blood products from a single donor. *Lancet* **340**, 863–7 (1992).
473. Learnmont, J. C. *et al.* 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**, 1715–22 (1999).
474. Wang, B. *et al.* Induction of humoral and cellular immune responses to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by in vivo DNA inoculation. *Virology* **211**, 102–12 (1995).
475. Lu, S. *et al.* Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.* **70**, 3978–91 (1996).
476. Boyer, J. D. *et al.* In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J. Med. Primatol.* **25**, 242–50 (1996).
477. Barouch, D. H. *et al.* 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**, 4192–7 (2000).
478. Sasaki, S., Amara, R. R., Yeow, W.-S., Pitha, P. M. & Robinson, H. L. Regulation of DNA-raised immune responses by cotransfected interferon regulatory factors. *J. Virol.* **76**, 6652–9 (2002).
479. Boyer, J. D. *et al.* SIV DNA vaccine co-administered with IL-12 expression plasmid enhances CD8 SIV cellular immune responses in cynomolgus macaques. *J. Med. Primatol.* **34**, 262–70 (2005).
480. Robinson, H. L. *et al.* Studies on GM-CSF DNA as an adjuvant for neutralizing Ab elicited by a DNA/MVA immunodeficiency virus vaccine. *Virology* **352**, 285–94 (2006).
481. Hutnick, N. A., Myles, D. J. F., Bian, C. B., Muthumani, K. & Weiner, D. B. Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo. *Curr. Opin. Virol.* **1**, 233–40 (2011).
482. Rosati, M. *et al.* Increased immune responses in rhesus macaques by DNA vaccination combined with electroporation. *Vaccine* **26**, 5223–9 (2008).
483. Vasan, S. *et al.* In vivo electroporation enhances the immunogenicity of an HIV-1 DNA vaccine candidate in healthy volunteers. *PLoS One* **6**, e19252 (2011).
484. Hutnick, N. A. *et al.* Intradermal DNA vaccination enhanced by low-current electroporation improves antigen expression and induces robust cellular and humoral immune responses. *Hum. Gene Ther.* **23**, 943–50 (2012).
485. Robinson, H. L. *et al.* Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* **5**, 526–34 (1999).
486. Gorelick, R. J. *et al.* Protection of *Macaca nemestrina* from disease following pathogenic simian immunodeficiency virus (SIV) challenge: utilization of SIV nucleocapsid mutant DNA vaccines with and without an SIV protein boost. *J. Virol.* **74**, 11935–49 (2000).
487. Amara, R. R. *et al.* Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Vaccine* **20**, 1949–55 (2002).
488. Casimiro, D. R. *et al.* Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immuni-

