

Entwicklung und Testung von multigenen,
multivektoriellen Impfstoffen gegen das humane und
simiane Immundefizienzvirus

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaft (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marc Reudelsterz
aus Berlin

2013

Diese Arbeit wurde in dem Zeitraum von Juni 2008 bis November 2011, unter Leitung von Prof. Dr. Reinhard Kurth, in der Projektgruppe 12 (HIV-Impfstoffentwicklung und Immunpathogenese) des Robert Koch-Instituts Berlin, angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Reinhard Kurth

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 05.07.2013

Danksagung

Vor allem danke ich meinen Eltern, da sie mir das Studium ermöglicht haben, und meiner Freundin Janet Hildebrandt, die mich in der Zeit des Studiums und der Doktorarbeit immer unterstützt hat.

Prof. Dr. R. Kurth und Dr. Stephen Norley möchte ich für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit und ihre wissenschaftliche Anleitung und Unterstützung danken.

Bei Dr. Isaac Sipo möchte ich mich für seine gute Betreuung in praktischen und theoretischen wissenschaftlichen Belangen sowie für seine kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der ganzen Arbeitsgruppe P12 von Dr. Stephen Norley, besonders bei Christiane Bug, Sandra Kühn und Nicky Norley, die mir während meiner Doktorarbeit immer hilfreich zur Seite gestanden haben.

Mein Dank gilt auch Dr. Oliver Hohn für das Überlassen der pTH-OVA und pTH-GMCSF Konstrukte und meinem Kommilitonen und Freund Johannes Neuhaus für die hilfreichen Diskussionen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>HIV-Pandemie</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Morphologie, genetischer Aufbau und Replikationszyklus des HI-Virus.....</i>	<i>2</i>
1.3	<i>HIV-Infektion, Therapie und AIDS-Erkrankung</i>	<i>4</i>
1.4	<i>HIV-1 Impfstoffentwicklung.....</i>	<i>6</i>
1.4.1	Tiermodelle.....	6
1.4.2	Klassische Impfstoffe und deren Misserfolg gegen HIV-1.....	8
1.4.3	Moderne Impfstoffe gegen HIV	9
1.4.4	Klinische Studien	17
1.4.5	Herausforderungen in der HIV-Impfstoffentwicklung	19
1.5	<i>Zielsetzung der Doktorarbeit.....</i>	<i>24</i>
2	Material und Methoden	26
2.1	<i>Materialien.....</i>	<i>26</i>
2.1.1	Bakterienstämme und Zelllinien	26
2.1.2	Puffer, Lösungen und Medien	27
2.1.3	Geräte	29
2.2	<i>molekularbiologische Methoden</i>	<i>30</i>
2.2.1	Konstruktion der HIV- und SIV-Konstrukte.....	30
2.2.2	Sequenzierungs-PCR.....	30
2.2.3	PCR-Amplifikation zur Halbierung der Konstrukte	31
2.2.4	Klonierungen.....	32
2.2.4.1	Restriktion mit Endonukleasen	32
2.2.4.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
2.2.4.3	Geextraktion	32
2.2.4.4	Ligation	32
2.2.4.5	Transformation	33
2.2.4.6	Rekombination	33
2.2.4.7	Kontrolle der Klone	33
2.2.5	Plasmidproduktion	34

2.2.6	DNA-Konzentrationsbestimmung	34
2.2.7	DNA-Extraktion	34
2.2.8	DNA-Fällung.....	35
2.2.9	Herstellung von Gene Gun Munition.....	35
2.2.10	Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels linearem Polyethylenimin...36	
2.2.11	Passagierung und Aussaat von Zellen.....	36
2.3	<i>Virologische Methoden</i>	37
	Rekombinante Adeno-assoziierte Viren	37
2.3.1	Kleinproduktion der rAAV2.9-Vektoren.....	37
2.3.2	Großproduktion und Aufreinigung der rAAV2.9-Vektoren	38
2.3.3	Physikalische Quantifizierung der produzierten rAAV2.9-Vektoren	40
2.3.3.1	Herstellung des Standards.....	40
2.3.3.2	Herstellung der Proben	41
2.3.3.3	Durchführung der PCR.....	41
2.3.4	In vitro Transduktionsversuche	42
	Rekombinante Adenoviren.....	43
2.3.5	Initiale Adenovirusproduktion und Amplifikation	43
2.3.6	Isolierung und Charakterisierung von rekombinanten Virusklonen	44
2.3.7	Testung auf replikationskompetente Adenoviren	45
2.3.8	Großproduktion und Aufreinigung rekombinanter Adenoviren.....	46
2.3.9	Quantifizierung der rekombinanten Adenoviren	47
2.4	<i>Immunologische Methoden</i>	48
2.4.1	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	48
2.4.2	Western Blot.....	48
2.4.2.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	48
2.4.2.2	Proteintransfer.....	49
2.4.3	ELISA	50
2.4.4	ELISpot	51
2.5	<i>Tierversuche</i>	54
2.5.1	Immunisierungsstudien	54
2.5.2	In vivo Zytotoxizitätstests	55

3	Ergebnisse	58
3.1	<i>Klonierungen und Plasmidproduktion</i>	<i>58</i>
3.2	<i>In vitro Expressionskontrolle der Plasmide und viralen Vektoren</i>	<i>61</i>
3.3	<i>Quantifizierung der produzierten viralen Vektoren</i>	<i>69</i>
3.4	<i>In vivo Immunogenitätsstudien</i>	<i>70</i>
3.5	<i>In vivo Validierung der Zytotoxizität der induzierten Immunantwort.....</i>	<i>81</i>
4	Diskussion.....	84
4.1	<i>Auswahl und Optimierung der Antigene</i>	<i>84</i>
4.2	<i>Produktion und in vitro Charakterisierung der Impfvektoren</i>	<i>85</i>
4.3	<i>In vivo Immunogenitätsstudien.....</i>	<i>88</i>
4.4	<i>In vivo Zytotoxizitätsstudien</i>	<i>91</i>
4.5	<i>Ausblick.....</i>	<i>92</i>
5	Zusammenfassung	96
6	Literaturverzeichnis.....	102
7	Anhang.....	120
7.1	<i>Plasmid-Vektoren.....</i>	<i>120</i>
7.2	<i>Primersequenzen</i>	<i>125</i>
7.3	<i>Peptidsequenzen.....</i>	<i>126</i>
7.4	<i>EliSpot.....</i>	<i>136</i>
7.5	<i>ELISA</i>	<i>146</i>
7.6	<i>Abkürzungen.....</i>	<i>152</i>

1 Einleitung

1.1 HIV-Pandemie

Seit der Pest ist das humane Immundefizienzvirus (HIV) und das damit verbundene erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS) die größte pandemische Gesundheitsbedrohung der Menschheit. Keine andere der Menschheit bekannte nicht impfpräventable Infektionskrankheit besitzt eine dermaßen hohe, fast hundertprozentige Letalitätsrate. Seit der Entdeckung der ersten fünf Fälle einer AIDS-Erkrankung vor annähernd drei Jahrzehnten (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983) sind weltweit annähernd 30 Millionen Menschen an der Krankheit gestorben und ca. 34 Millionen leben mit der HIV-Infektion, darunter allein 22,5 Millionen in der afrikanischen Sub-Sahara-Zone. Die dort lebenden 10 % der Weltbevölkerung machen 69 % der HIV-Infizierten aus. In Hinblick auf die Millenniumserklärung der Vereinten Nationen „Das Recht auf Entwicklung für jeden zur Wirklichkeit werden zu lassen und die gesamte Menschheit von Not zu befreien“ (UN-Generalversammlung, 2000) stellt somit die HIV-Pandemie ein großes Hindernis dar. Seitdem die Pandemie im Jahr 1997 in schätzungsweise 3,2 Millionen Neuinfektionen pro Jahr gipfelte, sank die Neuinfektionsrate dank verbesserter Prävention, steigender Verfügbarkeit von HIV-Medikamenten und Verringerung der Mutter-Kind-Übertragungen auf 2,5 Millionen Neuinfektionen im Jahr 2011 ab. Allein 2009 erhielten ca. 1,2 Millionen Menschen erstmals Zugang zu HIV-Medikamenten, ein Anstieg von 30 % innerhalb eines Jahres. Mittlerweile hat zumindest ein Drittel der Menschen in Entwicklungs- und Schwellenländern Zugang zu einer medikamentösen Behandlung. Aufgrund dieser positiven Entwicklung gelang es, die HIV-Inzidenz um mehr als 25 % zwischen 2001 und 2011 in über 39 Länder zu senken. In Ländern wie Äthiopien, Südafrika, Nigeria oder Sambia, welche mit am schwersten von der Pandemie betroffen sind, sank die Rate der Neuinfektion oder stabilisierte sich. Dieser positive Trend ist leider nicht global zu beobachten. Im Mittleren Osten, Nordafrika, Zentralasien und verschiedenen osteuropäischen Ländern stieg die Zahl der Neuinfektionen zwischen 2001 und 2011 um bis zu 35 % (UNAIDS, 2012). Bis zum Jahr 2009 hat die Krankheit 16,6 Millionen AIDS-Waisen hinterlassen, wodurch der ohnehin schon schlechte Ernährungs- und Gesundheitszustand sowie das Bildungsniveau weiter verschlechtert wurden, wobei sich auch in diesen Bereichen eine positive Entwicklung erkennen lässt (UNAIDS, 2010).

Hinzu kommt, dass anderen Infektionskrankheiten, wie z.B. Tuberkulose, durch die Immundefizienz eine Tür geöffnet wird (Sonnenberg *et al.*, 2005). Diese begonnene positive Trendwende der afrikanischen Länder in der Entwicklung der HIV-Pandemie muss durch Bereitstellung adäquater finanzieller Mittel auch in Zeiten der Rezession weiter ausgebaut und intensiviert werden, um diese Entwicklung fortsetzen zu können. Der beste Weg zur endgültigen Beendigung der HIV-Pandemie und Eradikation des Erregers ist die Entwicklung und flächendeckende Verteilung eines wirksamen, sicheren und vor allem für die Risikogebiete geeigneten HIV-Impfstoffes.

1.2 Morphologie, genetischer Aufbau und Replikationszyklus des HI-Virus

Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren und Gattung der Lentiviren. Es besitzt wie alle Retroviren die Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag*, kodiert für das Vorläuferprotein der inneren Nukleokapsidproteine, das Kapsidprotein p24, und das Matrixprotein p17. Das *pol*-Gen kodiert für die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Das Vorläuferprotein des Oberflächenproteins gp120 und des transmembranen Hüllproteins gp41 wird durch das *env*-Gen codiert. Zusätzlich besitzen Viren der Familie der Lentiviren die regulatorischen Gene *tat* und *rev*. Bei primaten Lentiviren wie HIV-1 und HIV-2 kommen noch die akzessorischen Gene *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* bzw. *vpx* bei HIV-2 hinzu. Die reifen

Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von 110 nm (Gelderblom *et al.*, 1987) und besitzen ein Genom aus zwei identischen, nicht-assoziierten 9,7 kb großen RNA-Einzelsträngen, umgeben von einem konischen Kapsid und einer Matrix. Darüber befindet sich eine Hüllmembran, welche von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleitet ist, Oberflächenmoleküle der Wirtszelle trägt und mit den viralen Glykoproteinen assoziiert ist (Abb. 1.1)

(Gelderblom, 1991). Die humanen Lentiviren können in die beiden Typen HIV-1 und HIV-2 unterteilt werden, wobei sie nur ca. 55 % Sequenzhomologie aufweisen

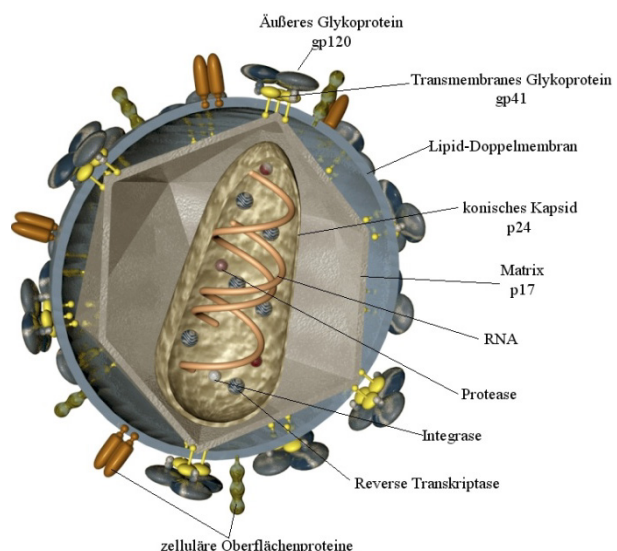


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung eines HIV-Partikels (von Dr. S. Norley, RKI).

(Guyader *et al.*, 1987), da sie aus unterschiedlichen simianen Immundefizienzviren hervorgegangen sind (Doolittle, 1989). Die beiden Virustypen ähneln sich in dem von ihnen ausgelösten Krankheitsbild, jedoch ist die Verbreitung und Krankheitsprogredienz bei HIV-2 wesentlich geringer (Leligdowicz and Rowland-Jones, 2008). Eine grundsätzliche Einteilung der HIV-1 Typen erfolgt in die Gruppen M (Haupttypen), O (Sondertypen), N (nicht N- oder O-Typen) und in die neue Gruppe P. In Gruppe M fallen über 90 % der zirkulierenden Virusvarianten. Die Hauptgruppe M wird weiter in die verschiedenen Untergruppen A, B, C, D, F, G, H, J und K unterteilt, welche ausgehend von Afrika stark regionsspezifisch verbreitet sind.

Die Virus-Zell-Fusion von HIV mit der Wirtszelle wird eingeleitet durch die Bindung von gp120 an den CD4 Rezeptor der Zielzelle. Nach einer anschließenden Konformationsänderung der trimären Struktur des gp120/gp41 Komplexes kommt es zur Interaktion des Komplexes mit dem Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4 auf der Zielzelle und es folgt die Fusion zwischen Zell- und Virusmembran. Das Viruskapsid gelangt dadurch in das Zytoplasma und das Kapsid wird abgebaut (Auewarakul *et al.*, 2005). Mithilfe der im Viruspartikel enthaltenen Reversen Transkriptase wird das virale RNA-Genom in doppelsträngige DNA transkribiert. Der gebildete virale Präintegrationskomplex, bestehend aus ssRNA, dsDNA, Matrixprotein, Integrase, Reverser Transkriptase und Vpr, gelangt anschließend in den Zellkern (Sherman *et al.*, 2003) und das doppelsträngige DNA-Genom wird mithilfe der Integrase in das Wirtsgenom integriert, um das Provirus zu bilden. Der Integrationsort ist nicht völlig zufällig, sondern liegt vorwiegend in schwach konservierten, palindromischen Sequenzen im Wirtsgenom (Tsuruyama *et al.*, 2010). Wenige Stunden nach einer produktiven Infektion kommt es zu einer *de novo* Expression der frühen viralen Proteine Rev, Nef und Tat. In einer späteren Phase werden die Proteine Gag, Pol, Env, Vif und Vpr exprimiert (Hope, 1999) und es kommt zur Assemblierung neuer Viruspartikel. Zuerst werden unreife Virionen bestehend aus den Vorläuferproteinen von Gag, Protease/Polymerase, Envelope und der ungespleißten HIV-RNA gebildet und von der Wirtszelle abgeschnürt. Während der anschließenden Reifung der Partikel kommt es zur Spaltung der Vorläuferproteine mittels der HIV-Protease und zellulärer Enzyme (Morrow *et al.*, 1994).

1.3 HIV-Infektion, Therapie und AIDS-Erkrankung

Die HIV-Infektion erfolgt vorwiegend durch Kontakt mit virushaltigen Körperflüssigkeiten, wie Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Muttermilch, über die Schleimhäute. Eine direkte systemische Infektion durch kontaminierte Injektionskanülen ist vorwiegend bei intravenös Drogenabhängigen verbreitet. Bis zur Einführung zuverlässiger HIV Test- und Inaktivierungsverfahren zählten auch Empfänger von Blutprodukten, wie z.B. Hämophiliepatienten, zu einer Risikogruppe.

Der CD4-Oberflächenrezeptor, den die T-Lymphozyten und Makrophagen exprimieren, ist der Hauptrezeptor für die gp120-vermittelte Fusion des Virus mit der Wirtszelle. Zusätzlich wird der Chemokinrezeptor CCR5 oder CXCR4 als Korezeptor benötigt (Deng *et al.*, 1996). CCR5 wird in hohem Maße von monozytären Zellen wie Makrophagen, CXCR4 vorwiegend von darmassoziierten lymphatischen T-Zellen, z.B. aktivierten CD4⁺ Gedächtnis-T-Zellen, exprimiert. Verschiedene HIV-1 Typen weisen einen starken Tropismus für einen der jeweiligen Korezeptoren, R5 HIV-1 für CCR5⁺ Zellen und X4 HIV-1 für CXCR4⁺ Zellen, auf. Einige Virusisolate sind dualtrop, da sie in der Lage sind, beide Korezeptoren zu benutzen. Wenige Personen sind durch eine Homozygotie für die Deletion von 32 Basenpaaren des CCR5-Gens und der damit verbundenen fehlenden Expression des CCR5-Korezeptors resistent gegen eine, meist initiale, R5 HIV-1 Infektion (Liu *et al.*, 1996).

Man vermutet, dass die dendritischen Zellen bei der Infektion der lymphozytenarmen genitalen Schleimhäute eine wichtige Rolle spielen. Vorwiegend unreife dendritische Zellen können *in vitro* produktiv infiziert werden. Ein Effekt, der sich *in vivo* bislang jedoch nur sehr selten beobachten ließ. Die Zellen sind jedoch in der Lage, das Virus an bestimmte Oberflächenrezeptoren zu binden und zu den Lymphknoten zu transportieren, wo es auf eine hohe Zahl infizierbarer CD4⁺ T-Zellen trifft (Steinman *et al.*, 2003). Da die Epithelzellen der Schleimhäute nicht die entsprechenden Oberflächenrezeptoren tragen, ist das HI-Virus nicht in der Lage sie zu infizieren und sie bilden somit einen Schutz vor dem Eindringen des Virus. Traumatische Läsionen, Entzündungen, sowie der unterschiedlich starke Aufbau der Schleimhäute haben einen Einfluss auf die Wirksamkeit dieser Barriere. Das Virus kann jedoch auch, ohne die Epithelzellen zu infizieren, durch Transzytose zu T-Lymphozyten oder Makrophagen gelangen (Bomsel, 1997).

Nach der initialen Infektion kommt es schnell zu einer rapiden, anfänglichen Replikation des Virus in CD4⁺ T-Zellen (Zhang *et al.*, 1999). Anfangs handelt es sich

um eine lokale Infektion der Schleimhäute, die sich, je nach Infektionsweg, unterschiedlich schnell ausbreitet, wobei das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) Hauptort der Virusreplikation und CD4⁺-Depletion während einer akuten HIV-1 Infektion ist (Brenchley *et al.*, 2004). Der Hochpunkt der Infektion ist meistens nach 3 Wochen erreicht und es zeigen sich erste grippeartige Symptome wie z.B. Fiebrigkeit (Little *et al.*, 1999). Der anschließend sinkende HIV-Plasmatiter lässt sich wahrscheinlich durch das zeitgleiche Auftreten HIV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen und einem zunehmenden Mangel an aktivierten CD4⁺ T-Zellen erklären (Schmitz *et al.*, 1999, Wodarz and Nowak, 2002). Die meisten infizierten Zellen sterben aufgrund der Immunreaktion oder zytopathischer Effekte ab. Wenige Tage nach dem Auftreten der ersten Symptome entwickelt sich ein reversibles, latentes Virusreservoir in ruhenden Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen, welches sich aus den wenigen überlebenden aktivierten und infizierten Gedächtnis-CD4⁺ T-Zellen entwickelt hat (Finzi *et al.*, 1999). Während dieser latenten chronischen Infektion kommt es zu kaum oder keiner viralen Genexpression und das Provirus-Genom ist besonders konserviert (Blankson *et al.*, 2002).

Die einzige Behandlungsmöglichkeit der HIV-Infektion ist eine hochaktive antiretrovirale Therapie (HAART) mit einer Kombination aus nukleosidischen und nichtnukleosidischen Reverse-Transkriptase-Inhibitoren sowie verschiedenen Protease-, Fusions- oder Integraseinhibitoren. Die Therapie supprimiert die Virusreplikation und die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen kann meistens auf einem stabilen Niveau gehalten werden. Das latente, nicht replizierende Virusreservoir in den ruhenden T-Gedächtnis-Zellen bleibt trotz HAART vermutlich lebenslang bestehen. Eine Beseitigung des Virusreservoirs durch das Immunsystem ist durch die geringe oder fehlende virale Genexpression und damit verbundene fehlende Antigenpräsentation nicht möglich (Siliciano *et al.*, 2003). Die bislang einzige Möglichkeit der vollständigen Eradikation einer bestehenden HIV-Infektion besteht in der Knochenmarktransplantation, unter Verwendung des Marks eines Spenders mit homozygoter CCR5-Mutation (Allers *et al.*, 2011).

Nach einer mehrjährigen asymptomatischen HIV-Infektion kommt es ohne Behandlung meistens zu sekundären opportunistischen und malignen Erkrankungen, charakteristisch für AIDS. Die voranschreitende Immunschwäche führt zu opportunistischen Infektionen durch Pilze, Viren, Bakterien und Parasiten, sowie malignen Erkrankungen wie das durch humane Herpesviren verursachte Karposi-Sarkom oder Zervixkarzinom und einer ungewollten Gewichtsabnahme.

Infolgedessen sterben die unbehandelten HIV-Patienten nach durchschnittlich 8 Jahren. Mit einer frühzeitigen und regelmäßigen, aber auch kostenintensiven und teilweise nebenwirkungsreichen HAART sinkt die Mortalität und Morbidität der Patienten signifikant. Die Wahrscheinlichkeit an nicht AIDS-assoziierten Erkrankungen zu sterben steigt jedoch an (Palella *et al.*, 2006).

1.4 HIV-1 Impfstoffentwicklung

1.4.1 Tiermodelle

Die präklinische Entwicklung eines Impfstoffes hängt in großem Maße von der Verfügbarkeit eines geeigneten Tiermodells zur Durchführung von Vakzinierungs- und Belastungsversuchen ab. Für HIV-1 gibt es jedoch leider bislang kein Tiermodell, welches den Infektionsverlauf und die Krankheitsprogression im Menschen widerspiegelt. Wenige Jahre nach der Entdeckung von HIV wurde klar, dass sich einzig Schimpansen und Gibbon-Affen mit HIV-1 infizieren lassen, jedoch ist der Virustiter in diesen Primaten niedriger als in einem infizierten Menschen und die Tiere entwickeln keine oder nur schwache Krankheitssymptome (Rutjens *et al.*, 2003). Darüber hinaus sind Schimpansenversuche mit großen ethischen und finanziellen Schwierigkeiten behaftet.

Aus diesen Gründen ist das heutzutage gebräuchlichste Tiermodell zur Effizienztestung von HIV-1 Impfstoffen das SIVmac/Makkaken-Modell. SIVmac löst in heterologen Wirten, wie z.B. asiatischen Makkaken, eine produktive Infektion und eine vergleichbare Krankheitssymptomatik wie HIV-1 im Menschen aus (Simon *et al.*, 1992). Hierbei ist von Vorteil, dass die Krankheitsprogression in infizierten Makkaken wesentlich schneller ist, wodurch der kostenintensive Versuchsablauf beschleunigt werden kann. Jedoch stammt SIVmac wie auch HIV-2 von SIVsm und steht somit nicht in direktem phylogenetischen Zusammenhang mit HIV-1 (Hirsch *et al.*, 1989). Zur Testung von HIV-1 basierten Impfstoffen im SIVmac/Makkaken-Modell wurden aus diesem Grund chimäre HIV-1/SIVmac Viren entwickelt (Reimann *et al.*, 1996). SHIV (simianes/humanes Immundefizienzvirus) trägt meist anstelle des natürlichen Envelope-Oberflächenantigens ein von HIV-1 stammendes Oberflächenantigen, wodurch die Testung von HIV-1 Envelope basierten Impfstoffen in diesem Tiermodell ermöglicht wird. Die Anwendung dieses Modells beschränkt sich jedoch vorwiegend

auf die Evaluierung von Antikörper-induzierenden Impfstoffen und es wird zunehmend deutlich, dass sich die Ergebnisse aus dem artifizialen SHIV/Makkaken-Modell nicht direkt auf die Wirksamkeit solcher Impfstoffe im Menschen übertragen lassen. So wurden in der präklinischen Evaluierung des in der STEP-Studie verwendeten adenoviralen Impfstoffes Belastungsversuche in Makkaken, mithilfe des SHIV- und des SIV/Makkaken-Modells durchgeführt. Nach Durchführung der klinischen Studie zeigte sich, dass nur die Ergebnisse der SIV/Makkaken-Studie mit den Resultaten der klinischen Studie korrelierten (Watkins *et al.*, 2008).

Aus diesen Gründen und der zunehmenden Bedeutung von T-Zell basierten Impfstoffen gegen HIV-1 findet das SIV/Makkaken-Modell immer häufiger Anwendung und kann als das beste heutzutage verfügbare Tiermodell klassifiziert werden.

Kleintiere, wie z.B. Mäuse, bieten große Vorteile bezüglich der Kosten, der Praktikabilität und geringerer ethischer Bedenken und finden seit Langem Anwendung in der präklinischen Testung von Impfstoffen bezüglich deren Immunogenität. Aus diesen Gründen besteht großes Interesse in der Entwicklung eines humanisierten Mausmodells, welches die Effizienztestung von HIV-1 Impfstoffen ermöglicht. Unter einer Vielzahl entwickelter Mausmodelle scheint das Trimer-Modell momentan am geeignetsten zu sein. Es konnte bereits erfolgreich zur Untersuchung von Hepatitis B, Influenza und HIV-1 Infektion und zur prophylaktischen und therapeutischen Immunisierung gegen diese Erkrankungen eingesetzt werden (Ben-Yedidia *et al.*, 1999, Bocher *et al.*, 2001, Ayash-Rashkovsky *et al.*, 2005a). Von Nachteil ist der relativ kurze Zeitraum von wenigen Monaten, in denen die Trimer-Mäuse funktionelle humane Immunfunktionen aufweisen. Dieser Zeitraum ist nicht ausreichend für die Testung von Impfstoffen, die nicht auf einen sterilisierenden Impfschutz ausgelegt sind. Verbesserungen in diesem System bezüglich der Langlebigkeit des transferierten Immunsystems und der Evaluierung der Relevanz der erzielten Ergebnisse im Vergleich zur Situation im Menschen könnten ein wichtiges Hilfsmittel in der Entwicklung eines wirksamen HIV-1 Impfstoffes darstellen.

1.4.2 Klassische Impfstoffe und deren Misserfolg gegen HIV-1

Klassische Impfstoffe, basierend auf lebenden, attenuierten Impfviren oder Totimpfstoffen, weisen eine eindrucksvolle Erfolgsgeschichte in Bezug auf die Eliminierung oder Reduzierung von schwerwiegenden Infektionskrankheiten wie Poliomyelitis, Pocken, Masern, Mumps, Röteln oder Influenza auf. Ihre Entdeckung war meist eher empirischer Natur und ihre Herstellung bedurfte keiner molekularbiologischen Techniken. Aus diesen Gründen erscheint es logisch, dass die ersten Versuche zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffes auf dieser Basis geschahen. So kam es, dass ungefähr sieben Jahre nach der Entdeckung von HIV ein sterilisierender Schutz durch die Verabreichung eines SIV-Totimpfstoffes im SIV/Makkaken-Modell erzielt werden konnte (Carlson *et al.*, 1990, Gardner *et al.*, 1991, Hartung *et al.*, 1992). Der anfängliche Optimismus wurde jedoch schnell zerstört, als klar wurde, dass der Impfschutz auf einem unerwarteten Artefakt im System beruhte. Das Impf- sowie das Belastungsvirus wurde in transformierten humanen T-Zelllinien gezüchtet und die schützende Antikörperantwort richtete sich nicht gegen das Virus selbst, sondern gegen humane MHC-Moleküle, welche in der das Virus umhüllenden menschlichen Zellmembran inkorporiert waren (Esser *et al.*, 2001). Eine Passage des Belastungsvirus in primären Makkaken-PBMCs machte den Impfschutz zunichte, da die menschlichen MHC-Moleküle gegen autologe Makkaken MHC-Moleküle ausgetauscht wurden (Norley *et al.*, 1998).

Eine vergleichbare Geschichte des anfänglichem Optimismus und anschließenden Misserfolges konnte leider auch bei der Entwicklung von Lebendimpfstoffen verzeichnet werden. Durch die Entfernung des für die Replikation nicht essentiellen *nef*-Gens wurde ein attenuiertes SIVmac Impfvirus entwickelt, welches Makkaken vollständig vor einer Superinfektion mit einem Wilttyp-Virus schützt (Daniel *et al.*, 1992). Anfängliche Sicherheitsbedenken bezüglich der Verwendung eines solchen Impfvirus wurden durch die Beobachtung einer apathogenen, natürlich vorkommenden HIV-1 *nef*-Deletionsmutante in Blutspendeempfängern zerstreut (Deacon *et al.*, 1995). Während der Planung von klinischen Studien mit einem attenuierten HIV-1 Impfvirus stellte sich heraus, dass das in den Makkaken verwendete Impfvirus eine rapide AIDS-Progression in neugeborenen Makkaken auslöste (Baba *et al.*, 1999). Wenig später zeigten sich auch bei den Blutspendeempfängern erste Krankheitssymptome wie auch bei einem Teil der immunisierten adulten Makkaken (Learmont *et al.*, 1999). Die Krankheitsprogression

war jedoch nur deutlich verzögert und nicht vollständig unterbunden worden, wodurch jegliche Planung zur Anwendung eines solchen Impfvirus im Menschen vollständig verworfen wurden.

Leider konnten die für den Schutz verantwortlichen immunologischen Mechanismen trotz intensiver Bemühungen bislang nicht identifiziert werden. Da nun beide klassisch erfolgreichen Methoden der Impfstoffentwicklung für HIV keinen Erfolg erzielt hatten, mussten neuartige, sichere und wirksame Methoden der Vakzinierung entwickelt und getestet werden.

1.4.3 Moderne Impfstoffe gegen HIV

Aufgrund des Scheiterns klassischer Lebend- und Totimpfstoffe konzentrierte sich die Forschung nun fast ausschließlich auf die Entwicklung und Testung modernerer bzw. neuartiger Impfverfahren. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über diese Impfverfahren, deren Anwendungsziele und ihre Vor- und Nachteile geben.

Proteinimpfstoffe:

Diese bestehen im Fall von HIV vorwiegend aus rekombinant hergestelltem äußerem Envelope-Oberflächenantigen gp120, meist in Verbindung mit Adjuvanzen. Sie sollen Antikörper induzieren, welche in der Lage sind, die HI-Viren zu neutralisieren und so eine Zell-Virus Fusion zu unterbinden, vergleichbar mit Totimpfstoffen. Von Vorteil sind hierbei die geringen Sicherheitsbedenken, jedoch kann es sehr schwierig sein, rekombinante Proteine in ausreichenden Mengen zu produzieren und aufzureinigen, ohne ihre native Struktur und damit ihre Antigenität zu verändern.

Molekulare Impfstoffe:

Sie besitzen den Vorteil, dass sie neben einer humoralen auch eine zelluläre Immunantwort induzieren können, vergleichbar mit Lebendimpfstoffen. Um dies zu erreichen, muss der für das gewünschte Antigen kodierende Impfvektor in die Wirtszelle gelangen, wo das Antigen anschließend *de novo* synthetisiert wird. Nach Prozession des Antigens im Proteasom und Endoplasmatischen Retikulum und der Bindung an MHC-I wird der Komplex an die Zelloberfläche transportiert und dort präsentiert, um von einem spezifischen T-Zellrezeptor erkannt zu werden. Um diese intrazelluläre Proteinexpression zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl von Vektorsystemen entwickelt. Hierzu zählen zum einen DNA-Impfstoffe, welche auf

verschiedenste Weisen appliziert werden können. Des Weiteren gibt es eine stetig wachsende Anzahl replizierender und replikationsdefizienter Vektorsysteme, welche häufig von bereits bekannten Impfviren oder anderen apathogen oder genetisch attenuierten Viren bzw. Bakterien abgeleitet sind.

Da die Vielfalt der verfügbaren Vektorsysteme zu groß ist, um alle genauer zu erläutern, werden im folgendem nur Vektoren behandelt, welche praktische Anwendung in dieser Arbeit gefunden haben.

DNA-Impfstoffe:

Die Verabreichung nackter DNA stellt eine der einfachsten Methoden dar, um Antigen-kodierende Sequenzen in den Organismus einzuführen. Der erste dokumentierte Versuch zur Einschleusung von DNA war die Applikation von aufgereinigter Papillomavirus DNA, welche zu einer anschließenden Papillomavirus-Infektion führte (Chambers and Ito, 1964). Es dauerte fast 30 Jahre, bis erste Versuche zur Induktion einer humoralen bzw. zellulären Immunantwort mittels DNA-Impfstoffen in Mäusen unternommen wurden (Wang *et al.*, 1993, Wang *et al.*, 1994, Ulmer *et al.*, 1993). Kurz darauf wurden erste erfolgreiche Versuche zur Induktion einer zellulären, sowie humoralen Immunantwort in Makkaken durchgeführt (Shiver *et al.*, 1995, Yasutomi *et al.*, 1996, Shiver *et al.*, 1997). So gelang es auch wenig später, einen robusten Schutz in heterologen Belastungsversuchen mit HIV-1 in Schimpansen (Boyer *et al.*, 1997, Ugen *et al.*, 1997) und SHIV in Makkaken zu erzielen (Boyer *et al.*, 1996). Diese vielversprechenden präklinischen Versuche führten kurze Zeit später zur Durchführung der ersten klinischen Phase 1 Studie zur therapeutischen Immunisierung mit DNA-Impfstoffen (Ugen *et al.*, 1998). Die verwendeten Impfstoffe erwiesen sich als sicher, jedoch war ihre Immunogenität und damit wahrscheinlich auch ihre therapeutische Wirksamkeit gering bzw. nicht nachweisbar. Um die Immunogenität im Menschen zu steigern, wurden deshalb eine Vielzahl von Optimierungen vorgenommen. Diese Verbesserungen betrafen zum einen die Applikationsmethode der DNA. Ausgehend von einfacher intramuskulärer bzw. intradermaler Injektion der Plasmid-DNA wurden Methoden entwickelt, um eine effizientere und gezieltere Transfektion, vorzugsweise von dermalen dendritischen Zellen, zu ermöglichen. Hierzu zählt die bioballistische Transfektion mittels „GeneGun“, bei der die Plasmide an winzige Goldkugeln gekoppelt und mittels Gasdruck in das Gewebe eingebracht werden. Diese Form der Verabreichung

steigerte die Immunogenität bei reduzierten DNA-Mengen (Haynes *et al.*, 1994, Fuller *et al.*, 1996). Weitere Methoden, wie die *in vivo* Elektroporation (Titomirov *et al.*, 1991, Hirao *et al.*, 2008) oder das Einbringen der DNA mittels einer gebräuchlichen Tätowiermaschine (Pokorna *et al.*, 2008) brachten ebenfalls eine Verbesserung im Vergleich zu einer simplen Injektion. Weitere Optimierungen der DNA-Immunisierung betreffen Antigen-codierende DNA-Sequenzen wie auch das Design des Plasmidvektors. Durch Codonoptimierung kann die Expressionseffizienz grundsätzlich gesteigert werden gerade beim HIV Gag-Gen macht sich dieser Effekt durch die damit verbundene Entfernung inhibitorischer Sequenzen, ohne die Proteinsequenz zu verändern, stark bemerkbar (Gao *et al.*, 2003, Deml *et al.*, 2001). Eine weitere Möglichkeit der Steigerung der Immunogenität stellt die Koapplikation verschiedener genetischer oder chemischer Adjuvantien dar. So können verschiedene Zytokine wie IL-2 oder IL-12, bzw. Chemokine wie GM-CSF verwendet werden, um die Immunantwort und deren Polyfunktionalität zu steigern oder die Art der Ausrichtung der Immunantwort, vorwiegend zellulär oder humoral, zu beeinflussen (Siegismund *et al.*, 2009, Tenbusch *et al.*, 2008, Mahdavi *et al.*, 2011). Auch der topische Einsatz verschiedener TLR-Agonisten, wie z.B. Imiquimod oder CpG ODN, kann zu einer Steigerung oder Beeinflussung der Immunreaktion führen (Thomsen *et al.*, 2004, Ayash-Rashkovsky *et al.*, 2005b). Erste klinischen Studien zeigten zwar, dass die Immunogenität von DNA-Impfstoffen im Menschen deutlich geringer war als in präklinischen Kleintiermodellen, jedoch wurden hier bislang nicht alle entwickelten Optimierungsstrategien angewendet (Guimaraes-Walker *et al.*, 2008). Trotzdem werden DNA-Vakzine in klinischen Studien weiterhin häufig als Prime-Immunogen verwendet. Das lässt sich dadurch erklären, dass bei DNA-Impfstoffen, außer dem eigentlichen Antigen keine weiteren Antigen-Motive exprimiert oder enthalten sind, im Gegensatz zu viralen Vektoren. Dadurch wird die induzierte Immunantwort ausschließlich auf das exprimierte Antigen konzentriert und bietet eine gute Basis für weitere Boost-Immunisierungen mit anderen Impfstoff-Vektoren, zur sukzessiven Steigerung der Immunantwort.

Rekombinante Adeno-assoziierte Viren:

Adeno-assoziierte Viren gehören zur der Familie der Parvoviren und Gattung der Dependoviren. Sie sind 20 nm groß und weisen eine ikosaedrische Morphologie auf.

Da sie selbst replikationsdefizient sind, benötigen sie eine Koinfektion mit Helferviren zur Produktion weiterer Viruspartikel wie Herpes oder Adenoviren. In Abwesenheit solcher Helferviren integrieren sich die Wildtyp-Viren als Provirus ortsspezifisch auf Chromosom 19 des Menschen und verbleiben in einer nichtproduktiven Latenzphase (Samulski *et al.*, 1991). Durch trans-Komplementation der für eine Re-

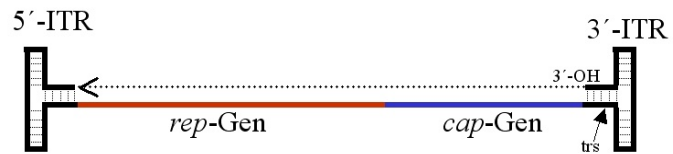


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des AAV-Wildtyp-Genoms mit dem Replikationsgen (rot) und dem Kapsidgen (blau) und den gefalteten, komplementären ITRs (schwarz), während der Folgestrangsynthese (Pfeil).

plikation notwendigen viralen Gene infolge einer Koinfektion mit Helferviren wird der lytische Reproduktionszyklus der AAVs ausgelöst (Muzyczka *et al.*, 1984). Das Wildtyp-Virus besitzt ein einzelsträngiges, lineares Genom von 4,7 kB. Es beinhaltet die Gene für die Replikation (*rep*) und die Kapsidproteine (*cap*). An den Enden des AAV-Genoms befinden sich die 145 bp langen „inverted terminal repeats“ (ITRs) (Berns and Bohenzky, 1987). Aufgrund ihrer multipalindromischen Struktur kommt es zu einer T-förmigen Faltung des einzelsträngigen Genoms durch komplementäre Basenpaarung zwischen den ITRs (Koczot *et al.*, 1973). Diese Sekundärstruktur mit einer freien 3'-Hydroxid-Gruppe ermöglicht die Synthese des komplementären DNA-Stranges mittels Selbst-Priming durch zelluläre Enzyme nach Entpackung der Viren (Abb.1.2) (Berns, 1990). Da die viralen ITRs alle cis-aktiven Elemente zur Virusreplikation und Verpackung besitzen, können die *rep* und *cap* Gene gegen eine Expressionskassette mit eukaryotischem Promotor, Intron und codierendem Gen mit einer maximalen Größe von 4,7 kB, ausgetauscht werden. Die *rep* und *cap* Gene werden, ebenso wie die für die Replikation benötigten Adeno-Helfervirus-Gene E2A, E4 und den VA RNAs, durch trans-Komplementation in Folge einer Plasmid-Transfektion bereitgestellt. Durch eine solche Mehrfachtransfektion der Produktionszelllinie, welche ein weiteres Helfervirus-Gen stabil integriert hat und dieses ebenfalls trans-komplementarisiert, werden helfervirusfreie rekombinante AAV-Partikel (rAAVs) gebildet (Xiao *et al.*, 1998). rAAVs besitzen einige Eigenschaften, die sie besonders interessant für die Anwendung als Genvektoren machen. Aus Sicherheitsgründen ist es von großem Vorteil, dass eine Infektion des Menschen mit dem Wildtyp-Virus trotz der hohen Seroprevalenz von 80 % für AAV Serotyp 2 seit seiner Entdeckung 1965 mit keiner Krankheit in Verbindung gebracht werden konnte (Berns and Bohenzky, 1987). *In vitro* Versuche zeigten ebenfalls keine Beeinflussung der Zellmorphologie oder des Zellwachstums durch eine AAV-Wildtyp-Integration (Handa *et al.*, 1977).