- zation with dna and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J. Virol.* **79**, 15547–55 (2005).
489. Hammer, S. M. *et al.* Efficacy Trial of a DNA/rAd5 HIV-1 Preventive Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 131007090110004 (2013). doi:10.1056/NEJMoa1310566
490. Rerks-Ngarm, S. *et al.* Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2209–20 (2009).
491. Kantakamalakul, W. *et al.* Enhanced sensitivity of detection of cytotoxic T lymphocyte responses to HIV type 1 proteins using an extended in vitro stimulation period for measuring effector function in volunteers enrolled in an ALVAC-HIV phase I/II prime boost vaccine trial in Thail. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **20**, 642–4 (2004).
492. Nitayaphan, S. *et al.* Safety and immunogenicity of an HIV subtype B and E prime-boost vaccine combination in HIV-negative Thai adults. *J. Infect. Dis.* **190**, 702–6 (2004).
493. Esparza, J. Understanding the efficacy variables of an HIV vaccine trial. *Lancet Infect. Dis.* **12**, 499–500 (2012).
494. Hansen, S. G. *et al.* Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat. Med.* **15**, 293–9 (2009).
495. Sylwester, A. W. *et al.* Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.* **202**, 673–85 (2005).
496. Casazza, J. P. *et al.* Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J. Exp. Med.* **203**, 2865–77 (2006).
497. Price, D. a. *et al.* Induction and evolution of cytomegalovirus-specific CD4+ T cell clonotypes in rhesus macaques. *J. Immunol.* **180**, 269–80 (2008).
498. Powers, C. & Früh, K. Rhesus CMV: an emerging animal model for human CMV. *Med. Microbiol. Immunol.* **197**, 109–15 (2008).
499. Lu, W. *et al.* Induction of CD8+ regulatory T cells protects macaques against SIV challenge. *Cell Rep.* **2**, 1736–46 (2012).
500. Grangette, C. *et al.* Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect. Immun.* **69**, 1547–53 (2001).
501. Grangette, C. *et al.* Protection against tetanus toxin after intragastric administration of two recombinant lactic acid bacteria: impact of strain viability and in vivo persistence. *Vaccine* **20**, 3304–9 (2002).
502. Smits, H. H. *et al.* Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**, 1260–7 (2005).
503. Shibata, R. *et al.* Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* **5**, 204–10 (1999).
504. Parren, P. W. *et al.* Antibody protects macaques against vaginal challenge with a pathogenic R5 simian/human immunodeficiency virus at serum levels giving complete neutralization in vitro. *J. Virol.* **75**, 8340–7 (2001).
505. Hessel, A. J. *et al.* Fc receptor but not complement binding is important in antibody protection against HIV. *Nature* **449**, 101–4 (2007).
506. Hessel, A. J. *et al.* Broadly neutralizing human anti-HIV antibody 2G12 is effective in protection against mucosal SHIV challenge even at low serum neutralizing titers. *PLoS Pathog.* **5**, e1000433 (2009).
507. Burton, D. R. *et al.* Limited or no protection by weakly or nonneutralizing antibodies against vaginal SHIV challenge of macaques compared with a strongly neutralizing antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 11181–6 (2011).
508. Moldt, B. *et al.* Highly potent HIV-specific antibody neutralization in vitro translates into effective protection against mucosal SHIV challenge in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 18921–5 (2012).
509. Klein, K. *et al.* Neutralizing IgG at the Portal of Infection Mediates Protection against Vaginal Simian/Human Immunodeficiency Virus Challenge. *J. Virol.* **87**, 11604–16 (2013).
510. Ahmad, A. & Menezes, J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity in HIV infections. *FASEB J.* **10**, 258–66 (1996).
511. Gómez-Román, V. R. *et al.* Vaccine-elicited antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity correlated with significantly reduced acute viremia in rhesus macaques challenged with SIVmac251. *J. Immunol.* **174**, 2185–9 (2005).
512. Hildreth, J. E., Hampton, R. & Halsey, N. a. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can protect PBMC from infection by cell-associated HIV-1. *Clin. Immunol.* **90**, 203–12 (1999).
513. Karnasuta, C. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic responses in participants enrolled in a phase I/II ALVAC-HIV/AIDSVAX B/E prime-boost HIV-1 vaccine trial in Thailand. *Vaccine* **23**, 2522–9 (2005).
514. Scott-Algara, D. *et al.* Cutting edge: increased NK cell activity in HIV-1-exposed but uninfected Vietnamese intravascular drug users. *J. Immunol.* **171**, 5663–7 (2003).
515. Tyler, D. S., Lysterly, H. K. & Weinhold, K. J. Anti-HIV-1 ADCC. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**, 557–63 (1989).
516. Chung, A. W. *et al.* Immune escape from HIV-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 7505–10 (2011).
517. Chung, A. W. *et al.* Activation of NK cells by ADCC responses during early HIV infection. *Viral Immunol.* **24**, 171–5 (2011).
518. Chung, A. W. *et al.* Activation of NK cells by ADCC antibodies and HIV disease progression. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **58**, 127–31 (2011).
519. Alpert, M. D. *et al.* ADCC develops over time during persistent infection with live-attenuated SIV and is associated with complete protection against SIV(mac)251 challenge. *PLoS Pathog.* **8**, e1002890 (2012).

520. Haynes, B. F. *et al.* Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.* **366**, 1275–86 (2012).
521. Hansen, S. G. *et al.* Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature* **473**, 523–7 (2011).
522. Hansen, S. G. *et al.* Immune clearance of highly pathogenic SIV infection. *Nature* **502**, 100–4 (2013).
523. Sanders-Beer, B. E. *et al.* Characterization of a monoclonal anti-capsid antibody that cross-reacts with three major primate lentivirus lineages. *Virology* **422**, 402–12 (2012).
524. Uberla, K. *et al.* Animal model for the therapy of acquired immunodeficiency syndrome with reverse transcriptase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 8210–4 (1995).
525. Hohn, O. Construction of Genetic Immunogens for the Induction and Characterisation of a protective Immune Response against AIDS. 1–124 (2004).
526. Saueremann, U. *et al.* Mhc class I haplotypes associated with survival time in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected rhesus macaques. *Genes Immun.* **9**, 69–80 (2008).
527. O'Doherty, U., Swiggard, W. J. & Malim, M. H. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J. Virol.* **74**, 10074–80 (2000).
528. Toyoshima, K. & Vogt, P. K. Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* **38**, 414–26 (1969).
529. Coelen, R. J., Jose, D. G. & May, J. T. The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV. *Arch. Virol.* **75**, 307–11 (1983).
530. Smolander, H. *et al.* A novel antibody avidity methodology for rapid point-of-care serological diagnosis. *J. Virol. Methods* **166**, 86–91 (2010).
531. Gómez-Román, V. R. *et al.* A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **308**, 53–67 (2006).
532. Dahri, K. & Ensom, M. H. H. Efavirenz and nevirapine in HIV-1 infection : is there a role for clinical pharmacokinetic monitoring? *Clin. Pharmacokinet.* **46**, 109–32 (2007).
533. Parkin, N. T. *et al.* Natural variation of drug susceptibility in wild-type human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 437–43 (2004).
534. Tenner-Racz, K. *et al.* Early protection against pathogenic virus infection at a mucosal challenge site after vaccination with attenuated simian immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3017–22 (2004).
535. Hofman, M. J. *et al.* Efavirenz therapy in rhesus macaques infected with a chimera of simian immunodeficiency virus containing reverse transcriptase from human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3483–90 (2004).
536. Johnson, R. P. *et al.* Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation. *J. Virol.* **73**, 4952–61 (1999).
537. Whitney, J. B. & Ruprecht, R. M. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**, 17–26 (2004).
538. Denesvre, C. *et al.* Highly attenuated SIVmac142 is immunogenic but does not protect against SIVmac251 challenge. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **11**, 1397–406 (1995).
539. Staprans, S. I. *et al.* Simian immunodeficiency virus disease course is predicted by the extent of virus replication during primary infection. *J. Virol.* **73**, 4829–39 (1999).
540. Li, J., Lord, C. I., Haseltine, W., Letvin, N. L. & Sodroski, J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **5**, 639–46 (1992).
541. Clements, J. E. *et al.* Cross-protective immune responses induced in rhesus macaques by immunization with attenuated macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **69**, 2737–44 (1995).
542. Van Rompay, K. K. *et al.* Passive immunization of newborn rhesus macaques prevents oral simian immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* **177**, 1247–59 (1998).
543. Haigwood, N. L. *et al.* Passive immune globulin therapy in the SIV/macaque model: early intervention can alter disease profile. *Immunol. Lett.* **51**, 107–14 (1996).
544. Mascola, J. R. *et al.* Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nat. Med.* **6**, 207–10 (2000).
545. Mascola, J. R. *et al.* Protection of Macaques against pathogenic simian/human immunodeficiency virus 89.6PD by passive transfer of neutralizing antibodies. *J. Virol.* **73**, 4009–18 (1999).
546. Foresman, L. *et al.* Neutralizing antibodies administered before, but not after, virulent SHIV prevent infection in macaques. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1035–43 (1998).
547. Bures, R. *et al.* Regional clustering of shared neutralization determinants on primary isolates of clade C human immunodeficiency virus type 1 from South Africa. *J. Virol.* **76**, 2233–44 (2002).
548. Pilgrim, a K. *et al.* Neutralizing antibody responses to human immunodeficiency virus type 1 in primary infection and long-term-nonprogressive infection. *J. Infect. Dis.* **176**, 924–32 (1997).
549. Moog, C., Fleury, H. J., Pellegrin, I., Kim, A. & Aubertin, A. M. Autologous and heterologous neutralizing antibody responses following initial seroconversion in human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* **71**, 3734–41 (1997).
550. Ogg, G. S. *et al.* Decay kinetics of human immunodeficiency virus-specific effector cytotoxic T lymphocytes after combination antiretroviral therapy. *J. Virol.* **73**, 797–800 (1999).
551. Busch, D. H. & Pamer, E. G. T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J. Exp. Med.* **189**, 701–10 (1999).
552. Genescà, M. *et al.* Protective attenuated lentivirus immunization induces SIV-specific T cells in the genital tract of rhesus monkeys. *Mucosal Immunol.* **1**, 219–28 (2008).