Bei den rekombinanten AAV-Vektoren wird zudem durch Deletion des *rep*-Gens eine gezielte chromosomale Integration unterbunden. Eine sehr seltene, zufällige Integration durch zelluläre Rekombination des AAV-Genoms mit dem Wirtsgenom lässt sich zwar in einigen Fällen beobachten (Yang *et al.*, 1997, Tenenbaum *et al.*, 2003), ein Zusammenhang dieses Vorgangs mit negativen Effekten, wie z.B. der Entstehung eines Leberkarzinoms in Mäusen, sind selten und nicht unumstritten (Donsante *et al.*, 2007). In keiner der vielen klinischen Studien mit rAAV-Vektoren, die in den letzten 15 Jahren durchgeführt wurden, konnten solche Effekte beobachtet werden. Die Replikationsdefizienz, die nichtpathogene Natur des Virus und die Eigenschaft, teilende und ruhende Zellen zu transduzieren, führte zur Entwicklung von rekombinanten AAV-Vektoren (rAAVs), vorwiegend für die Gentherapie und neuerdings auch für genetische Immunisierungen, vor allem basierend auf dem humanen Serotyp 2. Bis heute konnten insgesamt 12 verschiedene AAV-Serotypen beschrieben werden, nur zwei davon sind mit dem Menschen assoziiert. Sie unterscheiden sich ausschließlich im *cap*-Gen voneinander. Die damit verbundenen unterschiedlichen Kapsidproteine haben Einfluss auf den Zell- bzw. Rezeptortropismus des jeweiligen Serotyps. Durch den Austausch der *cap*-Gene gegen die anderer AAV-Serotypen ist es möglich, pseudotypisierte rAAVs zu produzieren. Die Anwendung solcher pseudotypisierter Vektoren bietet einige Vorteile. So kann eine preexistente Vektor-Immunität gegen einen bestimmten Sero- bzw. Pseudotyp, welche zu einer verminderten Transduktionseffizienz führt, umgangen werden. Zusätzlich kann der Zelltropismus der einzelnen rAAV-Pseudotypen für die gezielte Transduktion bestimmter Zelltypen oder Gewebe ausgenutzt werden (Zincarelli *et al.*, 2008). Somit kann beispielsweise eine gezielte Transduktion Antigen-präsentierender dendritischer Zellen durch AAV-1 und -2 erreicht werden (Veron *et al.*, 2007). Auch Mehrfachimmunisierungen, wie sie bei den meisten Impfungen üblich und notwendig sind, können sich, trotz entwickelnder Vektor-Immunität durch die Verwendung unterschiedlicher Pseudotypen realisieren. Da die rAAVs keine kodierenden viralen Gene mehr besitzen, ist der Vektor selbst, aufgrund der viralen Kapsidproteine, nur schwach immunogen. Eine zusätzliche Verbesserung der Transduktionseffizienz und Transgenexpression der rAAVs konnte durch Umgehung des limitierenden Schrittes der Synthese des komplementären DNA-Stranges durch zelluläre Enzyme nach Transduktion erreicht werden (Ferrari *et al.*, 1996). Durch Deletion der „terminal resolution site“ (*trs*) in einer der beiden flankierenden ITRs, wird das Ablösen des komplementären DNA-Stranges nach der

Doppelstrangsynthese unterbunden. Stattdessen bilden sich Virusgenome aus zwei invertierten, einzelsträngigen Genomen mit der mutierten ITR in der Mitte. Nach Entpackung des Virus in der Wirtszelle bildet sich durch komplementäre Basenpaarung ein doppelsträngiges AAV-Genom, ohne zelluläre Mechanismen zu benötigen (McCarty *et al.*, 2003). Die Verwendung solcher dimerischer, selbstkomplementarisierender Vektoren (scAAVs) führt im Vergleich zu den monomeren, einzelsträngigen Vektoren (ssAAVs) zu einer wesentlich verbesserten Transduktionseffizienz und einer früheren und stärkeren Expression (Wang *et al.*, 2003). Bei beiden Vektortypen aus den doppelsträngigen AAV-Genomen bilden sich Episome, teilweise entstehen auch Konkatemere mit mehreren AAV-Genomkopien. Ein Nachteil der scAAVs liegt in der auf ca. 2,7 kB halbierten Verpackungskapazität, bedingt durch die doppelte Genomkopie (Grieger and Samulski, 2005).

Rekombinante AAVs wurden ursprünglich als Gentherapievektoren entwickelt. Aufgrund bestimmter Eigenschaften, wie z.B. der langanhaltenden Transgenexpression und der Transduktion ruhender und terminal differenzierter Zellen, sind sie jedoch auch als Immunisierungsvektoren von Interesse. Trotz einzelner Berichte, in denen rAAVs eine funktionell gestörte, aberrante zelluläre Immunantwort in Mäusen induziert haben sollen (Lin *et al.*, 2007a, Lin *et al.*, 2007b), konnte ihre Eignung als Impfvektor bereits gegen verschiedene Infektionskrankheiten demonstriert werden. In Tierversuchen mit Krankheitserregern wie SARS, Papillomavirus, Hepatitis B und Influenza (Manning *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 2005, Mahadevan *et al.*, 2007, Du *et al.*, 2008a, Zhou *et al.*, 2010, Sipo *et al.*, 2011) und Krebsantigenen, wie z.B. das Prostata-spezifische Antigen (Mahadevan *et al.*, 2007), könnte ihre Eignung in Hinblick auf die Induktion einer wirksamen humoralen und zellulären Immunantwort unter Beweis gestellt werden. In präklinischen Versuchen mit HIV- bzw. SIV-Antigen exprimierenden rAAVs konnten in Mäusen starke zelluläre und humorale Immunantworten induziert werden (Xin *et al.*, 2002, Xin *et al.*, 2001). Durch eine einzelne Immunisierung von Makkaken, gefolgt von einer Belastung mit einem pathogenen SIV-Stamm, konnte zudem eine deutliche Suppression der Viruslast erzielt werden (Johnson *et al.*, 2005). Ausgehend von diesen ermutigenden Ergebnissen wurde eine klinische Phase I Studie mit rAAV-basierten HIV-Impfstoffen durchgeführt. Die Immunisierung wurde gut toleriert, jedoch war die Immunogenität gering. Weiterführende Versuche in Afrika mit höheren rAAV-Dosen und Wiederholungsimmunisierungen sollen zeigen, ob die Immunogenität gesteigert werden kann (Mehendale *et al.*, 2008). In Hinblick auf die Probleme der Induktion von

breitneutralisierenden HIV-Antikörpern durch Immunisierungen wurde ein neuartiger Versuchsansatz auf Basis rAAVs, kodierend für den neutralisierenden Antikörper IgG1b12, unternommen (Lewis *et al.*, 2002). Mit diesem Konzept gelang es, über mehrere Monate zirkulierende neutralisierende Antikörper im Serum von Makkaken zu induzieren und die Tiere vor einer intravenösen Belastung mit SIV zu schützen (Balazs *et al.*, 2012). Dieser Versuch stellt möglicherweise einen vielversprechenden Ansatz dar, das Problem der Induktion neutralisierenden Antikörper zu überwinden.

Rekombinante Adenoviren:

Adenoviren sind nicht-umhüllte Viren mit einer Größe von 80-110 nm und besitzen ein doppelstrangiges, lineares DNA-Genom mit einer Größe von 36-38 kB. Sie weisen eine ikosaedrische Morphologie auf und ihr Kapsid ist aus Penton- und Hexon-Kapsomeren aufgebaut. Die Familie der Adenoviridae lässt sich in vier Genera der Mastadenoviren (Säugetiere), Aviadenoviren (Vögel), Atadenoviren und Siadenoviren (verschiedene Wirte wie Säugetiere, Vögel, Fische, Reptilien und Amphibien) unterteilen. Sie verursachen vorwiegend Erkrankungen der Atemwege, der Bindehaut des Auges und des Gastrointestinaltraktes. Sie wurden erstmals 1953 aus Tonsillen und adenoidem Drüsengewebe isoliert und im Labor vermehrt (Arrode-Bruses *et al.*, 2012) und sie waren die ersten Viren, für die ein karzinogenes Potential bei Nagetieren nachgewiesen werden konnte (Yabe *et al.*, 1962). Ein Zusammenhang mit humanen Krebserkrankungen konnte jedoch nicht hergestellt werden. Molekularbiologische Bedeutung erlangten sie, als an ihnen erstmals der Vorgang des RNA-Spleißens nachgewiesen und die Kolinearität von mRNA und DNA widerlegt werden konnte (Berget *et al.*, 1977). Allein die Gruppe der humanen Adenoviren aus dem Genus der Mastadenoviren lässt sich in sieben Virusspezies (HAdV-A bis HAdV-G) und bislang in weitere 52 Serotypen untergliedern (Davison *et al.*, 2003).

Rekombinante Adenoviren weisen verschiedene Eigenschaften auf, welche sie als Impfstoff-Vektor attraktiv machen. Sie besitzen einen sehr breiten Zelltropismus, infizieren teilende und nicht-teilende Zellen und sind in der Lage, professionelle Antigen-präsentierende Zelle, wie z.B. Makrophagen und Dendritische Zellen, zu transduzieren (Kootstra and Verma, 2003). Sie können als replikationskompetente und –inkompetente Vektoren produziert werden und besitzen je nach Vektorart eine relativ hohe Insertionskapazität für Fremdartigene. Aufgrund der parallel exprimierten adenoviralen Gene haben sie eine immunstimulierende Wirkung, führen

zur Reifung Dendritischer Zellen, verstärken die zytolytische Aktivität Natürlicher Killerzellen und erhöhen die Interferon-gamma Produktion (Miller *et al.*, 2002). Sie lassen sich relativ einfach in großen Mengen produzieren (Cortin *et al.*, 2004) und sind biologisch sehr stabil gegenüber Umwelteinflüssen (Cortin *et al.*, 2004). Sie sind in der Lage, sowohl zelluläre, als auch humorale Immunantworten gegen das insertierte Antigen zu induzieren (Bruce *et al.*, 1999) und können sowohl systemisch als auch mukosal appliziert werden (Schulte *et al.*, 2009). Aus Sicherheitsgründen werden heutzutage fast ausschließlich replikationsinkompetente Vektoren eingesetzt, um eine ungewollte Virusverbreitung zu unterbinden (Buge *et al.*, 1997). Es ist von Vorteil, dass sie sich ohne Zuhilfenahme von replikationskompetenten Helferviren auf Produktionszelllinien generieren lassen (Luo *et al.*, 2007) und nicht in das Wirtsgenom integrieren.

Diese Eigenschaften führten dazu, dass adenovirale Vektoren in einer Vielzahl von Studien als Impfvektoren evaluiert wurden. Erste präklinische HIV-Impfstoffstudien bestätigten ihre Immunogenität in Kleintieren und Schimpansen (Natuk *et al.*, 1992, Natuk *et al.*, 1993). In Kombination mit Env-basierten Proteinimpfstoffen gelang es kurz darauf einen robusten Schutz von Schimpansen gegen eine HIV-Infektion zu erzielen (Lubeck *et al.*, 1997). In dem strengeren SIV/Makkaken-Modell konnte eine deutlich reduzierte Viruslast nach Belastung erzielt werden (Buge *et al.*, 1997). In einer Vergleichsstudie von DNA-, MVA- und Adenovirus-basierten Vektoren in Makkaken konnte die Überlegenheit der adenoviralen Vektoren im Hinblick auf deren Immunogenität und Viruslast-Reduktion gezeigt werden (Shiver *et al.*, 2002). Aufgrund dieser vielversprechenden präklinischen Daten wurden relativ schnell erste klinische Studien unter Verwendung Adenovirus-basierter HIV-Impfstoffe initiiert (Abschnitt 1.4.4), um deren protektive Effizienz in Menschen zu testen.

In allen erwähnten präklinischen Versuchen wurden Vektoren verwendet, die auf dem humanen Adenovirus des Serotyps 5 basierten. Da jedoch in der Bevölkerung eine hohe Seroprävalenz gerade gegen diesen Typ vorherrscht und teilweise gezeigt wurde, dass dies die Immunisierungseffizienz verringert, wurden verschiedene Methoden entwickelt, dieses Problem zu umgehen. So wurden Versuche mit anderen, selteneren humanen Adenoviren durchgeführt (Nan *et al.*, 2003, Vogels *et al.*, 2007), oder es wurde durch Pseudotypisierung des Kapsidbereiches, gegen welchen sich die präexistierende humorale Immunität richtet, gegen Kapsidbestandteile seltenerer Adenovirus-Varianten ausgetauscht (Xin *et al.*, 2005, Xin *et al.*, 2007).

1.4.4 Klinische Studien

Weit mehr als 100 klinische Studien mit den verschiedensten Arten von HIV-Impfstoffen wurden bereits durchgeführt oder sind noch in der klinischen Erprobung. Trotz dieser Vielzahl an Studien wurden weltweit erst zwei Phase IIb und drei Phase III Studien initiiert, um die protektive Effizienz der Impfstoffkandidaten in Hochrisikogruppen zu evaluieren. In den zwei ersten durchgeführten Phase III Studien, die auf die Induktion neutralisierender Antikörper mithilfe des Proteinimpfstoffes AIDSVAX B/E und B/B ausgerichtet war, konnte trotz erfolgreicher Induktion neutralisierender Antikörper keinerlei protektiver Schutz in Bezug auf die Ansteckungsrate oder dem klinischen Verlauf der HIV-Infektion beobachtet werden (Pitisuttithum *et al.*, 2006, Flynn *et al.*, 2005).

Aufgrund der bereits erwähnten Vorteile Adenovirus-basierter Impfstoffe in Bezug auf deren Sicherheit, Immunogenität, der Möglichkeit der Induktion zellulärer und humoraler systemischer und vor allem mukosaler Immunantworten und der bereits durchgeführten vielversprechenden präklinischen Untersuchungen wurden verschiedene klinische Studien auf dieser Basis durchgeführt. Eine der bislang zwei durchgeführten Phase IIB Studien, bekannt als Merck STEP Trial, erlangte bedauerlicherweise große öffentliche Bekanntheit, da sie aufgrund einer Interim-Analyse noch vor Beendigung der Studie vorzeitig abgebrochen wurde. Diese Zwischenanalyse zeigte nicht nur, dass kein positiver Immunisierungseffekt zu erkennen war, sondern auch ein erhöhtes Infektionsrisiko in immunisierten Probanden mit präexistierenden, Adenovirus 5 spezifischen Antikörpern beobachtet werden konnte (Buchbinder *et al.*, 2008). Möglicherweise ist es nach der Immunisierung zu einer Expansion von präexistenten, Ad5 spezifischen CD4+ T-Zellen in diesen Probanden gekommen. Eine Steigerung der Anzahl an infizierbaren Zielzellen in der Mukosa könnte zu einer erhöhten Aquisitionsrate geführt haben (Benlahrech *et al.*, 2009). Nachfolgende Untersuchungen statistischer und wissenschaftlicher Art lassen jedoch begründete Zweifel an der Hypothese zu. Erstens entwickeln alle Probanden nach Verabreichung der ersten Impfdosis Ad5 spezifische Antikörper und CD4+-T-Zellen. Außerdem wurde gezeigt, dass das Vorhandensein solcher Antikörper vor der Immunisierung nicht mit der Anzahl oder Expansion Ad5-spezifischen CD4+-T-Zellen korreliert (Hutnick *et al.*, 2009, O'Brien *et al.*, 2009). Gleichzeitig zu der STEP-Studie wurde auf Basis des gleichen Impfstoffes eine weitere Studie, der Phambili-Trial, durchgeführt. Im Gegensatz zur STEP-Kohorte,

welche aus homosexuellen Männern bestand, wurden hier heterosexuelle Männer und Frauen mit hohem Risiko der HIV-Ansteckung untersucht. Die Beobachtungen aus der STEP-Studie konnten hier nicht bestätigt werden, stattdessen konnte ein positiver Trend, wenn auch nicht statistisch signifikant, bezüglich der Viruslast nach Infektion und der CD4-Depletion in den immunisierten Frauen beobachtet werden (Gray *et al.*, 2010). Abschließend lässt sich sagen, dass beide Studien möglicherweise voreilig und unbegründet vorzeitig beendet wurden, jedoch wurde auch deutlich, dass die erhoffte protektive Wirksamkeit des Immunisierungsregimes ebenfalls ausgeblieben ist.

Gerade deshalb ist es enttäuschend, dass eine weitere geplante Studie mit DNA-Impfstoffen, gefolgt von dem Merck Adenovirus-Impfstoff (PAVE100), aufgrund dieser Ergebnisse verworfen wurde, obwohl anzunehmen ist, dass ein solches heterologes Immunisierungsregime möglicherweise in der Lage gewesen wäre, stärkere Immunantworten und somit auch einen protektiven Effekt zu induzieren.

In der dritten und bislang letzten Phase III Studie, bekannt als RV144 Thai-Trial, konnte erstmals eine moderate Reduktion der HIV Aquisitionsrate von 31 % innerhalb des dreijährigen Studienzeitraumes beobachtet werden. In dieser Studie wurde zwei bereits eigenständig getestete und einzeln nicht wirksame Impfstoffe kombiniert. Das Immunisierungsregime, basierend auf einem rekombinanten Vogelpockenvirus und dem AIDSVAX Proteinimpfstoff, wurde in der bislang größten Studienkohorte, welche vorwiegend aus Probanden mit niedrigerem bis mittlerem Ansteckungsrisiko bestand, getestet. Das Impfregime war auf die Induktion zellulärer, als auch humoraler Immunantworten ausgelegt. Betrachtet man das erste Jahr nach erfolgter Immunisierung, konnte statistisch sogar ein 50-60 % Reduktion erzielt werden, jedoch wird somit auch deutlich, dass der Impfschutz nur relativ kurzlebig ist. Entgegen den Erwartungen konnte, obwohl auch zelluläre Immunantworten induziert wurden, keinerlei klinischer Vorteil der Impflinge gegenüber der Placebo-Gruppe nach HIV-Infektion beobachtet werden (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Aufgrund der relativ geringen Anzahl an HIV-Infektionen in den Versuchsgruppen und einer auffälligen Erhöhung der Infektionsrate in der Placebo-Gruppe im Anfangszeitraum, den verschiedenen Möglichkeiten der statistischen Auswertung und Interpretation der erzielten Ergebnisse und der relativ geringen Impfstoffeffizienz gibt es momentan große Diskussion über die Signifikanz des erzielten Schutzes (Vaccari *et al.*, 2010, Gilbert *et al.*, 2011). Weiterführende Studien sollen durchgeführt werden, um die Ergebnisse zu stützen. Um die für den Schutz verantwortlichen immunologischen

Mechanismen zu identifizieren, werden die von den Probanden erhobenen Proben momentan von verschiedenen Forschungsgruppen detailliert analysiert. Sollte dies gelingen, wäre das ein wichtiger Schritt zur Entwicklung eines wirksameren HIV-Impfstoffes (Rolland and Gilbert, 2011).

1.4.5 Herausforderungen in der HIV-Impfstoffentwicklung

Ein optimaler Impfstoff müsste in der Lage sein, eine lebenslange, sterilisierende Immunantwort gegen alle zirkulierenden Virusvarianten, unabhängig vom genetischen Hintergrund des einzelnen Individuums, zu induzieren. Die meisten der heutzutage zugelassenen Impfstoffe gegen verschiedenste bakterielle und virale Infektionen sind jedoch nicht in der Lage, dieses Ziel auch nur annähernd zu erreichen. Aus einer Vielzahl von Gründen ist die Ausgangssituation für HIV um einiges komplizierter. Im Folgenden sollen diese Problematik und mögliche Auswege daraus genauer betrachtet werden.

Virusvarianz und neutralisierende Antikörper:

Ein großes Problem stellt die enorme Virusdiversität von HIV-1 dar. Der Grad der Virusvarianz in einem einzelnen HIV-Infizierten ist höher als die globale Variabilität der meisten andere humanpathogenen Erreger (Walker and Korber, 2001, Korber *et al.*, 2001).

Der Hauptteil der Virusvarianz bei HIV konzentriert sich gerade auf das für eine sterilisierende Immunität entscheidende Envelope-Oberflächenantigen (Gaschen *et al.*, 2002). Obwohl weitgehend konservierte Epitope im gp41 (Muster *et al.*, 1993) und die dazu passenden spezifischen Antikörper in HIV-Patienten schon sehr früh entdeckt werden konnten und die Anzahl solcher breitneutralisierender Antikörper ständig zunimmt (Walker *et al.*, 2011), schlugen bislang alle Versuche der Induktion solcher Antikörper mittels Immunisierung fehl. Eine Expression solcher Antikörper mittels eines Gentransfers stellt eine neuartige Möglichkeit dar, deren Eignung im Menschen jedoch noch nicht untersucht wurde (Lewis *et al.*, 2002, Balazs *et al.*, 2012). Sollte die Induktion solcher Antikörper gelingen, es aber beispielsweise durch einen zu geringen Antikörpertiter trotzdem zur HIV-Infektion kommen, kann, trotz zirkulierender neutralisierender Antikörper leider keine Abschwächung des Infektionsverlaufes erwartet werden (Euler *et al.*, 2010).

Fehlen eines Korrelats für Immunogenität und optimale Tiermodelle:

Im Gegensatz zu den meisten anderen Infektionskrankheiten gibt es bei HIV keine Personen, welche die Infektion auf natürlichem Weg komplett eliminiert haben und von denen sich ableiten ließe, wie eine schützende Immunität auszusehen hätte. Erschwerend kommt hinzu, dass es kein wirklich adäquates Tiermodell für eine HIV-1 Infektion gibt.

Gerade deshalb sind Beobachtungen der immunologischen Mechanismen in HIV-Patienten, welche in der Lage sind, die Infektion ohne medikamentöse Therapie zu kontrollieren (EC elite controller bzw. LTNP long-term non-progressor), oder Personen, die trotz ständiger HIV-Exposition seronegativ bleiben (HEPS highly exposed persistently seronegative), von großem Interesse. Aus einer Vielzahl von Untersuchungen lässt sich die Relevanz von zellulären Immunantworten für diese vor Infektion oder Krankheitsprogression schützenden Mechanismen erkennen. Untersuchungen der HLA Klasse I und II Typen der HEPS und Vergleiche mit anderen infizierten Personen zeigten, dass eine erhöhte Resistenz mit den HLA-Typen HLA-A2, A*6802 und eine erhöhte Ansteckungsgefahr mit HLA-A23 assoziiert ist (MacDonald *et al.*, 2000). Dieser Einfluss HLA-spezifischer Polymorphismen auf die HIV-Resistenz deutet auf eine Rolle des zellulären Immunsystems für den Schutz vor Infektionen hin. Weitere Untersuchungen an HEPS zeigten bei über 50 % der Personen eine HIV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort. Die Wahrscheinlichkeit der Detektion einer solchen Immunantwort stieg mit der Expositionsdauer an (Kaul *et al.*, 2001a). Das Vorhandensein von mukosalen CD8⁺ T-Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden (Kaul *et al.*, 2000). Mit sinkender Expositionshäufigkeit konnte eine Verringerung der CD8⁺ T-Zell-Antwort und eine Abnahme der HIV-Resistenz beobachtet werden (Kaul *et al.*, 2001b). Eine wiederholte Exposition kleiner Virusmengen führt somit bei Person bestimmter HLA-Polymorphismen anscheinend zu einer gewissen Resistenz, die wahrscheinlich durch eine zelluläre Immunantwort vermittelt wird. Der Schutz ist jedoch nicht vollständig und benötigt häufige Reexpositionen, um aufrechterhalten zu werden. In festen Partnerschaften mit einem HIV-positiven Partner konnten im Vergleich zu den CSWs wesentlich höhere CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Antworten gemessen werden. Dies deutet darauf hin, dass eine teilweise protektive Immunantwort anscheinend einfacher gegen einen als gegen verschiedene HIV-Stämme zu induzieren ist (Promadej *et al.*, 2003). HIV-1 spezifische CD4⁺ T-Zellen in HEPS wurden ebenfalls häufig beobachtet, in einem Fall konnte eine Resistenz dieser Zielzellen in *in-vitro* Versuchen gezeigt werden

(Eyeson *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen lassen Grund zum Optimismus zu, da sie zeigen, dass ein Schutz vor einer HIV-Infektion unter Feldbedingungen möglich ist. Trotz dieser Hinweise ist es möglich, dass die gemessenen zellulären Immunantworten nur ein Zeichen der HIV-Exposition sind, die Resistenz jedoch auf unbekanntem Ursachen beruht, denn nicht in allen Untersuchungen korreliert die Immunantwort mit dem Resistenzgrad (Kaul *et al.*, 2004). Es wäre auch vorstellbar, dass die Immunantwort einer transienten Infektion mit einem defizienten HIV-Stamm zugrunde liegt, oder diese Personen aufgrund ihres relativ seltenen HLA-Polymorphismus eine Allo-Immunität gegen fremdartige HLA-Moleküle auf der Oberfläche des Virus ausgebildet haben. Auch in HIV-Patienten mit gewöhnlichem Krankheitsverlauf kann der Zusammenhang zwischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und einer HIV-Suppression beobachtet werden. So konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Virämie in der akuten Phase der Infektion zeitlich mit dem Auftreten von HIV-spezifischen CTLs assoziiert ist (Borrow *et al.*, 1994, Koup *et al.*, 1994). Hingegen ist die Bildung HIV-spezifischer Antikörper erst wesentlich später zu beobachten und steht somit nicht in direktem Zusammenhang mit der Virus-suppression. Diese wichtige Rolle von CTLs, in der Kontrolle der Infektion, kann auch im SIV/Makkaken-Modell beobachtet werden. Eine Depletion der SIV-spezifischen CTLs ist sowohl in der akuten als auch chronischen Phase der Infektion mit einem Verlust der Kontrolle und ungehemmter Virusreplikation sowie einer deutlich beschleunigten Krankheitsprogression assoziiert (Friedrich *et al.*, 2007, Jin *et al.*, 1999, Schmitz *et al.*, 1999, Matano *et al.*, 1998).

Insbesondere scheint eine gesteigerte Perforin-vermittelte Zytolyse infizierter Zellen (Buseyne *et al.*, 2001, Hersperger *et al.*, 2010) für diese Art der Viruskontrolle ECs und LTNPs charakteristisch zu sein. Zusätzlich ließen sich bestimmte qualitative Eigenschaften der CTLs von ECs und LTNPs, wie die gleichzeitige Expression verschiedener Zytokine, wie Interleukin-2 und Interferon- γ und eine erhöhte Proliferationsfähigkeit trotz fehlender T-Zell Hyperaktivierung, identifizieren (Hersperger *et al.*, 2011, Loke *et al.*, 2010, Owen *et al.*, 2010). Solche Charakteristika könnten in Zukunft noch vor der Durchführung von kostenintensiven klinischen Effizienzstudien als Marker zur Identifizierung vielversprechender Impfstoffkandidaten eingesetzt werden und die Impfstoffentwicklung deutlich beschleunigen.

Wirkung eines CTL-basierten Impfstoffes ohne sterilisierende Immunogenität:

Obwohl ein zellulär basierter Impfschutz im klassischen Sinn keinen sterilisierenden Schutz bieten kann, könnte er im besten Fall zu einer transienten HIV-Infektion führen, indem initial infizierte Zellen noch vor Etablierung eines latenten Virusreservoirs abgetötet werden. Sollte dies nicht zu erreichen sein, könnte die virale Replikation, und damit die Infektion weiterer Zellen verhindert oder eingeschränkt werden. Dies könnte zur Inhibierung oder Verlangsamung der Krankheitsprogression ohne den Einsatz von teuren und nebenwirkungsreichen antiretroviralen Medikamenten führen (Mellors *et al.*, 1997, Ten Haaft *et al.*, 1998). Eine dauerhafte Senkung der Viruslast würde zur Unterbrechung der Infektionskette und damit zu einer Beendigung der HIV-Pandemie führen (Quinn, 2000, Gray *et al.*, 2001, Gray *et al.*, 2003).

Leider ist auch die Induktion und Aufrechterhaltung eines wirksamen zellulären Impfschutzes mit Problemen behaftet. Der durch das Immunsystem auf die Viren ausgeübte Selektionsdruck führt zur Entstehung von Fluchtmutanten. Obwohl solche Mutanten häufig eine verringerte virale Fitness in Bezug auf ihre Replikationsfähigkeit oder Virulenz aufweisen, können sie dem Selektionsdruck dauerhaft entgehen, was zu einem erneuten Ausbruch einer progressiven Infektion führt (Barouch *et al.*, 2003, Loh *et al.*, 2007, Troyer *et al.*, 2009). Ein weiteres Problem stellt bislang die Induktion einer ausreichend starken und langanhaltenden zellulären Immunantwort dar.

Probleme und Lösungsansätze bei der Entwicklung von CTL-Impfstoffen:

Um die Entwicklung von Fluchtmutanten zu unterdrücken, sollten CTL-Antworten gegen möglichst viele konservierte und funktionell essentielle Epitope induziert werden. Die mit am besten konservierten HIV-Proteine sind Gag und Pol. Mit einem Aminosäureunterschied von 10-15 % zwischen den verschiedenen HIV-Subtypen sind sie wesentlich besser konserviert als das Envelope-Oberflächenprotein mit 35 % Diversität (Gaschen *et al.*, 2002, Korber *et al.*, 2001). Problematisch ist hierbei die sehr früh nach Infektion von HIV Nef induzierte Suppression der MHC-I Präsentation auf der Oberfläche der infizierten Zellen (Collins *et al.*, 1998). Jedoch noch bevor dieser Effekt zum Tragen kommt, werden Gag-Epitope auf der Zelloberfläche präsentiert (Althaus and De Boer, 2011).

Trotz der besseren Konservierung der internen HIV-Gene stellt auch im Bereich der zellulären Impfstoffe die hohe Virusdiversität ein Problem dar. Aus diesem Grund

wurden verschiedenste Ansätze, wie z.B. die Verwendung von Konsensus-Sequenzen oder von regional vorherrschenden Virustypen angepasster Impfstoffvarianten, entwickelt (Fischer *et al.*, 2007, Santra *et al.*, 2008, Nickle *et al.*, 2007). Solche Überlegungen sind jedoch erst dann von praktischer Relevanz, wenn ein wirksames Impfverfahren verfügbar ist.

Zur Steigerung der Immunogenität der Impfung, zur Erhöhung der Anzahl der erkannten Epitope, Induktion einer polyfunktionalen Immunantwort und Vermeidung einer vektorspezifischen Immunität scheint ein heterologes Immunisierungsregime aus verschiedenen, aufeinander folgenden Immunisierungen mit unterschiedlichen viralen und nicht-viralen genetischen Impfstoffen das beste Mittel zu sein. Vor allem die Anwendung von DNA-Impfstoffen zur Erstimmunisierung (Prime), gefolgt von einer Wiederholungsimmunisierung (Boost) mit viralen Vektoren scheint eine besonders starke zelluläre Immunantwort zu induzieren. Der DNA-Primer induziert vorwiegend T-Helferzellen des Phänotyps 1, wodurch die Immunreaktion auf den zellulären Bereich konzentriert wird. Die Immunantwort wird dabei ausschließlich auf das verwendete Antigen konzentriert. Die anschließende Immunisierung mit viralen Vektoren führt zu einer wiederholten, starken Antigenpräsentation. Die Antigen-spezifische Immunantwort wird dadurch weiter verstärkt. (Hanke *et al.*, 1998, Brave *et al.*, 2007).

Neben der Steigerung der Stärke und Vielfalt der Immunreaktion ist es ebenso notwendig, eine möglichst langlebige Immunantwort, charakterisiert durch die Induktion von CD8⁺ zentralen (TCM) und Effektor-Gedächtniszellen (TEM), zu induzieren. Diese Gedächtniszellen sind in der Lage, nach erneuter Stimulation mit dem Antigen schnell zu differenzieren und proliferieren, um ausreichende Mengen an zytotoxischen Effektorzellen zu bilden. Wichtig ist hierfür, einen ausreichenden zeitlichen Abstand zwischen der Prime und Boost Immunisierung einzuhalten (Harty and Badovinac, 2008).

In einer Vielzahl von Studien, die auf unterschiedlichen Pathogenen basieren, konnte gezeigt werden, dass heterologe Prime-Boost Immunisierungsregime am besten geeignet sind, um diesen komplexen Anforderungen zu begegnen (Sabarth *et al.*, 2010, Ramshaw and Ramsay, 2000, Woodland, 2004, Estcourt *et al.*, 2002, McShane, 2002).

In Hinblick auf die Eintrittspforte von HIV in den Körper und den Ort der anfänglichen Virusreplikation, der Mukosa bzw. dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe, ist es sinnvoll, die induzierte Immunantwort, ob zellulär oder humoral, möglichst auf

diesen Bereich zu konzentrieren, um eine bestmögliche Eliminierung initial infizierter Zellen zu erzielen. Dies kann vorwiegend durch die Applikation der viralen Impfvektoren über die Schleimhäute erreicht werden. Bei DNA-Impfstoffen kann ein vergleichbarer Effekt erzielt werden, wenn sie, wie z.B. bei Verwendung der Gene Gun, in die oberen Hautschichten eingebracht werden (Asakura *et al.*, 1999, Neutra and Kozlowski, 2006).

1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit

Genetische Impfstoffe bieten die Möglichkeit, sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten auf einem sicheren und reproduzierbaren Weg zu induzieren. Immunisierungsstrategien, die auf einzelnen HIV bzw. SIV Genen oder Immunisierungsvektoren basieren, sind meist nur schwach immunogen und nicht in der Lage, eine protektive Immunantwort zu induzieren. Wiederholte Immunisierungen mit demselben Vektor sind, aufgrund der gleichzeitig induzierten Anti-Vektor-Immunität, kaum fähig, die Antigen-spezifische Immunität zu steigern. Die Verwendung von verschiedenen viralen und nicht-viralen Vektoren als heterologes Prime-Boost Immunisierungsregime stellt eine Möglichkeit dar, das Problem der geringen Immunogenität zu überwinden. Durch Steigerung der Antigen-Expression mithilfe der Codonoptimierung und der gleichzeitigen Verwendung von genetischen Zytokin-Adjuvantien, wie Granulozyten Monozyten Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF), kann die Immunogenität der verwendeten Antigene zum Teil drastisch gesteigert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, codonoptimierte Varianten der verhältnismäßig gut konservierten HIV-1 bzw. SIVmac239 Gene *gag*, *pol*, *nef*, *rev* und *tat* zu konstruieren. Ausgehend von diesen Konstrukten sollen verschiedene genetische Impfvektoren, die auf Plasmid-DNA GeneGun-Vektoren basieren, rekombinanten Adeno-assoziierten Viren und Adenoviren, entwickelt und in verschiedenen homologen und heterologen Immunisierungsregimen getestet werden. Die Stärke der induzierten humoralen und vor allem zellulären Immunantwort sowie die Anzahl der erkannten T-Zell Epitope soll zwischen den verschiedenen Immunisierungsregimen verglichen werden, um ein optimales Immunisierungsregime zu ermitteln. Abschließend soll die biologische Wirksamkeit der induzierten Immunantwort in Form einer robusten CTL-vermittelten Lyse antigener Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätsversuch unter Beweis gestellt werden.

Mithilfe solcher vergleichbarer HIV- und SIV-Impfstoffe wäre es möglich, weitere Immunogenitätsuntersuchungen in Makkaken durchzuführen. Durch Belastungsversuche könnte die Effektivität der Immunisierung im derzeit am besten geeigneten SIV/Makkaken-Modell untersucht werden und helfen, Rückschlüsse auf die Wirksamkeit solcher Immunisierungen im Menschen zu ziehen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme und Zelllinien

Name (Bezugsquelle)	Beschreibung	Kultivierungsbedingungen
<i>E. coli</i> Stamm XL10 Gold elektrokompetent (Stratagene)	Tet ^R $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-$ <i>hsdSMR-mrr)173 endA1</i> <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96</i> <i>relA1 lac Hte [F' proAB</i> <i>lac^dZΔM15 Tn10 (Tet^R) Amy</i> <i>Cam^R]</i>	In Lysogeny Broth Medium (LB) oder Agar mit oder ohne Ampicillinzusatz, bei 37°C, 220 UPM
<i>E. coli</i> Stamm BJ5183-AD-1 elektrokompetent (Stratagene)	<i>endA1 sbcBC recBC galk</i> met <i>thi-1 bioT hsdR (Strr) [pAdEasy-</i> <i>1(AmpR)]</i>	In Lysogeny Broth Medium (LB) oder Agar mit oder ohne Ampicillinzusatz, bei 37°C, 220 UPM
HEK-293T (ATCC)	Derivat der humanen embryonalen Nierenzelllinie 293 mit stabil integriertem Adenovirus-Gen <i>E1A</i> und großem SV40 T-Antigen.	In Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum bei 37°C, 5 % CO ₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.
AD-293 (Stratagene)	Adhärenz-optimiertes Derivat der humanen embryonalen Nierenzell-linie 293 mit stabil integriertem Adenovirus-Gen <i>E1A</i> und großem SV40 T- Antigen.	In Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum bei 37°C, 5 % CO ₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.1.2 Puffer, Lösungen und Medien

PBS-Puffer 0,2 M	175 mM Na ₂ HPO ₄ (Sigma); 25 mM NaH ₂ PO ₄ (Sigma); 150 mM NaCl (Sigma) in A. dest.; pH 7
PBS 0,1 M	87 mM Na ₂ HPO ₄ (Sigma); 13 mM NaH ₂ PO ₄ (Sigma); 75 mM NaCl (Sigma) in A. dest.; pH 7
PBS 0,01 M	8,7 mM Na ₂ HPO ₄ (Sigma); 1,3 mM NaH ₂ PO ₄ (Sigma); 150 mM NaCl (Sigma) in A. dest.; pH 7
PBS-MK	25 mM KCl (Sigma); 5 mM MgCl ₂ (Sigma) in PBS 0,2 M
TBS-Puffer	50 mM TRIS-HCl; 150 mM NaCl in A. dest.; pH 7,4
TE-Puffer	10 mM TRIS (Sigma); 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (SIGMA) in A. dest.; pH 8
TAE-Puffer	40 mM TRIS (Sigma); 20 mM Essigsäure (Sigma); 1 mM EDTA (Sigma) in A. dest.; pH 8,2
DNA-Ladepuffer	650 g/L Saccharose (Sigma); 4 g/L Orange G (Sigma); 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma) in TE-Puffer
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % (v/v) Trypsin; 0,02 % (v/v) Ethylendiamintetraessigsäure in PBS (PAA)
Polyethylenimin-Lösung	2,58 µg/µL lineares Polyethylenimin (MW~25000; Polyscience Inc.) in A. dest.; sterilfiltriert
NaCl / PEG-Lösung	1,86 M NaCl (Sigma); 24 % (w/v) PEG-6000 (Sigma) in A. dest.; sterilfiltriert
PEG/NaCL-Lösung	2,5 mM NaCl (Sigma); 20 % PEG-6000 (Sigma)) in A. dest.; sterilfiltriert
NaCl/HEPES-Lösung	150 mM NaCl (Sigma); 50 mM HEPES (Sigma); 26 mM Ethylendiamintetraessigsäure (SIGMA) in A. dest.
Iodxaniol-Lösung	OptiPrep-Lösung; Dichte 1,32 g/mL (Axis-Shield)
Polyvinylpyrrolidon-Stammlösung	20 mg PVP (BioRad) in 1 mL Ethanol 99,9 %
Spermidin-Stammlösung	1 M Spermidin (Sigma) in A. dest.
DNaseI-Puffer	22,2 mM TRIS (Sigma); 2,2 mM MgCl ₂ (Sigma) in A. dest.; pH 8
Paraformaldehyd-Lösung	3 % (w/v) Paraformaldehyd (Roth) in PBS 0,1 M; pH 7,6; filtriert
Verdünnungspuffer	1 % (w/v) BSA (Sigma); 0,05 % Tween20 (v/v) (Sigma) in

	PBS 0,01 M
Permeabilisierungspuffer	1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma) in Verdünnungspuffer
IFA-Blockierungspuffer	5 % (v/v) FKS (Biochrom KG) in Verdünnungspuffer
Eindeckmedium	1:5000 DAPI (10 mg/mL in DMSO; Molecular Probes) in wässrigem PermaFluor-Eindeckmedium (Beckmann Coulter)
RIPA-Lysepuffer	150 mM NaCl (Sigma); 10 mM TRIS (Sigma); 5 mM Ethylendiamintetraessigsäure (Sigma); 1 % (v/v) Triton X-100 (Sigma); 0,1 % (w/v) DOC (Sigma); 0,1 % (w/v) SDS (Sigma); 1 Proteaseinhibitor-Tablette auf 10 mL (Roche) in A. dest.
Protein-Probenpuffer	5fach Lämmli-Puffer (BioRad) mit 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol (Sigma)
Laufpuffer	190 mM Glycin (Sigma); 25 mM TRIS (Sigma); 3,5 mM SDS (Sigma) in A. dest.
Transferpuffer	190 mM Glycin (Sigma); 25 mM TRIS (Sigma); 5 % (v/v) Methanol (Sigma) 99,9 % in A. dest.
Waschpuffer	0,05 % (v/v) Tween20 (Sigma) in PBS 0,2 M
WB-Blockierungspuffer	10 % (v/v) FKS (Biochrom AG); 5 % (w/v) fettfreies Milchpulver; 1 % (w/v) BSA (Sigma) in PBS-Tween
DMEM komplett	100 mL/L fötales Kälberserum (Biochrom AG; 5 mL/L 100fach Penicillin/Streptomycin-Lösung (PAA) in Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glukose und stabilem L-Glutamin (PAA)
RPMI komplett	100 mL/L fötales Kälberserum (Biochrom AG; 5 mL/L 100fach Penicillin/Streptomycin-Lösung (PAA) in Roswell Park Memorial Institute Medium mit 4,5 g/L Glukose und stabilem L-Glutamin (PAA)
LB-Amp-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton (Gibco); 0,5 % (w/v) Bacto Hefe-Extrakt (Gibco); 1 % (w/v) NaCl (Sigma); 1 mg/mL Ampicillin (Sigma); pH 7
LB-Amp-Agar	LB-Amp-Medium mit 20 g/L Agar (Select Agar; Sigma)
LB-Kan-Medium	1 % (w/v) Bacto-Trypton (Gibco); 0,5 % (w/v) Bacto Hefe-Extrakt (Gibco); 1 % (w/v) NaCl (Sigma); 25 μ g/mL Kanamycin (Sigma); pH 7
LB-Kan-Agar	LB-Amp-Medium mit 20 g/L Agar (Select Agar; Sigma)

SOC-Medium 2 % (w/v) Bacto-Trypton (Gibco); 0,5 % (w/v) Bacto Hefe-Extrakt (Gibco); 10 mM NaCl (Sigma); 2,5 mM KCl (Sigma); 10 mM MgCl₂ (Sigma); 10mM MgSO₄ (Sigma); 20 mM Glukose (Sigma); pH 7

2.1.3 Geräte

PCR-Thermocycler	MJ Research PTC-200
Realtime-PCR-Thermocycler	Stratagene MX4000
Spektralphotometer	PeqLab Nanodrop ND-1000
EliSpot Reader	AID EliSpot Reader
Inkubatoren	Hereaus Kelvitronic 37°C / 30°C ThermoScientific HERAcell240
Schüttelinkubator	Infors HAT Ecotron
Sterilwerkbank	Hereaus Herasafe
Automatischer Zellzähler	Coulter Particle Count & Size Analyzer Z2
Elektroporator	BioRad Gene Pulser II
Gene Gun	BioRad Helios Gene Gun; BioRad Tubing Prep Station
Mikroskop	Nikon Eclipse TS100
Floureszenzmikroskope	Nikon Eclipse E600; Carl Zeiss Axiovert 100M; Carl Zeiss LSM 510 META
DNA-Gelelektrophoresesystem	BioRad Sub-Cell GT
Geldokumentationssystem	Biosystemica GelDocMega
UV-Transilluminationstisch	Vilber-Lourmat
PAGE-Gelelektrophoresekammer	BioRad Mini-PROTEAN 3 Cell
Semi-Dry-Blot-Kammer	BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell
Elektrophoresenetztteil	BioRad PowerPac 300
Zentrifugen	VWR Galaxy Mini-Zentrifuge Eppendorf Zentrifuge 5804R; Sigma 4K15 Ultrazentrifuge Beckmann L7-65
Schüttelnder Heizblock	Eppendorf Thermomixer 5436
Horizontalschüttler	Heidolph Polymax 2040

2.2 molekularbiologische Methoden

2.2.1 Konstruktion der HIV- und SIV-Konstrukte

Als Ausgangssequenz wurde eine Consensus-Sequenz des HIV-1 Klade B Typs und von SIVmac239 aus der HIV-Datenbank des Los Alamos National Laboratory benutzt. Zur Erhöhung der Expressionsstärke wurde die Sequenz codonoptimiert und mit einer initialen Kozak-Sequenz versehen. In den beiden ersten Konstrukten sind die vier HIV-1 bzw. SIV Gene *rev*, *nef*, *tat* und *gag* fusioniert. Durch die beidseitige Fusion des Nef-Proteins wurde dessen biologische Aktivität inhibiert. Die beiden zweiten Konstrukte bestehen aus dem Vollängen *pol*-Gen, welches die Virusproteine Protease, Reverser Transkriptase und Integrase kodiert. Aus Sicherheitsgründen wurden in alle drei Enzyme Mutationen in den katalytisch aktiven Bereichen eingeführt, um diese funktionell zu inaktivieren.