553. Genescà, M. *et al.* With minimal systemic T-cell expansion, CD8+ T Cells mediate protection of rhesus macaques immunized with attenuated simian-human immunodeficiency virus SHIV89.6 from vaginal challenge with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **82**, 11181–96 (2008).
554. Betts, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **107**, 4781–9 (2006).
555. Almeida, J. R. *et al.* Superior control of HIV-1 replication by CD8+ T cells is reflected by their avidity, polyfunctionality, and clonal turnover. *J. Exp. Med.* **204**, 2473–85 (2007).
556. Addo, M. M. *et al.* Comprehensive epitope analysis of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-specific T-cell responses directed against the entire expressed HIV-1 genome demonstrate broadly directed responses, but no correlation to viral load. *J. Virol.* **77**, 2081–92 (2003).
557. Jackson, S. E., Mason, G. M. & Wills, M. R. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res.* **157**, 151–60 (2011).
558. Van de Berg, P. J. E. J., van Stijn, A., Ten Berge, I. J. M. & van Lier, R. a W. A fingerprint left by cytomegalovirus infection in the human T cell compartment. *J. Clin. Virol.* **41**, 213–7 (2008).
559. Thomson, A. W. & Lotze, M. T. *The Cytokine Handbook*. 1572 (Elsevier, 2003).
560. Seder, R. A., Grabstein, K. H., Berzofsky, J. A. & McDyer, J. F. Cytokine interactions in human immunodeficiency virus-infected individuals: roles of interleukin (IL)-2, IL-12, and IL-15. *J. Exp. Med.* **182**, 1067–77 (1995).
561. Zeng, R. *et al.* Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* **201**, 139–48 (2005).
562. White, L. *et al.* Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV). *Blood* **109**, 3873–80 (2007).
563. Kanai, T., Thomas, E. K., Yasutomi, Y. & Letvin, N. L. IL-15 stimulates the expansion of AIDS virus-specific CTL. *J. Immunol.* **157**, 3681–7 (1996).
564. Chehimi, J. *et al.* IL-15 enhances immune functions during HIV infection. *J. Immunol.* **158**, 5978–87 (1997).
565. Mueller, Y. M. *et al.* IL-15 enhances survival and function of HIV-specific CD8+ T cells. *Blood* **101**, 1024–9 (2003).
566. Oh, S., Berzofsky, J. a, Burke, D. S., Waldmann, T. a & Perera, L. P. Coadministration of HIV vaccine vectors with vaccinia viruses expressing IL-15 but not IL-2 induces long-lasting cellular immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 3392–7 (2003).
567. Matsushima, K., Larsen, C. G., DuBois, G. C. & Oppenheim, J. J. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J. Exp. Med.* **169**, 1485–90 (1989).
568. Cinque, P. *et al.* Elevated cerebrospinal fluid levels of monocyte chemotactic protein-1 correlate with HIV-1 encephalitis and local viral replication. *AIDS* **12**, 1327–32 (1998).
569. Frade, J. M. *et al.* The amino-terminal domain of the CCR2 chemokine receptor acts as coreceptor for HIV-1 infection. *J. Clin. Invest.* **100**, 497–502 (1997).
570. Skogstrand, K. *et al.* Effects of blood sample handling procedures on measurable inflammatory markers in plasma, serum and dried blood spot samples. *J. Immunol. Methods* **336**, 78–84 (2008).
571. Keustermans, G. C. E., Hoeks, S. B. E., Meering, J. M., Prakken, B. J. & de Jager, W. Cytokine assays: an assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples. *Methods* **61**, 10–7 (2013).
572. Bienvenu, J. a, Monneret, G., Gutowski, M. C. & Fabien, N. Cytokine assays in human sera and tissues. *Toxicology* **129**, 55–61 (1998).
573. Hoxie, J. a *et al.* Alterations in T4 (CD4) protein and mRNA synthesis in cells infected with HIV. *Science* **234**, 1123–7 (1986).
574. Salmon, P. *et al.* Loss of CD4 membrane expression and CD4 mRNA during acute human immunodeficiency virus replication. *J. Exp. Med.* **168**, 1953–69 (1988).
575. Le Guern, M. & Levy, J. a. Human immunodeficiency virus (HIV) type 1 can superinfect HIV-2-infected cells: pseudotype virions produced with expanded cellular host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 363–7 (1992).
576. Klatt, N. R., Silvestri, G. & Hirsch, V. Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infections. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2**, a007153 (2012).
577. Excler, J.-L., Robb, M. L. & Kim, J. H. HIV-1 vaccines: Challenges and new perspectives. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, (2014).
578. Grossman, Z., Meier-Schellersheim, M., Paul, W. E. & Picker, L. J. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* **12**, 289–95 (2006).
579. Laboratory, L. A. N., of Health, U. S. N. I. & Services, D. of H. and H. HIV Database. (2014). at <<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>>
580. Cohen, M., Shaw, G. & McMichael, A. Acute HIV-1 infection. *New Engl. J.* 1943–1954 (2011). at <<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra1011874>>
581. Balasubramaniam, M. & Freed, E. O. New insights into HIV assembly and trafficking. *Physiology (Bethesda)*. **26**, 236–51 (2011).
582. Modrow, S., Falke, D., Truyen, U. & Schätzl, H. *Molekulare Virologie*. 1–730 (Spektrum Akademischer Verlag, 2010). doi:10.1007/978-3-8274-2241-5

8 Anhang

8.1 IFN- γ ELISpot Assay

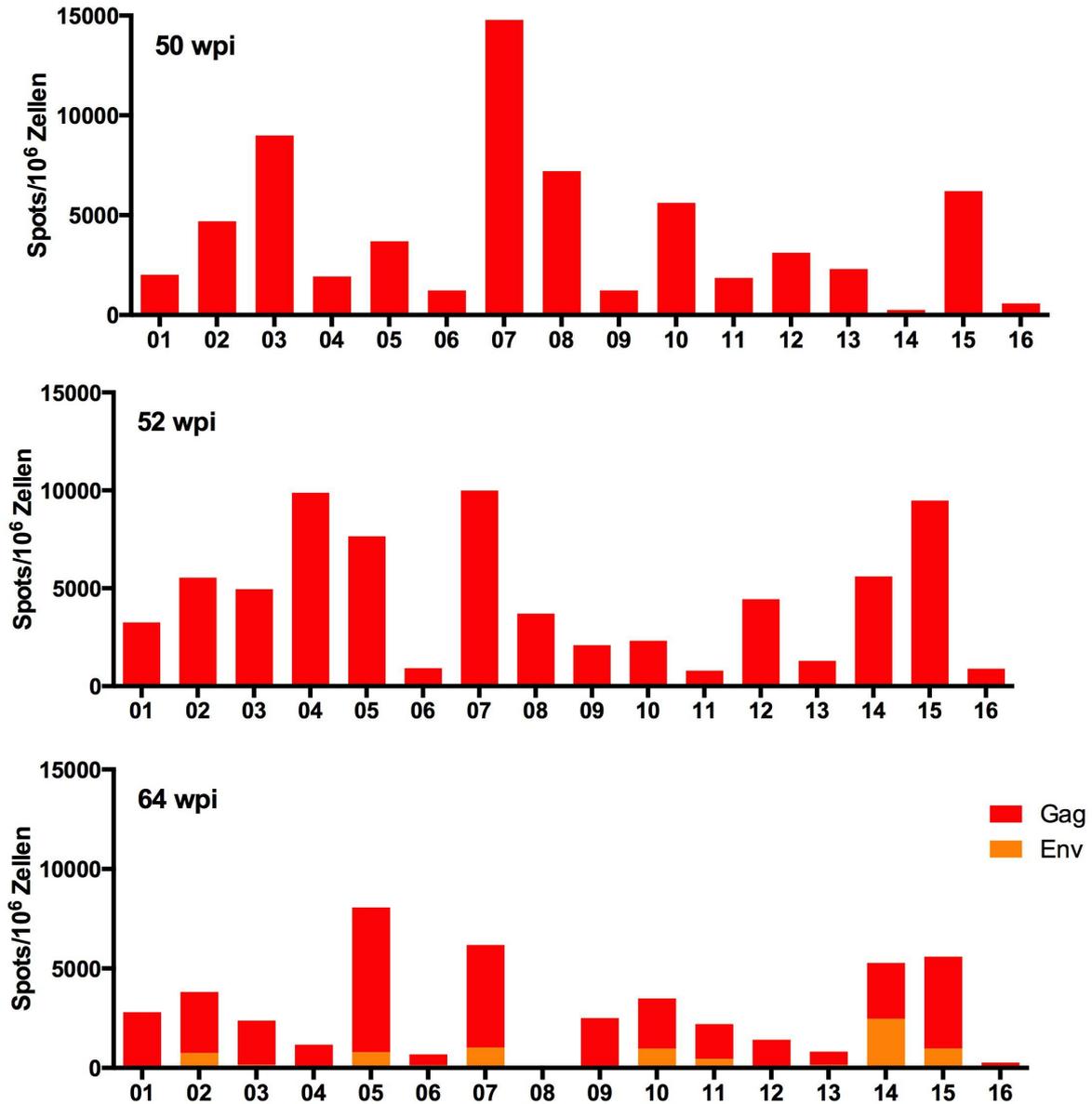
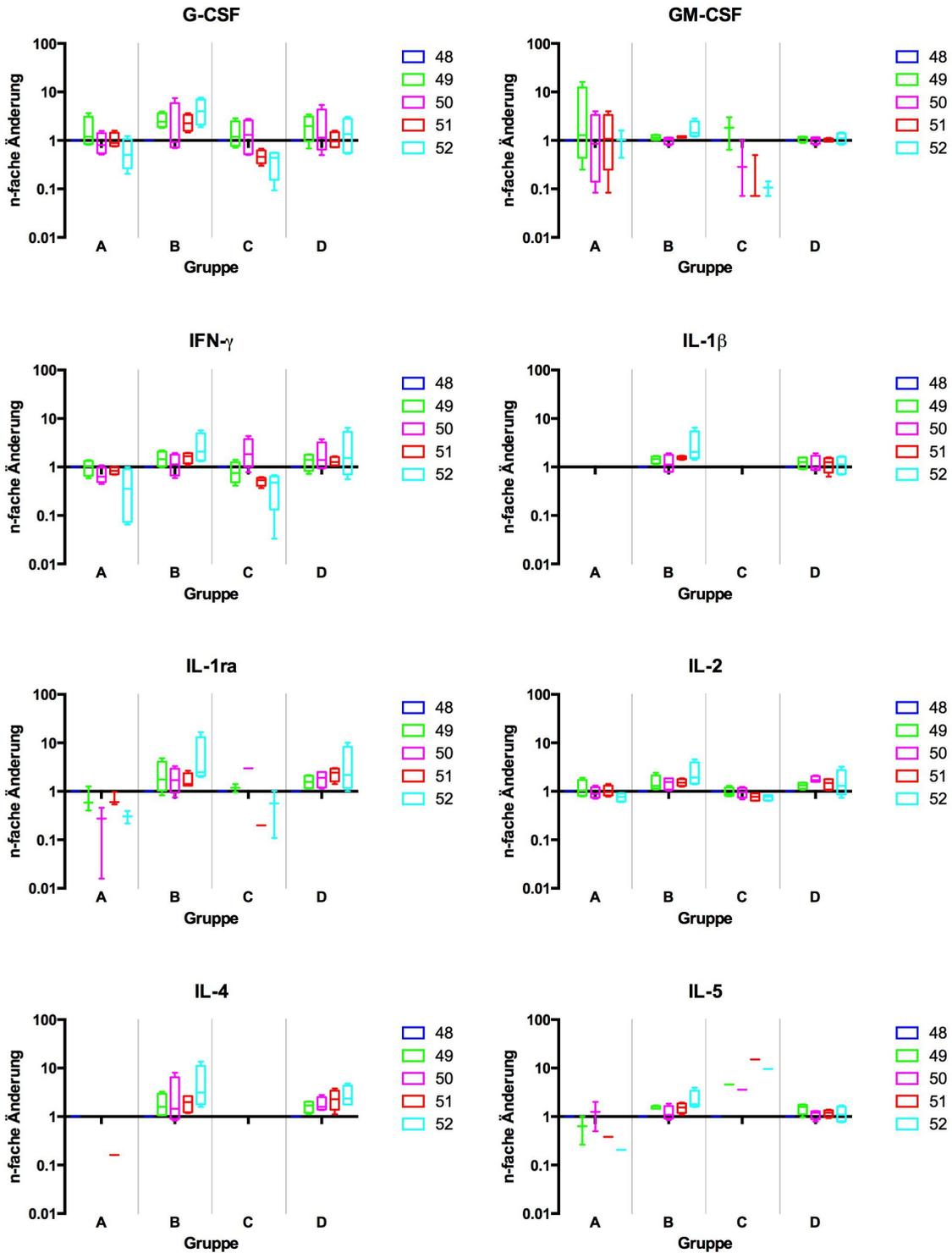