Für die spätere Klonierung der Konstrukte in die Plasmidvektoren wurden die benötigten *Bam*HI- und *Hind*III- Restriktionsschnittstellen eingefügt. Für die späteren Expressionsuntersuchungen wurde an jedes Konstrukt ein V5-Tag an den C-Terminus angehängt (Abb. 2.1).

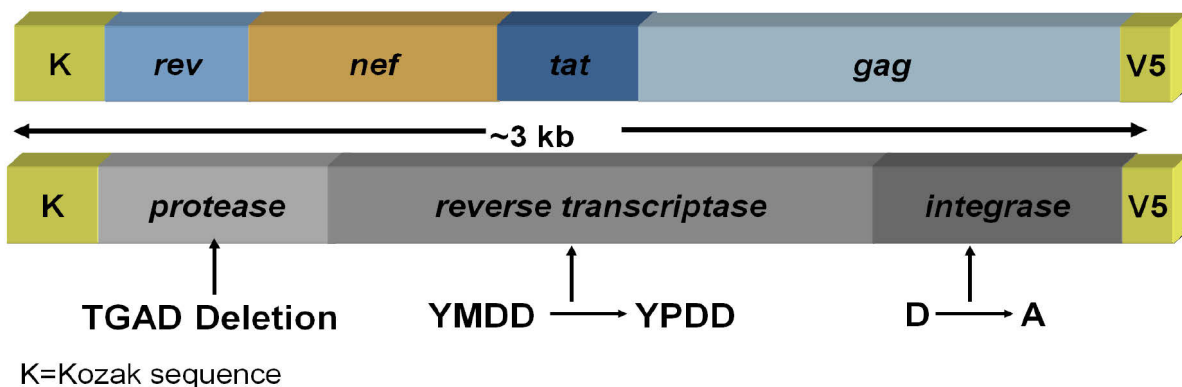


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der codonoptimierten HIV-1/SIVmac239 *revneftatgag*- und *pol*-Konstrukte mit Restriktionsschnittstellen, V5-Affinitätsmarkierung und Translationsinitiationssequenz (Kozak-Sequenz).

2.2.2 Sequenzierungs-PCR

Die Sequenzierungs-PCR wurde nach dem „Cycle-Sequencing-Verfahren“ nach Sanger mit einem vorgefertigten DNA-Polymerase/dNTPs-Mix (ABI BigDye Terminator v3.1; Applied Biosystems) durchgeführt (Tab. 2.1). Als Sequenzierungs-Primer wurden entsprechend konstruierte Oligonukleotide (Invitrogen; siehe Anhang)

verwendet. Die Analyse der Sequenzierungs-PCR wurde mittels eines Kapillarsequenzierautomaten (ABI-Prism; Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 2.1 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und das verwendete Temperatur- und Zeitprogramm des Thermocyclers, für die Sequenzierungs-PCR unter Verwendung verschiedener Sequenzierungsprimer.

Reaktionsansatz (10 μ L)		PCR-Programm		
Zusammensetzung		Temperatur in $^{\circ}$ C	Dauer	Zyklenzahl
10x PCR-Puffer	1 μ L	95	30 s	1
Primer (10 μ M)	0,5 μ L	95	10 s	25
BigDye 3.1	1 μ L	55	10 s	
Plasmid-Template	250 ng	60	4 min	
Wasser	ad 10 μ L	4	unbegrenzt	1

2.2.3 PCR-Amplifikation zur Halbierung der Konstrukte

Um die in die pAAV-Vektoren zu inserierenden Konstrukte zu halbieren, wurden verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt. Die jeweiligen Hälften wurden zusammen mit einer an den Vorwärts- oder Rückwärtsprimer angefügten Restriktionsschnittstelle amplifiziert. Als Template dienten die jeweiligen pAAV-Volllängenvektoren. Um eine möglichst geringe Fehlerrate zu erzielen, wurde ein „Proofreading“-DNA-Polymerasemix verwendet.

Tabelle 2.2 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und das verwendete Temperatur- und Zeitprogramm des Thermocyclers zur Amplifikation der Konstrukthälften mit den entsprechenden angefügten Restriktionsschnittstellen.

Reaktionsansatz (25 μ L)		PCR-Programm		
Zusammensetzung		Temperatur in $^{\circ}$ C	Dauer	Zyklenzahl
10x PCR-Puffer	2,5 μ L	95	5 min	1
Primer f und r (10 μ M)	0,5 μ L	95	15 s	5
Plasmid-Template	0,1 μ L	50	15 s	
Bio-X-Act-Polymerase	0,25 μ L	68	2 min	
dNTPs (25 μ M je Nukleotid)	0,5 μ L	95	15 s	25
Wasser	ad 25 μ L	57	15 s	
		68	2 min	

2.2.4 Klonierungen

2.2.4.1 Restriktion mit Endonukleasen

Alle Restriktionsverdauungen wurden in 20 µL Ansätzen mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern und den entsprechenden Inkubationstemperaturen durchgeführt (Fermentas DoubleDigest). Hierfür wurden 1-2 µg Plasmid-DNA und 2,5 U jedes Restriktionsenzym eingesetzt und mindestens 2 h verdaut. Für Kontrollrestriktionen wurde die Enzymmenge und Inkubationszeit halbiert, das Reaktionsvolumen wurde beibehalten.

2.2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Je nach zu trennender Fragmentgröße wurden 1-1,5 %ige Agarosegele (peqGOLD Universal Agarose; PeqLab) in TAE-Puffer mit 0,05 µL/mL Ethidiumbromid (Sigma) benutzt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:5 mit DNA-Ladepuffer versetzt und davon 20 µL in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer bei 120 V für 30-60 min. Zur Größenbestimmung wurden zwei verschiedene DNA-Größenstandards (100 bp und 1 kb DNA-Marker; Fermentas) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht durchleuchtet und fotografiert.

2.2.4.3 Gelextraktion

Die zur Ligation benötigten DNA-Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und mithilfe eines Gelextraktionskits (QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN) isoliert und anschließend die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.7).

2.2.4.4 Ligation

Alle Ligationen wurden mit einem sechsfachen molaren Überschuss des Inserts gegenüber dem Vektor (Abb. 2.12) in 20 µL Gesamtvolumen und einer DNA-Gesamtmenge von 10-20 ng durchgeführt. Für jeden Ansatz wurden 1 Weiss-Einheit T4-DNA-Ligase (Fermentas) und der beiliegende Ligase-Puffer verwendet. Die Ligrationsreaktion wurde im PCR-Thermocycler nach dem dargestellten Temperaturschema (Tab. 2.9) mit auf 100°C erhitztem Thermocycler-Deckel durchgeführt.

$$\text{Masse Insert [ng]} = F * \text{Masse Vektor [ng]} * \text{Länge Insert [bp]} / \text{Länge Vektor [bp]}$$

F = Verhältnis-Faktor (Insert : Vektor), sechsfache Menge Insert (F = 6) bei allen Ligationen

Abbildung 2.2 Berechnung des molaren Verhältnisses von Vektor zu Insert für die anschließende Ligation.

Tabelle 2.3 Temperatur- und Zeitschema des PCR-Thermocyclers für die Ligationsreaktion.

Temperatur	Zeit
37°C	0,5-24 h
75°C	10 min
4°C	unbegrenzt

2.2.4.5 Transformation

Die Plasmid-Vektoren wurden mittels Elektroporation in die Bakterien eingeschleust. Zur Elektroporation wurden 50 µL elektrokompetente *E. coli* XI10, gemischt mit 1-2 µL DNA, in einer Elektroporationsküvette (Biozym) bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ohm elektroporiert. Nach der Transformation wurden die Bakterien in 250 µL SOC- bzw. LB-Medium ohne Ampicillin bzw. Kanamycin für 1 h bei 37°C mit 700 UPM im Heizblock geschüttelt und anschließend unterschiedliche Mengen mittels steriler Glaskügelchen auf LB-Ampicillin/Kanamycin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Bei Klonierungen mit Plasmiden mit Ampicillin-Resistenz wurde meistens direkt, ohne einstündige Vorinkubation, ausplattiert. Um die Rekombinationsrate oder die Wachstumsgeschwindigkeit zu reduzieren, wurden einzelne Platten für einen längeren Zeitraum bei 30°C oder RT inkubiert.

2.2.4.6 Rekombination

Zur Generierung der pAd-Vektoren mithilfe der zuvor klonierten pShuttle-Vektoren wurden *E. coli* BJ5183-AD-1 Zellen, welche bereits das pAd-1-Plasmid tragen, mit den jeweiligen pShuttle-Vektoren elektroporiert und auf LB-Kanamycin Agaroseplatten in unterschiedlichen Mengen ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag waren Kolonien in drei unterschiedlichen Größen erkennbar. Es wurden ausschließlich die kleinsten Kolonien gepickt und zur weiteren Verwendung und Kontrolle in LB-Kanamycin Nährmedium kultiviert.

2.2.4.7 Kontrolle der Klone

Zur Überprüfung der Insertion der DNA-Fragmente wurden die Klone von der Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze in 2,5 mL LB-Amp-Medium überimpft und über Nacht bei 30-37°C und 220 UPM im Schüttelinkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Plasmide isoliert (QuickLyse Miniprep Kit; QIAGEN) und mittels *Bam*HI/*Hind*III-Kontrollrestriktion auf Insertion des gewünschten DNA-Fragmentes

überprüft. Bei den AAV-Plasmiden wurde die ITR-Integrität zusätzlich durch einen *Sma*I- oder *Pvu*II-Verdau kontrolliert (Kap. 2.2.5.1). Anschließend wurde die Größe der entstandenen Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.2.5.2), überprüft.

2.2.5 Plasmidproduktion

Je nach Menge der benötigten Plasmide wurden Kulturvolumen von 250 mL bis 3 L LB-Ampicillin-Medium mit einer frischen Übernachtskultur in einem Verhältnis von 1:1000 beimpft und über Nacht bei 30-37°C und 220 UPM im Schüttelinkubator kultiviert. Nach Pellettierung der Bakterien mittels Zentrifugation bei 6000 g für 10 min wurden die Plasmide mittels endotoxinfreien Maxi- bzw. Megaprep-Plasmid-isolierungskits (EndoFree Plasmid Maxi/Mega Kit; QIAGEN) aufgereinigt. Anschließend wurden die DNA-Konzentration und -Reinheit photometrisch bestimmt (Kap. 2.2.7) und zur erneuten Kontrolle ein oder mehrere Kontrollrestriktionen der Plasmide durchgeführt (siehe 2.2.4.1.).

2.2.6 DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur DNA-Konzentrations- und -Reinheitsbestimmung wurden 1 µL der unverdünnten Plasmid-DNA-Lösung im Spektralphotometer analysiert. Dazu wurde die Extinktion bei 260 nm und 280 nm gemessen und über den Extinktionskoeffizienten die DNA-Konzentration berechnet. Die Reinheit der DNA-Lösung wurde durch Bestimmung der A_{260}/A_{280} -Ratio ermittelt. Bei einem Quotienten von 1,7-1,9 wurde von einer ausreichenden Reinheit der Plasmidpräparation ausgegangen.

2.2.7 DNA-Extraktion

Da die meisten für die Adenovirus-Produktion benötigten Plasmide zu groß sind, um effizient und intakt mittels Festphasen-basierten DNA-Aufreinigungsverfahrens isoliert zu werden, wurde hierfür eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion verwendet. Ein Volumen der DNA-haltigen Lösung wurde dazu mit einem Volumen einer P/C/I-Lösung (24:25:1) für eine Minute intensiv gemischt und anschließend für eine Minute zentrifugiert (12000 g). Die obere wässrige Phase wurde überführt und mit einem Volumen C/I-Lösung (24:1) für eine Minute gemischt und zentrifugiert. Die

DNA-haltige obere Phase wurde benutzt, um die DNA anschließend mittels Fällung zu konzentrieren.

2.2.8 DNA-Fällung

Ein Volumen der DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung und 2 Volumen absolutem Ethanol vermischt und für mindestens 30 min bei -80°C gelagert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 12000 g für 15 min. Das entstandene Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Lufttrocknung des Pellets wurde es in nukleasefreiem Wasser resuspendiert.

2.2.9 Herstellung von Gene Gun Munition

Für die Beschichtung des Inneren eines Kunststoffschlauches (Tefzel Tubing; BioRad) mit DNA und Goldpartikeln (sphärisches Goldpulver 0,8-1,5 μm Durchmesser; Alfa Aesar) wurden pro Schlauch 4 mL einer 1:400 verdünnten PVP-Stammlösung sowie 1:20 verdünnter Spermidin-Lösung frisch angesetzt. Zu 25 mg der Goldpartikel wurden 100 μL der Spermidin-Lösung hinzugegeben und für 5 s im Ultraschallbad sonifiziert. Nun wurden 35 μg Plasmid-DNA hinzugegeben und unter Mischen 100 μL sterile 1 M CaCl_2 -Lösung tropfenweise zugefügt. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Goldpartikel in der Zentrifuge pelletiert, der Überstand abgenommen, 1 mL wasserfreies Ethanol 99,9 % hinzugegeben, gemischt und 5 s sonifiziert. Dieser Waschvorgang wurde 3-4 Mal wiederholt, währenddessen wurde der Schlauch mithilfe des Stickstoffgasflusses getrocknet. Das Pellet wurde in 2,9 mL PVP-Lösung im Ultraschallbad resuspendiert und von dort mittels einer am getrockneten Schlauch angeschlossenen Spritze in den Schlauch eingesaugt. Der gefüllte Schlauch wurde in die Apparatur (Tubing Prep Station; BioRad) eingelegt und 5 min in dieser Position belassen. Danach wurde die Lösung aus dem Schlauch abgezogen und dieser für 10 s um 180° gedreht. Anschließend rotierte der Schlauch für 30 s um 360° . Dann trocknete dieser unter Rotation durch das Anlegen eines Stickstoffgasflusses für 5 min und wurde mit einer Schneidevorrichtung (BioRad Tubing Cutter) in ca. 45 Gene Gun-Patronen zerschnitten und bei 4°C wasserfrei im Exikator gelagert.

2.2.10 Transfektion von HEK 293T-Zellen mittels linearem Polyethylenimin

Zur Herstellung der Polyethylenimin-Lösung mit einer Konzentration von 2,58 µg/µL wurden 129 mg lineares PEI (Polyscience Inc.) in 50 mL doppeldestilliertem Wasser, bei 70°C unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Lösung mittels Filtration sterilisiert (Porengröße 0,45 µm; TPP). Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Zur PEI-Transfektion von 293T-Zellen wurden für 1 µg DNA je 1 µL PEI-Lösung verwendet, was einem für HEK 293T-Zellen optimalen Stickstoff/Phosphor-Verhältnis von 2,58 entspricht. PEI und DNA wurden in 50 µL steriler 150 mM NaCl-Lösung gemischt und zur Komplexbildung 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Mischen wurde die Lösung vorsichtig auf die Zellen getropft und mittels Schwenken verteilt.

2.2.11 Passagierung und Aussaat von Zellen

Zur Passagierung der Zellen wurden das Medium der Zellen entfernt, die Flaschen einmal mit 0,2 M PBS-Puffer gewaschen und durch Trypsinierung die Zellen abgelöst und vereinzelt. Für eine 300 cm² Zellkulturflasche wurden ca. 2 mL Trypsin/EDTA-Lösung verwendet. Nach dem vollständigen Ablösen wurde die Proteolyse durch Zugabe von ca. 10 mL komplettem DMEM gestoppt. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 300 g zentrifugiert und das Zellpellett in ca. 10 mL komplettem DMEM resuspendiert. Mittels eines automatischen Zellzählers konnte anschließend die Zellkonzentration bestimmt werden, um eine genaue Zellzahl aussäen zu können. Zur Subkultivierung wurden die Zellen im Verhältnis von 1:5 in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

2.3 Virologische Methoden

Rekombinante Adeno-assoziierte Viren

2.3.1 Kleinproduktion der rAAV2.9-Vektoren

Auf einer 15 cm Zellkulturschale (TPP) wurden 1×10^7 HEK 293T-Zellen in 20 mL komplettem DMEM ausgesät. Nach 24 h wurde, bei einer Konfluenz von 70-80 %, eine Polyethylenimin-Transfektion der Plasmide pAAV-HIV- bzw. SIV-Plasmide mit den Verpackungs- und Helferplasmiden p5E18-VD2/9 und pHelper durchgeführt (Tab. 2.4). Zur direkten fluoreszenzmikroskopischen Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde teilweise ebenfalls pscAAV-GFP transfiziert. 48-72 h nach der Transfektion wurde das FKS-haltige Medium zur Virusernte abgesaugt und gegen 1,8 mL FKS-freies Medium ausgetauscht. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellkratzer geerntet, in 2 mL Reaktionsgefäße überführt und durch viermaliges Einfrieren und Auftauen in -80°C kaltem Ethanol auf Trockeneis und Auftauen in einem 37°C warmen Wasserbad schonend lysiert. Dann konnten die entstandenen Zellbruchstücke 10 min bei 5000 g pelletiert und der virushaltige Überstand bis zur Durchführung der Transduktionsversuche bei -80°C gelagert werden.

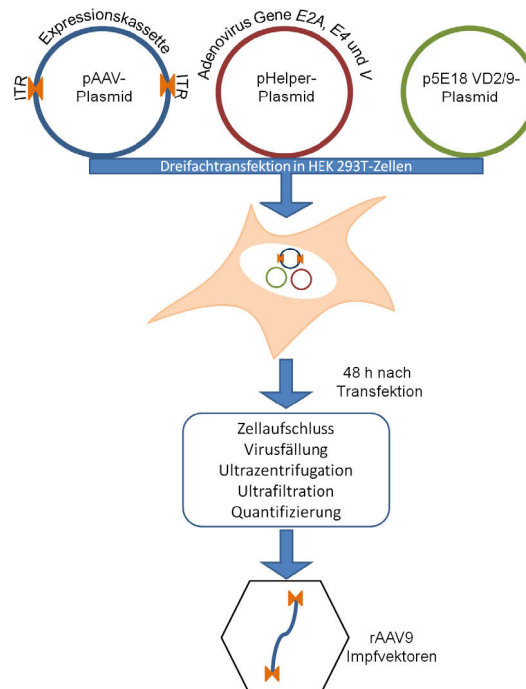


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses der rAAV9-Impfvectoren

Tabelle 2.4 Zusammensetzung der PEI-Transfektionsmischung für eine Dreifachtransfektion, zur Viruskleinproduktion auf einer 15 cm Zellkulturschale.

	p/pscAAV	pHelper	p5E18 VD2/9	PEI-Lösung 2,58 µg/µL	NaCl 150 mM
1 x 15 cm Zellkulturschale	10 µg	18 µg	18 µg	46 µL	2 mL

2.3.2 Großproduktion und Aufreinigung der rAAV2.9-Vektoren

Zur Großproduktion der rAAV2.9-Vektoren für die Immunisierungsstudien wurden, für jede der verschiedenen Vektoren, circa zehn konfluent mit HEK 293T-Zellen bewachsene T300-Zellkulturflaschen (TPP) mit einer Wuchsfläche von 300 cm², benötigt. Mittels automatischen Zellzählers wurde die Gesamtzellzahl und Konzentration bestimmt und insgesamt 5x10⁸ Zellen in einem Liter komplettem DMEM suspendiert. Je 20 mL der Zellsuspension wurden auf fünfzig 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 24 h im Zellkulturschrank inkubiert. Bei dem Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurde ein PEI-Transfektionsmix hergestellt (Tab. 2.6). Nach Mischen der Lösung wurde diese 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und je 2 mL tropfenweise pro 15 cm Zellkulturplatte verteilt und geschwenkt. Nach 72 h wurden die Zellen in dem alten Medium durch Abschaben geerntet und in 50 mL Zellkulturröhrchen (TPP) für 5 min bei 300 g pellettiert. Der Überstand wurde in einer sterilen Flasche gesammelt und die Zellpellets in 10 mL PBS-Puffer pro Röhrchen resuspendiert, gepoolt und wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde in der Flasche mit dem virushaltigen Mediumüberstand gesammelt und die Pelletts nochmals in je 25 mL PBS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pelletts in 5 mL PBS-Puffer resuspendiert. Zur schonenden Lyse der Zellen wurde die Suspension fünfmal in einem -80°C kalten Ethanolbad eingefroren und in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. Die Zelltrümmer wurden anschließend bei 15700 g für mindestens 15 min abgetrennt, bis der virushaltige Überstand annähernd klar war. Um die Viruspartikel aus dem gesammelten Mediumüberstand zu fällen, wurden zuerst störende Salze durch Zugabe von 20 mL steriler 2,5 M CaCl₂-Lösung pro Liter Überstand für 1 h bei 4°C gefällt. Der Überstand wurde dann auf 50 mL Zellkulturröhrchen (TPP) verteilt und für 30 min bei 4000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden wieder in eine sterile Flasche überführt, mit 325 mL PEG/NaCl-Lösung pro Liter Überstand vermischt und über Nacht bei 4°C zur Fällung der Viruspartikel inkubiert. Nach Resuspendierung des Niederschlags wurde der Überstand auf 50 mL Röhrchen verteilt und 30 min bei 3000 g zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen und die virushaltigen Pelletts in insgesamt 5 mL NaCl-HEPES-Lösung resuspendiert. Die beiden Virussuspensionen aus dem Zelllysat und dem Mediumüberstand wurden mit 125 U/mL Benzonase versetzt, 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert und alle 15 min gemischt. Das Zelllysat wurde nochmal für mindestens 15 min bei 15.700 g von restlichen unlöslichen Verunreinigungen getrennt und die Virussuspensionen anschließend bei –80°C gelagert. Nach Vorbereitung der Iodxaniol-Lösungen für die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation wurden die Virussuspensionen auf je 11 mL mit sterilem PBS-MK Puffer aufgefüllt und mit einer langen sterilen Kanüle auf den Boden eines Ultrazentrifugationsröhrchens (Quick Seal Centrifuge Tubes 25x89 mm; Beckman Coulter) gegeben. Danach wurden Virussuspensionen mit den zuvor genau abgemessenen sterilen Iodxaniol-Lösungen, beginnend mit der am niedrigsten konzentrierten Lösung, langsam und luftblasenfrei unterschichtet (Tab. 2.6). Anschließend wurden die fast vollständig gefüllten Röhrchen paarweise auf maximal 10 mg Gewichtsunterschied mithilfe einer Spritze mit feiner Kanüle mit PBS-MK austariert und die Öffnung verschweißt. Die vollständige Dichtheit der Röhrchen wurde mittels Druck kontrolliert. Der Festwinkelrotor der Ultrazentrifuge wurde beladen und die Zentrifugation ohne Bremse für 2 h bei 54000 UPM und 18°C ausgeführt. Anschließend wurden ca. 3 mL der farblosen Bande zwischen der rötlichen 54 %- und 25 %-Iodxaniolschicht, mit einer sterilen Spritze nach Anstechen der oberen Luftkammer abgesaugt. Diese Fraktion wurde 1:50 mit sterilem PBS-MK verdünnt und mittels zwei Ultrafiltrationsröhrchen (Amicon Ultra-15 MWCO 100000; Millipore) bei 3000-4000 g auf je ca. 500 µL aufkonzentriert und vom Iodxaniol gereinigt. Das Viruskonzentrat konnte bis zur Durchführung der Transduktionsversuche oder Virusquantifizierung bei –80°C gelagert werden.

Tabelle 2.5 Zusammensetzung der PEI-Transfektionsmischung für die Dreifachtransfektion von fünfzig 15 cm Zellkulturschalen zur Virusgroßproduktion.

	pss/pscAAV	pHelper-2	p5E18 VD2/9	PEI-Lösung 2,58 µg/µL	NaCl 150 mM
50 x 15 cm Zellkulturschale	500 µg	900 µg	900 µg	2,3 mL	100 mL

Tabelle 2.6 Zusammensetzung der verschiedenen Iodxaniol-Lösungen und benötigte Volumina pro Ultrazentrifugationsröhrchen.

	15 % Iodxaniollsg.	25 % Iodxaniollsg. + Phenolrot	40 % Iodxaniollsg.	54 % Iodxaniollsg. + Phenolrot
PBS-MK Lösung	37,5 mL	28 mL	16,5 mL	5 m
60 % Iodxaniol Stocklösung	12,5 mL	20 mL	33 mL	45 mL
Phenolrot	-	100 µL	-	80 µL
Volumen pro Röhrchen	9 mL	6 mL	5 mL	5 mL

2.3.3 Physikalische Quantifizierung der produzierten rAAV2.9-Vektoren

Zur physikalischen Quantifizierung der rAAV-Vektoren wurde eine quantitative Real-Time PCR mit einer TaqMan-Sonde durchgeführt, um die Kopienzahl der DNase-resistenten Partikel (DRP) zu bestimmen. Während der PCR wurde ein kurzer Bereich des CMV-Promotors amplifiziert, in dem auch die Sonde bindet. Aufgrund der 5'-Exonukleaseaktivität der verwendeten Taq-Polymerase kommt es während der Elongation zum Abbau der Sonde, wodurch der Reporter vom Quencher getrennt und ein Fluoreszenzsignal nach Anregung emittiert wird.

2.3.3.1 Herstellung des Standards

Hierfür wurde aus einem AAV-Plasmidvektor eine komplette Expressionskassette mit CMV-Promotor, Intron und Gen mittels *Sma*I-Verdau ausgeschnitten. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente und Gelextraktion der entsprechenden DNA-Bande wurde die DNA-Konzentration bestimmt und möglichst genau auf 1 ng/µL eingestellt. Danach wurden dekadische Verdünnungsreihen dieser Stammlösung angesetzt. Die Kopienzahl der Stammlösung wurde anschließend berechnet (Abb. 2.3). Diese gibt an, wie viele Genomkopien pro Mikroliter in der qPCR-Standard Stammlösung mit einer DNA-Konzentration von 1 ng/µL enthalten sind.

Molekulargewicht MW des DNA-Fragmentes [g/mol] =

$[(313,2 \cdot A) + (329,2 \cdot G) + (289,2 \cdot C) + (304,2 \cdot T)] - (62 \cdot 2)$

Molzahl M [mol] = $1 \cdot 10^{-9} \text{ g} / \text{MW}$

Kopienzahl = $N_A \cdot M = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \cdot M$

Abbildung 2.4 Berechnung des Molekulargewichtes [g/mol] des ausgeschnittenen qPCR-Standardfragmentes, der Molzahl [mol] von 1 ng des Standardfragmentes und der daraus resultierenden Kopienzahl.

2.3.3.2 Herstellung der Proben

Das rAAV-Konzentrat wurde nach der Aufreinigung und Aufkonzentrierung mit 1:100 DNaseI-Puffer verdünnt und 29 μL dieser Verdünnung über Nacht mit 10 U DNaseI bei 37°C im Wasserbad inkubiert, um unverpackte, nicht DNase-resistente Virusgenome und die Plasmide von der Transfektion zu beseitigen. Zur Inaktivierung des Enzyms und zum Aufschluss der DNase-resistenten Partikel wurden 30 μL 400 mM NaOH-Lösung hinzugegeben und bei 65°C für 45 min inkubiert. Anschließend wurde der pH-Wert durch Zugabe von 30 μL 400 mM HCl-Lösung wieder neutralisiert und die Proben wurden dekadisch verdünnt.

2.3.3.3 Durchführung der PCR

Für alle Proben wurde ein Mastermix (Tab. 2.7) angesetzt und in eine transparente, dünnwandige 96-Loch PCR-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Negativkontrollen, Proben und Standards hinzugegeben. Die Standards wurden $1 \cdot 10^0$ - 10^{-4} , die Proben $1 \cdot 10^{-2}$ - 10^{-5} verdünnt und als Matrize eingesetzt. Für alle Messungen wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Endkonzentration an DNase-resistenten Partikeln berechnet sich aus den Mittelwerten der berechneten Kopienzahlen der Dreifachbestimmungen sowie der Mittelwerte der mit dem Verdünnungsfaktor korrigierten Werte der verschiedenen Verdünnungsstufen.

Tabelle 2.7 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und das verwendete Temperatur- und Zeitprogramm des Real-Time-PCR-Thermocyclers für die physikalische Quantifizierung der DNaseI-resistenten AAV-Genome mittels quantitativer Real-Time-PCR.

Reaktionsansatz (25 μL)		PCR-Programm		
Zusammensetzung		Temperatur in °C	Dauer	Zyklenzahl
10x Taq PCR-Puffer	2,5 μL	95	10 min	1
CMV-TaqMan Primer vorwärts und rückwärts (10 μM)	je 0,5 μL	95	15 s	40
CMV-Sonde	0,5 μL	60	1 min	
HotStart-Taq-Polymerase	0,25 μL			
dNTPs (25 μM je Nukleotid)	0,5 μL			
DNA-Matrize (Probe bzw. Standard)	1 μL			
Wasser	ad 25 μL			

2.3.4 *In vitro* Transduktionsversuche

Nach Transduktion mit den produzierten rAAV2.9-Vektoren bzw. Transfektion mit den AAV-Plasmidvektoren mittels Immunfluoreszenzfärbung, wurde zum Nachweis der Proteinexpression in die Löcher einer 24-Loch Zellkulturplatte (TPP) jeweils ein Tropfen PBS-Puffer gegeben und entsprechend je ein steriler 1,5 cm Glasobjektträger (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG) eingelegt und angedrückt. Anschließend wurden $7,5 \times 10^4$ HEK 293T-Zellen pro Loch in 1 mL komplettem DMEM ausgesät. Nach 24 h wurde, bei einem Konfluenzgrad von 60-70 %, eine Transduktion bzw. Transfektion der Zellen durchgeführt. Für die Transduktion der Zellen wurde zuerst das FKS-haltige Medium abgesaugt und dann je 100 μ L des virushaltigen Überstandes aus der Viruskleinproduktion bzw. 3 μ L des Viruskonzentrats nach Virusgroßproduktion, aufgefüllt auf 200 μ L mit FKS-freiem DMEM, auf die Zellen gegeben und für 2-3 h im Zellkulturschrank inkubiert. Danach wurde jeweils 800 μ L komplettes DMEM hinzugegeben. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurde die Hälfte der infizierten Zellen 24-48 h nach Transduktion durch Zugabe von $7,5 \times 10^5$ replikationskompetentem Adenovirus 5 (RCA 5) Partikeln pro Loch superinfiziert. 24 h nach der Superinfektion wurde anschließend die Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Zur Kontrolle der Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbung wurde eine Transfektion mit 1,5 μ g Plasmid-DNA pro Loch durchgeführt. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrollen verwendet und alle Versuche doppelt durchgeführt. Zur Durchführung des Western Blots wurden 6×10^5 293T-Zellen pro Loch einer 6-Loch-Zellkulturplatte in 3 mL komplettem DMEM ausgesät und für 24 h bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. Je zwei Löcher wurden dann mit je 3 μ g Plasmid-DNA transfiziert bzw. als Negativkontrolle unbehandelt gelassen. Weitere vier wurden mit je 300 μ L virushaltigem Medium aus der Kleinproduktion infiziert. Dazu wurde das FKS-haltige Medium abgesaugt und die Infektion für 2-3 h in einem Gesamtvolumen von 500 μ L, aufgefüllt mit FKS-freiem DMEM, im Zellkulturschrank durchgeführt. Anschließend wurden 2,5 mL komplettes DMEM hinzugegeben. Zur Erhöhung der Transduktionseffizienz wurde 24 h nach Transduktion bei zwei der infizierten Löcher eine Superinfektion durch Zugabe von 6×10^6 RCA 5 Partikeln durchgeführt. 24 h nach der Superinfektion konnten die Proteine für den Western Blot isoliert werden.

Rekombinante Adenoviren

2.3.5 Initiale Adenovirusproduktion und Amplifikation

Um mithilfe des klonierten und rekombinierten pAd-Plasmides rekombinante Adenoviren zu produzieren, wurden AD-293 Zellen mit dem Plasmid transfiziert. Hierfür wurden 24 h vor Transfektion 5×10^5 Zellen in 3mL FKS-haltigem DMEM-Medium pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät. Bei einer Konfluenz zwischen 70-90 % wurde pro Loch eine PEI-basierte Transfektion mit 3 µg das PacI-linearisiertem und Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol -Extraktion aufgereinigtem Adenovirus-Plasmid durchgeführt. Die Zellen wurden für 7-10 Tage kultiviert, falls nötig wurde das Medium gewechselt. Anschließend wurden die Zellen geerntet, in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert und einer vierfachen Frier/Tau-Lyse in flüssigem Stickstoff und 37°C warmen Wasserbad ausgesetzt. Das erhaltene virushaltige Zelllysate wurde anschließend auf frisch ausgesäte AD-293 Zellen passagiert und ebenfalls für 7-10 Tage inkubiert. Die Kultur wurde regelmäßig mikroskopisch auf Anzeichen für zytopathische Effekte untersucht. Ein beginnender zytopathischer Effekt bis hin zum vollständigen Ablösen aller Zellen ist ein deutliches Anzeichen für eine produktive Adenovirusreplikation. Es wird erneut ein virushaltiges Zelllysate hergestellt und bei -80°C gelagert.

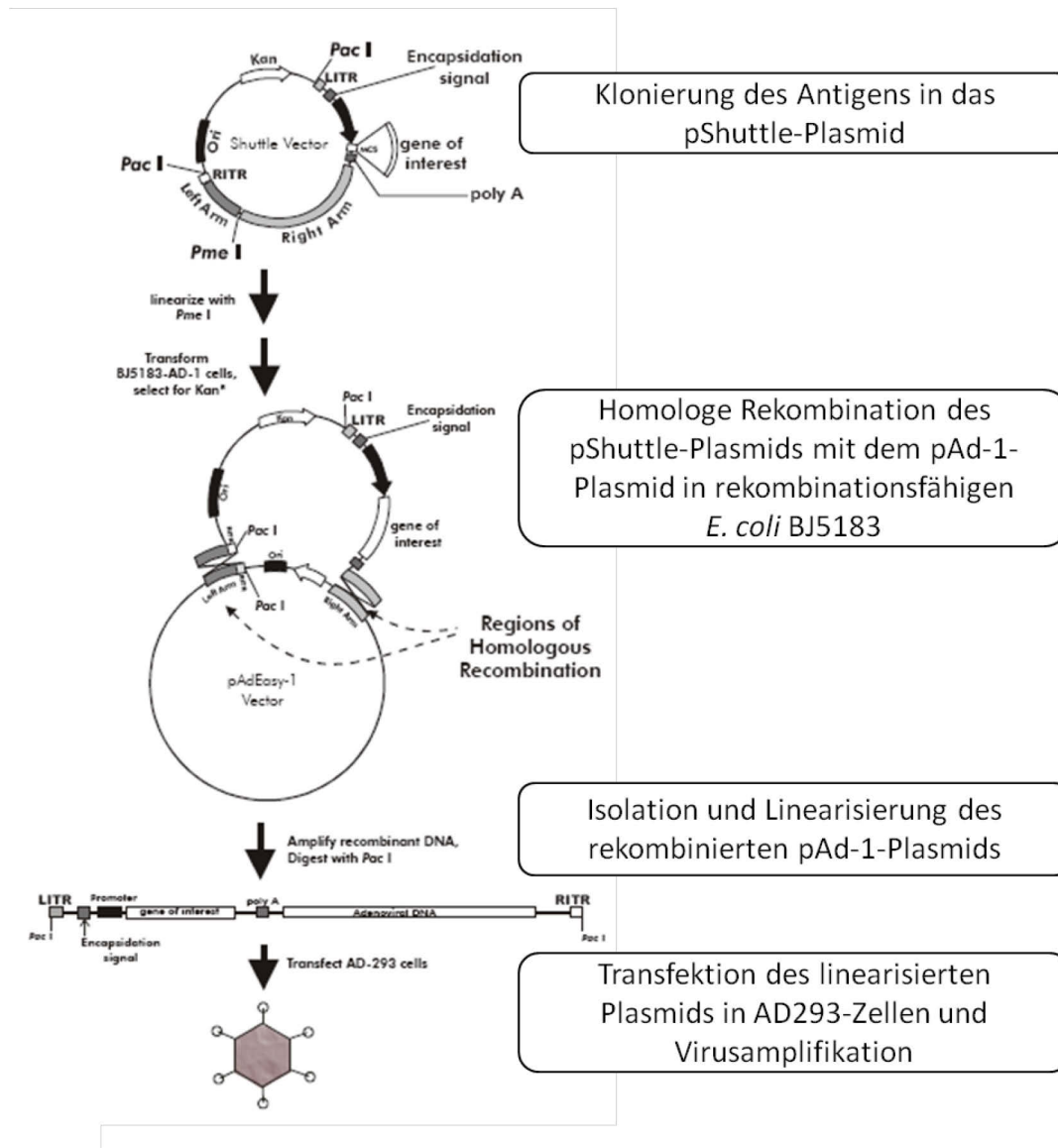


Abbildung 2.5 Schematische Darstellung der Klonierungs- und Rekombinationsschritte und der anschließenden Virusamplifikation (Abbildung teilweise von Stratagene)

2.3.6 Isolierung und Charakterisierung von rekombinanten Virusklonen

Zur Isolierung einzelner Virusklone wurden fast konfluent mit AD-293 Zellen bewachsene 6-Loch Platten benötigt. Es wurden dekadische Verdünnungen ($\sim 10^{-1}$ - 10^{-3}) des zuvor hergestellten virushaltigen Zelllysats in komplettem Medium hergestellt. Pro Loch wurden die Zellen mit 1 mL virushaltigen Mediums für mehrere Stunden überschichtet und inkubiert. Anschließend wurde 5 %ige SeaPlaque-Agarose in PBS zum Überschichten der Zellen vorbereitet. Diese Lösung wurde in der Mikrowelle geschmolzen und im Wasserbad auf 45°C temperiert. Direkt bevor die Zellen überschichtet werden sollten, wurde die Agaroselösung im Verhältnis 1:4 mit

auf 37°C vorgewärmtem komplettem Medium (2 % FKS) verdünnt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert.

Nach Polymerisation der Agarose bei Raumtemperatur wurde die Kultur maximal 1-2 Wochen inkubiert und mikroskopisch auf die Entstehung von Plaques untersucht. Stark sichtbare und gut abgegrenzte Plaques wurden mit einem Stift auf der Unterseite der Zellkulturplatte markiert, anschließend mit einer Pipette (Pipettenspitze abgeschnitten) ausgestanzt und abgesaugt und in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert. Nach anschließender Frier/Tau-Lyse wurde das virushaltige Lysat auf frische AD-293 Zellen in einem der Löcher einer 24-Loch-Platte passagiert und für 1-2 Wochen inkubiert, bis ein zytopathischer Effekt sichtbar wurde. Der virushaltige Medienüberstand, inklusive der abgelösten Zellen, wurde auf zwei weitere mit AD-293 bewachsene Löcher einer 24er Platte passagiert. Die in dem Loch verbleibenden Zellen wurden genutzt, um die Transgenexpression der verschiedenen gepickten Virusklone mittels intrazellulärer Immunfluoreszenzfärbung (Kap. 2.4.1) zu überprüfen. Die anderen beiden Löcher wurden genutzt, um weiteres virushaltiges Zelllysate zu produzieren. Dieses Lysat wurde zur Testung auf replikationskompetente Adenoviren (RCA) und zur anschließenden rAd5-Großproduktion genutzt.

2.3.7 Testung auf replikationskompetente Adenoviren

Die Hälfte (~50 µL) des gepoolten virushaltigen Lysats der expressionsfähigen Virusklone wurde benutzt, um die virale DNA zu isolieren. Zum Aufschluss der Viruspartikel wurden 40 µL der Virussuspension mit 5 µL 10fach TE-Puffer, 5 µL 10 % SDS-Lösung und 0,1 µL Proteinase K (5 mg/mL) für 2-3 h bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion (Kap. 2.2.7) abgetrennt und mittels DNA-Fällung aufkonzentriert (Kap. 2.2.8). Die isolierte Adenovirus DNA wird als Template für die anschließende RCA-Detektions-PCR eingesetzt (Tab. 2.8). Als Positivkontrolle diente identisch präparierte DNA von Wildtyp RCA 5. Die *E1A*-spezifischen Primer erzeugen in Anwesenheit von RCA-DNA ein 1285 bp großes Amplifikat. Virusklone ohne RCA-spezifischen Amplifikat und eine gute Expression in der Immunfluoreszenzuntersuchung wurden für die anschließende rAd5-Großproduktion eingesetzt.

Tabelle 2.8 Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze und das verwendete Temperatur- und Zeitprogramm der RCA-Detektions-PCR

Reaktionsansatz (25 μL)		PCR-Programm		
Zusammensetzung		Temperatur in $^{\circ}$C	Dauer	Zyklenzahl
10x Taq PCR-Puffer	2,5 μ L	95	1 min	1
Primer f und r (10 μ M)	1 μ L	95	15 s	40
Matrize	3 μ L	50	15 s	
Taq-Polymerase	0,125 μ L	72	1 min	
dNTPs (25 μ M je Nukleotid)	0,5 μ L	4	unbegrenzt	1
MgCl ₂	2,5 μ L			
Wasser	ad 25 μ L			

2.3.8 Großproduktion und Aufreinigung rekombinanter Adenoviren

Die gewonnene und getestete primäre Virussuspension wurde, begonnen bei einem Loch einer 6-Loch Platte, über eine 75 cm² Zellkulturflasche bis hin zu einer 150 cm² Flasche auf AD-293 Zellen hochpassagiert und dabei amplifiziert. Die Zellen wurden immer geerntet und aufgeschlossen, wenn ein starker zytopathischer Effekt sichtbar wurde. Im Fall der 150 cm² Flasche wurden die Zellen mitsamt des Mediums entnommen und mit 0,5 % Nonidet-P40 versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 13000 g zentrifugiert, der zellfreie Überstand mit 0,5 Volumen PEG/NaCl- Puffer (20 %; 2,5 mM) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 13000 g für 15 min wurde das entstandene Pellett in 4 mL TBS-Puffer resuspendiert und bei 1200 g für 5 min zentrifugiert.

Die 4 mL des Überstandes wurden mit 2 g CsCl vermischt und für eine Stunde unter Bewegung zum Lösen inkubiert, um eine Dichte von ~ 1,34 g/mL zu erreichen. 2 mL dieser Lösung wurde mittels einer Spritze in die Ultrazentrifugen-Röhrchen gefüllt, mit 1,34 g/mL TBS-CsCl-Lösung austariert und anschließend mithilfe des Tube-Topper-Heaters (Beckman) verschweißt. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 90000 UPM für 3 h bei 20°C (Beckman Ultrazentrifuge, TLA-120 Rotor). Nach der Zentrifugation war ein opaleszierender Ring in der Mitte des Röhrchens zu erkennen, der mittels Spritze angesaugt wurde.

Zur Entfernung des CsCl-Salzes aus der Virussuspension wurde eine Gelfiltrations-Chromatographie auf NAP-Säulen (Amersham Biosciences) durchgeführt. Dafür

wurden die Säulen zuvor mit 25 mL TBS-Puffer aquilibriert, 1 mL der Virus-suspension auf die Säule gegeben und nach Durchlauf zuerst mit 1,5 mL sowie anschließend mit 6 mL TBS-Puffer gewaschen.