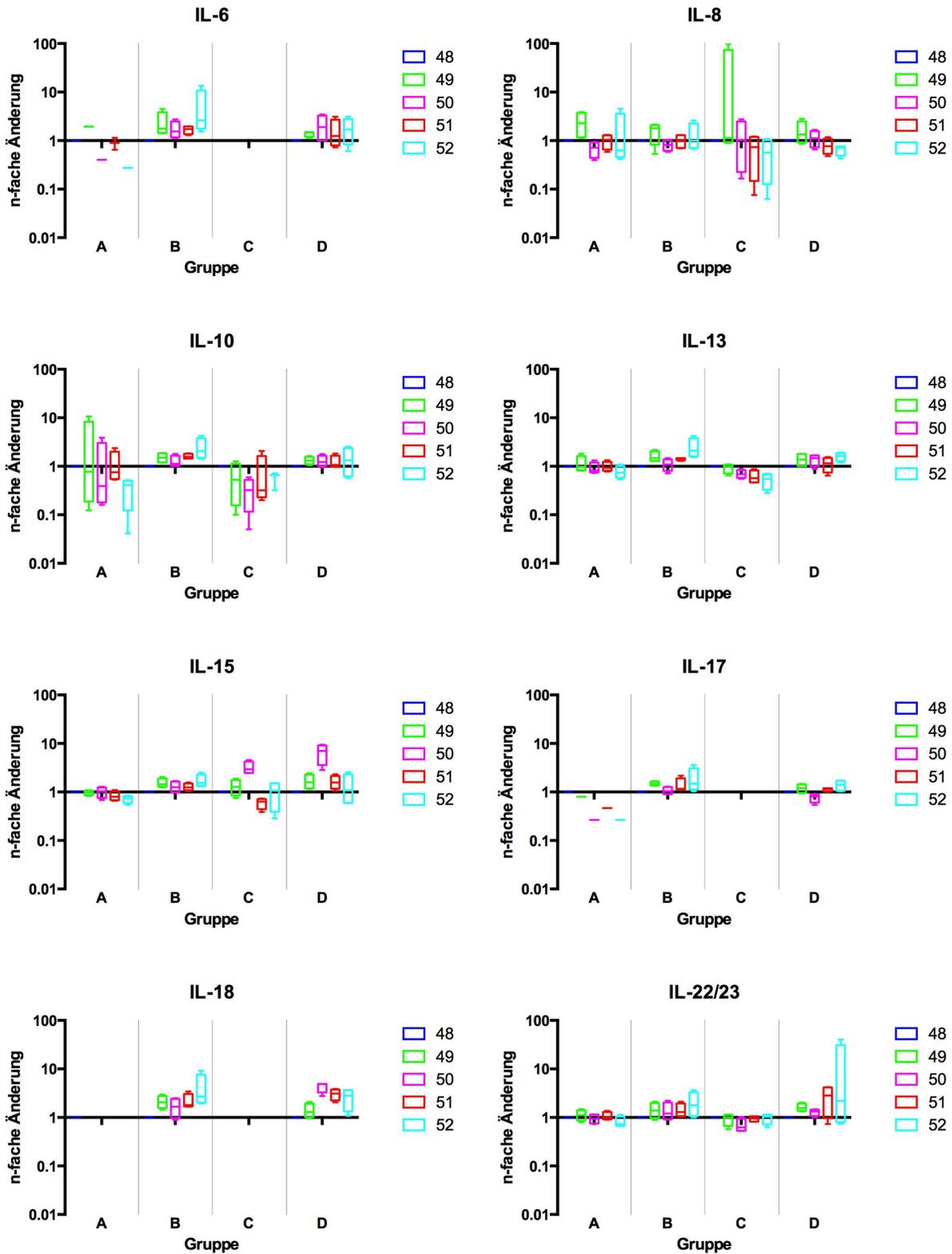