Es wurden 0,5 mL Fraktionen gesammelt, die ca. 4-6 Fraktionen mit der optisch höchsten Turbidität wurden gepoolt, zum Stabilisieren mit BSA versetzt (Endkonzentration 1 mg/mL) und in Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.3.9 Quantifizierung der rekombinanten Adenoviren

Zur Quantifizierung der biologisch aktiven Viruspartikel als plaquebildende Einheiten (PFU) wurde ein Plaque-Test durchgeführt. Hierfür wurden annähernd konfluent mit AD-293 Zellen bewachsene 6-Loch Platten benötigt. Die zu testenden Virusstocks wurden aufgetaut und dekadisch in komplettem DMEM (2 % FKS) verdünnt, sodass je 1 mL jeder Verdünnung ($\sim 10^{-2}$ - 10^{-6} Verdünnung) zur Verfügung standen. Das Medium der 6-Loch Platten wurde entfernt und die Zellen mit je 500 μ L der Virusverdünnungen vorsichtig überschichtet. Je Verdünnung wurden 2 Löcher überschichtet und die Zellen für 2 h im Inkubator inkubiert. Direkt anschließend wurde die 5 %ige SeaPlaque-Agarose vorbereitet und nach Ablauf der Inkubationszeit die Zellen mit Agarose überschichtet (Kap. 2.3.6). Die Platten wurden nach zwei Wochen mikroskopisch untersucht und die Verdünnungsstufe/n, bei denen genügend Plaques (möglichst >10 Plaques) mit einer ausreichenden Trennung voneinander vorhanden waren, ausgezählt und der Virustiter berechnet.

$$\text{Virustiter (PFU/mL)} = (N \times F) / V$$

V: Volumen der zur Infektion verwendeten Virus-Suspension

N: Anzahl der gebildeten Plaques

F: Verdünnungsfaktor (entspricht der Verdünnungsstufe)

Abbildung 2.6 Formel zur Berechnung des Virustiters rekombinanter Adenoviren mittels Plaque-Tests

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Das Medium der transduzierten, transfizierten oder unbehandelten HEK 293T- bzw. AD-293-Zellen wurde abgesaugt und die Löcher der 24-Loch Platte vorsichtig dreimal mit je 400 μL 0,2 M PBS-Puffer gewaschen. Danach erfolgte die Fixierung der Zellen auf den Objektträgern durch Zugabe von 200 μL 3 %iger Paraformaldehyd-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur. Nach Absaugen der Lösung und dreimaligem Waschen mit 400 μL PBS-Puffer wurde 200 μL Permeabilisierungspuffer für 15 min hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wurde die unspezifische Adhäsion der Antikörper durch Zugabe von 200 μL IFA-Blockierungspuffer für 30 min unterbunden. Anschließend wurden dann je 150 μL der 1:500 verdünnten Antikörper-Lösung (monoklonaler Maus anti-V5-Antikörper, mit Cy5-Fluorophor markiert; Sigma) angesetzt, in Verdünnungspuffer zugegeben und bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 1 h auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 400 μL PBS wurden die Objektträger für wenige Sekunden mit einer 1:5000 DAPI-Verdünnung überschichtet und anschließend dreifach gewaschen. Mit einer gebogenen Kanüle und einer Pinzette wurden die Deckgläschen aus den Löchern entnommen und auf einem Tropfen wässrigen Eindeckmediums (AquaMount) auf einem Glasobjektträger fixiert und lichtgeschützt für einige Stunden getrocknet. Der Rand der Deckgläschen wurde mit Lack versiegelt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern.

2.4.2 Western Blot

2.4.2.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Medium der transduzierten, transfizierten oder unbehandelten HEK 293T-Zellen wurde entfernt und 800 μL PBS-Puffer pro Loch der 6-Loch Platte zugegeben, die Zellen aus allen Löchern durch Abkratzen geerntet und die doppelten Ansätze vereinigt. Nach Pellettierung der Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 g wurde der Überstand entfernt und die Zellen in 120 μL gekühltem RIPA-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Ansätze zur Zellyse für 10 min auf Eis inkubiert und zusätzlich für 30 s im Ultraschallbad sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden dann durch Zentrifugation bei 10000 g für 10 min abgetrennt und der proteinhaltige

Überstand konnte bei -20°C gelagert werden. Das hergestellte (Tab. 2.8) und bei 37°C auspolymerisierte, 1,5 mm starke SDS-Polyacrylamidgel wurde in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und die innere und äußere Kammer wurden mit Laufpuffer befüllt. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wurden je 40 μL der Proben mit 10 μL 5fach Lämmli-Proteinprobenpuffer versetzt, für 10 min bei 99°C im Heizblock inkubiert und anschließend umgehend auf Eis gestellt. Vor der Auftragung auf das Gel wurden die Proben, um restliche unlösliche Bestandteile abzutrennen, für 1 min bei 15700 g zentrifugiert und anschließend 50 μL der Proben pro Geltasche aufgetragen. Als Größenstandard wurden 10 μL eines vorgefärbten Proteinmarkers (Precision Plus Protein Dual Color Standards; BioRad) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V für ca. 10 min, bis die Lauffront das Trenngel erreichte, durchgeführt. Anschließend wurde die Spannung auf 180 V erhöht und die Elektrophorese beendet, sobald die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte.

Tabelle 2.9 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel.

	5 % Sammelgel	10 % Trenngel
Aqua bidest	2,8 mL	4,1 mL
Acrylamid / Bisacrylamid 30 % (29:1) (BioRad)	0,8 mL	3,3 mL
1,5 M Tris pH 8,8 (BioRad)	-	2,5 mL
0,5 M Tris pH 6,8 (BioRad)	1,2 mL	-
10 % SDS (BioRad)	50 μL	100 μL
10 % APS (BioRad)	30 μL	70 μL
TEMED (BioRad)	5 μL	5 μL

2.4.2.2 Proteintransfer

Die aufgetrennten Proteine wurden aus dem Polyacrylamidgel durch ein Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine aktivierte PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,2 μM ; Millipore) übertragen. Dazu wurde das Gel für 15 min in Transferpuffer inkubiert. Dann wurde mithilfe von zwei, auf Gelgröße zugeschnittenen und in Transferpuffer getränkten Filterpapieren (Extra Thick Blot Paper; BioRad) einer gleichgroßen PVDF-Membran, die zuvor durch kurzes Tränken in 99,9 % Methanol aktiviert wurde, und dem Gel ein Blot-Sandwich aufgebaut. Es war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen den Schichten befanden oder die Filterpapiere seitlich überstanden, da dies zu einem unvollständigen, oder ausfallenden Transfer der Proteine geführt hätte. Der Transfer wurde für 30-60 min bei 10-20 V durchgeführt. Die Membran wurde dann für eine bessere Adhäsion der Proteine luftgetrocknet und anschließend kurz in Methanol getränkt. Danach wurde sie eine Stunde in Blockierpuffer bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert und dann einmal kurz in

Waschpuffer gewaschen. Die Inkubation der Membran erfolgte mit dem primären Antikörper (unmarkierter monoklonaler Maus anti-V5-Antikörper; Serotech), 1:5000 verdünnt in 15 mL Blockierpuffer. Für den Nachweis von Antikörpern in Mausseren wurden diese ebenfalls in Blockierpuffer verdünnt und die Membran in einer SlotBlot-Apparatur (BioRad) eingespannt. Pro Nachweis wurden bei diesem Verfahren nur 700 µL Antikörperlösung benötigt. Die Inkubation der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C auf dem Horizontalschüttler durchgeführt. Nach dreimaligem fünfminütigen Waschen der Membran mit Waschpuffer wurde der sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper (monoklonaler Gans anti-Maus-IgG-Antikörper, mit Peroxidase konjugiert; Sigma) 1:5000 verdünnt in 15 mL Blockierpuffer zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran abgetropft und mit 2 mL, der nach Herstellerangaben gemischten Substratlösung (ECL Western Blotting Substrat; PIERCE) für eine Minute bedeckt. Die Membran wurde abgetropft und der Röntgenfilm (x-ray Retina; Fotochemische Werke GmbH) in einer lichtdichten Filmkassette mit unterschiedlichen Expositionszeiten von 10-60 s durch die Membran belichtet. Danach erfolgte die Entwicklung der Filme in einem Entwicklungsautomaten. Abschließend wurde das Bandenmuster des Proteinmarkers auf den entwickelten Film übertragen.

2.4.3 ELISA

Die humorale Immunreaktion der immunisierten Mäuse wurde mittels ELISA überprüft. Die Seren der Mäuse einer Immunisierungsgruppe wurden gepoolt, um genügend Probenvolumen für alle Untersuchungen zu haben. Als Antigen wurden die Histidin-markierten, rekombinanten HIV und SIV Proteine Gag, Nef, Tat und Rev in *E. coli* produziert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie in Ni-NTA Säulen (Quiagen) aufgereinigt. Des Weiteren wurde ein Lysat von HIV pNL4.3 und SIVmac239 Partikeln, die mittels Ultrazentrifugation gereinigt wurden, als Antigen benutzt. Die verschiedenen Antigene wurden mit 0.05M Karbonat/Bikarbonat-Puffer pH 9.6 in der zuvor ausgetesteten optimalen Konzentration über Nacht bei 4°C auf die 96-Loch Probind-Platten (Becton-Dickson) gekoppelt. Die Platten wurden anschließend dreifach mit Waschpuffer (PBS + 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend mit PMT-Puffer (Waschpuffer mit 2 %igem fettfreien Milchpulver) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Mausseren wurden dann in PMT-Puffer verdünnt und in

Duplikaten mit je 50 μL in die Löcher pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C, anschließend wurden die Platten dreifach gewaschen und mit je 50 μL eines 1:1000 in PMT-Puffer verdünnten Peroxidase-markierten Ziege anti-Maus IgG Antikörper (Sigma, Deutschland) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden je 50 μL der frisch angesetzten Substratlösung, bestehend aus 1 mg/mL o-Phenylendiamin Dihydrochlorid (Sigma, St. Louis, MO) in Citrat-Puffer (pH5, Sigma) mit 0,00012 % Wasserstoffperoxid, zu den Löchern gegeben. Die Farb-reaktion wurde durch Zugabe von je 25 μL 25 % Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte mittels SunRise Photometer (TECAN, Schweiz) ermittelt.

2.4.4 ELISpot

Sterile PVDF 96-Loch Platten (Millipore, Bedford, MA) wurden für 1 min durch Zugabe von 70 %igem Ethanol aktiviert und anschließend dreifach mit PBS-Puffer gewaschen. Die Platten wurden über Nacht bei 4°C mit einem 1:300 in PBS verdünntem monoklonalem anti-IFN γ Maus Antikörper (MabTech, Schweden) beschichtet.

Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Lösung durch Klopfen der Platte auf Zellstoff gründlich entfernt und anschließend dreifach mit PBS gewaschen. Durch Zugabe des 200 μL kompletten RPMI-Mediums (PAA, Deutschland) pro Loch für 1 h bei RT wurde die PVDF-Membran blockiert. In dieser Inkubationszeit wurden die benötigten vorverdünnten Peptidlösungen aufgetaut, die benötigten Milzzellen gezählt und auf die passende Konzentration eingestellt. Die in DMSO gelösten Peptide (50-100 μL DMSO auf 1 mg Peptid; NIH, USA) wurden zuvor nach einem Matrixmuster gepoolt, um die Anzahl der Testansätze zu reduzieren. Aus der Reaktivität der einzelnen horizontalen und vertikalen Peptidpools lassen sich Rückschlüsse auf das möglicherweise reaktive Einzelpeptid ziehen (siehe Abb. 2.5). Für die Epitopenkartierung hingegen wurden diese möglicherweise reaktiven Einzelpeptide eingesetzt. Die Peptidpools bzw. Einzelpeptide wurden jeweils in komplettem RPMI verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pro Peptid entstand. Das als Positivkontrolle eingesetzte Pokeweed Mitogen (Sigma, USA) wurde in einer Verdünnung von 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Medium ohne Peptid benutzt.

Die Maus Splenozyten-Suspension wurde vorbereitet, indem die Milz entnommen und weiter mittels GentleMacs (Miltenyi, Deutschland) in 3 mL FKS-freiem RPMI

dissoziiert wurde. Die Zellen wurden in ein Falcon mit einem Nylonfilter (Becton-Dickson) überführt, der Filter mit 5 mL komplettem RPMI-Medium nachgespült und für 10 min bei 300 g und 4°C pellettiert. Anschließend wurde jedes Zellpellett einer Milz in 5 mL ACK-Lysepuffer resuspendiert und für 3 min unter gelegentlichem Mischen bei RT inkubiert. Anschließend wurden 45 mL kalter PBS-Puffer hinzugegeben und noch einmal zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Die Zellen waren nun bereit zur Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neugebauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung. Bereits aufgearbeitete und eingefrorene Zellen wurden zur Verwendung im EliSpot aufgetaut und dreifach in kaltem komplettem RPMI-Medium gewaschen, durch einen Nylonfilter gegeben und anschließend ebenfalls die Vitalzellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde so mit komplettem RPMI-Medium verdünnt, sodass optimalerweise eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/mL (Mindestkonzentration 1×10^6 Zellen/mL) vorlag.

Nachdem die einstündige Blockierung der PVDF-Platten vorüber war, wurden, dem Auftragsschema entsprechend, 50 µL jeder Peptidverdünnung in die Löcher pipetiert. Dabei war bei allen Arbeitsschritten mit den PVDF-Platten darauf zu achten, dass diese nie trocken wurden. Anschließend wurden 100 µL der Zellsuspension dazugegeben, die Platten in Aluminiumfolie eingepackt und für 20 h im Brutschrank erschütterungsfrei inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Ausklopfen der Platte auf Zellstoff entfernt und mit PBS dreifach gewaschen. Es wurde pro Platte 10 mL einer 1:1000 Antikörper-Verdünnung des monoklonalen anti-IFN γ -Biotin Maus Antikörpers (MabTech, Schweden) in PBS mit 0,5 % FKS hergestellt und je 100 µL dieser Verdünnung pro Loch der Platte zugegeben. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden die Platten wieder ausgeklopft und dreifach gewaschen. Nun erfolgte eine einstündige Inkubation bei RT mit je 100 µL einer 1:1000 Verdünnung von Streptavidin/Alkalische Phosphatase (MabTech, Schweden). Nach erneutem Ausklopfen und dreifachem Waschen wurde die Platte zur Farbentwicklung der Spots mit 100 µL/Loch einer Entwicklungslösung, bestehend aus 12,5 mL 1x Pufferlösung und je 125 µL NBT und BCIP (Pierce, Rockford, IL), für 5-120 min bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Farbreaktion wurden die Platten ausgeklopft, die untere Kunststoffolie entfernt, mit reichlich Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Die Visualisierung und Auszählung der Spotanzahl pro Loch wurde mithilfe des AID ELISPOT Readers (Autoimmun Diagnostika GmbH, Deutschland) durchgeführt.

Peptidpools
6-10

	6	7	8	9	10
1	1	2	3	4	5
2	6	7	8	9	10
3	11	12	13	14	15
4	16	17	18	19	20
5	21	22	23	24	25

Peptidpools 1-5 Einzelpeptide 1-25

Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der Zusammensetzung der EliSpot-Peptidpools. Die gelb hinterlegte Spalte bzw. Zeile soll reaktive Peptidpools darstellen. Beide Pools weisen, als gemeinsame Komponente, das Peptid 19 auf, welches in weiterführenden Epitopenkartierungen bestätigt werden muss.

2.5 Tierversuche

2.5.1 Immunisierungsstudien

Für alle Immunisierungen wurden 4-6 Wochen alte, weibliche C57BL/6 Mäuse in Gruppen von je 5 Mäusen verwendet. Frühestens eine Woche nach Ankunft der Tiere im Tierbereich erfolgte die Erstimmunisierung der Mäuse. Die Immunisierungen oder Probenentnahmen einer Versuchsreihe wurden immer gleichzeitig durchgeführt. Die Zweifach- und Dreifach-Immunisierungen wurden immer nach dem unten dargestellten zeitlichen Versuchsablauf durchgeführt (Abb. 2.6).

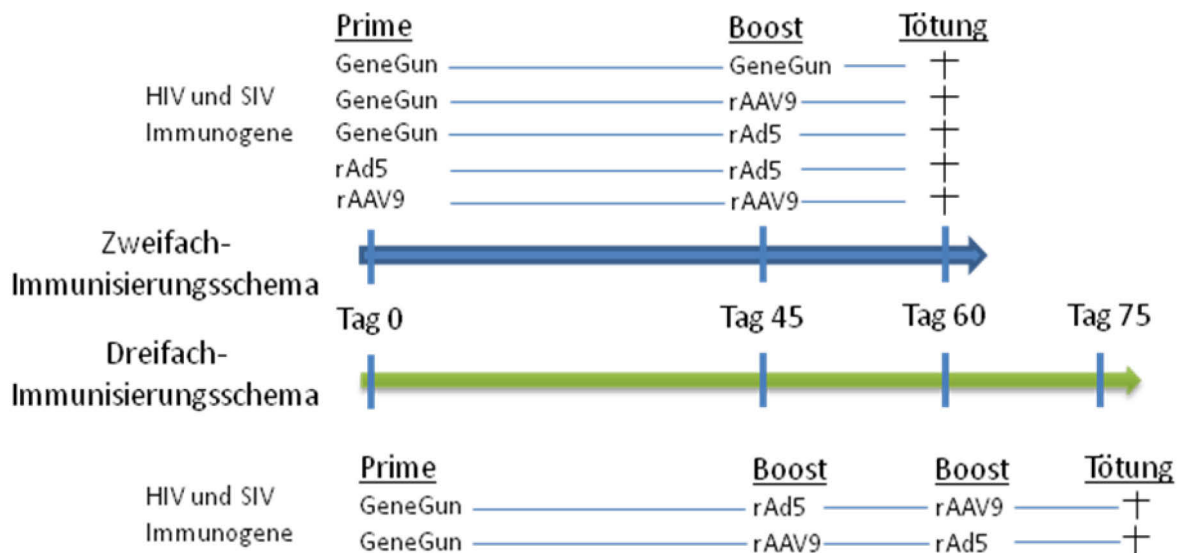


Abbildung 2.8 Schematische Darstellung der Zusammensetzung und zeitlichen Einteilung der verschiedenen homologen und heterologen Impfreime.

Für die Immunisierung der Mäuse mittels GeneGun (BioRad) wurden diese mithilfe von Isofluran betäubt, der Bauch wurde rasiert und der Maus wurden drei Schüsse mit der GeneGun mit 200 psi Heliumdruck auf den Bauch verabreicht (1,4 µg DNA pro Schuss).

Die Immunisierung der Mäuse mit den viralen Vektoren erfolgte unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank. Die Tiere wurden fixiert und ihnen wurde maximal 25 µL der Virussuspension in den Unterschenkelmuskel injiziert. Für Immunisierungen mit rekombinanten Adenoviren wurde je Konstrukt und Maus 1×10^7 PFU verabreicht, bei rAAVs wurden $1,25 \cdot 10^9$ DRP verwendet. Zur Tötung wurden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert, die Endblutung durch Punktion des Retrobulbärkomplexes durchgeführt und abschließend durch zervikale Dislokation getötet.

Anschließend wurde die Milz entnommen und in PBS auf Eis bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.5.2 *In vivo* Zytotoxizitätstests

Grundlage des hier verwendeten, CFSE-basierten *in vivo* Zytotoxizitätstest ist die Injektion von Antigen-markierter und nicht-markierter syngener Maussplenozyten in immunisierte und unimmunisierte Rezipientenmäuse. Die beiden transferierten Milzzellpopulationen ließen sich aufgrund ihrer unterschiedlich starken Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE unterscheiden. Außerdem wurden die beiden Zellpopulationen in gleichen Verhältnissen gemischt und injiziert. Aus den Veränderungen dieses Verhältnisses bei den immunisierten Tieren, relativ zur Kontrollmaus, ließ sich die durch die Immunisierung induzierte spezifische Zytotoxizität berechnen (Abb. 2.9 und 2.10).

Zwei Gruppen mit je drei C57/BL6 Mäusen wurden mithilfe des vollständigen DNA/rAd5/rAAV9 Impfgregimes immunisiert. An Tag 75, 15 Tage nach dem letzten Boost, wurden 2 naive C57/BL6 Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Die Milzen wurden, wie zuvor beschrieben, mittels GentleMacs (Miltenyi, Deutschland) aufgearbeitet und die Erythrozyten lysiert (Kap. 2.4.4). Wichtig war, dass in allen Arbeitsschritten mit den Zielzellen nur Medium mit hitzeinaktiviertem FKS verwendet wurde. Die Zellen wurden durch einen 40 µM Nylonfilter (Becton-Dickson) passagiert, mittels Neugebauer-Zählkammer die Vitalzellzahl bestimmt und die Zellsuspension auf genau 1×10^7 vitale Zellen/mL eingestellt. Daraus ergaben sich ca. 8-10 mL Zellsuspension (pro Milz ca. $4-5 \times 10^7$ Zellen). Die Zellsuspension wurde in vier gleiche Aliquote aufgeteilt.

Zwei der Aliquote wurden durch Zugabe von HIV- bzw. SIV-Peptid Antigen-markiert (Zielzellen). Die anderen beiden Aliquote blieben unmarkiert (Kontrollzellen). Es wurden zwei der reaktivsten Peptide (HIV Gag #92; SIV Gag #78) verwendet und die Zellen wurden zusammen mit den Peptiden (Endkonzentration 5 µM) in komplettem RPMI-Medium 90 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden alle 4 Ansätze zuerst einfach mit Medium und dann dreifach mit PBS gewaschen, um die ungebundenen Peptide zu entfernen. Die Zellen wurden erneut durch einen 40µM Filter passagiert, die Vitalzellzahl bestimmt und die Ansätze auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/mL in PBS eingestellt.

Ein Aliquot der zuvor in wasserfreiem DMSO gelösten und eingefrorenen 5 μM CFSE-Stammlösung wurde aufgetaut und kurz vor Gebrauch 1:10 in DMSO verdünnt. Die Peptid-markierten Zellen wurden durch Zugabe von 1 μL CFSE-Stammlösung/mL Zellsuspension stark gefärbt. Die unmarkierten Zellen wurden mit 1 μL CFSE-Verdünnung/mL Zellsuspension versetzt. Nach Zugabe des Farbstoffes war auf ein schnelles und schonendes Mischen zu achten. Die Zellen wurden mit dem Farbstoff 10 min bei 37°C im Wasserbad unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln (Tropfenbildung vermeiden) inkubiert. Die Färbung wurde dann durch Zugabe des zehnfachen Volumens kompletten RPMI-Mediums gestoppt und die Zellen wurden bei 300 g für 10 min pelletiert. Die Zellen wurden dreifach mit PBS gewaschen und durch einen 40 μM Filter passagiert. Die Zellzahl aller Aliquots wurde bestimmt und auf 5×10^7 /mL in PBS eingestellt. Nun wurden pro zu injizierendem Tier einer Gruppe (HIV oder SIV) mindestens 100 μL jeder Zellpopulationen homogen gemischt (Zielzellen/Kontrollzellen) und je 200 μL pro Spritze und Tier luftblasen- und klumpenfrei aufgezogen.

Die Rezipientenmäuse wurden wenige Minuten vor der Injektion einer Heizlampe ausgesetzt, um die Schwanzvenen zu dilatieren. Die Maus wurde fixiert, der Schwanz mit Alkohol abgewischt und die Schwanzvene an der Wurzel gestaut. Nach erfolgreicher Punktion der Vene wurde die Stauung gelöst und vorsichtig die Zellsuspension injiziert. Eine erfolgreiche Injektion war durch die sichtbare Verdrängung des Blutes im Lumen der Vene und durch eine leichtgängige Injektion zu erkennen. Die in den Spritzen verbliebenen Zellen wurden entnommen und als Rückstellprobe im Brutschrank inkubiert. Nach 12 h wurden die Mäuse getötet, die Milzen und das Blut entnommen und die Milzzellen zu einer Einzelzellsuspension aufgearbeitet.

Zur fluorometrischen Messung der Milzzellproben im FACS Calibur (Becton-Dickson) wurden die Zellen in Cellfix (Becton-Dickson) fixiert und direkt vor der Messung durch einen 40 μM Filter passagiert, um die Probennadel nicht zu verstopfen. Zuerst wurde die Rückstellprobe jeder Gruppe gemessen (FSC/SSC Gate auf Lymphozyten-Population; FI1 zwei Gates auf CFSE starke bzw. schwache Population) und die Gates und Verstärkereinstellungen voreingestellt. Anschließend wurden die Proben der immunisierten und unimmunisierten Tiere gemessen ($\sim 1,5\text{-}2 \times 10^7$ gezählte Zellen pro Tier). Die Auswertung und grafische Darstellung der Daten erfolgte mittels FlowJo 7 und die spezifische prozentuale Zytotoxizität wurde mit der folgenden Formel berechnet (Abb. 2.9).

$$\text{Antigen-spezifische Lyse \%} = [1 - (\text{Ratio in naiver Maus} / \text{Ratio in immunisierter Maus})] * 100$$

Abbildung 2.9 Formel zur Berechnung der Antigen-spezifischen Zytolyse.

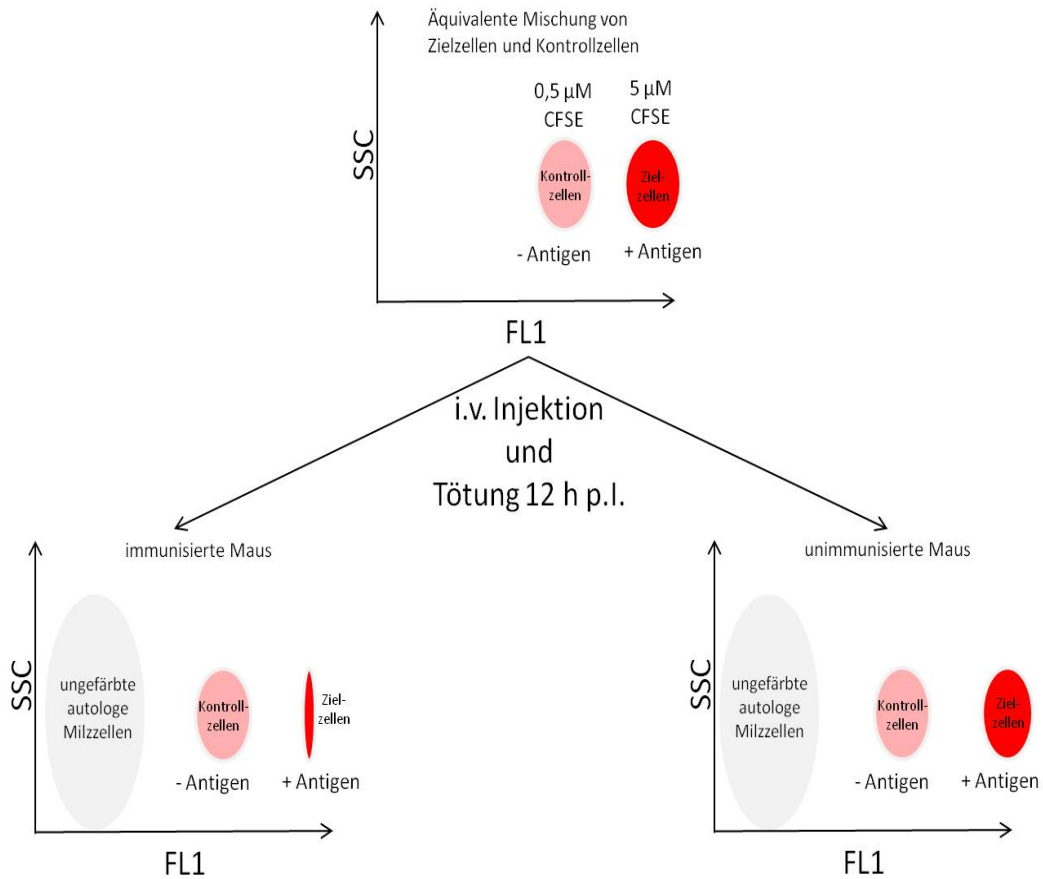


Abbildung 2.10 Schematische Darstellung der Resultate der FACS-Untersuchung, vor Injektion der CFSE gefärbten Zellen und nach Isolation der Milzzellen aus den immunisierten und unimmunisierten Rezipientenmäusen

3 Ergebnisse

3.1 Klonierungen und Plasmidproduktion

Nach der *in silico* Konstruktion der vier verschiedenen HIV und SIV Impfkonstrukte (Kap. 2.2.1) und erfolgter Lieferung der Konstrukte wurden die vier Plasmidvektoren des Herstellers zuerst in *E. coli* XL10 transformiert und anschließend ein Einzelklon verwendet, um je eine Midiprep-Plasmidproduktion durchzuführen, sodass ausreichend Material für die weiteren Subklonierungen entstand. Nun wurden die vier Spendervektoren und die beiden Empfängervektoren pTH und pAAV mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III geschnitten. Nach Bestätigung des korrekten Restriktionsmusters wurden die benötigten Banden extrahiert und für die Ligationen verwendet. Um die vier Konstrukte in den pShuttle-CMV Vektor subklonieren zu können, wurde dieser Vektor mit *Hind*III und *Eco*RV (blunt) geschnitten. Die bereits klonierten pAAV-Vektoren wurden zuerst mit *Xba*I verdaut und anschließend wurden mittels Mungobohnen-Nuklease die überstehenden einzelsträngigen Enden abgebaut. Erst dann **wurde** ein weiterer Verdau mit *Hind*III durchgeführt und das erhaltene Fragment mit dem linearisierten pShuttle-Vektor ligiert.

Das korrekte Restriktionsmuster der klonierten und in größerem Maßstab produzierten, endotoxin-freien Plasmide wurde mittels Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Hind*III, bei den pAAV Plasmiden zusätzlich mit *Pvu*II und *Sma*I, kontrolliert und bestätigt (Abb. 3.1).

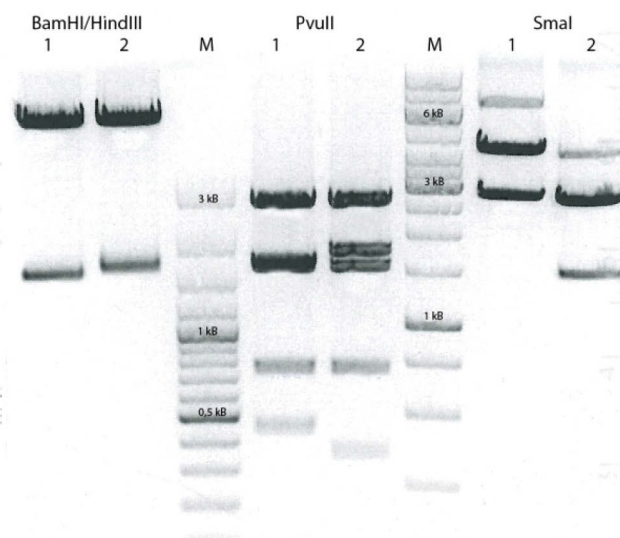


Abbildung 3.1 Beispielhafte Darstellung eines Kontrollverdaues mit *Bam*HI/*Hind*III, *Pvu*II und *Sma*I von pAAV Plasmiden nach Klonierung bzw. Großproduktion der halbierten pAAV-Vektoren; 1=HIV RevNefTat, 2=HIV Gag, M=3 kb bzw. 10 kb DNA Marker

Die für die Herstellung der rekombinanten AAV-Vektoren zusätzlich benötigten Helfer- und Verpackungsplasmide pHelper und p5E18 VD2/9 wurden im Mega- bzw. Gigaprep-Maßstab produziert und mittels *SmaI* und *PvuII* das Restriktionsmuster bestätigt (Abb. 3.2).

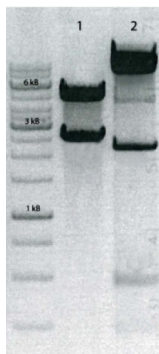


Abbildung 3.2 Kontrollrestriktion der produzierten Verpackungs- und Helferplasmide; 1=p5E18 VD2/9 mit *PvuII*; 2=pHelper mit *SmaI*

Wie sich später noch herausstellen sollte, wurde es nötig, alle vier Konstrukte für die Subklonierung in den pAAV Vektor mittels PCR zu halbieren und mit der fehlenden Restriktionsschnittstelle zu versehen (Kap. 2.2.3). Die PCR Amplifikate (Abb. 3.3) wurden mit *BamHI* und *HindIII* geschnitten und mit dem pAAV-Vektor ligiert. Auch hier wurde der Erfolg der Klonierung mithilfe eines *BamHI/HindIII* Kontrollverdaus bestätigt (nicht gezeigt).

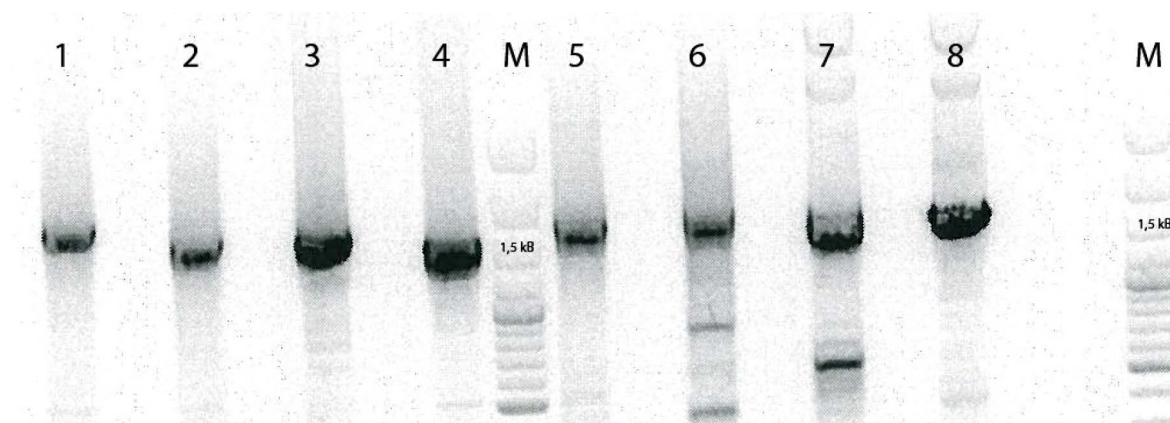


Abbildung 3.3 DNA-Gelelektrophorese der PCR-Amplifikate der Konstrukthalbierung; 1=HIV Pol 1. Teil, 2= HIV Pol 2. Teil, 3=HIV RevNefTat, 4=HIV Gag, 5=SIV Pol 1. Teil, 6=SIV Pol 2. Teil, 7=SIV RevNefTat 8=SIV Gag, M=Fermentas 3 kB DNA Marker

Zur Herstellung der Adenovirus-Produktionsplasmide mithilfe der klonierten Shuttlevektoren wurden die pShuttle-CMV Vektoren mittels *PmeI* Verdau vollständig linearisiert und ein Aliquot jedes Verdaues auf vollständige Restriktion überprüft (nicht gezeigt). Die vollständig linearisierte DNA wurde in *E. coli* BJ

elektrotransformiert. Von den entstandenen Einzelkolonien wurden nur die kleinsten Kolonien auf der Agaroseplatte gepickt und angezchtet. Nach adäquater DNA-Isolation (Kap. 2.2.7) wurde die Rekombination der Expressionskassette aus dem pShuttle-Vektor in den Adenovirus-Vektor mittels *PacI* Verdau überprüf. Korrekt rekombinierte Plasmide wurden in rekombinationsdefiziente E.coli XL10 retransformiert und das korrekte Restriktionsmuster erneut für alle Vektoren und Klone bestätigt. Nach erfolgreicher Rekombination und *PacI* Verdau eines pAD-Plasmides sollte sich eine hochmolekulare Bande bei ca. 30 kB und eine weitere Bande bei 3 oder 4,5 kB, je nach Rekombinationsort, identifizieren lassen (Abb. 3.4).

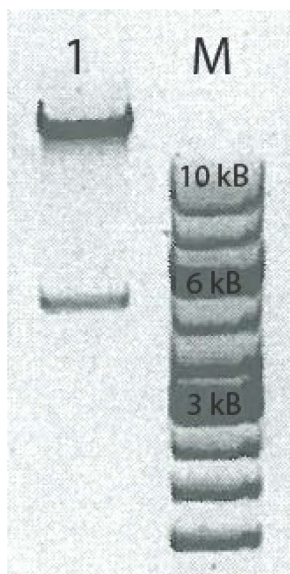


Abbildung 3.4 Beispielhafte Darstellung der *PacI* Restriktionkontrolle der in E.coli XL10 retransformierten Adenovirus-Vektoren; 1=pAD-SIV Pol, M=10 kB DNA Marker

Für jeden pAD-Vektor wurde eine Midiprep-Plasmidproduktion durchgeführt, wovon anschließend 10 µg DNA mit *PacI* verdaut wurden, welche später für die PEI-Transfektion von AD293-Zellen zur Adenovirusproduktion benötigt wurden.

3.2 In vitro Expressionskontrolle der Plasmide und viralen Vektoren

Nach erfolgreicher Klonierung und Restriktionskontrolle der für die GeneGun benötigten pTH-Expressionsvektoren wurden diese *in vitro* auf ihre korrekte Expression untersucht. Hierfür wurden HEK 293T-Zellen mit den Plasmiden transfiziert. Die exprimierten Proteine wurden mittels intrazellulärer Immunfluoreszenzfärbung auf die richtige zytosolische Lokalisation und mittels Western Blots auf das richtige Molekulargewicht hin überprüft. Nach erfolgreicher Expressionskontrolle waren die vier pTH-Plasmide bereit für die Herstellung der GeneGun-Munition und Immunisierung (Abb. 3.5 und 3.6).

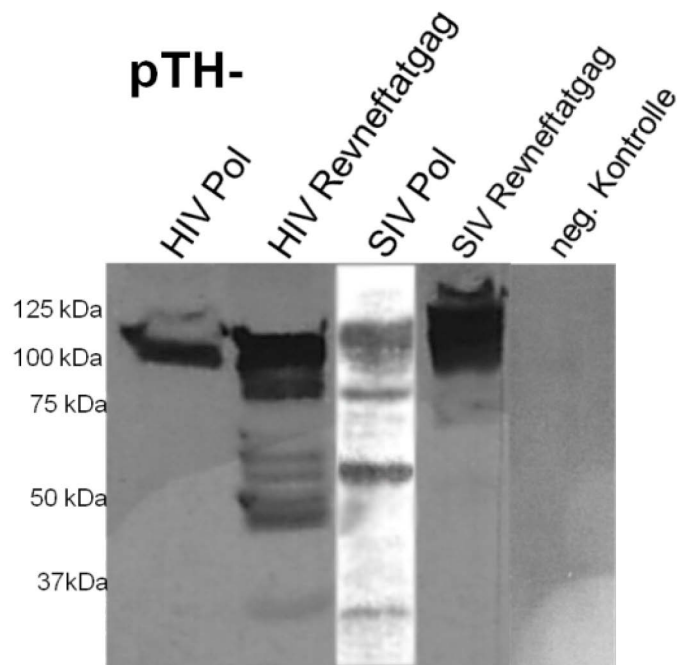


Abbildung 3.5 Western Blot der zellulären Proteine, markiert mit anti-V5-Maus/anti-Maus-Peroxidase Antikörpern 48 h nach PEI-Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den pTH GeneGun-Plasmidvektoren, sowie der untransfizierten Negativkontrolle

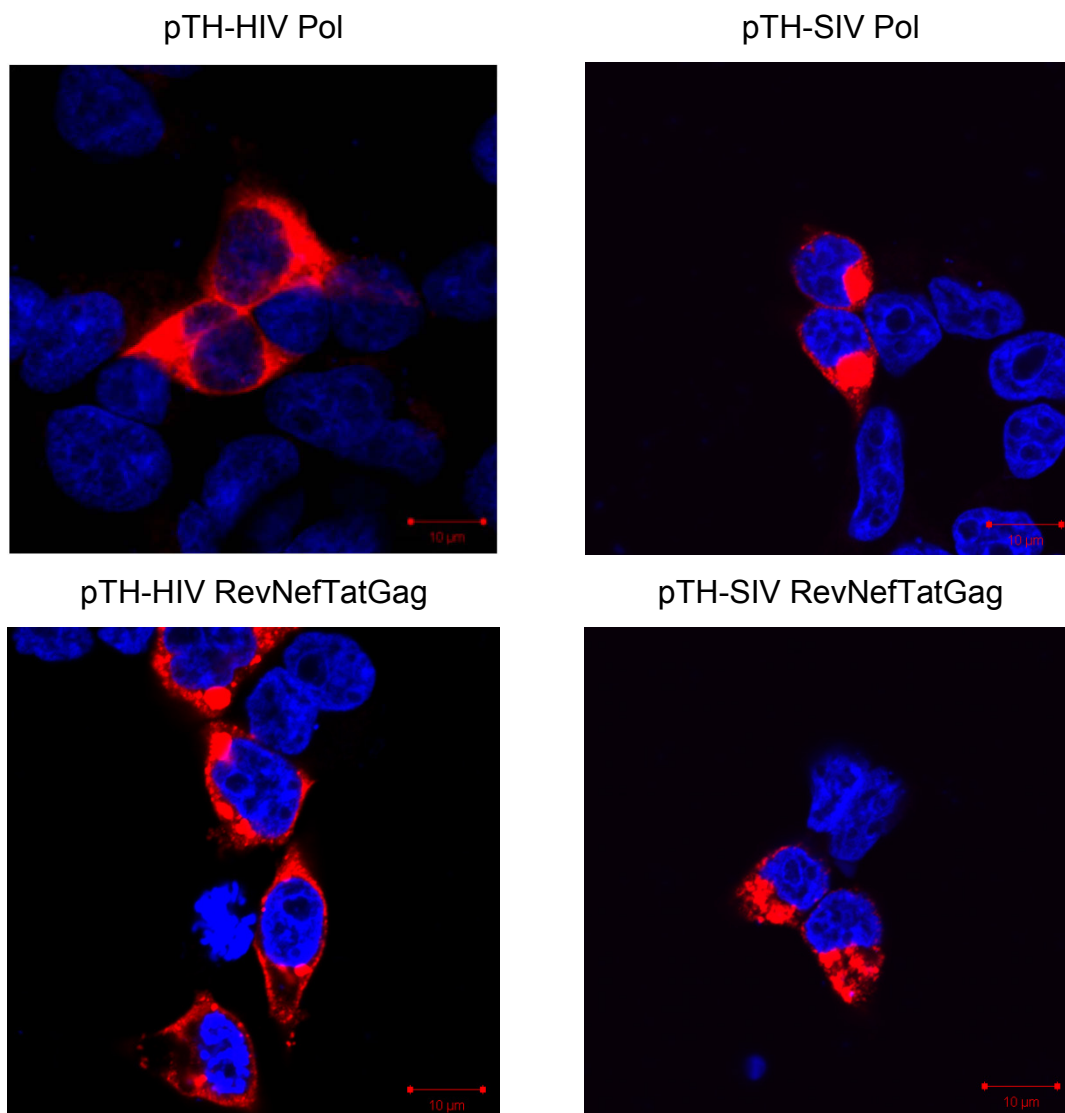


Abbildung 3.6 Immunfluoreszenzfärbung der Proteinexpression (rot) und des Zellkerns (blau) von HEK 293T-Zellen, 48 h nach PEI-Transfektion mit den pTH GeneGun-Vektoren mithilfe des monoklonalen konjugierten Antikörpers anti-V5-Cy5 und des Farbstoffes DAPI.

Die für die Virusproduktion benötigten pAVV- und pShuttle-Vektoren wurden nach erfolgreicher Klonierung ebenfalls mittels intrazellulärer Immunfluoreszenzfärbung und Western Blot auf korrekte Antigenexpression untersucht, bevor weitere Schritte der Virusproduktion unternommen wurden. Die Überprüfung der für die rekombinante Adenovirusproduktion benötigten pShuttle-Plasmide bestätigte die Expression aller vier Antigene in erwarteter Größe und Lokalisation, vergleichbar mit den GeneGun-Vektoren (nicht gezeigt). Nach

erfolgter Adenovirus Klein- bzw. Großproduktion wurden die erzeugten Viruspartikel benutzt, um eine erneute Expressionskontrolle durchzuführen. Hierfür wurden AD293 Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der Virus-suspension oder einer MOI 1-5 infiziert. Mithilfe des Western Blots und intrazellulärer Immunfluoreszenzfärbung konnte die korrekte Expression aller fünf rAd5-Vektoren bestätigt werden (Abb. 3.7 und 3.8).

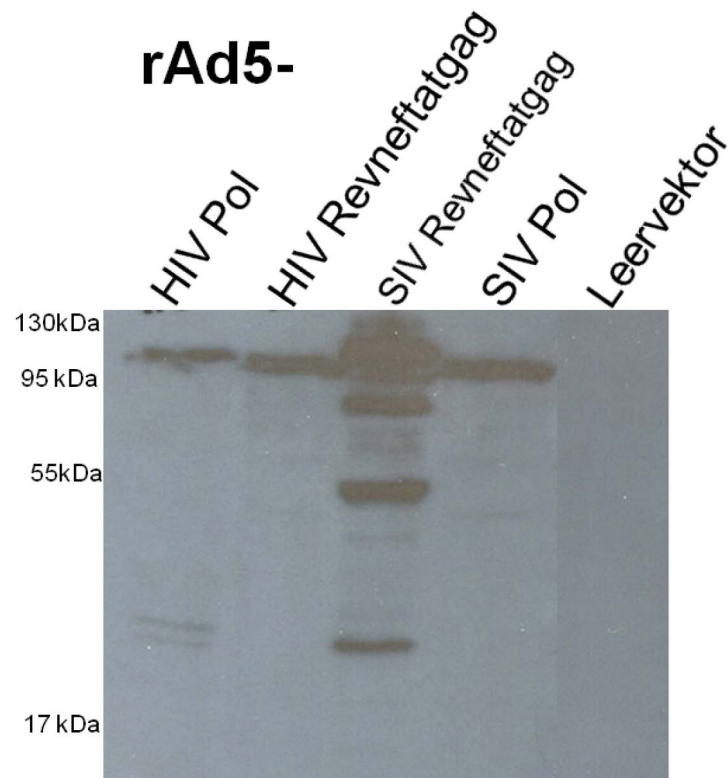


Abbildung 3.7 Western Blot der zellulären Proteine, markiert mit anti-V5-Maus/anti-Maus-Peroxidase Antikörpern 48 h nach Infektion von AD293-Zellen mit rekombinanten Adenoviren MOI 1-5

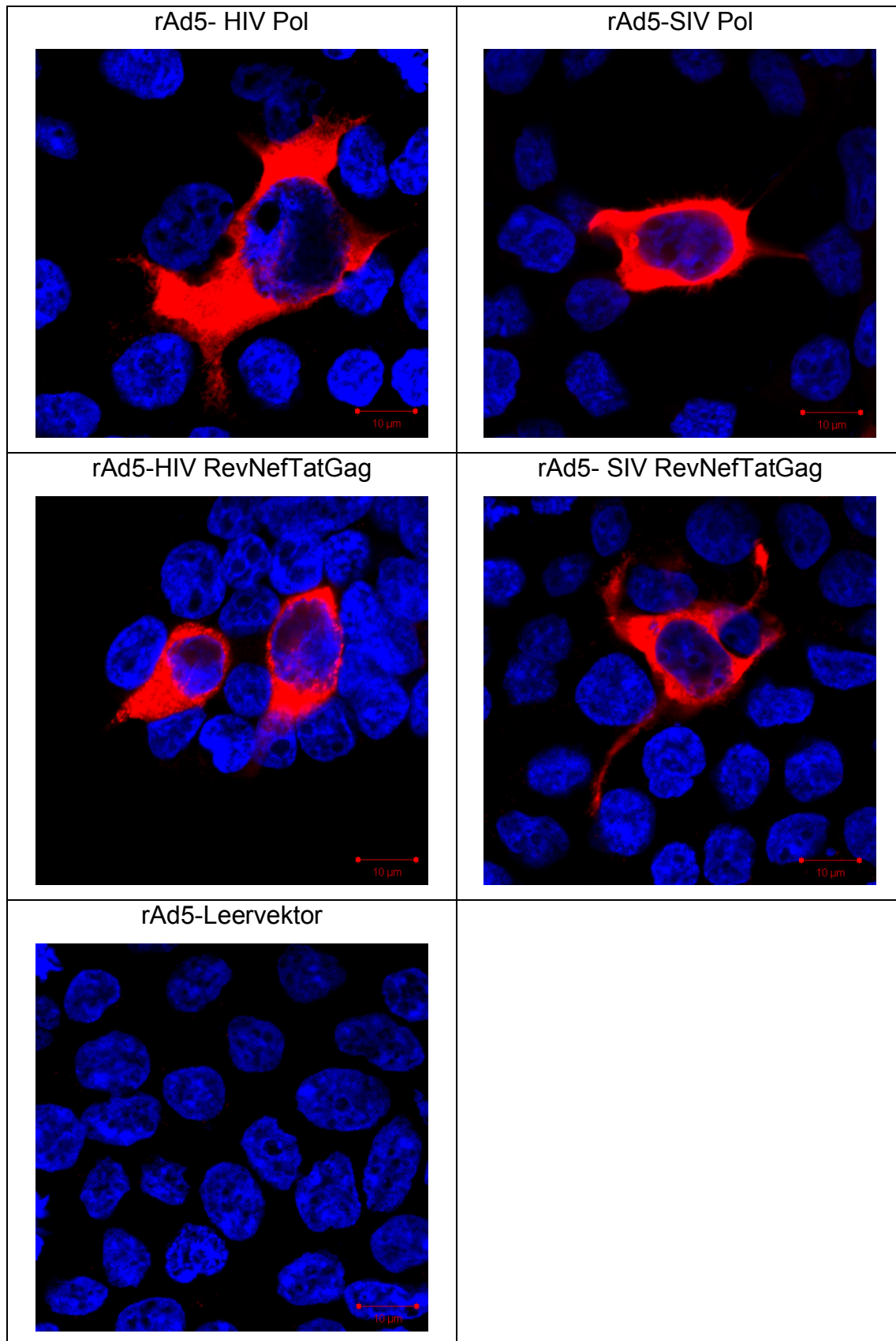


Abbildung 3.8 Immunfluoreszenzfärbung der Proteinexpression (rot) und des Zellkerns (blau) von AD293-Zellen, 48 h nach Infektion mit den rAd5-Vektoren, mithilfe des monoklonalen konjugierten Antikörpers anti-V5-Cy5 und des Farbstoffes DAPI.

Für die pAAV-Vektoren mit den ca. 3 kB großen, vollständigen Konstrukten wurden, nach erfolgreicher Klonierung, ebenfalls Expressionsuntersuchungen auf Plasmidbasis durchgeführt. Nach Transfektion von HEK 293T-Zellen und anschließendem Western Blot (Abb. 3.9) und Immunfluoreszenzfärbung (nicht gezeigt) zeigte sich eine starke Expression der Proteine in erwarteter Größe und Lokalisation.

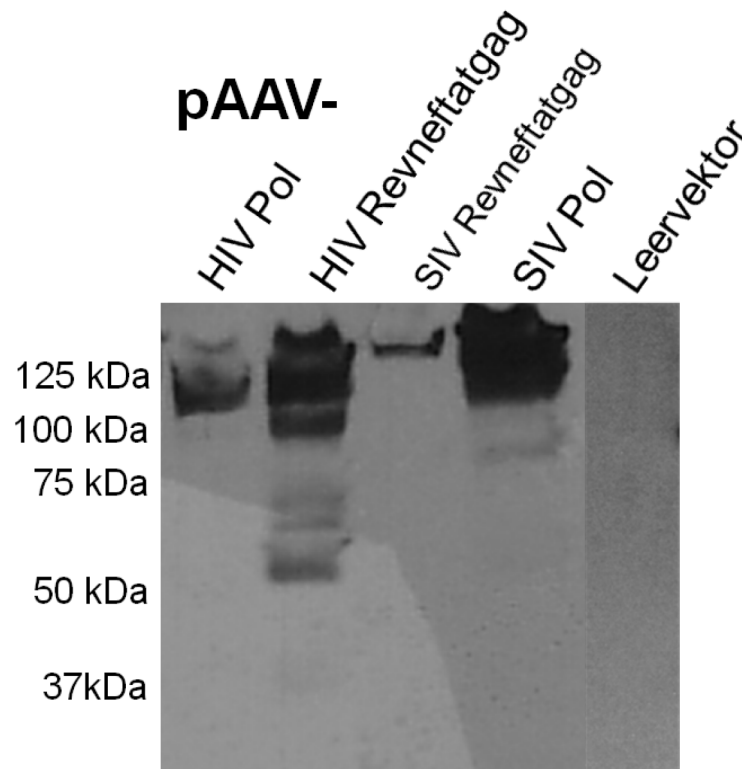


Abbildung 3.9 Western Blot der zellulären Proteine, markiert mit anti-V5-Maus/anti-Maus-Peroxidase Antikörpern 48 h nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den Vollängen pAAV-Plasmiden.

Anschließende Versuche einer rekombinanten AAV9 Produktion auf Basis der getesteten pAAV-Plasmide schlugen leider fehl. Mehrfache Versuche einer rAAV9 Produktion in kleinerem Maßstab und anschließende Transduktionsversuche mit den erzeugten Viruspartikeln zeigten nicht das erwartete Resultat. Sehr wenige oder gar keine transduzierten Zellen waren nach mehreren Tagen Inkubation und Superinfektion im Vergleich zu Kontrollproduktionen anderer rAAV9-Partikel zu erkennen (Abb.3.10). Des Weiteren ließen sich nach der Transduktion keine Banden im Western Blot erkennen und die gemessene physikalische Partikelanzahl war ebenfalls 100-1000fach niedriger als erwartet (nicht gezeigt).

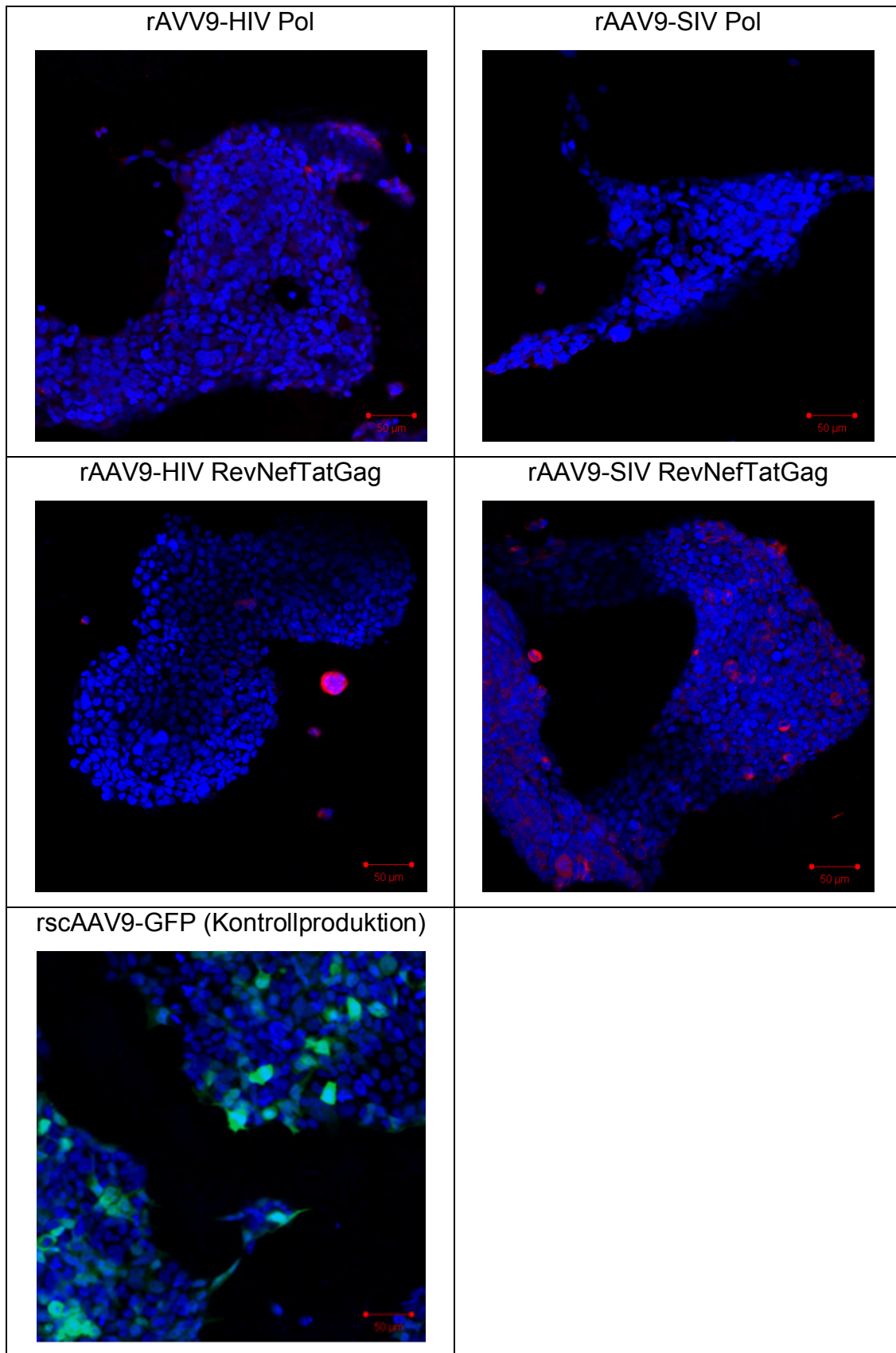


Abbildung 3.10 Immunfluoreszenzfärbung der Proteinexpression (rot) und des Zellkerns (blau) von HEK 293T-Zellen, 72 h nach Infektion mit den Vollängen rAAV9/rscAAV9-Vektoren und 24 h nach Superinfektion der rAAV9-Vektoren mit RCA MOI 2; Färbung mithilfe des monoklonalen konjugierten Antikörpers anti-V5-Cy5 und des Farbstoffes DAPI.

Wie schon zuvor erwähnt (Kap. 3.1), wurde die Größe des zu verpackenden Virusgenoms verringert, um unter die natürliche Verpackungsgröße von ca. 4,7 kB zu gelangen. Die dafür aus PCR-Amplifikaten klonierten pAAV-Vektoren mit halbierten, ca. 1,5 kB langen Konstrukten wurden nach erfolgreicher Klonierung und Sequenzierung auf ihre Expression auf Plasmidebene sowie Effektivität bezüglich der Virusproduktion hin untersucht. Der Western Blot auf Plasmidebene zeigte eine erwartete Molekularmasse der halbierten Proteine von ca. 50-75 kDa (Abb. 3.11). Trotz mehrfach wiederholter Klonierungsversuche und Austausch der Amplifikationsprimer gelang es bis zuletzt nicht, die beiden Hälften des HIV Pol-Konstruktes zu klonieren. Demzufolge waren für die folgenden Immunisierungsstudien keine HIV Pol codierenden rAAV9 Vektoren verfügbar. Um einen visuellen Vergleich der Transduktionseffizienz bzw. Virusproduktivität der Vollängen und halbierten pAAV-Plasmide bzw. rAAV- Vektoren zu ermöglichen, wurden alle Viruskonstrukte parallel auf identische Weise in kleinerem Maßstab produziert, aufgearbeitet und anschließend parallel verwendet, um eine Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen. Es zeigte sich deutlich, dass die Transduktionseffizienz dieser halbierten rAAV9-Vektoren um ein Vielfaches, verglichen mit den Vollängen-Vektoren, gesteigert werden konnte (Vergleich Abb. 3.10 und 3.12).

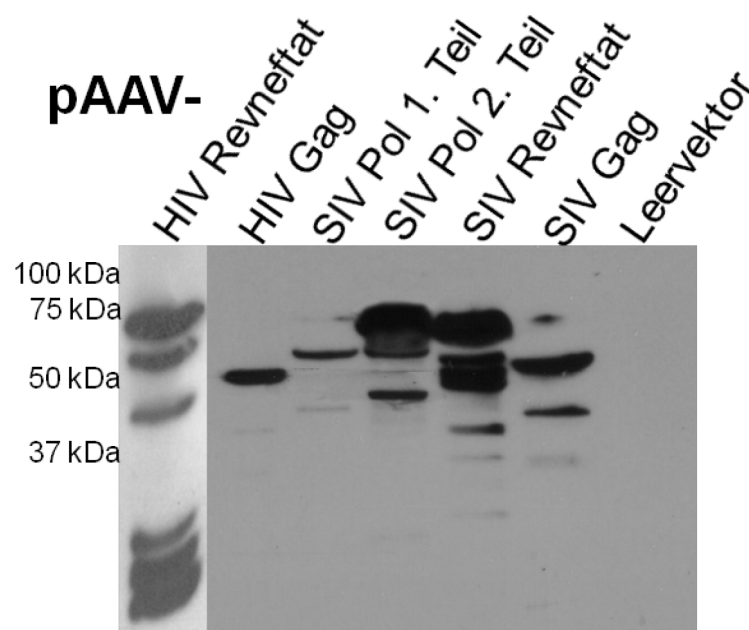


Abbildung 3.11 Western Blot der zellulären Proteine, markiert mit anti-V5-Maus/anti-Maus-Peroxidase Antikörpern, 48 h nach Transfektion von HEK 293T-Zellen mit den halbierten pAAV-Plasmiden.

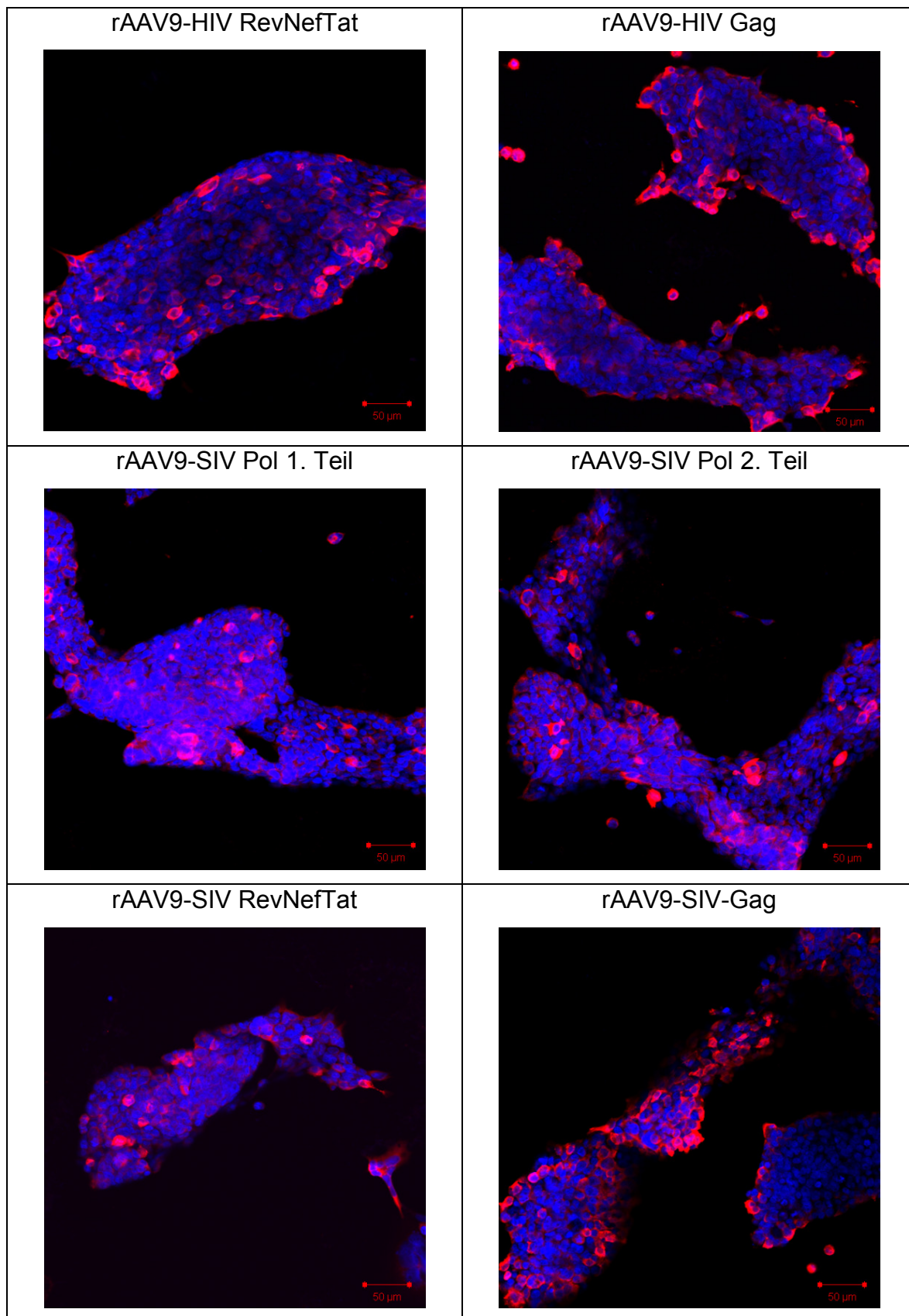


Abbildung 3.12 Immunfluoreszenzfärbung der Proteinexpression (rot) und des Zellkerns (blau) von HEK 293T-Zellen, 72 h nach Infektion mit den halbierten rAAV9/rscAAV9-Vektoren und 24 h nach Superinfektion der rAAV9-Vektoren mit RCA MOI 2; Färbung mithilfe des monoklonalen konjugierten Antikörpers anti-V5-Cy5 und des Farbstoffes DAPI.

3.3 Quantifizierung der produzierten viralen Vektoren

Nach erfolgreicher *in vitro* Charakterisierung der rekombinanten viralen Vektoren wurden diese in größerem Maßstab produziert, aufgereinigt und konzentriert, um ausreichende Mengen und Konzentrationen für die anschließenden Immunisierungsversuche zu gewinnen.

Die Adenovirus- und AAV-Vektoren wurden auf unterschiedliche Weise quantifiziert. Die rAd5-Vektoren wurden mittels eines biologischen Quantifizierungstests, dem relativ langwierigen Plaque-Test, auf infektiöse, plaquebildende Einheiten untersucht. Die rAAV9-Vektoren wurden mit einer wesentlich schnelleren, physikalischen Quantifizierungsmethode untersucht. Hierbei wurden DNase-resistente, verpackte Virusgenome quantifiziert. Dieser Wert ergab jedoch keine direkte Aussage über die tatsächliche Konzentration infektiöser Viruspartikel.

Tabelle 3.1 Tabellarische Darstellung der aus verschiedenen Virusgroßproduktionen gewonnenen Virusmengen und der daraus resultierenden Anzahl verfügbarer Impfdosen (Maus) bzw. tatsächlich pro Immunisierung eingesetzter rAAV9-Menge

rAd5-Impfvektor	PFU/mL	Anzahl Impfdosen je 1×10^7 PFU
rAd5-HIV Pol	14×10^9	2800
rAd5-HIV RevNefTatGag	9×10^9	1800
rAd5-SIV Pol	4×10^9	800
rAd5-SIV RevNefTatGag	5×10^9	1000
rAd5-Leervektor	3×10^9	600

rAAV9-Impfvektoren	DRP/ μ L	eingesetzte DRP pro Impfdosis (für 27 Impfdosen)
rAAV9-HIV RevNefTat	$1,75 \times 10^8$	$2,40 \times 10^9$
rAAV9-HIV Gag	$2,35 \times 10^8$	$4,09 \times 10^9$
rAAV9-SIV Pol 1. Teil	$1,91 \times 10^8$	$4,09 \times 10^9$
rAAV9-SIV Pol 2. Teil	$8,14 \times 10^7$	$1,15 \times 10^9$
rAAV9-SIV RevNefTat	$4,16 \times 10^8$	$1,00 \times 10^{10}$
rAAV9-SIV Gag	$1,80 \times 10^9$	$1,00 \times 10^{10}$
rAAV9-Leervektor	$9,02 \times 10^{10}$	$1,00 \times 10^{10}$

Aus der tabellarischen Übersicht (Tab. 3.1) wurde deutlich, dass sich die rekombinanten Adenoviren sehr effizient mit einem sehr hohen Titer, bezogen auf die relativ kleine Kulturfläche von insgesamt 900 cm², produzieren ließen.

Bei den produzierten rekombinanten AAV9-Vektoren war die gewonnene physikalische Partikelzahl deutlich niedriger ausgefallen. So wurden initial je 20 15 cm Zellkulturschalen pro Konstrukt produziert und quantifiziert. Da in manchen Produktionen die Partikelzahl deutlich unter der benötigten Menge lag, wurden bis zu 40 Zellkulturschalen je Konstrukt zusätzlich produziert, mit den ersten Virusstocks gepoolt und erneut quantifiziert.

Da die abschließend ermittelte Partikelzahl bei vier der sieben rAAV9-Vektoren nicht für die 25 benötigten Virusdosen mit der üblichen Virusmenge von 1×10^{10} DRP ausreichte, wurden die Impfdosen teilweise um das Neunfache auf minimal $1,15 \times 10^9$ DRP reduziert.

3.4 In vivo Immunogenitätsstudien

3.4.1 Untersuchung der induzierten zellulären Immunantwort

Vorversuche

Um die Immunogenität der, von den Impfkonstrukten exprimierten Proteine, grundsätzlich zu bestätigen und zu untersuchen, ob es durch gleichzeitige Applikation der Pol- und RevNefTatGag-Impfkonstrukte zu Immundominanzeffekten kommt, wurde eine Immunisierungsreihe in Mäusen durchgeführt. In diesem Vorversuch wurden die Milzzellen der Mäuse nicht gepoolt, sondern die Mäuse individuell getestet. Dieses Vorgehen sollte helfen zu beantworten, wie homogen das Reaktivitätsmuster der Mäuse innerhalb einer Gruppe ist. Hierfür wurden je 4-5 Mäuse mit den einzelnen oder kombinierten HIV bzw. SIV GeneGun-Vektoren immunisiert. Aus den Abbildungen wird deutlich, dass, wenn ein Peptidpool ein deutlich positives Resultat liefert, in der Regel jede Maus eine Reaktivität gegen diesen Peptidpool zeigt, wenn auch in unterschiedlichem Maße (Abb. 3.13). Beim Vergleich der Resultate der Einzel- und Kombinationsimpfungen wurde deutlich, dass bei den Kombinationsimpfungen keine Verringerung der Immunogenität beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu war

beim Vergleich der HIV-Immunsierungen sogar der Trend einer Steigerung der Immunogenität bei den Kombinationsimpfungen zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung fiel auf, dass meist eine bestimmte Maus die stärkste Reaktion zeigte, jedoch nur in Bezug auf ein Immunogen und nicht auf beide.

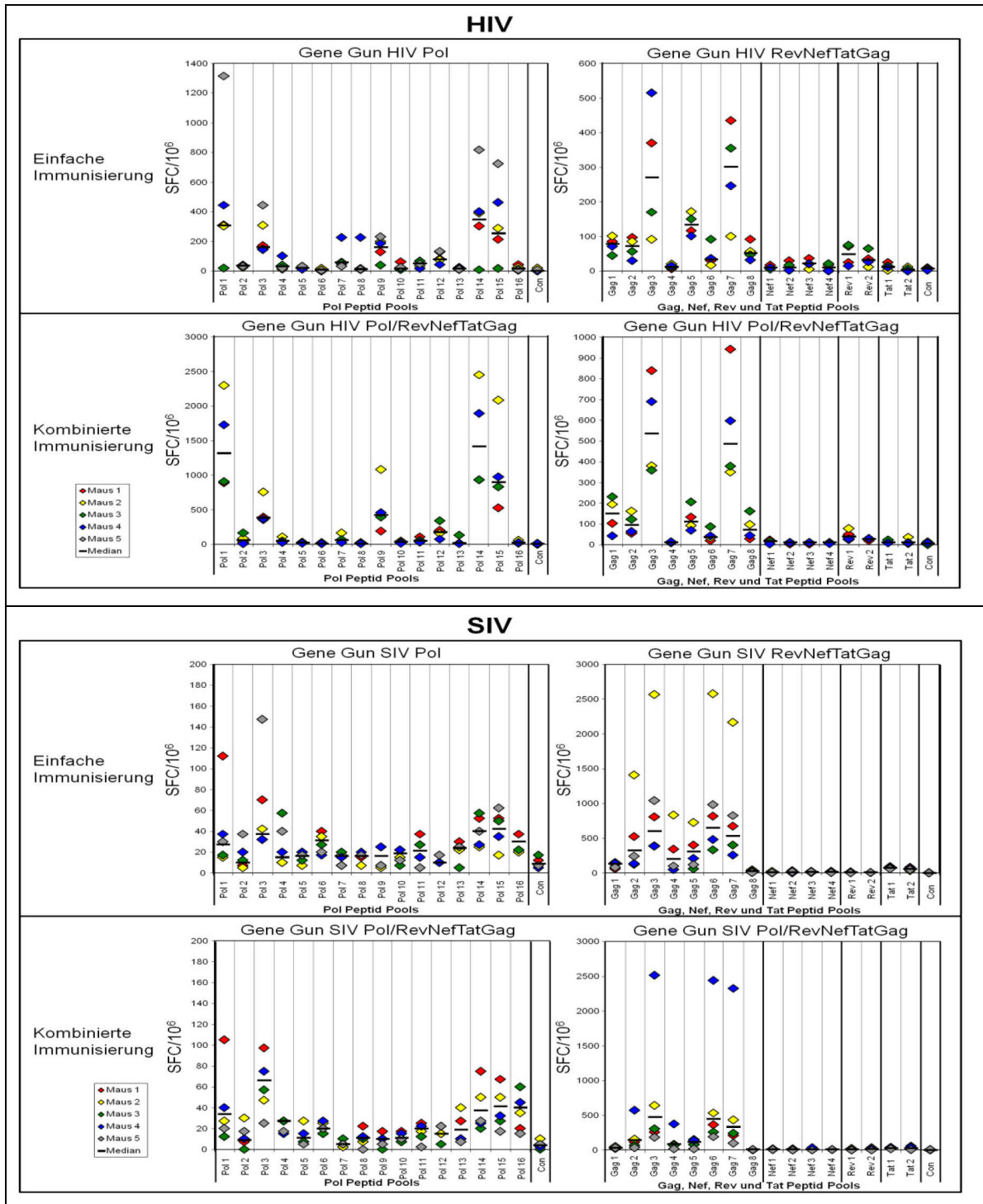


Abbildung 3.13 Resultate der Immunisierungen von C57/BL6 Mäusen mit den einzelnen bzw. kombinierten HIV und SIV GeneGun-Vektoren. Die Ergebnisse des EliSpots sind als spotbildende Kolonien pro eine Million Zellen angegeben. Die farbigen Rauten repräsentieren die individuellen Mäuse und der schwarze Strich jeweils den berechneten Mittelwert aller Mäuse einer Versuchsgruppe.

Um zu überprüfen, ob die relativ geringe Immunogenität des pTH-SIV Pol Konstruktes produktions- oder konstruktbedingt ist, wurde neue GeneGun-Munition hergestellt und erneut in Mäusen getestet. Hierbei wurden Ergebnisse erzielt, welche vergleichbar mit denen der anderen Immunogene waren (Daten nicht gezeigt). Alle nachfolgenden Immunisierungen wurden mit der neu hergestellten Munition durchgeführt.

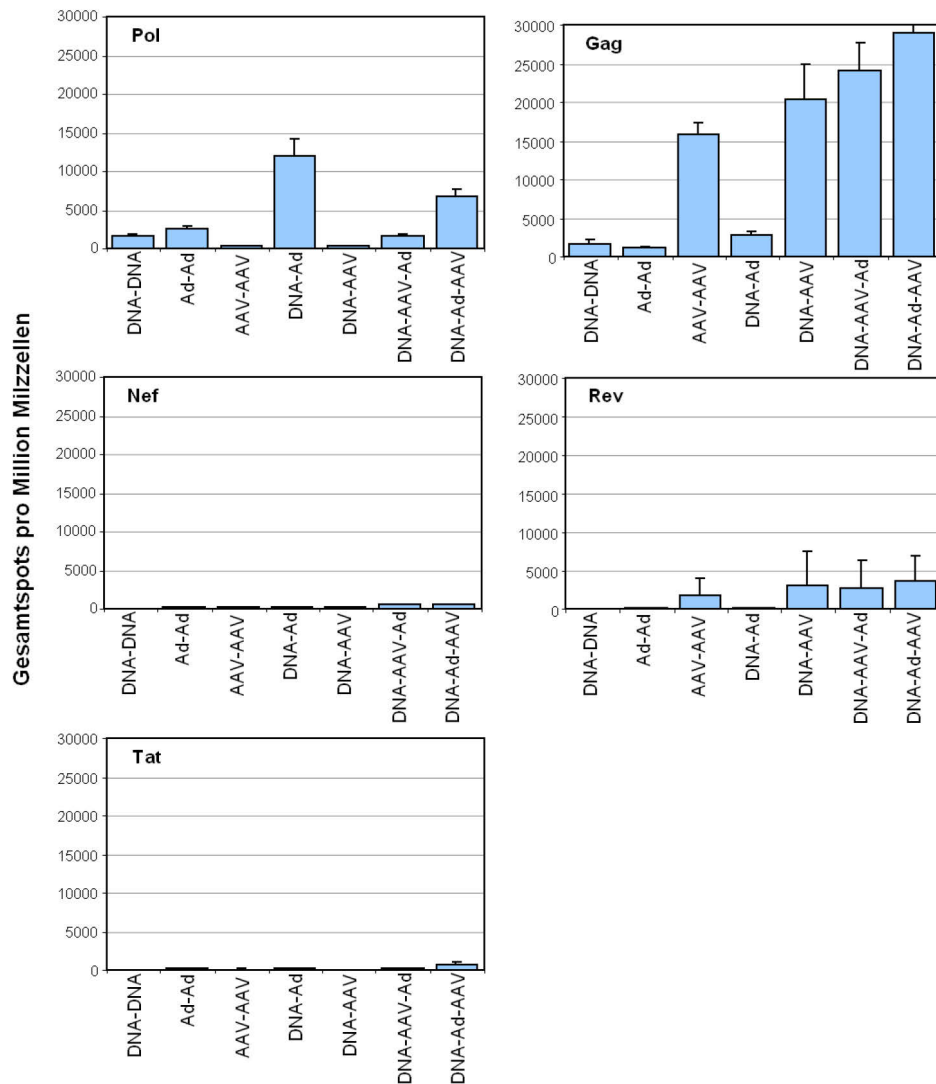
Immunogenitätsstudien

Aufgrund der Resultate der Vorversuche wurden die nachfolgenden Tierversuche entsprechend angepasst. So wurden aufgrund der relativ homogenen Reaktivität der einzelnen Mäuse alle Milzzellen und Blutproben der einzelnen Mäuse einer Versuchsgruppe gepoolt, um eine höhere Gesamtmenge an Milzzellen für alle Analysen zur Verfügung zu haben. Da schon in den Vorversuchen unerwartet viele Peptidpools eine positive Reaktion induzierten, wurde in den nachfolgenden Versuchen die Größe der Peptidpools halbiert und damit die Anzahl verdoppelt, um eine bessere Auflösung für die Durchführung der späteren Epitopenkartierung zu erhalten (Abb. 2.5)..

In den nachfolgenden Abbildungen sind, für eine bessere Übersicht, die Gesamtpots für jedes der verwendeten HIV- bzw. SIV-Proteine der unterschiedlichen homologen und heterologen zwei- und dreifach Immunisierungen dargestellt (Abb. 3.14). Es ist zu erkennen, dass eine dramatische Immunogenitätssteigerung von den homologen hin zu den heterologen, vor allem den dreifach Immunisierungen, erzielt wurde. So konnten starke Immunogenitätssteigerungen um maximal das Zwanzigfache (Vergleich SIV Pol DNA-DNA vs. DNA-Ad-AAV) bzw. minimal das Vier- bis Fünffache (Vergleich SIV Gag DNA-DNA vs. DNA-AAV-Ad) erzielt werden. Es ist zu berücksichtigen, dass kein HIV Pol rAAV9-Vektor zur Verfügung stand. Darüber hinaus wird deutlich, dass die drei kleineren, akzessorischen Proteine Nef, Rev und Tat keine, oder eine sporadische und deutlich geringere zelluläre Immunantwort induziert haben. So

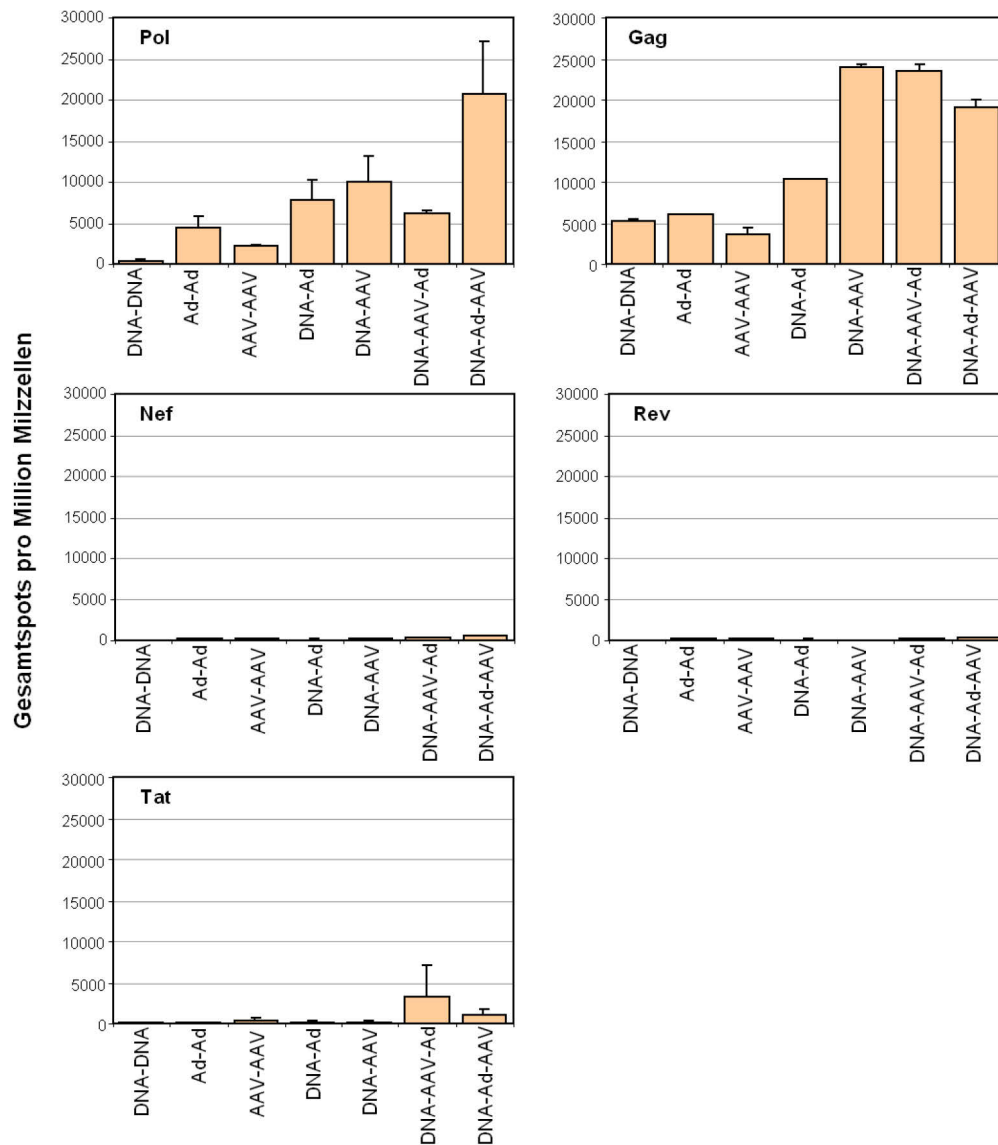
ist eine Reaktivität nur bei HIV Rev und SIV Tat, vorwiegend bei den heterologen Dreifachimmunisierungen, zu erkennen.

EliSpot: HIV-1 – Gesamtpots



3.14.1 Darstellung der kumulativen Ergebnisse der im EliSpot pro HIV Protein erzielten Gesamtpots der verschiedenen homologen und heterologen Immunisierungsreihen mit den GeneGun-, rAAV9- und rAd5-Vektoren. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Mittelwertberechnung wieder.

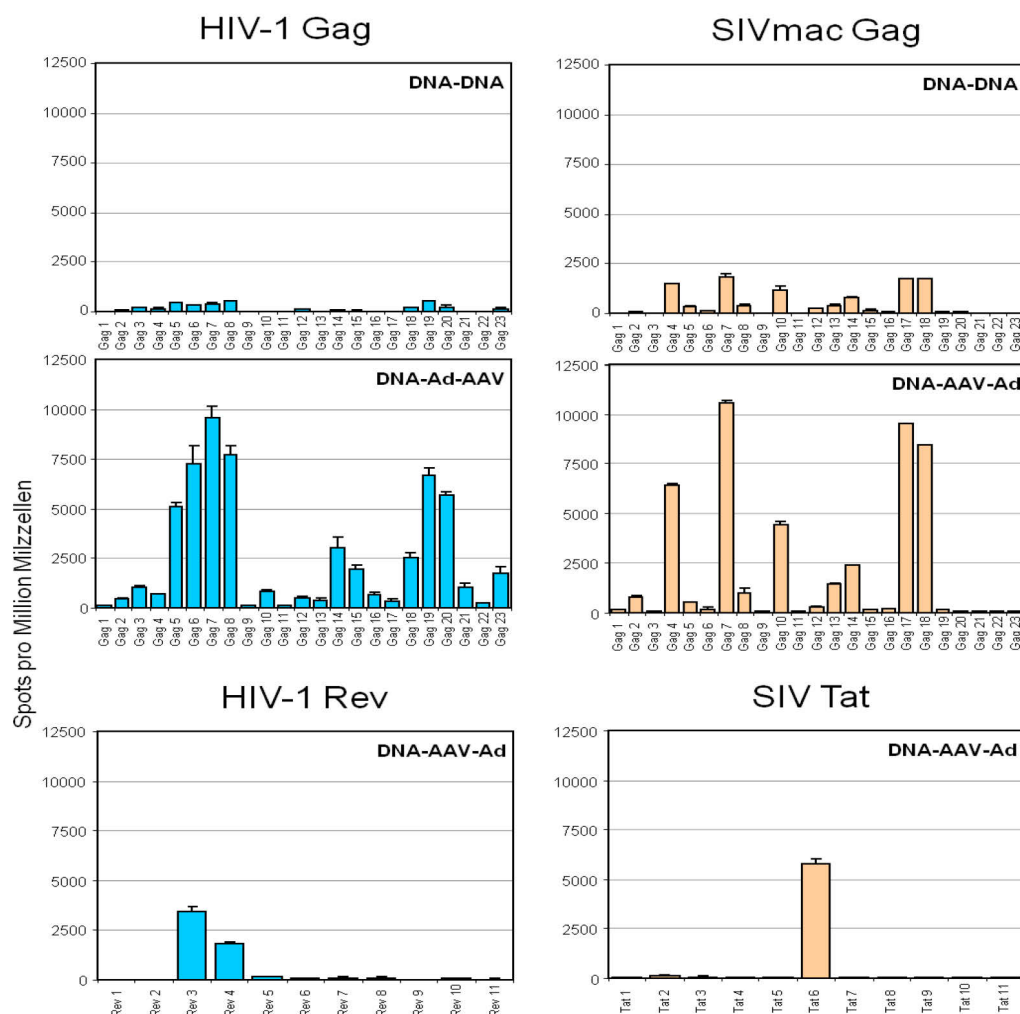
EliSpot: SIV – Gesamtspots



3.14.2 Darstellung der kumulativen Ergebnisse der im EliSpot pro SIV Protein erzielten Gesamtspots der verschiedenen homologen und heterologen Immunisierungsreihen mit den GeneGun-, rAAV9- und rAd5-Vektoren. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Mittelwertberechnung wieder.