Abbildung 30. Bestimmung der Anzahl IFN- γ sezernierender T-Zellen nach Peptidstimulation (Woche 48-64). Analog zur Abbildung 14 ist hier die Anzahl Spots pro SIV-Protein pro 10⁶ Zellen für alle Affen nach Belastung dargestellt. Affe 08 wurde in Woche 54 aus der Studie genommen.

8.2 Zytokindaten



Abbildungserläuterung auf Seite 138.



Abbildungserläuterung auf Seite 138.

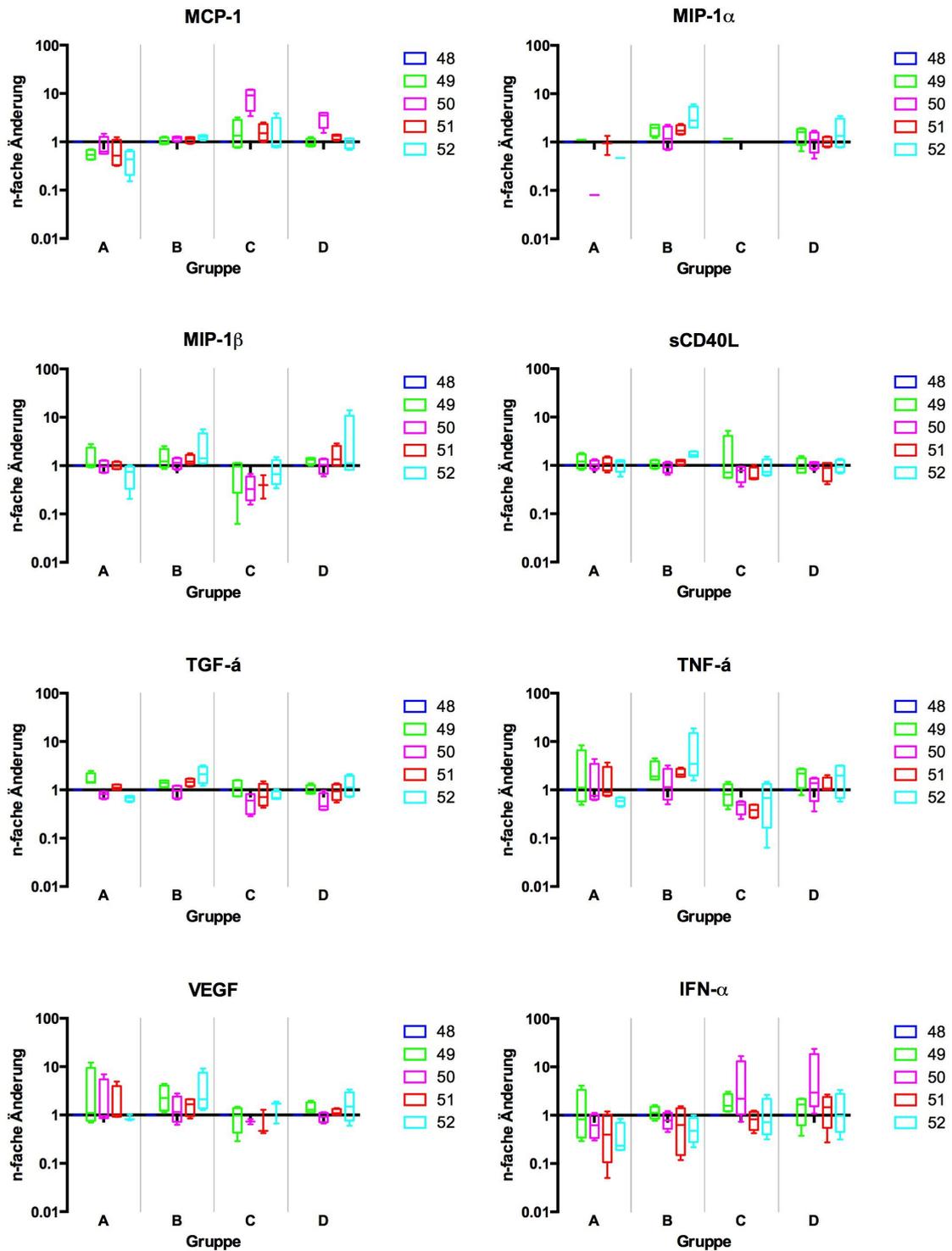


Abbildung 31. Änderung der Zytokinkonzentration im Plasma der Rhesusaffen 1 bis 16 innerhalb der ersten vier Wochen nach Belastung mit dem Wildtypvirus. Die Belastung erfolgte in Woche 48 wpi. Die Zytokinkonzentration wurden mittels Multiplex-Assay bzw. Singleplex-Assay bestimmt. Dargestellt sind die Änderungen der Zytokinkonzentrationen in Folge der Wildtypvirusbelastung.

Eigenständigkeitserklärung

Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Arbeiten wurden am Robert Koch-Institut in Berlin in der Zeit vom 15. Februar 2011 bis 14. Februar 2014 durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 08. Juli 2014

Benjamin Gabriel