Um die für die Immunreaktion verantwortlichen Einzelpeptide identifizieren zu können, werden die reaktiven Peptidpools mit der Peptidpoolmatrix verglichen, um möglicherweise reaktive Peptide identifizieren und testen zu können. Betrachtet man die Darstellung der Reaktivität der einzelnen Peptidpools einer Auswahl von Immunisierungen, fällt auf, dass sich die Reaktivitätsmuster für ein

Immungen stark ähneln, nur die Stärke der Reaktionen, abhängig vom Immunisierungsregime, deutlich differiert (Abb. 3.15, weitere Abbildungen im Anhang). Aufgrund der Zusammensetzung der Peptidpools sollten sich die Gesamtintensitäten in der linken bzw. rechten Hälfte eines jeweiligen Diagramms ähneln, da in der ersten und zweiten Hälfte der Peptidpools jeweils die gleichen Peptide, jedoch in einer anderen Komposition, vorhanden sind. Aus dieser Grundüberlegung ergibt sich, dass die dargestellten Ergebnisse für HIV-1 Rev und SIV Tat nicht erwartungsgemäß sind. Es sollte sich auf jeder Hälfte des Diagramms eine Reaktion erkennen lassen. Da dies nicht der Fall war, diese Art von positiver Reaktion aber in mehreren Immunisierungsreihen gleichermaßen beobachtet wurde, sollte trotzdem eine Epitopenkartierung durchgeführt werden. Da keine möglicherweise reaktiven Peptide vorher ausgewählt werden konnten, wurden alle Peptide getestet.



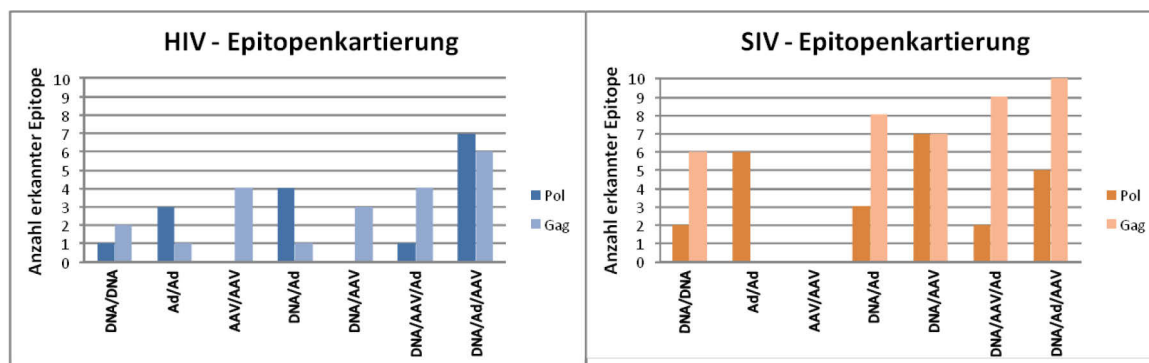
3.15 Darstellung der Peptidpool-spezifischen ELISpot Ergebnisse für eine Auswahl von HIV-1 und SIV Immunogenen und Immunisierungsregimen. Alle weiteren dazugehörigen Abbildungen sind

im Anhang dargestellt. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Doppelbestimmungen wieder.

Epitopenkartierung

Wie schon zuvor beschrieben, wurden mithilfe der Zusammenstellung positiver Peptidpools und der Poolmatrix möglicherweise reaktive Einzelpeptide identifiziert (Kap. 2.4.4). Aufgrund der überdurchschnittlich hohen Anzahl an reaktiven Peptidpools ergab sich ebenfalls eine relativ hohe Anzahl möglicher Einzelpeptide. Der experimentelle Zeitablauf machte es zudem notwendig, die restlichen Milzzellen zu kryokonservieren, bevor sie zur Durchführung der Epitopenkartierung benötigt wurden. Aufgrund von Schwankungen bei der Ausbeute der Milzzellpräparation, den vielen zu testenden Einzelpeptiden und dem durch die Kryokonservierung bedingten Verlust vitaler Zellen waren teilweise nicht genügend Milzzellen vorhanden. Im Fall der HIV DNA/AAV, HIV AAV/AAV Pol, sowie SIV AAV/AAV Pol und Gag Immunisierungsreihen waren leider keine Milzzellen für eine Epitopenkartierung verfügbar. Bei anderen Versuchsreihen waren teilweise so wenige Milzzellen vorhanden, dass die Zahl der pro Loch eingesetzten Zellen von 2×10^5 auf minimal 1×10^5 Milzzellen reduziert wurde.

Vergleicht man die Anzahl der erkannten Epitope für die verschiedenen Immunisierungsregime, so wird deutlich, dass auch hier die heterologen Dreifachimmunisierungen die größte Anzahl der Epitope induziert (Abb. 3.16; Peptidsequenzen im Anhang). Obwohl die gleichen positiven Peptidpools in HIV Rev und SIV Tat in verschiedenen Immunisierungsregimen beobachtet werden konnten, erbrachte die Testung aller einzelner HIV Rev bzw. SIV Tat Peptide keinerlei positives Resultat.



3.16 Anzahl der ermittelten reaktiven Peptidepitope in den HIV bzw. SIV Proteinen Gag und Pol, aufgeteilt nach den verschiedenen homologen und heterologen Immunisierungsregimen. Die Aminosäuresequenzen der reaktiven Peptide sind im Anhang aufgeführt. Im Fall der HIV

DNA/AAV und AAV/AAV Pol Immunisierung und SIV AAV/AAV Pol und Gag Epitopenkartierung waren leider nicht genügend Milzzellen verfügbar, um die Kartierung durchzuführen.

3.4.2 Untersuchung der induzierten humoralen Immunantwort

ELISA

Die gepoolten Seren der Mäuse einer Versuchsgruppe wurden mithilfe von ELISA auf das Vorhandensein von Antigen-spezifischen Antikörpern getestet und relativ quantifiziert. Als „Capture“-Antigen wurden verschiedene in *E. coli* rekombinant produzierte HIV und SIV Proteine, wie Gag, Rev, Nef und Tat, verwendet. Ein rekombinantes Pol-Protein stand nicht zur Verfügung. Außerdem wurden Lysate aus HIV pNL4.3 und SIVmac239 Viruspartikeln, in welchen vorwiegend prozessiertes Gag und Env vorkommt, als Antigen benutzt.

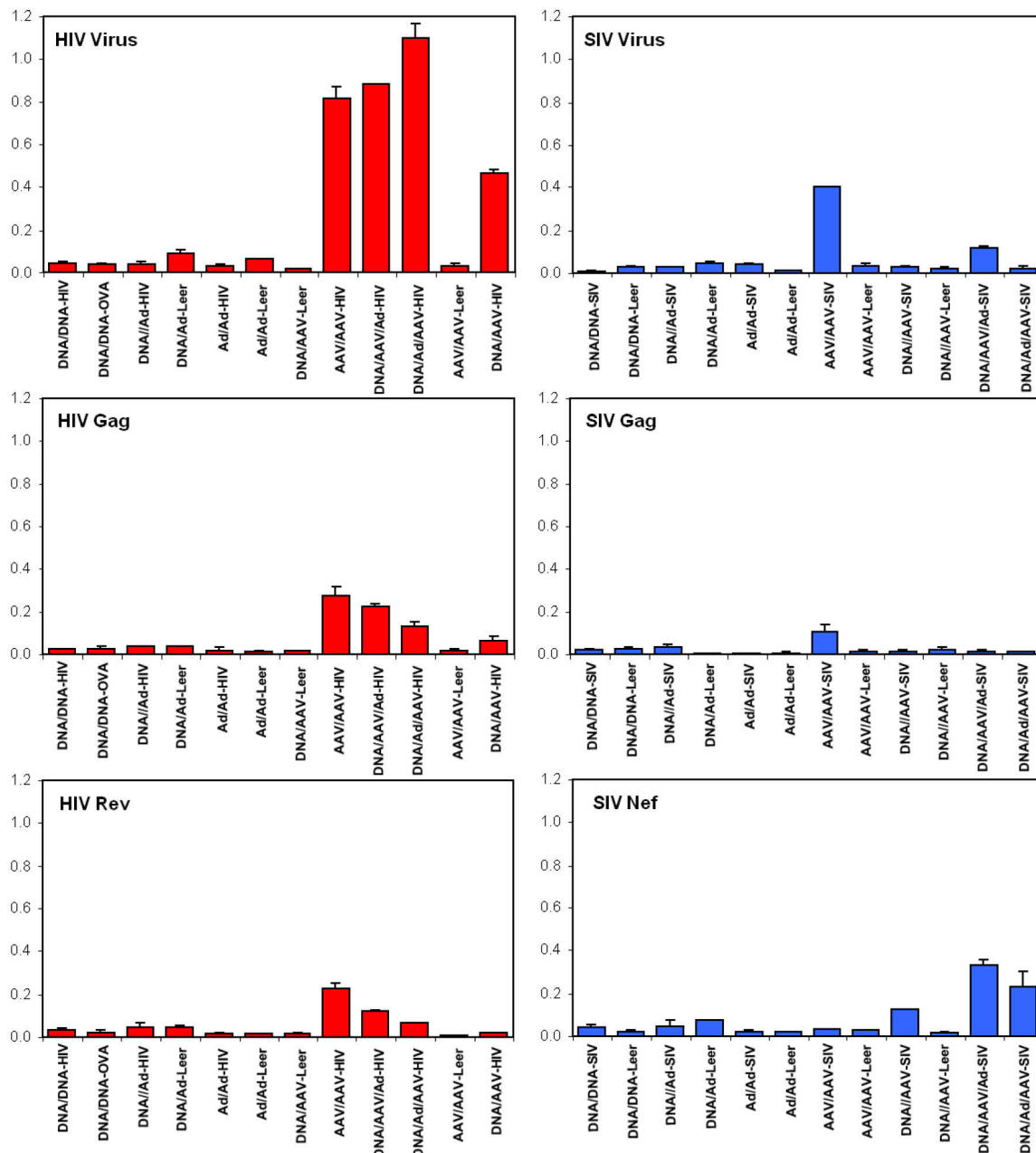


Abbildung 3.17 Ergebnisse der Untersuchung der humoralen Immunreaktion gegen verschiedene rekombinante und natürliche HIV- und SIV-Antigene. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Doppelbestimmungen wieder.

Aus der Abbildung wird deutlich, dass nur ein Teil der verschiedenen Immunisierungsregime in der Lage ist, eine deutliche humorale Immunreaktion zu induzieren (Abb. 3.17). Bei den HIV Gruppen sind immer die gleichen vier Gruppen mit einer Reaktion assoziiert. In allen diesen vier Gruppen wurden rAAV9-Vektoren verwendet. Auch in den SIV Gruppen ist dieser Zusammenhang zu beobachten, wenn auch weniger stark und konsistent. Gegen die restlichen

rekombinanten Proteine konnten keine humoralen Immunantworten gemessen werden (Daten siehe Anhang).

Western Blot

Da kein rekombinantes HIV bzw. SIV Pol aus *E. coli* verfügbar war, das Vorhandensein Pol-spezifischer Antikörper jedoch überprüft werden sollte, wurden HEK-293T-Zellen mit den entsprechenden Pol-Expressionsplasmiden transfiziert, um Antigen zu exprimieren und im Western Blot, mithilfe von den Immunseren, nachweisen zu können. Neben den mehreren Western Blots im SlotBlot-Format, auf Basis der HIV und SIV Pol-Antigene, wurden ebenfalls Viruslysate von HIV pNL4.3 und SIV 32H als Antigen im Western Blot verwendet.

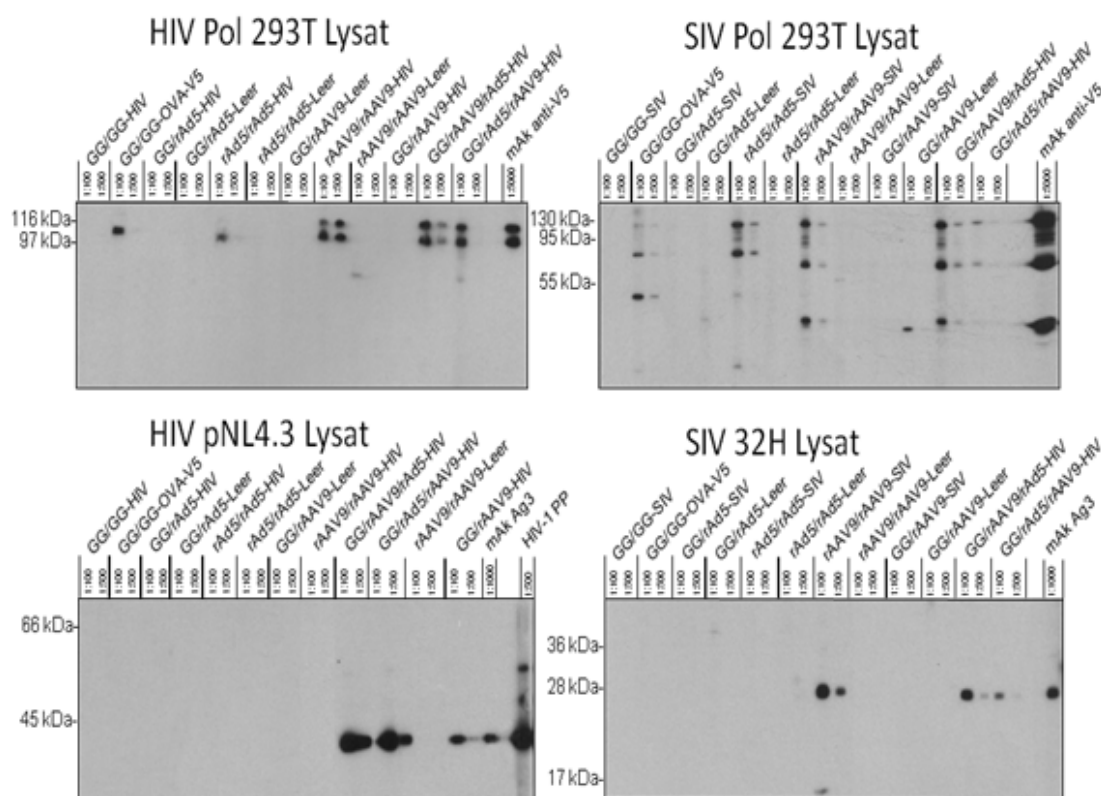


Abbildung 3.18 Ergebnisse der Western Blots mit HIV bzw. SIV Pol Antigen aus HEK293T-Zellen und Antigen aus HIV pNL4.3 und SIV 32H Viruslysate getestet gegen verschiedene Konzentrationen gepoolter Mauseren.

Aus den Abbildungen der Western Blots lässt sich erkennen, dass die Ergebnisse der Pol-spezifischen Western Blots die Ergebnisse des ELISAs mit dem rekombinanten Gag bzw. Viruslysate weitgehend widerspiegeln. Vorwiegend zeigen Gruppen, in deren Impfreime rAAV9-Vektoren enthalten waren, Anti-

körper gegen Pol. Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem ELISA scheinen auch die homologen Impfregimes mit den rAd5-Vektoren Antikörper gegen Pol, nicht jedoch gegen Gag induziert zu haben. Es fällt auf, dass die Seren der mit pTH-OVA-V5 immunisierten Mäuse ebenfalls Reaktivität gegen das produzierte Pol-V5 Antigen aufweisen. Um eine unspezifische Kreuzreaktivität von einer Spezifität der induzierten Antikörper gegen die in Immunogen und Western Blot Antigen enthaltene V5-Markierung unterscheiden zu können, wurden weitere Western Blots mit einem anderen Antigen durchgeführt, welches ebenfalls eine V5-Markierung enthielt. Mithilfe des PSA-V5 Proteins, das aus transfizierten HEK-293T-Zellen gewonnen wurde, wurden alle Mausseren, welche eine deutliche Reaktion gegen das Pol-V5 Lysat zeigten, erneut getestet. Hierbei zeigte sich, dass die Seren der mit OVA-V5 immunisierten Mäuse ebenfalls mit dem PSA-V5 Antigen reagierten. Eine Kreuzreaktivität konnte demnach ausgeschlossen werden, vielmehr schienen V5-spezifische Antikörper vorhanden zu sein. Einzig in den mit rAAV9/rAAV9-HIV Gag und RevNefTat immunisierten Mäusen konnten ebenfalls Antikörper gegen die V5-Markierung nachgewiesen werden. Alle anderen Immunisierungsregime haben keine Antikörper gegen die V5-Peptidsequenz induziert.

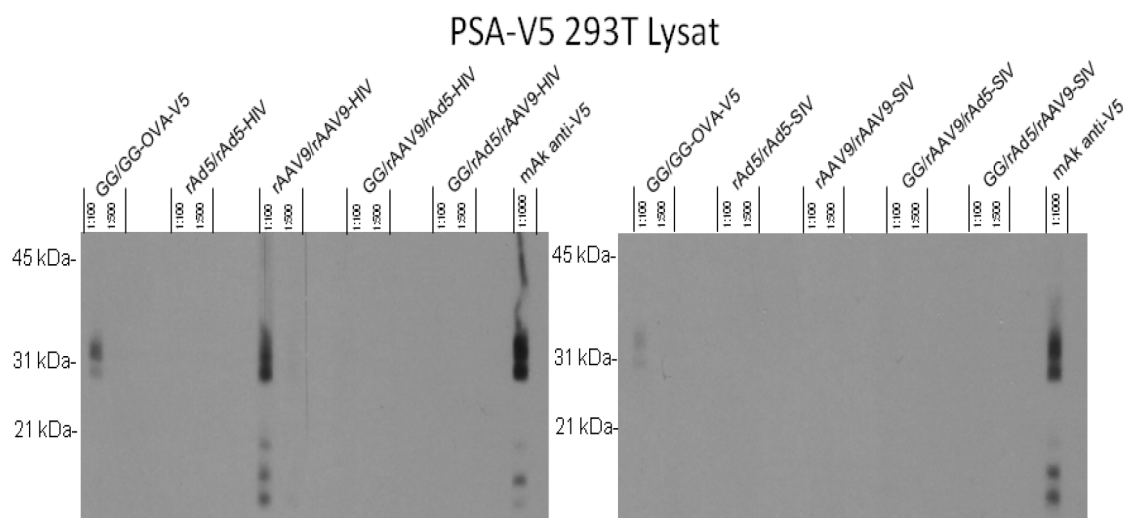


Abbildung 3.19 Ergebnisse der Western Blots mit PSA-V5 Antigen aus HEK293T-Zellen und gepoolter sowie positiv getesteter Mausseren.

3.5 In vivo Validierung der Zytotoxizität der induzierten Immunantwort

Zur Untersuchung der zytotoxischen Funktionalität und Stärke der induzierten zellulären Immunantwort *in vivo* wurden je zwei Mäuse mit dem optimalen HIV bzw. SIV DNA/rAd5/rAAV9 Impfregime immunisiert. 15 Tage nach dem zweiten Boost wurden den immunisierten Mäusen und je einer weiteren naiven Kontrollmaus unterschiedlich stark CFSE-gefärbte Antigen-markierte und -unmarkierte syngene Milzzellen intravenös gespritzt (Kap. 2.5.2). Die 12 Stunden später entnommenen Milzen wurden aufgearbeitet und mittels Durchflusszytometer analysiert (FACS Calibur, BD). Die erhaltenen Daten wurden mittels FlowJo Software analysiert und grafisch dargestellt (Abb. 3.20). Aus der Berechnung der prozentualen Antigen-spezifischen Zytotoxizität ergab sich nach 12 h ein Mittelwert von ~98 % für HIV (Gag Peptid #92) und ~88 % für SIV (Gag Peptid #72). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass diese relativ hohen Werte mit nur einem immundominanten Epitop erzielt wurden. Im Falle des HIVs konnten 12 weitere, in Bezug auf SIV sogar 14 weitere Epitope identifiziert werden, deren mögliches zytotoxisches Potential hier nicht berücksichtigt wurde.

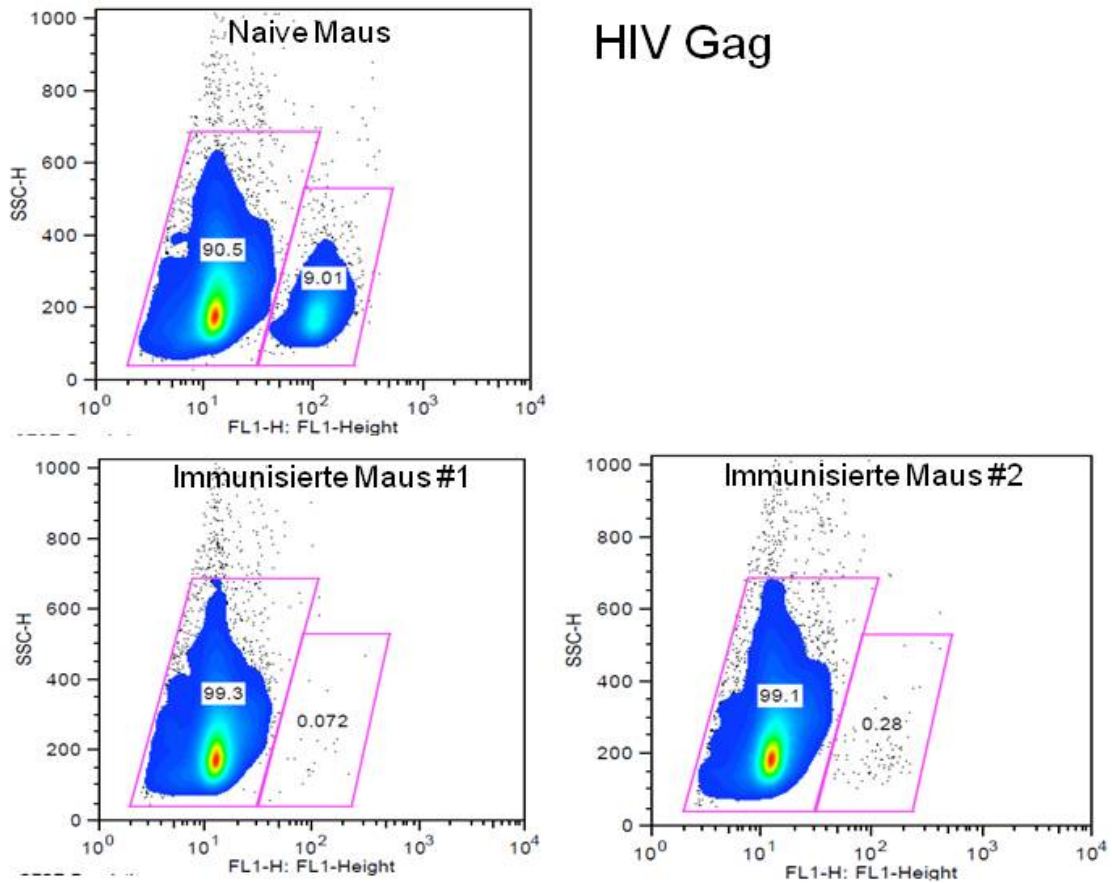


Abbildung 3.20.1 Darstellung des Density Blots der Ergebnisse der zytometrischen Analyse der Milzzellen aus naiven und immunisierten Mäusen, 12 h nach Injektion der unterschiedlich stark CFSE-gefärbten und HIV Gag Antigen-markierten (rechtes Gate) und –unmarkierten (linkes Gate) syngenen Milzzellen.

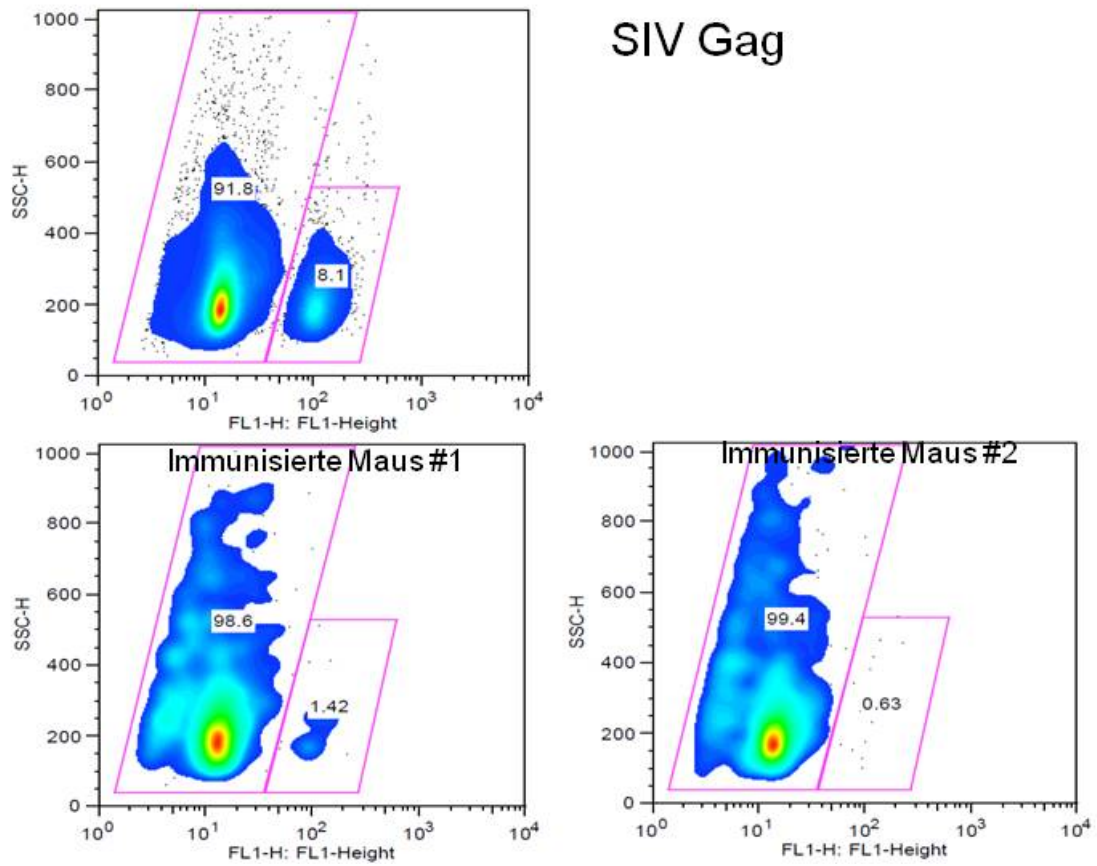


Abbildung 3.20.2 Darstellung des Density Blots der Ergebnisse der zytometrischen Analyse der Milzzellen aus naiven und immunisierten Mäusen, 12 h nach Injektion der unterschiedlich stark CFSE-gefärbten und SIV Gag Antigen-markierten (rechtes Gate) und –unmarkierten (linkes Gate) syngenen Milzzellen.

4 Diskussion

4.1 Auswahl und Optimierung der Antigene

Zu Beginn einer modernen Impfstoffentwicklung steht immer die Auswahl des Antigens bzw. der Antigene und der optimalen Verabreichungsform der entsprechenden Impfstoffe. In fast allen Fällen kann sich dabei auf Untersuchungen einer natürlich erworbenen Immunität nach überstandener Infektion oder Erfahrungen aus geeigneten Tiermodellen gestützt werden. Solch eine direkte Korrelation protektiver Mechanismen gegen eine HIV-1 Infektion oder AIDS-Erkrankung im Menschen ist bislang mangels dieser beiden Voraussetzungen leider diffus.

Wie schon erläutert weisen jedoch eine Reihe von Untersuchungen in hochgradig HIV exponierten, jedoch seronegativen Personen oder solchen, welche trotz Infektion eine außergewöhnlich geringe oder nicht vorhandene Krankheitsprogression aufweisen, auf eine vorrangige Rolle von virusspezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der Inhibierung einer Infektion oder dauerhaften Suppression der AIDS-Progression unter Feldbedingungen hin. Vergleichbare Beobachtungen, basierend auf dem bislang am besten geeigneten SIV/Makkaken-Modell, unterstützen diese Hypothese (Mudd and Watkins, 2011, Hersperger *et al.*, 2011, Kaul *et al.*, 2000, Kaul *et al.*, 2001b).

Als Antigene zur Induktion einer virusspezifischen zellulären Immunantwort steht eine Vielzahl von Virusproteinen zur Auswahl. Um eine möglichst breitwirkende und frühzeitige immunologische Erkennung zu ermöglichen, wurden mehrere verhältnismäßig gut konservierte und früh nach Infektion präsentierte bzw. exprimierte Proteine Gag, Pol, Rev, Nef und Tat als Antigene ausgewählt. Das Env-Protein wurde, aufgrund der Fokussierung auf eine zelluläre Immunantwort und relativ geringen Konservierung, als Antigen ausgeschlossen (Burton *et al.*, 2004, Gaschen *et al.*, 2002).

Trotz der besseren Konservierung stellt die hohe Virusdiversität ein beträchtliches Problem für die Entwicklung eines einzigen, gegen alle zirkulierenden Virusstämme wirksamen Impfstoffes dar. Aus diesem Grund wurde eine Konsensussequenz, basierend auf HIV-1 Untergruppe B, verwendet. Hiermit ist eine besonders gute Abdeckung aller Sequenzvariationen innerhalb dieser Untergruppe möglich (Nickle *et*

al., 2007). Für SIVmac ist die Verwendung einer Konsensussequenz aufgrund der relativ geringen Anzahl bekannter Virusvarianten leider nicht möglich gewesen, weshalb wir uns für die Verwendung der gebräuchlichsten Virusvariante, SIVmac239, entschieden haben.

Alle weiteren Sequenzmodifikationen, wie die Codonoptimierung zur Steigerung der Antigenexpression und die Inaktivierung enzymatisch aktiver Domänen, wurde bei den HIV-1 und SIVmac239 Konstrukte identisch durchgeführt, um eine optimale Vergleichbarkeit zu erzielen (Wang *et al.*, 2006, Leavitt *et al.*, 1993, Gao *et al.*, 2003, Loeb *et al.*, 1989). Für die DNA-Impfvektoren wurde zusätzlich ein GMCSF-Expressionsplasmid als genetischer Adjuvant zur Steigerung der Immunantwort und Fokussierung auf den zellulären Bereich verwendet (Qin *et al.*, 2007).

4.2 Produktion und *in vitro* Charakterisierung der Impfvektoren

Bei der anschließenden Produktion und *in vitro* Charakterisierung der auf den Antigen-Konstrukten basierenden DNA-, rAd5 und rAAV9 Impfvektoren wurden grundlegende technische und biologische Eigenschaften der verschiedenen Impfvektoren deutlich.

Wie schon erwähnt, haben genetische Plasmid-DNA Impfvektoren den Vorteil, mit relativ geringem technischem Aufwand in größerem Maßstab und in verhältnismäßig kurzer Zeit entwickelt, produziert und *in vitro* charakterisiert werden zu können. Diese Vorteile konnten bei der Herstellung der HIV und SIV DNA-Impfstoffe eindrucksvoll unter Beweis gestellt werden. So dauerte es nur eine Woche, bis aus den gelieferten vier Antigen-Konstrukten die jeweiligen DNA-Expressionsplasmide kloniert und in ausreichender Menge Plasmide verfügbar waren. Die produzierten Expressionsvektoren konnten nach erfolgreicher *in vitro* Expressionsuntersuchung direkt zur Herstellung von GeneGun-Munition verwendet werden. Nachdem die einwandfreie Funktion eines Teils der hergestellten GeneGun-Munition durch bioballistische Transfektion von Zellen in einem weiteren Zellkultur-Versuch bestätigt wurde, waren die GeneGun basierten DNA-Impfvektoren bereit für den Einsatz in Tierversuchen. Die Produktion, *in vitro* Charakterisierung und Quantifizierung der weiteren viralen, replikationsdefizienten rAd5 und rAAV9 Vektoren war, meist erwartungsgemäß, mit einem deutlich höheren technischen und zeitlichen Aufwand verbunden.

Die Herstellung der adenoviralen Impfvektoren lief, im Gegensatz zu den rAAV-Vektoren, ohne unerwartete Probleme ab. Nach der Virusamplifikation und –Quantifikation standen die rAd5-Impfvektoren in sehr großer Menge und ausreichender Reinheit für die Verwendung in den Immunisierungsstudien bereit (Luo *et al.*, 2007).

Die Produktion der rAAV9-Vektoren hingegen war aus mehreren Gründen weitaus problematischer, obwohl prinzipiell die Herstellung von rAAV-Vektoren in kürzerer Zeit als bei den rAd5-Vektoren möglich ist. Der erwähnte Nachteil von rAAV-Vektoren, die relativ geringe Verpackungskapazität von ungefähr 4,7 kB, führte zu Problemen bei der Produktion der viralen Impfvektoren (Dong *et al.*, 1996, Hermonat *et al.*, 1997). Die anfänglich konstruierten pAAV-Plasmide mit den vier, ungefähr 3 kB großen Impfkonstrukt-Sequenzen, wiesen jedoch eine höhere Verpackungsgröße von 5,5-6 kB auf. Zwei unabhängige Veröffentlichungen zeigten jedoch, dass trotz Überschreitung der natürlichen Verpackungskapazität eine effektive Produktion funktioneller rAAV-Vektoren möglich ist. Es wurde gezeigt, dass eine effektive Produktion von rAAVs der Serotypen 1-5 mit einer Verpackungsgröße bis 6 kB möglich ist. Einzig die Vektoren über 5,3 kB Verpackungsgröße wiesen eine um den Faktor 10 verringerte Transduktionseffizienz auf. Eine Beeinflussung der Verpackungseffizienz konnte nicht festgestellt werden (Grieger and Samulski, 2005). In einer späteren Veröffentlichung konnte die Produktion funktioneller rAAV-Vektoren des Serotyps 1-9 mit einer Genomgröße von bis zu 11,4 kB gezeigt werden. Gegensätzlich zu der Publikation von Grieger und Samulski von 2005 wurde hier jedoch eine ausgeprägtere und vor allem Serotyp-abhängige Reduktion der Verpackungseffizienz beobachtet. Die Transduktionseffizienz hingegen blieb von der Verpackungsgröße und dem Serotyp weitgehend unbeeinflusst (Allocca *et al.*, 2008). Unsere Ergebnisse aus der Produktion und Testung der 5,5-6 kB großen rAAV9-Vektoren widersprachen jedoch in jeder Hinsicht diesen beiden Studien und spiegelten damit die Ergebnisse früherer Untersuchungen wider. Trotz guter Antigenexpression der vier klonierten pAAV-Vektoren auf Plasmidbasis schlugen wiederholte Versuche der effizienten Produktion der entsprechenden rAAV9-Vektoren fehl. Der mittels quantitativer realtime PCR ermittelte Titer verpackter rAAV9-Genome war hierbei um den Faktor 100-1000, verglichen mit Vektoren von 4,1-4,6 kB Größe, verringert. Eine Antigenexpression konnte mittels Western Blots nicht bestätigt werden, einzig mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden wenige

transduzierte Zellen nachgewiesen. Ob dieser Effekt nur auf der drastisch verringerten Verpackungseffizienz beruht oder zusätzlich durch eine verringerte Transduktionseffizienz verstärkt wird, wurde nicht genauer untersucht.

Die, zur Verringerung der Genomgröße entwickelten halbierten pAAV-Vektoren lösten das Problem der Größenrestriktion bzw. Produktionseffizienz fast vollständig. Leider schlugen, trotz mehrfachen Wiederholungen, alle Versuche der Klonierung der halbierten pAAV-HIV Pol Vektoren fehl. Eine Neusynthese der verwendeten Primer bzw. Neuplanung des Primerdesigns wäre als Lösungsansatz in Frage gekommen. Aufgrund des Zeitmangels wurde auf die beiden rAAV9-Pol Impfvektoren für die nachfolgenden Immunisierungsstudien verzichtet.

Während der anschließenden Großproduktion der rAAV9-Vektoren wurde ein weiterer Produktionsnachteil offensichtlich. Während zur Produktion einer ausreichenden Menge rAd5-Vektoren nur wenige hundert Quadratzentimeter Zellkulturfläche benötigt wurden, war die benötigte Fläche bei den rAAV9-Vektoren um mehr als das Zwanzig- bis Dreißigfache höher. Aufgrund dieser Tatsache und der beschränkten Produktionskapazität war es trotz sequentieller Produktion mehrerer Viruschargen teilweise nicht möglich, die benötigte Anzahl Impfdosen zu erhalten. Leider gibt es für rAAV Immunisierungen keine direkten Dosis-Wirkungs-Untersuchungen. In anderen Immunisierungsstudien wurden teilweise deutlich höhere oder geringere Impfdosen eingesetzt. Darüber hinaus kann bei der relativ hohen Impfdosis von 1×10^{10} DRP pro Tier angenommen werden, dass ein Sättigungsbereich erreicht ist. Daher wurden die Impfdosen eines Teiles der Impfvektoren maximal um den Faktor 9 reduziert.

Die drei verschiedenen Vektorsysteme weisen in Bezug auf ihre *in vitro* Expressionsstärke, Expressionskinetik und die Transduktionseffizienz weitgehend ähnliche Charakteristika auf. Lediglich die Kinetik der Antigenexpression der rAAV9-Vektoren ist aufgrund der Verwendung monomerischer rAAVs und der damit notwendigen Doppelstrangsynthese deutlich verzögert. Durch Koinfektion mit Adenovirus Helferviren wurde dieser Prozess deutlich beschleunigt und eine starke Antigenexpression ließ sich bereits drei Tage nach Infektion beobachten (Ferrari *et al.*, 1996).

4.3 In vivo Immunogenitätsstudien

Nach Fertigstellung der verfügbaren Impfvektoren wurde in einem Vorversuch die generelle Immunogenität der verwendeten Antigene sowie eine mögliche Induktion von Immundominanzeffekten bei einer Kombinationsimpfung, überprüft. Die Mäuse einer Versuchsgruppe zeigten ein homogenes Reaktivitätsprofil in Bezug auf die im INF- γ EliSpot positiv getesteten Peptidpools. Bei Betrachtung der Ergebnisse der Kombinationsimmunisierungen fällt auf, dass die verschiedenen Mäuse einer Versuchsgruppe unterschiedlich starke zelluläre Immunantworten entwickeln. Dieser Trend einer Hierarchie in der Stärke der Impfreaktion war jedoch nur für einen der beiden verwendeten Impfvektoren innerhalb eines Versuchstieres zu beobachten. Interindividuelle Unterschiede der Stärke der Impfreaktion zwischen den Versuchsmäusen sind deshalb unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, dass Unterschiede in der Beschichtung der GeneGun-Munition zu diesem Effekt geführt haben.

Die relativ schwache Immunogenität des SIV Pol Vektors, verglichen mit den anderen Antigenen, ließ sich durch Herstellung neuer Munition deutlich steigern, die Ursache ist demzufolge ebenfalls auf Schwierigkeiten bei der Produktion der Munition zurückzuführen.

Immundominanzeffekte, die zur Ausbildung einer Hierarchie in der Stärke der induzierten zellulären Immunantwort führen, sind bei Immunisierungen ein häufig beobachtetes Problem (Balazs *et al.*, 2012). Eine Ursache für diesen Effekt liegt in der aktiven Suppression subdominanter CD8⁺ T-Zell Antworten durch dominante CD8⁺ T-Zell Antworten (Rodriguez *et al.*, 2002). Eine weitere Hypothese zur Erklärung dieses Effektes ist die passive Konkurrenz von CD8⁺ T-Zellen, um eine begrenzte lokale Anzahl an Antigen präsentierenden Zellen. Um diesen lokalen Effekt bei der Verwendung mehrerer einzelner Antigene zu umgehen oder zu vermindern, können die unterschiedlichen Antigene gleichzeitig an verschiedenen Körperstellen oder in mehreren Tagen Abstand an der gleichen Stelle appliziert werden. Ein solch sequentielles Immunisierungsschema wäre jedoch in Hinsicht auf die erste Hypothese denkbar ungünstig. Aufgrund der geringen Hautoberfläche der Versuchsmäuse und vergleichsweise großen Fläche der einzelnen Applikationsstellen ist eine deutliche räumliche Abgrenzung der Applikationsorte nicht möglich. Trotz dieses Umstandes und der Verwendung von zwei verhältnismäßig großen für

viele CTL-Epitope kodierenden Antigen-Konstrukten ließ sich keine Zunahme an Immundominanzeffekten bei den Kombinationsimmunisierungen beobachten. Im Gegensatz dazu konnte sogar der Trend einer Steigerung der Immunogenität beobachtet werden. Es kommen mehrere mögliche Erklärungen für diese unerwartete Beobachtung in Frage. So könnte die gesteigerte Menge an GMCSF Adjuvanz durch die verdoppelte Dosis an GMCSF-Expressionsplasmiden eine mögliche Erklärung darstellen. Die durch die verdoppelte Plasmidmenge ebenfalls gesteigerte Menge an unmethylierten CpG-Motiven könnte ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Immunogenität genommen haben. CpG-Motive stellen Pathogen-assoziierte molekulare Muster dar und interagieren mit dem Toll-like Rezeptor 9. Der Adjuvanzeffekt beruht auf der Steigerung der Expression von T-Helfer Typ 1, proinflammatorischen Zytokinen und Induktion der Reifung und Aktivierung professioneller Antigen präsentierender Zellen (Lewis *et al.*, 2002). Eine gesteigerte unspezifische Inflammation aufgrund der durch die Transfektion großflächig penetrierten Hautoberfläche könnte ebenfalls verstärkend gewirkt haben.

Nach diesen Voruntersuchungen wurde mit der Durchführung der eigentlichen verschiedenen, homologen und heterologen Immunisierungsstudien begonnen. Erwartungsgemäß induzierten die homologen GeneGun Immunisierungen die vergleichsweise schwächsten zellulären Immunantworten, die Anzahl der erkannten T-Zell Epitope war dabei ebenfalls relativ begrenzt. Die homologen Immunisierungen mit den rAAV9 und rAd5 Vektoren erbrachten vergleichbare Ergebnisse. Durch Verwendung heterologer Immunisierungsregime, im Besonderen der dreifach Immunisierungen, konnte hingegen eine drastische Steigerung der induzierten Immunantworten und der Anzahl erkannter Epitope erreicht werden. So war es möglich, die Anzahl reaktiver, Antigen-spezifischer T-Zellen um das Vier- bis Zwanzigfache zu steigern. Eine deutliche zwei- bis vierfache Steigerung der Anzahl der erkannten Epitope konnte ebenfalls mithilfe der dreifach Immunisierungen erzielt werden. Die hervorragende Immunogenität solcher, auf DNA-, rAd- und rAAV-Vektoren basierender Dreifachimmunisierung wurde kürzlich ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe gegen das EBV LMP2-Protein in Mäusen berichtet (Wang *et al.*, 2011). Die von uns induzierten zellulären Immunantworten mit bis zu annähernd 30000 reaktiven T-Zellen pro Million Splenozyten und bis zu 15 reaktiven Epitopen im Pol und Gag Antigen waren deutlich höher als erwartet. Die Stärke und

Epitopenvielfalt der gemessenen Immunantwort lag deutlich über der in anderen erfolgreichen Immunisierung- und Belastungsversuchen mit Influenza, LCMV, SARS oder Tumorzellen detektierten zellulären Immunantworten (Sipo *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2008b, Shedlock *et al.*, 2011, Nieto *et al.*, 2009).

Leider gelang es nicht, zuverlässige zelluläre Immunantworten gegen die verhältnismäßig kleinen, akzessorischen Rev, Nef und Tat Proteine zu induzieren. Es ist bekannt, dass eine vorhandene subdominante CTL-Antwort durch die gleichzeitige Induktion einer weiteren dominanten CTL-Antwort drastisch supprimiert werden kann. Ein Zusammenspiel verschiedener komplexer Vorgänge während der Prozessierung und Präsentation der antigenen Fusionsproteine als MHC-I-Peptid-Komplexe sind verantwortlich für diesen Dominanzeffekt (Esser *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 1992, Li *et al.*, 1992, Kim *et al.*, 2011, Kulkarni *et al.*, 2011). Die gleichzeitige Expression des RevNefTatGag-Fusionsantigens und die damit verbundene Prozessierung und Präsentation immundominanter Gag-Peptide könnte zur Suppression einer vorhandenen, Rev-, Nef oder Tat-spezifischen CTL-Antwort geführt haben.

Das sporadische, untypische Auftreten von T-Zell Antworten gegen bestimmte Peptidpools, jedoch gegen keines der entsprechenden Einzelpeptide, konnte leider aufgrund des Mangels an weiteren, dafür notwendigen Splenozyten nicht weiter untersucht werden. Zur weiteren Untersuchung dieses sporadischen Auftretens wäre eine erneute Durchführung dieser Immunisierungsreihen notwendig. Eine Neukonstruktion der GeneGun- und rAd5 Impfvektoren zur Trennung des immundominanten Gag-Antigens von den drei andern Antigenen in verschiedenen Vektoren könnte möglicherweise das Problem der Immundominanz umgehen und zur Induktion einer Rev-, Nef- oder Tat-spezifischen zellulären Immunantwort führen.

Parallel zu diesen zellulären Immunogenitätsstudien wurde ebenfalls die Induktion von spezifischen Antikörpern untersucht. Hierbei zeigte ein Teil der mittels ELISA untersuchten Antiseren einen teilweise relativ hohen anti-Gag Antikörpertiter. Antikörper gegen HIV Rev und SIV Nef konnten ebenfalls detektiert werden, wohingegen ein Pol-Antigen zur Verwendung im ELISA leider nicht verfügbar war. Mithilfe von Western Blots war es jedoch möglich, ebenfalls Pol-spezifische Antikörper nachzuweisen und die Ergebnisse aus dem Gag-ELISA zu bestätigen. Es zeigt sich ein Trend der gesteigerten Antikörperinduktion in Immunisierungsregimen, welche rAAV9-Vektoren beinhalten. Eine Steigerung der humoralen Immunantwort

durch Verwendung heterologer zweifacher oder dreifacher Immunisierungen lässt sich bei diesen Untersuchungen nicht erkennen. Zwei der wenigen veröffentlichten rAAV9 basierten HPV-Immunisierungsstudien in Mäusen und Makkaken stützen diese Beobachtung. Vor allem rAAV9-Vektoren waren dort in der Lage, eine starke und langanhaltende humorale und auch zelluläre Immunantwort zu induzieren und einen robusten Schutz im Belastungsmodell zu erzielen (Nieto *et al.*, 2012, Nieto *et al.*, 2009).

4.4 In vivo Zytotoxizitätsstudien

Obwohl der INF- γ EliSpot eine Standardmethode in der Quantifizierung und Charakterisierung zellulärer Immunantworten darstellt, steht die Expression von INF- γ nicht direkt im Zusammenhang mit deren zytotoxischen Potential (Streeck *et al.*, 2009). Aus verschiedenen Beobachtungen von HIV-Patienten mit einer natürlich kontrollierten Infektion (EC oder LTNP) lässt sich vielmehr eine Korrelation mit der gleichzeitigen Expression verschiedener Marker, wie INF- γ , IL-2, TNF α , CD107a oder MIP-1 β , ableiten (Betts *et al.*, 2006, Ferre *et al.*, 2009, Almeida *et al.*, 2009, Mkhwanazi *et al.*, 2010). Kürzlich gelang es, ein direkt mit der Zytolyse assoziiertes Protein mit dem CTL-Profil in diesen Personen zu korrelieren. Mithilfe eines neuen Antikörpers könnte hier erstmals die Expression von *de novo* synthetisiertem Perforin mit der Kontrolle der HIV-Infektion assoziiert werden (Hersperger *et al.*, 2010, Makedonas *et al.*, 2009).

Ausgehend von diesem multifaktoriellen Hintergrund und den bereits erwähnten Beobachtungen zweier verschiedener Arbeitsgruppen, in denen rAAV-Vektoren eine aberrante, funktionell gestörte zelluläre Immunantwort induziert hatten (Lin *et al.*, 2007a, Lin *et al.*, 2007b), sollte das zytotoxische Potential und damit die Funktionalität der induzierten Immunantwort in einem direkten *in vivo* Tierversuch evaluiert werden. Der *in vivo* Zytotoxizitätstest stellt derzeit die beste und unmittelbarste Möglichkeit des Nachweises des zytotoxischen CTL bzw. ADCC Potentials dar, wobei Belastungsversuche in einem optimal geeigneten Tiermodell ausgenommen werden müssen (Hermans *et al.*, 2004, Ingulli, 2007). Für diesen Versuch wurden zwei Tiergruppen mit einem der immunogensten HIV- bzw. SIV- Impfregeime, bestehend aus GeneGun-, rAd5- und rAAV9-Vektoren, immunisiert. 15 Tage nach der letzten Immunisierung wurden diese Tiere und unimmunisierte Kontrolltiere

syngene, mit antigenem Peptid markierte oder unmarkierte und mittels CFSE-Farbstoff gefärbte Splenozyten intravenös injiziert. Als Ziel für die zytotoxischen T-Zellen wurde je eins der immundominanten HIV bzw. SIV Gag-Peptide verwendet. Als Inkubationszeitraum wurden zwölf Stunden gewählt, da dies, wie schon erwähnt, der Zeitspanne gleicht, in der nach HIV Infektion einer T-Helferzelle die immun-supprimierende Funktion des Nef-Proteins einsetzt (Althaus and De Boer, 2011, Collins *et al.*, 1998).

Die Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine deutliche zytolytische Aktivität. Nach zwölf Stunden wurden 88 % (SIV Gag #78) bis 98 % (HIV Gag #92) der mit antigenem Peptid-markierten Splenozyten entfernt. Es sind uns bislang keine weiteren Immunisierungsstudien bekannt, welche eine vergleichbar starke zytolytische Aktivität in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest induzieren konnten. Hingegen besteht eine große Ähnlichkeit zu Resultaten aus Mausstudien mit kontrollierten, chronischen oder transienten Virusinfektionen, wie LCMV oder Polyomavirus (Barchet *et al.*, 2000, Byers *et al.*, 2003, Ganusov *et al.*, 2010). Die Beobachtung, dass in Polyomavirus infizierten Mäusen der CTL-induzierte Schutz vor Tumorgenese nicht perforinabhängig ist, unterstreicht die Relevanz solcher direkter *in vivo* Untersuchungen mangels verlässlicher Marker zusätzlich (Byers *et al.*, 2007). Bei der Bewertung der erzielten Zytotoxizität ist zu berücksichtigen, dass nur je ein immundominantes Gag-Peptid als Antigen eingesetzt wurde und nicht zwangsläufig eine Korrelation zwischen dieser Immundominanz und dem zytotoxischen Potential dieser CTL-Population besteht. So ist es möglich, dass ein noch größeres zytotoxisches Potential in einer der anderen epitopenspezifischen CTL-Populationen vorhanden ist. In Anbetracht der bis zu 14 weiteren erkannten CTL-Epitope wäre bei Kombination aller Epitope ein starker synergistischer Effekt und damit eine weitere Steigerung des zytotoxischen Potentials zu erwarten.

4.5 Ausblick

In der vorgestellten Arbeit wurden erstmals verschiedene vielversprechende, genetische Immunisierungsvektoren und Optimierungsstrategien kombiniert und parallel für mehrere vergleichbare HIV und SIV Antigene, in Hinblick auf deren zelluläre und humorale Immunogenität und des Zytotoxizitätspotentials, vergleichend evaluiert. Diese Studie stellt einen der wenigen, auf rAAV9 Vektoren basierten,

Immunisierungsversuche dar und es konnten erstmals die hervorragenden Eigenschaften dieses neuartigen, optimierten dreifachen genetischen Immunisierungsregimes in Mäusen demonstriert werden.

Zu Beginn dieser Arbeit waren lediglich erfolgreiche Immunisierungsstudien auf Basis des SHIV/Makkaken-Modell veröffentlicht (Shiver *et al.*, 2002, Shiver and Emini, 2004, Amara *et al.*, 2001, Barouch *et al.*, 2001). Die mangelhafte Eignung des SHIV-Modells und fehlende Korrelation solcher Ergebnisse in Bezug auf die Situation in Menschen wurde spätestens mit dem Scheitern der Merck STEP-Studie offensichtlich (Watkins *et al.*, 2008, Nishimura *et al.*, 2004, Feinberg and Moore, 2002). Untersuchungen, unter Verwendung des adäquateren SIV/Makkaken-Modells erbrachten hingegen bislang leider nur sehr limitierte Resultate, ein protektiver Effekt in Bezug auf eine dauerhafte Viruskontrolle oder Reduktion der AIDS-bedingten Mortalität konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht gezeigt werden (Casimiro *et al.*, 2005, Matano *et al.*, 2004, Ourmanov *et al.*, 2000, Egan *et al.*, 2000).

Während der Anfertigung dieser Arbeit wurden erstmals mehrere vielversprechende Studien im SIV/Makkaken-Modell publiziert. In all diesen Untersuchungen wurden vorwiegend multigene und heterologe Immunisierungsregime, meist bestehend aus DNA-Vektoren, gefolgt von einem replikationsdefizienten viralen Vektor, verwendet. Obwohl erwartungsgemäß in keinem dieser Versuche eine vollständige Sterilität erzielt wurde, konnte eine deutliche Reduktion der Viruslast während der akuten und chronischen Phase der SIV-Infektion, Präservierung der CD4+ T-Zell Population und damit eine eindrucksvolle Reduktion der Krankheitsprogression und Mortalität induziert werden (Wilson *et al.*, 2009). Mithilfe eines heterologen rAd26/rAd5 Immunisierungsregimes, in welchem nur SIVmac239-Gag als Antigen enthalten war, konnte ebenfalls ein vergleichbarer Schutz in Mamu-A*01 und –B*27 negativen Makkaken sogar nach heterologer, hochdosierter intravenöser Belastung beobachtet werden. Alle anderen getesteten homologen und heterologen rAd-Vektor-kombinationen hingegen erbrachten deutlich schlechtere Resultate (Liu *et al.*, 2009). Eine noch stärkere und dauerhafte Reduktion der Viruslast unter die Detektionsgrenze konnte infolge einer mukosalen, genetisch adjuvantierten Immunisierung mit DNA und rMVA Immunisierungsvektoren gezeigt werden (Manrique *et al.*, 2011). Durch zusätzliche Verwendung eines Env-Antigens konnte, neben dauerhafter Kontrolle der Virusreplikation, sogar eine um 80 % gesteigerte Resistenz vor SIV-Infektion nach rektaler Belastung erzielt werden. Erstmals konnte ein Resistenzeffekt

gegen ein neutralisationsresistentes SIVmac251 Belastungsvirus beobachtet und mit der Anwesenheit Env-spezifischer Antikörper korreliert werden. Diese antikörpervermittelte Resistenz gegen ein neutralisationsresistentes SIVmac251 Belastungsvirus deutet auf eine dominante Rolle von ADCC für diesen Effekt hin (Barouch *et al.*, 2012). In den erwähnten Studien konnte der induzierte zelluläre Schutzeffekt vorwiegend mit einer starken, polyfunktionalen CD8⁺ T-Zell-Antwort gegen eine Vielzahl von Epitopen in Verbindung gebracht werden. Eine erhöhte Ansteckungsresistenz war hingegen mit der Anwesenheit Env-spezifischer Antikörper und einer messbaren ADCC Aktivität verbunden.

Neben diesen ermutigenden Ergebnissen, die auf replikationsdefizienten Vektoren beruhen, wurden ebenfalls erfolgreiche Studien auf Basis eines replikationskompetenten Rhesus CMV-Vektors veröffentlicht. Neben einer erhöhten Resistenz vor einer SIV-Infektion nach niedrigdosierten, wiederholten mukosalen Belastungen (Hansen *et al.*, 2009) konnte in einer weiterführenden Studie eine frühe und dauerhafte Kontrolle der Virusreplikation bis unter die Nachweisgrenze in der Hälfte der immunisierten Makkaken erzielt werden. Die Abnahme der anamnestic Immunantwort bis hin zu deren vollständigem Verlust, als auch der fehlende Anstieg der Viruslast infolge einer transienten CD8⁺ T-Zell Depletion, deuten möglicherweise erstmals auf eine vollständige Beseitigung des Virusreservoirs hin. Die hier beobachtete Viruskontrolle konnte mit einer langanhaltenden, starken und breiten CD8⁺ T_{EM}-Antwort assoziiert werden (Hansen *et al.*, 2011).

Diese Resultate zeigen eindrucksvoll die Bedeutung der optimalen Kombination heterologer genetischer Immunisierungsvektoren, der Verwendung mehrerer Antigene als auch der mukosalen Belastungs- sowie Immunisierungsrouten für die beobachteten Immunisierungseffekte. Darüber hinaus wird das Potential und die Notwendigkeit der Synergie aus zellulärer und humoraler Immunität, auch in Abwesenheit neutralisierender Antikörper, für einen Schutz vor Ansteckung und Krankheitsprogression deutlich. Obwohl die klinische Wirksamkeit solcher Impfregime noch zu beweisen ist und die Verwendung replikationskompetenter viraler Vektoren im Menschen aufgrund von Sicherheitsbedenken ungewiss ist, könnten diese Ergebnisse einen wichtigen Schritt auf dem Weg der Entwicklung eines wirksamen HIV-Impfstoffes darstellen.

In Hinblick auf diese Fortschritte und den daraus folgenden Implikationen stellt das in dieser Arbeit erstmals in Mäusen evaluierte heterologe, multigene DNA/rAd5/rAAV9

Immunisierungsregime ein neues, vielversprechendes Konzept zur Steigerung der bislang mit replikationsdefizienten Vektoren erzielten zellulären Immunogenität dar. Untersuchungen zu dem Vergleich der Immunogenität von genetischen Impfstoffen in Mäusen und Makkaken zeigen eine deutliche Korrelation der erzielten Resultate in Bezug auf Immunogenitätshierarchie und Phänotyp der induzierten Immunantwort (Kulkarni *et al.*, 2011, Arrode-Bruses *et al.*, 2012, Dupuy *et al.*, 2011, Nanda *et al.*, 2005). Dies gibt Grund zu der Hoffnung, dass sich die hervorragenden Eigenschaften dieses heterologen, dreifachen Immunisierungsregimes ebenfalls auf Makkaken übertragen ließen. Sollte dies möglich sein, könnte eine vergleichende Untersuchung der Effizienz dieses Konzeptes im SIV/Makkaken-Belastungsmodell und eine umfassende phänotypische Analyse der induzierten Immunantworten ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden protektiven Mechanismen ermöglichen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse könnten einen weiteren Schritt in der Entwicklung eines wirksamen und sicheren HIV-Impfstoffes darstellen.

5 Zusammenfassung

Die HIV-1 Infektion, und die damit verbundene AIDS-Erkrankung stellt seit der Pest die größte pandemische Gesundheitsbedrohung der Menschheit dar. Obwohl diese schon seit fast 30 Jahren bekannt und seitdem im Fokus der Impfstoffentwicklung ist, konnte bislang kein wirksamer Impfstoff entwickelt werden. Der vorherrschende wissenschaftliche Optimismus nach der Identifikation des Auslösers des erworbenen Immundefizienzsyndroms in Bezug auf die schnelle Entwicklung eines wirksamen Impfstoffes fand nach ungefähr einer Dekade des Scheiterns klassischer Impfstoffkonzepte ein ernüchterndes Ende. Infolge dieser Problematik und grundlegenden wissenschaftlichen Fortschritten wurden vielfältige neuartige Immunisierungsstrategien, hauptsächlich auf Basis rekombinanter Proteine und genetischer Impfstoffe, entwickelt und in unzähligen präklinischen und klinischen Studien getestet. Leider spiegelt sich die einzigartige Natur und Pathologie von HIV-1 auch hier in großen Hürden bei der Entwicklung eines effektiven modernen Impfstoffes wider. Die fehlende Kenntnis immunologisch protektiver Mechanismen, die außerordentlich hohe Virusdiversität, die rapide Entwicklung latenter Virusreservoirs sowie von Fluchtmutanten infolge immunologischen Selektionsdruck, die virusbedingte Modulation wichtiger immunologischer Funktionen, die gezielte Infektion und Depletion der für die adaptive Immunantwort essentiellen T-Helferzellen sowie die Probleme der Induktion und Effektivität neutralisierender Antikörper stellen in dieser Kombination und Komplexität eine bislang nie dagewesene Herausforderung dar. Mithilfe der, seit ungefähr Mitte der neunziger Jahre in Tiermodellen durchgeführten genetischen Immunisierung konnten bislang auf Basis von HIV oder anderer Virus- bzw. Tumorerkrankungen zum Teil sehr vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Die gewonnenen Erfahrungen aus diesen Tierstudien und Untersuchungen von Personen mit einer ausgeprägten Resistenz vor HIV-Infektion oder AIDS-Progression stärkten die Bedeutung einer virusspezifischen, zellulären Immunantwort vorrangig zytotoxischer T-Zellen, nachhaltig. Infolge dessen wurden eine Vielzahl genetischer Immunisierungsvektoren und -regime entwickelt und getestet. Mit den zunehmenden Fortschritten wurden Probleme bei der Übertragung von in Tiermodellen erzielten Ergebnissen auf klinische Studien in Menschen deutlich. So wurden um HIV-Impfstoffe direkt im Makkaken-Belastungsmodell testen

zu können, chimäre SHIV-Belastungsviren entwickelt und in Effizienzstudien verwendet. Die mangelhafte Aussagekraft der Ergebnisse des SHIV-Makkaken Modells gipfelte letztendlich in dem vorzeitigem Abbruch einer darauf initiierten großen klinischen Effizienzstudie. Darüber hinaus wurden in dieser und weiteren klinischen Studien Schwierigkeiten in Bezug auf die vergleichsweise geringe Immunogenität der verwendeten Impfstoffe deutlich. Als mögliche Ursache für diese Unterschiede kommen vorrangig eine präexistente Vektorimmunität und Schwierigkeiten bei der Skalierbarkeit von genetischen, vor allem DNA-basierten Impf- bzw. Applikationsmethoden in Frage. Die hohe genetische Heterogenität menschlicher Probanden, insbesondere in Bezug auf den HLA-Haplotypen, ist ein weiterer Faktor, der erst neuerdings verstärkt bei der Durchführung von Makkaken-Studien berücksichtigt wird.

Mithilfe der Erfahrungen aus den unzähligen Publikationen zu dem Thema HIV-Impfstoffe in den letzten Jahrzehnten und den damit verbundenen Problemen haben wir versucht, eine rationale Immunisierungsstrategie zu entwickeln, um einen möglichst großen Teil dieser Problematik zu berücksichtigen. Hierfür wurde ein multigenes, multivektorielles genetisches Immunisierungsregime, basierend auf DNA GeneGun-Vektoren, rekombinanten Adenoviren des Serotyps 5 und rekombinanten Adeno assoziierten Viren des Pseudotyps 9 entwickelt. Obwohl bekannt ist, dass heterologe Immunisierungsregime die Immunogenität deutlich steigern können, einer Vektorimmunität entgegenwirken und die Eignung der einzelnen Vektoren für Immunisierungen bereits mehrfach gezeigt werden konnte, ist nach unserem Wissen keine Arbeit publiziert, in der alle drei Vektorsysteme kombiniert wurden. Eine zusätzliche Steigerung der Immunogenität sollte durch bekannte Methoden, wie die Codonoptimierung der DNA-Sequenzen, und mithilfe eines genetischen GMCSF-Adjuvants erzielt werden. Um dem Problem der hohen Virusdiversität zu begegnen, haben wir uns für die Verwendung einer HIV Klade B Konsensussequenz entschieden. Diese Art regionspezifischen Impfstoffs stellt zwar einen Kompromiss dar, ist jedoch nichtsdestotrotz ein adäquates Mittel, um dem Problem der Diversität zu begegnen. Um die Möglichkeit einer späteren Effizienztestung der entwickelten Immunisierungsstrategie unter Verwendung des am besten geeigneten SIV/Makkaken-Modells zu haben, wurden parallel zu den HIV-1 Impfvektoren SIVmac239 Impfvektoren auf die gleiche Weise entwickelt und vergleichend auf deren Eigenschaften im Mausmodell getestet. Die Evaluation der verschiedenen

homologen und heterologen zweifachen und dreifachen Immunisierungsregime zeigte für die HIV und SIV Impfstoffe deutlich die Überlegenheit von dreifachen, heterologen Immunisierungen in Bezug auf die Stärke der induzierten zellulären Immunantwort und die Anzahl erkannt antigener Epitope. Die gemessenen zellulären Immunantworten von annähernd 30000 reaktiven T-Zellen pro Million Splenozyten und bis zu 15 reaktiven Epitopen im Gag und Pol Antigen, waren deutlich höher als erwartet und übertreffen die Werte aus erfolgreichen Immunisierungs- und Belastungsversuchen mit Influenza, LCMV, SARS oder Tumorzellen deutlich. Untersuchungen der induzierten humoralen Immunantwort zeigten einen Trend der Steigerung der Antikörperproduktion bei Verwendung von rAAV9 Vektoren, weitgehend unabhängig von der Anzahl oder der Kombination der Immunisierungen. Die gemessene Stärke der zellulären Immunantwort, die Anzahl der erkannten Epitope sowie die beobachteten Trends ähnelten sich für die HIV- und SIV-Immunisierungen weitgehend. Eine abschließende Untersuchung der *in vivo* Zytotoxizität dieses optimalen dreifach heterologen HIV- und SIV-Immunisierungsregime konnte die Funktionalität der induzierten Immunantwort eindeutig bestätigen. Immunisierte Mäuse waren in der Lage, 88-98 % der injizierten syngenen Splenozyten, welche mit je einem immundominanten Gag-Peptid markiert wurden, innerhalb von zwölf Stunden zu lysieren.

Die hervorragenden Eigenschaften dieses neuartigen multigenen DNA/rAd5/rAAV9 Immunisierungsregimes in Bezug auf die Induktion einer äußerst starken, breitgefächerten und funktionellen zellulären Immunantwort zeichnen dieses als einen interessanten Kandidaten für weiterführenden Makkakenstudien aus. Mehrere, gegen Ende dieser Arbeit publizierte vielversprechende Immunisierungs- und Belastungsversuche in Makkaken unterstützen die Bedeutsamkeit dieses Immunisierungskonzeptes eindeutig und könnten einen Schritt in Richtung eines wirksamen HIV-Impfstoffes beitragen.

Summary

Despite being the focus of vaccine research for almost 30 years, an effective vaccine against HIV/AIDS, a pandemic that perhaps poses the greatest threat to human health since the Black Death, remains elusive. The scientific optimism for the rapid development of an effective vaccine that prevailed following the initial identification of the pathogen causing AIDS disappeared within a decade as the classical approaches to vaccine production continuously failed. As a result of these problems and based on the scientific advances of the time, a wide range of novel immunisation strategies, based mainly on recombinant proteins and genetic vaccines, were developed and evaluated in numerous preclinical and clinical studies. Unfortunately, the unique nature and pathology of HIV-1 imposes major hurdles to the development of an effective, modern vaccine. Critically, knowledge is lacking of a protective immune mechanism and factors such as the extraordinarily high degree of virus diversity, the rapid development of latent virus reservoirs and of escape mutants as a result of immunological selective pressure, the modulation by the virus of critical immunological functions, the targeted infection and depletion of the helper T-cells essential for an adaptive immune response, as well as the problems with the induction and efficacy of neutralising antibodies, present, in this combination and complexity, a previously unknown challenge. More recently, promising results have been generated with HIV, other viruses and cancers using the technique of 'genetic immunisation' established in the mid-1990s. The experience gained from these animal studies and studies involving humans that have an exceptional resistance to HIV-infection or AIDS progression continue to support the conclusion that virus-specific, predominantly cytotoxic T-lymphocytes can be effective. As a result, many genetic vaccine vectors and regimes have been developed and tested. It became increasingly clear that there are major problems in transferring the results from the animal model to human clinical trials. To enable HIV vaccines to be tested directly in the macaque challenge model, chimeric SHIV challenge viruses were developed and used in efficacy trials. However, the poor relevance of results from the SHIV model for the situation in humans came into sharp focus when a large clinical trial initiated partially in response to results with the SHIV/macaque model was abandoned due to an unexpected higher rate of infection in vaccinees. Furthermore, this and other clinical studies revealed the poor immunogenicity of the vaccines being tested. Possible reasons for these differences were predominantly the presence of pre-

existing anti-vector immunity and problems with the scale-up of genetic vaccines, particularly those based on DNA, and their method of application. The high genetic heterogeneity of human test subjects, particularly with regard to HLA-haplotypes, is another factor that is only recently being taken into account during macaque studies. Based on the experience and countless publications concerning HIV vaccine development and its problems over the preceding decades, we attempted to develop a rational immunisation strategy that took these problems into account. Therefore, a multigenic, multivector genetic immunisation regime, based on gene-gun vectors (DNA), recombinant adenovirus type 5 (rAd5) and recombinant adeno-associated virus pseudotype 9 (rAAV9) was developed. Although it is known that a heterologous immunisation regime can greatly enhance immunogenicity, that it can eliminate the inhibitory effects of vector immunity and that the suitability of the individual vectors has been demonstrated many times, no publication has yet included a combination of all three vector systems. It was also decided to provide an additional boost in immunogenicity by using methods such as codon-optimisation of the DNA sequence and the use of a genetic form of GM-CSF as adjuvant. To avoid problems with the high diversity of HIV we decided to base the HIV vaccine on a clade B consensus sequence. Although this form of region-specific vaccine represents a compromise, it is nevertheless a promising approach to tackling the problem of diversity. To allow subsequent efficacy trials in the relevant SIV/macaque model, we developed in parallel to the HIV constructs vaccines based on SIVmac239 and compared their immunogenicities in mice.

The evaluation of different homologous and heterologous double- and triple-immunisation regimes demonstrated for both the HIV and SIV vaccines a clear superiority for triple, heterologous vaccination, with regard to the strength of the cellular immune response induced and the number of antigen epitopes recognised.

The cellular immune responses, with almost 30000 reactive T-cells per million splenocytes and up to 15 reactive epitopes in Gag and Pol, were far higher than expected and significantly exceed those reported in successful immunisation/challenge studies with influenza, LCMV, SARS and tumor cells. Investigations of the induced humoral immune responses demonstrated a trend for increasing antibody production using rAAV9 vectors, largely independently of the number or combination of the immunisation. The strength of the cellular immune response, the number of epitopes recognised and the trends observed were similar

for the HIV and SIV vaccines. A concluding evaluation of the *in vivo* efficacy of the optimal triple, heterologous HIV and SIV immunisation regime confirmed the functionality of the immune responses induced. Immunised mice were able, within twelve hours, to eliminate 88-98% of injected, syngeneic splenocytes pulsed with an immunodominant Gag peptide.

The impressive properties of this new multigenic DNA/rAd5/rAAV9 immunisation regime, with regard to the extremely strong, broad and functional cellular immune response, make this an interesting candidate for subsequent macaque studies. A number of immunisation/challenge macaque studies published towards the end of this project support the significance of this immunisation concept and could contribute to the eventual development of an effective AIDS vaccine.

6 Literaturverzeichnis

- ALLERS, K., HUTTER, G., HOFMANN, J., LODDENKEMPER, C., RIEGER, K., THIEL, E. & SCHNEIDER, T. 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5Delta32/Delta32 stem cell transplantation. *Blood*, 117, 2791-9.
- ALLOCCA, M., DORIA, M., PETRILLO, M., COLELLA, P., GARCIA-HOYOS, M., GIBBS, D., KIM, S. R., MAGUIRE, A., REX, T. S., DI VICINO, U., CUTILLO, L., SPARROW, J. R., WILLIAMS, D. S., BENNETT, J. & AURICCHIO, A. 2008. Serotype-dependent packaging of large genes in adeno-associated viral vectors results in effective gene delivery in mice. *J Clin Invest*, 118, 1955-64.
- ALMEIDA, J. R., SAUCE, D., PRICE, D. A., PAPAGNO, L., SHIN, S. Y., MORIS, A., LARSEN, M., PANCINO, G., DOUEK, D. C., AUTRAN, B., SAEZ-CIRION, A. & APPAY, V. 2009. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8+ T-cell polyfunctionality and HIV-suppressive activity. *Blood*, 113, 6351-60.
- ALTHAUS, C. L. & DE BOER, R. J. 2011. Implications of CTL-mediated killing of HIV-infected cells during the non-productive stage of infection. *PLoS One*, 6, e16468.
- AMARA, R. R., VILLINGER, F., ALTMAN, J. D., LYDY, S. L., O'NEIL, S. P., STAPRANS, S. I., MONTEFIORI, D. C., XU, Y., HERNDON, J. G., WYATT, L. S., CANDIDO, M. A., KOZYZR, N. L., EARL, P. L., SMITH, J. M., MA, H. L., GRIMM, B. D., HULSEY, M. L., MILLER, J., MCCLURE, H. M., MCNICHOLL, J. M., MOSS, B. & ROBINSON, H. L. 2001. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*, 292, 69-74.
- ARRODE-BRUSES, G., HEGDE, R., JIN, Y., LIU, Z., NARAYAN, O. & CHEBLOUNE, Y. 2012. Immunogenicity of a lentiviral-based DNA vaccine driven by the 5'LTR of the naturally attenuated caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in mice and macaques. *Vaccine*, 30, 2956-62.
- ASAKURA, Y., LUNDHOLM, P., KJERRSTROM, A., BENTHIN, R., LUCHT, E., FUKUSHIMA, J., SCHWARTZ, S., OKUDA, K., WAHREN, B. & HINKULA, J. 1999. DNA-plasmids of HIV-1 induce systemic and mucosal immune responses. *Biol Chem*, 380, 375-9.
- AUEWARAKUL, P., WACHARAPORNIN, P., SRICHATRAPIMUK, S., CHUTIPONGTANATE, S. & PUTHAVATHANA, P. 2005. Uncoating of HIV-1 requires cellular activation. *Virology*, 337, 93-101.
- AYASH-RASHKOVSKY, M., BENTWICH, Z., ARDITTI, F., FRIEDMAN, S., REISNER, Y. & BORKOW, G. 2005a. A novel small animal model for HIV-1 infection. *FASEB J*, 19, 1149-51.
- AYASH-RASHKOVSKY, M., BORKOW, G., DAVIS, H. L., MOSS, R. B., BARTHOLOMEW, R. & BENTWICH, Z. 2005b. Enhanced HIV-1 specific immune response by CpG ODN and HIV-1 immunogen-pulsed dendritic cells confers protection in the Trimeric murine model of HIV-1 infection. *FASEB J*, 19, 1152-4.
- BABA, T. W., LISKA, V., KHIMANI, A. H., RAY, N. B., DAILEY, P. J., PENNINCK, D., BRONSON, R., GREENE, M. F., MCCLURE, H. M., MARTIN, L. N. & RUPRECHT, R. M. 1999. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. *Nat Med*, 5, 194-203.
- BALAZS, A. B., CHEN, J., HONG, C. M., RAO, D. S., YANG, L. & BALTIMORE, D. 2012. Antibody-based protection against HIV infection by vectored immunoprophylaxis. *Nature*, 481, 81-4.
- BARCET, W., OEHEN, S., KLENERMAN, P., WODARZ, D., BOCHAROV, G., LLOYD, A. L., NOWAK, M. A., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R. M. & EHL, S.

2000. Direct quantitation of rapid elimination of viral antigen-positive lymphocytes by antiviral CD8(+) T cells in vivo. *Eur J Immunol*, 30, 1356-63.
- BAROUCHE, D. H., KUNSTMAN, J., GLOWCZWSKIE, J., KUNSTMAN, K. J., EGAN, M. A., PEYERL, F. W., SANTRA, S., KURODA, M. J., SCHMITZ, J. E., BEAUDRY, K., KRIVULKA, G. R., LIFTON, M. A., GORGONE, D. A., WOLINSKY, S. M. & LETVIN, N. L. 2003. Viral escape from dominant simian immunodeficiency virus epitope-specific cytotoxic T lymphocytes in DNA-vaccinated rhesus monkeys. *J Virol*, 77, 7367-75.
- BAROUCHE, D. H., LIU, J., LI, H., MAXFIELD, L. F., ABBINK, P., LYNCH, D. M., IAMPIETRO, M. J., SANMIGUEL, A., SEAMAN, M. S., FERRARI, G., FORTHAL, D. N., OURMANOV, I., HIRSCH, V. M., CARVILLE, A., MANSFIELD, K. G., STABLEIN, D., PAU, M. G., SCHUITEMAKER, H., SADOFF, J. C., BILLINGS, E. A., RAO, M., ROBB, M. L., KIM, J. H., MAROVICH, M. A., GOUDSMIT, J. & MICHAEL, N. L. 2012. Vaccine protection against acquisition of neutralization-resistant SIV challenges in rhesus monkeys. *Nature*, 482, 89-93.
- BAROUCHE, D. H., SANTRA, S., KURODA, M. J., SCHMITZ, J. E., PLISHKA, R., BUCKLER-WHITE, A., GAITAN, A. E., ZIN, R., NAM, J. H., WYATT, L. S., LIFTON, M. A., NICKERSON, C. E., MOSS, B., MONTEFIORI, D. C., HIRSCH, V. M. & LETVIN, N. L. 2001. Reduction of simian-human immunodeficiency virus 89.6P viremia in rhesus monkeys by recombinant modified vaccinia virus Ankara vaccination. *J Virol*, 75, 5151-8.
- BARRE-SINOUSSE, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W. & MONTAGNIER, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220, 868-71.
- BEN-YEDIDIA, T., MARCUS, H., REISNER, Y. & ARNON, R. 1999. Intranasal administration of peptide vaccine protects human/mouse radiation chimera from influenza infection. *Int Immunol*, 11, 1043-51.
- BENLAHRECH, A., HARRIS, J., MEISER, A., PAPAGATSIAS, T., HORNIG, J., HAYES, P., LIEBER, A., ATHANASOPOULOS, T., BACHY, V., CSOMOR, E., DANIELS, R., FISHER, K., GOTCH, F., SEYMOUR, L., LOGAN, K., BARBAGALLO, R., KLAVINSKIS, L., DICKSON, G. & PATTERSON, S. 2009. Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 19940-5.
- BERGET, S. M., MOORE, C. & SHARP, P. A. 1977. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3171-5.
- BURNS, K. I. 1990. Parvovirus replication. *Microbiol Rev*, 54, 316-29.
- BURNS, K. I. & BOHENZKY, R. A. 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res*, 32, 243-306.
- BETTS, M. R., NASON, M. C., WEST, S. M., DE ROSA, S. C., MIGUELES, S. A., ABRAHAM, J., LEDERMAN, M. M., BENITO, J. M., GOEPFERT, P. A., CONNORS, M., ROEDERER, M. & KOUPI, R. A. 2006. HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8+ T cells. *Blood*, 107, 4781-9.
- BLANKSON, J. N., PERSAUD, D. & SILICIANO, R. F. 2002. The challenge of viral reservoirs in HIV-1 infection. *Annu Rev Med*, 53, 557-93.
- BOCHER, W. O., DEKEL, B., SCHWERIN, W., GEISSLER, M., HOFFMANN, S., ROHWER, A., ARDITTI, F., COOPER, A., BERNHARD, H., BERREBI, A., ROSE-

- JOHN, S., SHAUL, Y., GALLE, P. R., LOHR, H. F. & REISNER, Y. 2001. Induction of strong hepatitis B virus (HBV) specific T helper cell and cytotoxic T lymphocyte responses by therapeutic vaccination in the trimera mouse model of chronic HBV infection. *Eur J Immunol*, 31, 2071-9.
- BOMSEL, M. 1997. Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier. *Nat Med*, 3, 42-7.
- BORROW, P., LEWICKI, H., HAHN, B. H., SHAW, G. M. & OLDSTONE, M. B. 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 68, 6103-10.
- BOYER, J. D., UGEN, K. E., WANG, B., AGADJANYAN, M., GILBERT, L., BAGARAZZI, M. L., CHATTERGOON, M., FROST, P., JAVADIAN, A., WILLIAMS, W. V., REFAELI, Y., CICCARELLI, R. B., MCCALLUS, D., CONEY, L. & WEINER, D. B. 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med*, 3, 526-32.
- BOYER, J. D., WANG, B., UGEN, K. E., AGADJANYAN, M., JAVADIAN, A., FROST, P., DANG, K., CARRANO, R. A., CICCARELLI, R., CONEY, L., WILLIAMS, W. V. & WEINER, D. B. 1996. In vivo protective anti-HIV immune responses in non-human primates through DNA immunization. *J Med Primatol*, 25, 242-50.
- BRAVE, A., BOBERG, A., GUDMUNSDOTTER, L., ROLLMAN, E., HALLERMALM, K., LJUNGBERG, K., BLOMBERG, P., STOUT, R., PAULIE, S., SANDSTROM, E., BIBERFELD, G., EARL, P., MOSS, B., COX, J. H. & WAHREN, B. 2007. A new multi-clade DNA prime/recombinant MVA boost vaccine induces broad and high levels of HIV-1-specific CD8(+) T-cell and humoral responses in mice. *Mol Ther*, 15, 1724-33.
- BRENCHLEY, J. M., SCHACKER, T. W., RUFF, L. E., PRICE, D. A., TAYLOR, J. H., BEILMAN, G. J., NGUYEN, P. L., KHORUTS, A., LARSON, M., HAASE, A. T. & DOUEK, D. C. 2004. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med*, 200, 749-59.
- BRUCE, C. B., AKRIGG, A., SHARPE, S. A., HANKE, T., WILKINSON, G. W. & CRANAGE, M. P. 1999. Replication-deficient recombinant adenoviruses expressing the human immunodeficiency virus Env antigen can induce both humoral and CTL immune responses in mice. *J Gen Virol*, 80 (Pt 10), 2621-8.
- BUCHBINDER, S. P., MEHROTRA, D. V., DUERR, A., FITZGERALD, D. W., MOGG, R., LI, D., GILBERT, P. B., LAMA, J. R., MARMOR, M., DEL RIO, C., MCELRATH, M. J., CASIMIRO, D. R., GOTTESDIENER, K. M., CHODAKEWITZ, J. A., COREY, L. & ROBERTSON, M. N. 2008. 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.
- BUGE, S. L., RICHARDSON, E., ALIPANAH, S., MARKHAM, P., CHENG, S., KALYAN, N., MILLER, C. J., LUBECK, M., UDEM, S., ELDRIDGE, J. & ROBERT-GUROFF, M. 1997. An adenovirus-simian immunodeficiency virus env vaccine elicits humoral, cellular, and mucosal immune responses in rhesus macaques and decreases viral burden following vaginal challenge. *J Virol*, 71, 8531-41.
- BURTON, D. R., DESROSIERS, R. C., DOMS, R. W., KOFF, W. C., KWONG, P. D., MOORE, J. P., NABEL, G. J., SODROSKI, J., WILSON, I. A. & WYATT, R. T. 2004. HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*, 5, 233-6.
- BUSEYNE, F., LE GALL, S., BOCCACCIO, C., ABASTADO, J. P., LIFSON, J. D., ARTHUR, L. O., RIVIERE, Y., HEARD, J. M. & SCHWARTZ, O. 2001. MHC-I-

- restricted presentation of HIV-1 virion antigens without viral replication. *Nat Med*, 7, 344-9.
- BYERS, A. M., HADLEY, A. & LUKACHER, A. E. 2007. Protection against polyoma virus-induced tumors is perforin-independent. *Virology*, 358, 485-92.
- BYERS, A. M., KEMBALL, C. C., MOSER, J. M. & LUKACHER, A. E. 2003. Cutting edge: rapid in vivo CTL activity by polyoma virus-specific effector and memory CD8⁺ T cells. *J Immunol*, 171, 17-21.
- CARLSON, J. R., MCGRAW, T. P., KEDDIE, E., YEE, J. L., ROSENTHAL, A., LANGLOIS, A. J., DICKOVER, R., DONOVAN, R., LUCIW, P. A., JENNINGS, M. B. & ET AL. 1990. Vaccine protection of rhesus macaques against simian immunodeficiency virus infection. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 6, 1239-46.
- CASIMIRO, D. R., WANG, F., SCHLEIF, W. A., LIANG, X., ZHANG, Z. Q., TOBERY, T. W., DAVIES, M. E., MCDERMOTT, A. B., O'CONNOR, D. H., FRIDMAN, A., BAGCHI, A., TUSSEY, L. G., BETT, A. J., FINNEFROCK, A. C., FU, T. M., TANG, A., WILSON, K. A., CHEN, M., PERRY, H. C., HEIDECKER, G. J., FREED, D. C., CARELLA, A., PUNT, K. S., SYKES, K. J., HUANG, L., AUSENSI, V. I., BACHINSKY, M., SADASIVAN-NAIR, U., WATKINS, D. I., EMINI, E. A. & SHIVER, J. W. 2005. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with dna and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J Virol*, 79, 15547-55.
- CHAMBERS, V. C. & ITO, Y. 1964. Morphology of Shope Papilloma Virus Associated with Nucleic Acid-Induced Tumors of Cottontail Rabbits. *Virology*, 23, 434-6.
- COLLINS, K. L., CHEN, B. K., KALAMS, S. A., WALKER, B. D. & BALTIMORE, D. 1998. HIV-1 Nef protein protects infected primary cells against killing by cytotoxic T lymphocytes. *Nature*, 391, 397-401.
- CORTIN, V., THIBAUT, J., JACOB, D. & GARNIER, A. 2004. High-titer adenovirus vector production in 293S cell perfusion culture. *Biotechnol Prog*, 20, 858-63.
- DANIEL, M. D., KIRCHHOFF, F., CZAJAK, S. C., SEHGAL, P. K. & DESROSIERS, R. C. 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science*, 258, 1938-41.
- DAVISON, A. J., BENKO, M. & HARRACH, B. 2003. Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 84, 2895-908.
- DEACON, N. J., TSYKIN, A., SOLOMON, A., SMITH, K., LUDFORD-MENTING, M., HOOKER, D. J., MCPHEE, D. A., GREENWAY, A. L., ELLETT, A., CHATFIELD, C., LAWSON, V. A., CROWE, S., MAERZ, A., SONZA, S., LEARMONT, J., SULLIVAN, J. S., CUNNINGHAM, A., DWYER, D., DOWTON, D. & MILLS, J. 1995. Genomic structure of an attenuated quasi species of HIV-1 from a blood transfusion donor and recipients. *Science*, 270, 988-91.
- DEML, L., BOJAK, A., STECK, S., GRAF, M., WILD, J., SCHIRMBECK, R., WOLF, H. & WAGNER, R. 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 Gag protein. *J Virol*, 75, 10991-1001.
- DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DI MARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R. E., HILL, C. M., DAVIS, C. B., PEIPER, S. C., SCHALL, T. J., LITTMAN, D. R. & LANDAU, N. R. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 381, 661-6.
- DONG, J. Y., FAN, P. D. & FRIZZELL, R. A. 1996. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, 7, 2101-12.
- DONSANTE, A., MILLER, D. G., LI, Y., VOGLER, C., BRUNT, E. M., RUSSELL, D. W. & SANDS, M. S. 2007. AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science*, 317, 477.

- DOOLITTLE, R. F. 1989. Immunodeficiency viruses: the simian-human connection. *Nature*, 339, 338-9.
- DU, L., ZHAO, G., LIN, Y., CHAN, C., HE, Y., JIANG, S., WU, C., JIN, D. Y., YUEN, K. Y., ZHOU, Y. & ZHENG, B. J. 2008a. Priming with rAAV encoding RBD of SARS-CoV S protein and boosting with RBD-specific peptides for T cell epitopes elevated humoral and cellular immune responses against SARS-CoV infection. *Vaccine*, 26, 1644-51.
- DU, L., ZHAO, G., LIN, Y., SUI, H., CHAN, C., MA, S., HE, Y., JIANG, S., WU, C., YUEN, K. Y., JIN, D. Y., ZHOU, Y. & ZHENG, B. J. 2008b. Intranasal vaccination of recombinant adeno-associated virus encoding receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) spike protein induces strong mucosal immune responses and provides long-term protection against SARS-CoV infection. *J Immunol*, 180, 948-56.
- DUPUY, L. C., RICHARDS, M. J., ELLEFSEN, B., CHAU, L., LUXEMBOURG, A., HANNAMAN, D., LIVINGSTON, B. D. & SCHMALJOHN, C. S. 2011. A DNA vaccine for venezuelan equine encephalitis virus delivered by intramuscular electroporation elicits high levels of neutralizing antibodies in multiple animal models and provides protective immunity to mice and nonhuman primates. *Clin Vaccine Immunol*, 18, 707-16.
- EGAN, M. A., CHARINI, W. A., KURODA, M. J., SCHMITZ, J. E., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., MANSON, K., WYAND, M., LIFTON, M. A., NICKERSON, C. E., FU, T., SHIVER, J. W. & LETVIN, N. L. 2000. Simian immunodeficiency virus (SIV) gag DNA-vaccinated rhesus monkeys develop secondary cytotoxic T-lymphocyte responses and control viral replication after pathogenic SIV infection. *J Virol*, 74, 7485-95.
- ESSER, M. T., GRAHAM, D. R., COREN, L. V., TRUBEY, C. M., BESS, J. W., JR., ARTHUR, L. O., OTT, D. E. & LIFSON, J. D. 2001. Differential incorporation of CD45, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), and major histocompatibility complex class I and II molecules into human immunodeficiency virus type 1 virions and microvesicles: implications for viral pathogenesis and immune regulation. *J Virol*, 75, 6173-82.
- ESTCOURT, M. J., RAMSAY, A. J., BROOKS, A., THOMSON, S. A., MEDVECKZY, C. J. & RAMSHAW, I. A. 2002. Prime-boost immunization generates a high frequency, high-avidity CD8(+) cytotoxic T lymphocyte population. *Int Immunol*, 14, 31-7.
- EULER, Z., VAN GILS, M. J., BUNNIK, E. M., PHUNG, P., SCHWEIGHARDT, B., WRIN, T. & SCHUITEMAKER, H. 2010. Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J Infect Dis*, 201, 1045-53.
- EYESON, J., KING, D., BOAZ, M. J., SEFIA, E., TOMKINS, S., WATERS, A., EASTERBROOK, P. J. & VYAKARNAM, A. 2003. Evidence for Gag p24-specific CD4 T cells with reduced susceptibility to R5 HIV-1 infection in a UK cohort of HIV-exposed-seronegative subjects. *AIDS*, 17, 2299-311.
- FEINBERG, M. B. & MOORE, J. P. 2002. AIDS vaccine models: challenging challenge viruses. *Nat Med*, 8, 207-10.
- FERRARI, F. K., SAMULSKI, T., SHENK, T. & SAMULSKI, R. J. 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol*, 70, 3227-34.
- FERRE, A. L., HUNT, P. W., CRITCHFIELD, J. W., YOUNG, D. H., MORRIS, M. M., GARCIA, J. C., POLLARD, R. B., YEE, H. F., JR., MARTIN, J. N., DEEKS, S. G. & SHACKLETT, B. L. 2009. Mucosal immune responses to HIV-1 in elite controllers: a potential correlate of immune control. *Blood*, 113, 3978-89.

- FINZI, D., BLANKSON, J., SILICIANO, J. D., MARGOLICK, J. B., CHADWICK, K., PIERSON, T., SMITH, K., LISZIEWICZ, J., LORI, F., FLEXNER, C., QUINN, T. C., CHAISSON, R. E., ROSENBERG, E., WALKER, B., GANGE, S., GALLANT, J. & SILICIANO, R. F. 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*, 5, 512-7.
- FISCHER, W., PERKINS, S., THEILER, J., BHATTACHARYA, T., YUSIM, K., FUNKHOUSER, R., KUIKEN, C., HAYNES, B., LETVIN, N. L., WALKER, B. D., HAHN, B. H. & KORBER, B. T. 2007. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med*, 13, 100-6.
- FLYNN, N. M., FORTHAL, D. N., HARRO, C. D., JUDSON, F. N., MAYER, K. H. & PARA, M. F. 2005. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. *J Infect Dis*, 191, 654-65.
- FRIEDRICH, T. C., VALENTINE, L. E., YANT, L. J., RAKASZ, E. G., PIASKOWSKI, S. M., FURLOTT, J. R., WEISGRAU, K. L., BURWITZ, B., MAY, G. E., LEON, E. J., SOMA, T., NAPOE, G., CAPUANO, S. V., 3RD, WILSON, N. A. & WATKINS, D. I. 2007. Subdominant CD8+ T-cell responses are involved in durable control of AIDS virus replication. *J Virol*, 81, 3465-76.
- FULLER, D. H., MURPHEY-CORB, M., CLEMENTS, J., BARNETT, S. & HAYNES, J. R. 1996. Induction of immunodeficiency virus-specific immune responses in rhesus monkeys following gene gun-mediated DNA vaccination. *J Med Primatol*, 25, 236-41.
- GANUSOV, V. V., LUKACHER, A. E. & BYERS, A. M. 2010. Persistence of viral infection despite similar killing efficacy of antiviral CD8(+) T cells during acute and chronic phases of infection. *Virology*, 405, 193-200.
- GAO, F., LI, Y., DECKER, J. M., PEYERL, F. W., BIBOLLET-RUCHE, F., RODENBURG, C. M., CHEN, Y., SHAW, D. R., ALLEN, S., MUSONDA, R., SHAW, G. M., ZAJAC, A. J., LETVIN, N. & HAHN, B. H. 2003. Codon usage optimization of HIV type 1 subtype C gag, pol, env, and nef genes: in vitro expression and immune responses in DNA-vaccinated mice. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 19, 817-23.
- GARDNER, M. B., CARLSON, J. R., JENNINGS, M., ROSENTHAL, A., LANGLOIS, A., HAYNES, B., BOLOGNESI, D. & PALKER, T. J. 1991. SIV vaccine protection of rhesus monkeys. *Biotechnol Ther*, 2, 9-19.
- GASCHEN, B., TAYLOR, J., YUSIM, K., FOLEY, B., GAO, F., LANG, D., NOVITSKY, V., HAYNES, B., HAHN, B. H., BHATTACHARYA, T. & KORBER, B. 2002. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*, 296, 2354-60.
- GELDERBLUM, H. R. 1991. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS*, 5, 617-37.
- GELDERBLUM, H. R., HAUSMANN, E. H., OZEL, M., PAULI, G. & KOCH, M. A. 1987. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology*, 156, 171-6.
- GILBERT, P. B., BERGER, J. O., STABLEIN, D., BECKER, S., ESSEX, M., HAMMER, S. M., KIM, J. H. & DEGRUTTOLA, V. G. 2011. Statistical interpretation of the RV144 HIV vaccine efficacy trial in Thailand: a case study for statistical issues in efficacy trials. *J Infect Dis*, 203, 969-75.
- GRAY, G., BUCHBINDER, S. & DUERR, A. 2010. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. *Curr Opin HIV AIDS*, 5, 357-61.
- GRAY, R. H., LI, X., WAWER, M. J., GANGE, S. J., SERWADDA, D., SEWANKAMBO, N. K., MOORE, R., WABWIRE-MANGEN, F., LUTALO, T. & QUINN, T. C. 2003.

- Stochastic simulation of the impact of antiretroviral therapy and HIV vaccines on HIV transmission; Rakai, Uganda. *AIDS*, 17, 1941-51.
- GRAY, R. H., WAWER, M. J., BROOKMEYER, R., SEWANKAMBO, N. K., SERWADDA, D., WABWIRE-MANGEN, F., LUTALO, T., LI, X., VANCOTT, T. & QUINN, T. C. 2001. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda. *Lancet*, 357, 1149-53.
- GRIEGER, J. C. & SAMULSKI, R. J. 2005. Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps. *J Virol*, 79, 9933-44.
- GUIMARAES-WALKER, A., MACKIE, N., MCCORMACK, S., HANKE, T., SCHMIDT, C., GILMOUR, J., BARIN, B., MCMICHAEL, A., WEBER, J., LEGG, K., BABIKER, A., HAYES, P., GOTCH, F., SMITH, C., DALLY, L., DORRELL, L., CEBERE, I., KAY, R., WINSTONE, N., MOORE, S., GOONETILLEKE, N. & FAST, P. 2008. Lessons from IAVI-006, a phase I clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the pTHr.HIVA DNA and MVA.HIVA vaccines in a prime-boost strategy to induce HIV-1 specific T-cell responses in healthy volunteers. *Vaccine*, 26, 6671-7.
- GUYADER, M., EMERMAN, M., SONIGO, P., CLAVEL, F., MONTAGNIER, L. & ALIZON, M. 1987. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, 326, 662-9.
- HANDA, H., SHIROKI, K. & SHIMOJO, H. 1977. Establishment and characterization of KB cell lines latently infected with adeno-associated virus type 1. *Virology*, 82, 84-92.
- HANKE, T., BLANCHARD, T. J., SCHNEIDER, J., HANNAN, C. M., BECKER, M., GILBERT, S. C., HILL, A. V., SMITH, G. L. & MCMICHAEL, A. 1998. Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime. *Vaccine*, 16, 439-45.
- HANSEN, S. G., FORD, J. C., LEWIS, M. S., VENTURA, A. B., HUGHES, C. M., COYNE-JOHNSON, L., WHIZIN, N., OSWALD, K., SHOEMAKER, R., SWANSON, T., LEGASSE, A. W., CHIUCHIOLO, M. J., PARKS, C. L., AXTHELM, M. K., NELSON, J. A., JARVIS, M. A., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D. & PICKER, L. J. 2011. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*, 473, 523-7.
- HANSEN, S. G., VIEVILLE, C., WHIZIN, N., COYNE-JOHNSON, L., SIESS, D. C., DRUMMOND, D. D., LEGASSE, A. W., AXTHELM, M. K., OSWALD, K., TRUBEY, C. M., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D., NELSON, J. A., JARVIS, M. A. & PICKER, L. J. 2009. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat Med*, 15, 293-9.
- HARTUNG, S., NORLEY, S. G., ENNEN, J., CICHUTEK, K., PLESKER, R. & KURTH, R. 1992. Vaccine protection against SIVmac infection by high- but not low-dose whole inactivated virus immunogen. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 5, 461-8.
- HARTY, J. T. & BADOVINAC, V. P. 2008. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol*, 8, 107-19.
- HAYNES, J. R., FULLER, D. H., EISENBRAUN, M. D., FORD, M. J. & PERTMER, T. M. 1994. Accell particle-mediated DNA immunization elicits humoral, cytotoxic, and protective immune responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10 Suppl 2, S43-5.
- HERMANS, I. F., SILK, J. D., YANG, J., PALMOWSKI, M. J., GILEADI, U., MCCARTHY, C., SALIO, M., RONCHESE, F. & CERUNDOLO, V. 2004. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-

- mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J Immunol Methods*, 285, 25-40.
- HERMONAT, P. L., QUIRK, J. G., BISHOP, B. M. & HAN, L. 1997. The packaging capacity of adeno-associated virus (AAV) and the potential for wild-type-plus AAV gene therapy vectors. *FEBS Lett*, 407, 78-84.
- HERSPERGER, A. R., MIGUELES, S. A., BETTS, M. R. & CONNORS, M. 2011. Qualitative features of the HIV-specific CD8⁺ T-cell response associated with immunologic control. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 169-73.
- HERSPERGER, A. R., PEREYRA, F., NASON, M., DEMERS, K., SHETH, P., SHIN, L. Y., KOVACS, C. M., RODRIGUEZ, B., SIEG, S. F., TEIXEIRA-JOHNSON, L., GUDONIS, D., GOEPFERT, P. A., LEDERMAN, M. M., FRANK, I., MAKEDONAS, G., KAUL, R., WALKER, B. D. & BETTS, M. R. 2010. Perforin expression directly ex vivo by HIV-specific CD8 T-cells is a correlate of HIV elite control. *PLoS Pathog*, 6, e1000917.
- HIRAO, L. A., WU, L., KHAN, A. S., SATISHCHANDRAN, A., DRAGHIA-AKLI, R. & WEINER, D. B. 2008. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine*, 26, 440-8.
- HIRSCH, V. M., OLMSTED, R. A., MURPHEY-CORB, M., PURCELL, R. H. & JOHNSON, P. R. 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*, 339, 389-92.
- HOPE, T. J. 1999. The ins and outs of HIV Rev. *Arch Biochem Biophys*, 365, 186-91.
- HUTNICK, N. A., CARNATHAN, D. G., DUBEY, S. A., MAKEDONAS, G., COX, K. S., KIERSTEAD, L., RATCLIFFE, S. J., ROBERTSON, M. N., CASIMIRO, D. R., ERTL, H. C. & BETTS, M. R. 2009. Baseline Ad5 serostatus does not predict Ad5 HIV vaccine-induced expansion of adenovirus-specific CD4⁺ T cells. *Nat Med*, 15, 876-8.
- INGULLI, E. 2007. Tracing tolerance and immunity in vivo by CFSE-labeling of administered cells. *Methods Mol Biol*, 380, 365-76.
- JIN, X., BAUER, D. E., TUTTLETON, S. E., LEWIN, S., GETTIE, A., BLANCHARD, J., IRWIN, C. E., SAFRIT, J. T., MITTLER, J., WEINBERGER, L., KOSTRIKIS, L. G., ZHANG, L., PERELSON, A. S. & HO, D. D. 1999. Dramatic rise in plasma viremia after CD8(+) T cell depletion in simian immunodeficiency virus-infected macaques. *J Exp Med*, 189, 991-8.
- JOHNSON, P. R., SCHNEPP, B. C., CONNELL, M. J., ROHNE, D., ROBINSON, S., KRIVULKA, G. R., LORD, C. I., ZINN, R., MONTEFIORI, D. C., LETVIN, N. L. & CLARK, K. R. 2005. Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J Virol*, 79, 955-65.
- KAUL, R., DONG, T., PLUMMER, F. A., KIMANI, J., ROSTRON, T., KIAMA, P., NJAGI, E., IRUNGU, E., FARAH, B., OYUGI, J., CHAKRABORTY, R., MACDONALD, K. S., BWAYO, J. J., MCMICHAEL, A. & ROWLAND-JONES, S. L. 2001a. CD8(+) lymphocytes respond to different HIV epitopes in seronegative and infected subjects. *J Clin Invest*, 107, 1303-10.
- KAUL, R., PLUMMER, F. A., KIMANI, J., DONG, T., KIAMA, P., ROSTRON, T., NJAGI, E., MACDONALD, K. S., BWAYO, J. J., MCMICHAEL, A. J. & ROWLAND-JONES, S. L. 2000. HIV-1-specific mucosal CD8⁺ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol*, 164, 1602-11.
- KAUL, R., ROWLAND-JONES, S. L., KIMANI, J., FOWKE, K., DONG, T., KIAMA, P., RUTHERFORD, J., NJAGI, E., MWANGI, F., ROSTRON, T., ONYANGO, J., OYUGI, J., MACDONALD, K. S., BWAYO, J. J. & PLUMMER, F. A. 2001b. New

- insights into HIV-1 specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, persistently seronegative Kenyan sex workers. *Immunol Lett*, 79, 3-13.
- KAUL, R., RUTHERFORD, J., ROWLAND-JONES, S. L., KIMANI, J., ONYANGO, J. I., FOWKE, K., MACDONALD, K., BWAYO, J. J., MCMICHAEL, A. J. & PLUMMER, F. A. 2004. HIV-1 Env-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in exposed, uninfected Kenyan sex workers: a prospective analysis. *AIDS*, 18, 2087-9.
- KIM, P. S., LEE, P. P. & LEVY, D. 2011. A theory of immunodominance and adaptive regulation. *Bull Math Biol*, 73, 1645-65.
- KOCZOT, F. J., CARTER, B. J., GARON, C. F. & ROSE, J. A. 1973. Self-complementarity of terminal sequences within plus or minus strands of adenovirus-associated virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 215-9.
- KOOTSTRA, N. A. & VERMA, I. M. 2003. Gene therapy with viral vectors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 43, 413-39.
- KORBER, B., GASCHEN, B., YUSIM, K., THAKALLAPALLY, R., KESMIR, C. & DETOURS, V. 2001. Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull*, 58, 19-42.
- KOUP, R. A., SAFRIT, J. T., CAO, Y., ANDREWS, C. A., MCLEOD, G., BORKOWSKY, W., FARTHING, C. & HO, D. D. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J Virol*, 68, 4650-5.
- KULKARNI, V., JALAH, R., GANNERU, B., BERGAMASCHI, C., ALICEA, C., VON GEGERFELT, A., PATEL, V., ZHANG, G. M., CHOWDHURY, B., BRODERICK, K. E., SARDESAI, N. Y., VALENTIN, A., ROSATI, M., FELBER, B. K. & PAVLAKIS, G. N. 2011. Comparison of immune responses generated by optimized DNA vaccination against SIV antigens in mice and macaques. *Vaccine*, 29, 6742-54.
- LEARMONT, J. C., GECZY, A. F., MILLS, J., ASHTON, L. J., RAYNES-GREENOW, C. H., GARSIA, R. J., DYER, W. B., MCINTYRE, L., OELRICHS, R. B., RHODES, D. I., DEACON, N. J. & SULLIVAN, J. S. 1999. Immunologic and virologic status after 14 to 18 years of infection with an attenuated strain of HIV-1. A report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med*, 340, 1715-22.
- LEAVITT, A. D., SHIUE, L. & VARMUS, H. E. 1993. Site-directed mutagenesis of HIV-1 integrase demonstrates differential effects on integrase functions in vitro. *J Biol Chem*, 268, 2113-9.
- LELIGDOWICZ, A. & ROWLAND-JONES, S. 2008. Tenets of protection from progression to AIDS: lessons from the immune responses to HIV-2 infection. *Expert Rev Vaccines*, 7, 319-31.
- LEWIS, A. D., CHEN, R., MONTEFIORI, D. C., JOHNSON, P. R. & CLARK, K. R. 2002. Generation of neutralizing activity against human immunodeficiency virus type 1 in serum by antibody gene transfer. *J Virol*, 76, 8769-75.
- LI, W. F., FAN, M. D., PAN, C. B. & LAI, M. Z. 1992. T cell epitope selection: dominance may be determined by both affinity for major histocompatibility complex and stoichiometry of epitope. *Eur J Immunol*, 22, 943-9.
- LIN, J., ZHI, Y., MAYS, L. & WILSON, J. M. 2007a. Vaccines based on novel adeno-associated virus vectors elicit aberrant CD8⁺ T-cell responses in mice. *J Virol*, 81, 11840-9.
- LIN, S. W., HENSLEY, S. E., TATSIS, N., LASARO, M. O. & ERTL, H. C. 2007b. Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8⁺ T cells in mice. *J Clin Invest*, 117, 3958-70.
- LITTLE, S. J., MCLEAN, A. R., SPINA, C. A., RICHMAN, D. D. & HAVLIR, D. V. 1999. Viral dynamics of acute HIV-1 infection. *J Exp Med*, 190, 841-50.

- LIU, D. W., CHANG, J. L., TSAO, Y. P., HUANG, C. W., KUO, S. W. & CHEN, S. L. 2005. Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int J Cancer*, 113, 93-100.
- LIU, J., O'BRIEN, K. L., LYNCH, D. M., SIMMONS, N. L., LA PORTE, A., RIGGS, A. M., ABBINK, P., COFFEY, R. T., GRANDPRE, L. E., SEAMAN, M. S., LANDUCCI, G., FORTHAL, D. N., MONTEFIORI, D. C., CARVILLE, A., MANSFIELD, K. G., HAVENGA, M. J., PAU, M. G., GOUDSMIT, J. & BAROUCH, D. H. 2009. Immune control of an SIV challenge by a T-cell-based vaccine in rhesus monkeys. *Nature*, 457, 87-91.
- LIU, R., PAXTON, W. A., CHOE, S., CERADINI, D., MARTIN, S. R., HORUK, R., MACDONALD, M. E., STUHLMANN, H., KOUP, R. A. & LANDAU, N. R. 1996. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 86, 367-77.
- LOEB, D. D., SWANSTROM, R., EVERITT, L., MANCHESTER, M., STAMPER, S. E. & HUTCHISON, C. A., 3RD 1989. Complete mutagenesis of the HIV-1 protease. *Nature*, 340, 397-400.
- LOH, L., BATTEN, C. J., PETRAVIC, J., DAVENPORT, M. P. & KENT, S. J. 2007. In vivo fitness costs of different Gag CD8 T-cell escape mutant simian-human immunodeficiency viruses for macaques. *J Virol*, 81, 5418-22.
- LOKE, P., FAVRE, D., HUNT, P. W., LEUNG, J. M., KANWAR, B., MARTIN, J. N., DEEKS, S. G. & MCCUNE, J. M. 2010. Correlating cellular and molecular signatures of mucosal immunity that distinguish HIV controllers from noncontrollers. *Blood*, 115, e20-32.
- LUBECK, M. D., NATUK, R., MYAGKIKH, M., KALYAN, N., ALDRICH, K., SINANGIL, F., ALIPANAH, S., MURTHY, S. C., CHANDA, P. K., NIGIDA, S. M., JR., MARKHAM, P. D., ZOLLA-PAZNER, S., STEIMER, K., WADE, M., REITZ, M. S., JR., ARTHUR, L. O., MIZUTANI, S., DAVIS, A., HUNG, P. P., GALLO, R. C., EICHBERG, J. & ROBERT-GUROFF, M. 1997. Long-term protection of chimpanzees against high-dose HIV-1 challenge induced by immunization. *Nat Med*, 3, 651-8.
- LUO, J., DENG, Z. L., LUO, X., TANG, N., SONG, W. X., CHEN, J., SHARFF, K. A., LUU, H. H., HAYDON, R. C., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & HE, T. C. 2007. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc*, 2, 1236-47.
- MACDONALD, K. S., FOWKE, K. R., KIMANI, J., DUNAND, V. A., NAGELKERKE, N. J., BALL, T. B., OYUGI, J., NJAGI, E., GAUR, L. K., BRUNHAM, R. C., WADE, J., LUSCHER, M. A., KRAUSA, P., ROWLAND-JONES, S., NGUGI, E., BWAYO, J. J. & PLUMMER, F. A. 2000. Influence of HLA supertypes on susceptibility and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 181, 1581-9.
- MAHADEVAN, M., LIU, Y., YOU, C., LUO, R., YOU, H., MEHTA, J. L. & HERMONAT, P. L. 2007. Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus. *Cancer Immunol Immunother*, 56, 1615-24.
- MAHDAVI, M., EBTEKAR, M., KHORRAM KHORSHID, H. R., AZADMANESH, K., HARTOONIAN, C. & HASSAN, Z. M. 2011. ELISPOT analysis of a new CTL based DNA vaccine for HIV-1 using GM-CSF in DNA prime/peptide boost strategy: GM-CSF induced long-lived memory responses. *Immunol Lett*, 140, 14-20.
- MAKEDONAS, G., BANERJEE, P. P., PANDEY, R., HERSPERGER, A. R., SANBORN, K. B., HARDY, G. A., ORANGE, J. S. & BETTS, M. R. 2009. Rapid up-regulation

- and granule-independent transport of perforin to the immunological synapse define a novel mechanism of antigen-specific CD8⁺ T cell cytotoxic activity. *J Immunol*, 182, 5560-9.
- MANNING, W. C., PALIARD, X., ZHOU, S., PAT BLAND, M., LEE, A. Y., HONG, K., WALKER, C. M., ESCOBEDO, J. A. & DWARKI, V. 1997. Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol*, 71, 7960-2.
- MANRIQUE, M., KOZLOWSKI, P. A., COBO-MOLINOS, A., WANG, S. W., WILSON, R. L., MONTEFIORI, D. C., MANSFIELD, K. G., CARVILLE, A. & ALDOVINI, A. 2011. Long-term control of simian immunodeficiency virus mac251 viremia to undetectable levels in half of infected female rhesus macaques nasally vaccinated with simian immunodeficiency virus DNA/recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J Immunol*, 186, 3581-93.
- MATANO, T., KOBAYASHI, M., IGARASHI, H., TAKEDA, A., NAKAMURA, H., KANO, M., SUGIMOTO, C., MORI, K., IIDA, A., HIRATA, T., HASEGAWA, M., YUASA, T., MIYAZAWA, M., TAKAHASHI, Y., YASUNAMI, M., KIMURA, A., O'CONNOR, D. H., WATKINS, D. I. & NAGAI, Y. 2004. Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med*, 199, 1709-18.
- MATANO, T., SHIBATA, R., SIEMON, C., CONNORS, M., LANE, H. C. & MARTIN, M. A. 1998. Administration of an anti-CD8 monoclonal antibody interferes with the clearance of chimeric simian/human immunodeficiency virus during primary infections of rhesus macaques. *J Virol*, 72, 164-9.
- MCCARTY, D. M., FU, H., MONAHAN, P. E., TOULSON, C. E., NAIK, P. & SAMULSKI, R. J. 2003. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther*, 10, 2112-8.
- MCSHANE, H. 2002. Prime-boost immunization strategies for infectious diseases. *Curr Opin Mol Ther*, 4, 23-7.
- MEHENDALE, S., VAN LUNZEN, J., CLUMECK, N., ROCKSTROH, J., VETS, E., JOHNSON, P. R., ANKLESARIA, P., BARIN, B., BOAZ, M., KOCHHAR, S., LEHRMAN, J., SCHMIDT, C., PEETERS, M., SCHWARZE-ZANDER, C., KABAMBA, K., GLAUNSINGER, T., SAHAY, S., THAKAR, M., PARANJAPE, R., GILMOUR, J., EXCLER, J. L., FAST, P. & HEALD, A. E. 2008. A phase 1 study to evaluate the safety and immunogenicity of a recombinant HIV type 1 subtype C adeno-associated virus vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24, 873-80.
- MELLORS, J. W., MUNOZ, A., GIORGI, J. V., MARGOLICK, J. B., TASSONI, C. J., GUPTA, P., KINGSLEY, L. A., TODD, J. A., SAAH, A. J., DETELS, R., PHAIR, J. P. & RINALDO, C. R., JR. 1997. Plasma viral load and CD4⁺ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med*, 126, 946-54.
- MILLER, G., LAHRS, S., PILLARISSETTY, V. G., SHAH, A. B. & DEMATTEO, R. P. 2002. Adenovirus infection enhances dendritic cell immunostimulatory properties and induces natural killer and T-cell-mediated tumor protection. *Cancer Res*, 62, 5260-6.
- MKHWANAZI, N., THOBAKGALE, C. F., VAN DER STOK, M., REDDY, S., MNCUBE, Z., CHONCO, F., WALKER, B. D., ALTFELD, M., GOULDER, P. J. & NDUNG'U, T. 2010. Immunodominant HIV-1-specific HLA-B- and HLA-C-restricted CD8⁺ T cells do not differ in polyfunctionality. *Virology*, 405, 483-91.
- MORROW, C. D., PARK, J. & WAKEFIELD, J. K. 1994. Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am J Physiol*, 266, C1135-56.

- MUDD, P. A. & WATKINS, D. I. 2011. Understanding animal models of elite control: windows on effective immune responses against immunodeficiency viruses. *Curr Opin HIV AIDS*, 6, 197-201.
- MUSTER, T., STEINDL, F., PURTSCHER, M., TRKOLA, A., KLIMA, A., HIMMLER, G., RUKER, F. & KATINGER, H. 1993. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 67, 6642-7.
- MUZYCZKA, N., SAMULSKI, R. J., HERMONAT, P., SRIVASTAVA, A. & BERNS, K. I. 1984. The genetics of adeno-associated virus. *Adv Exp Med Biol*, 179, 151-61.
- NAN, X., PENG, B., HAHN, T. W., RICHARDSON, E., LIZONOVA, A., KOVESDI, I. & ROBERT-GUROFF, M. 2003. Development of an Ad7 cosmid system and generation of an Ad7deltaE1deltaE3HIV(MN) env/rev recombinant virus. *Gene Ther*, 10, 326-36.
- NANDA, A., LYNCH, D. M., GOUDSMIT, J., LEMCKERT, A. A., EWALD, B. A., SUMIDA, S. M., TRUITT, D. M., ABBINK, P., KISHKO, M. G., GORGONE, D. A., LIFTON, M. A., SHEN, L., CARVILLE, A., MANSFIELD, K. G., HAVENGA, M. J. & BAROUCH, D. H. 2005. Immunogenicity of recombinant fiber-chimeric adenovirus serotype 35 vector-based vaccines in mice and rhesus monkeys. *J Virol*, 79, 14161-8.
- NATUK, R. J., CHANDA, P. K., LUBECK, M. D., DAVIS, A. R., WILHELM, J., HJORTH, R., WADE, M. S., BHAT, B. M., MIZUTANI, S., LEE, S. & ET AL. 1992. Adenovirus-human immunodeficiency virus (HIV) envelope recombinant vaccines elicit high-titered HIV-neutralizing antibodies in the dog model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 7777-81.
- NATUK, R. J., LUBECK, M. D., CHANDA, P. K., CHENGALVALA, M., WADE, M. S., MURTHY, S. C., WILHELM, J., VERNON, S. K., DHEER, S. K., MIZUTANI, S. & ET AL. 1993. Immunogenicity of recombinant human adenovirus-human immunodeficiency virus vaccines in chimpanzees. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 9, 395-404.
- NEUTRA, M. R. & KOZLOWSKI, P. A. 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*, 6, 148-58.
- NICKLE, D. C., ROLLAND, M., JENSEN, M. A., POND, S. L., DENG, W., SELIGMAN, M., HECKERMAN, D., MULLINS, J. I. & JOJIC, N. 2007. Coping with viral diversity in HIV vaccine design. *PLoS Comput Biol*, 3, e75.
- NIETO, K., KERN, A., LEUCHS, B., GISSMANN, L., MULLER, M. & KLEINSCHMIDT, J. A. 2009. Combined prophylactic and therapeutic intranasal vaccination against human papillomavirus type-16 using different adeno-associated virus serotype vectors. *Antivir Ther*, 14, 1125-37.
- NIETO, K., STAHL-HENNIG, C., LEUCHS, B., MUELLER, M., GISSMANN, L. & KLEINSCHMIDT, J. A. 2012. Intranasal Vaccination with AAV5 and 9 Vectors against Human Papillomavirus Type 16 in Rhesus Macaques. *Hum Gene Ther*.
- NISHIMURA, Y., IGARASHI, T., DONAU, O. K., BUCKLER-WHITE, A., BUCKLER, C., LAFONT, B. A., GOEKEN, R. M., GOLDSTEIN, S., HIRSCH, V. M. & MARTIN, M. A. 2004. Highly pathogenic SHIVs and SIVs target different CD4+ T cell subsets in rhesus monkeys, explaining their divergent clinical courses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 12324-9.
- NORLEY, S., BEER, B., KONIG, H., JENSEN, F. & KURTH, R. 1998. SIVmac vaccine studies using whole inactivated virus antigen sequentially depleted of viral proteins. *J Med Primatol*, 27, 184-92.
- O'BRIEN, K. L., LIU, J., KING, S. L., SUN, Y. H., SCHMITZ, J. E., LIFTON, M. A., HUTNICK, N. A., BETTS, M. R., DUBEY, S. A., GOUDSMIT, J., SHIVER, J. W., ROBERTSON, M. N., CASIMIRO, D. R. & BAROUCH, D. H. 2009. Adenovirus-

- specific immunity after immunization with an Ad5 HIV-1 vaccine candidate in humans. *Nat Med*, 15, 873-5.
- OURMANOV, I., BROWN, C. R., MOSS, B., CARROLL, M., WYATT, L., PLETNEVA, L., GOLDSTEIN, S., VENZON, D. & HIRSCH, V. M. 2000. Comparative efficacy of recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing simian immunodeficiency virus (SIV) Gag-Pol and/or Env in macaques challenged with pathogenic SIV. *J Virol*, 74, 2740-51.
- OWEN, R. E., HEITMAN, J. W., HIRSCHKORN, D. F., LANTERI, M. C., BISWAS, H. H., MARTIN, J. N., KRONE, M. R., DEEKS, S. G. & NORRIS, P. J. 2010. HIV+ elite controllers have low HIV-specific T-cell activation yet maintain strong, polyfunctional T-cell responses. *AIDS*, 24, 1095-105.
- PALELLA, F. J., JR., BAKER, R. K., MOORMAN, A. C., CHMIEL, J. S., WOOD, K. C., BROOKS, J. T. & HOLMBERG, S. D. 2006. Mortality in the highly active antiretroviral therapy era: changing causes of death and disease in the HIV outpatient study. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 43, 27-34.
- PITISUTTITHUM, P., GILBERT, P., GURWITH, M., HEYWARD, W., MARTIN, M., VAN GRIENSVEN, F., HU, D., TAPPERO, J. W. & CHOOPANYA, K. 2006. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. *J Infect Dis*, 194, 1661-71.
- POKORNA, D., RUBIO, I. & MULLER, M. 2008. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genet Vaccines Ther*, 6, 4.
- PROMADEJ, N., COSTELLO, C., WERNETT, M. M., KULKARNI, P. S., ROBISON, V. A., NELSON, K. E., HODGE, T. W., SURIYANON, V., DUERR, A. & MCNICHOLL, J. M. 2003. Broad human immunodeficiency virus (HIV)-specific T cell responses to conserved HIV proteins in HIV-seronegative women highly exposed to a single HIV-infected partner. *J Infect Dis*, 187, 1053-63.
- QIN, L., GREENLAND, J. R., MORIYA, C., CAYABYAB, M. J. & LETVIN, N. L. 2007. Effects of type I interferons on the adjuvant properties of plasmid granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in vivo. *J Virol*, 81, 10606-13.
- QUINN, T. C. 2000. Viral load, circumcision and heterosexual transmission. *Hopkins HIV Rep*, 12, 1, 5, 11.
- RAMSHAW, I. A. & RAMSAY, A. J. 2000. The prime-boost strategy: exciting prospects for improved vaccination. *Immunol Today*, 21, 163-5.
- REIMANN, K. A., LI, J. T., VEAZEY, R., HALLORAN, M., PARK, I. W., KARLSSON, G. B., SODROSKI, J. & LETVIN, N. L. 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J Virol*, 70, 6922-8.
- RERKS-NGARM, S., PITISUTTITHUM, P., NITAYAPHAN, S., KAEWKUNGWAL, J., CHIU, J., PARIS, R., PREMSRI, N., NAMWAT, C., DE SOUZA, M., ADAMS, E., BENENSON, M., GURUNATHAN, S., TARTAGLIA, J., MCNEIL, J. G., FRANCIS, D. P., STABLEIN, D., BIRX, D. L., CHUNSUTTIWAT, S., KHAMBOONRUANG, C., THONGCHAROEN, P., ROBB, M. L., MICHAEL, N. L., KUNASOL, P. & KIM, J. H. 2009. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med*, 361, 2209-20.
- RODRIGUEZ, F., HARKINS, S., SLIFKA, M. K. & WHITTON, J. L. 2002. Immunodominance in virus-induced CD8(+) T-cell responses is dramatically modified by DNA immunization and is regulated by gamma interferon. *J Virol*, 76, 4251-9.

- ROLLAND, M. & GILBERT, P. 2011. Evaluating Immune Correlates in HIV Type 1 Vaccine Efficacy Trials: What RV144 May Provide. *AIDS Res Hum Retroviruses*.
- RUTJENS, E., BALLA-JHAGJHOORSINGH, S., VERSCHOOR, E., BOGERS, W., KOOPMAN, G. & HEENEY, J. 2003. Lentivirus infections and mechanisms of disease resistance in chimpanzees. *Front Biosci*, 8, d1134-45.
- SABARTH, N., HOWARD, M. K., SAVIDIS-DACHO, H., VAN MAURIK, A., BARRETT, P. N. & KISTNER, O. 2010. Comparison of single, homologous prime-boost and heterologous prime-boost immunization strategies against H5N1 influenza virus in a mouse challenge model. *Vaccine*, 28, 650-6.
- SAMULSKI, R. J., ZHU, X., XIAO, X., BROOK, J. D., HOUSMAN, D. E., EPSTEIN, N. & HUNTER, L. A. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*, 10, 3941-50.
- SANTRA, S., KORBER, B. T., MULDOON, M., BAROUCH, D. H., NABEL, G. J., GAO, F., HAHN, B. H., HAYNES, B. F. & LETVIN, N. L. 2008. A centralized gene-based HIV-1 vaccine elicits broad cross-clade cellular immune responses in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 10489-94.
- SCHMITZ, J. E., KURODA, M. J., SANTRA, S., SASSEVILLE, V. G., SIMON, M. A., LIFTON, M. A., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., DALESANDRO, M., SCALLON, B. J., GHRAYEB, J., FORMAN, M. A., MONTEFIORI, D. C., RIEBER, E. P., LETVIN, N. L. & REIMANN, K. A. 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science*, 283, 857-60.
- SCHULTE, R., SUH, Y. S., SAUERMAN, U., OCHIENG, W., SOPPER, S., KIM, K. S., AHN, S. S., PARK, K. S., STOLTE-LEEB, N., HUNSMANN, G., SUNG, Y. C. & STAHL-HENNIG, C. 2009. Mucosal prior to systemic application of recombinant adenovirus boosting is more immunogenic than systemic application twice but confers similar protection against SIV-challenge in DNA vaccine-primed macaques. *Virology*, 383, 300-9.
- SHEDLOCK, D. J., TALBOTT, K. T., CRESS, C., FERRARO, B., TUYISHME, S., MALLILANKARAMAN, K., CISPER, N. J., MORROW, M. P., WU, S. J., KAWALEKAR, O. U., KHAN, A. S., SARDESAI, N. Y., MUTHUMANI, K., SHEN, H. & WEINER, D. B. 2011. A highly optimized DNA vaccine confers complete protective immunity against high-dose lethal lymphocytic choriomeningitis virus challenge. *Vaccine*, 29, 6755-62.
- SHERMAN, M. P., DE NORONHA, C. M., ECKSTEIN, L. A., HATAYE, J., MUNDT, P., WILLIAMS, S. A., NEIDLEMAN, J. A., GOLDSMITH, M. A. & GREENE, W. C. 2003. Nuclear export of Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in tissue macrophages. *J Virol*, 77, 7582-9.
- SHIVER, J. W., DAVIES, M. E., YASUTOMI, Y., PERRY, H. C., FREED, D. C., LETVIN, N. L. & LIU, M. A. 1997. Anti-HIV env immunities elicited by nucleic acid vaccines. *Vaccine*, 15, 884-7.
- SHIVER, J. W. & EMINI, E. A. 2004. Recent advances in the development of HIV-1 vaccines using replication-incompetent adenovirus vectors. *Annu Rev Med*, 55, 355-72.
- SHIVER, J. W., FU, T. M., CHEN, L., CASIMIRO, D. R., DAVIES, M. E., EVANS, R. K., ZHANG, Z. Q., SIMON, A. J., TRIGONA, W. L., DUBEY, S. A., HUANG, L., HARRIS, V. A., LONG, R. S., LIANG, X., HANDT, L., SCHLEIF, W. A., ZHU, L., FREED, D. C., PERSAUD, N. V., GUAN, L., PUNT, K. S., TANG, A., CHEN, M., WILSON, K. A., COLLINS, K. B., HEIDECKER, G. J., FERNANDEZ, V. R., PERRY, H. C., JOYCE, J. G., GRIMM, K. M., COOK, J. C., KELLER, P. M., KRESOCK, D. S., MACH, H., TROUTMAN, R. D., ISOPI, L. A., WILLIAMS, D. M., XU, Z., BOHANNON, K. E., VOLKIN, D. B., MONTEFIORI, D. C., MIURA,

- A., KRIVULKA, G. R., LIFTON, M. A., KURODA, M. J., SCHMITZ, J. E., LETVIN, N. L., CAULFIELD, M. J., BETT, A. J., YOUIL, R., KASLOW, D. C. & EMINI, E. A. 2002. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. *Nature*, 415, 331-5.
- SHIVER, J. W., PERRY, H. C., DAVIES, M. E., FREED, D. C. & LIU, M. A. 1995. Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann N Y Acad Sci*, 772, 198-208.
- SIEGISMUND, C. S., HOHN, O., KURTH, R. & NORLEY, S. 2009. Enhanced T- and B-cell responses to simian immunodeficiency virus (SIV)agm, SIVmac and human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA immunization and identification of novel T-cell epitopes in mice via codon optimization. *J Gen Virol*, 90, 2513-8.
- SILICIANO, J. D., KAJDAS, J., FINZI, D., QUINN, T. C., CHADWICK, K., MARGOLICK, J. B., KOVACS, C., GANGE, S. J. & SILICIANO, R. F. 2003. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*, 9, 727-8.
- SIMON, M. A., CHALIFOUX, L. V. & RINGLER, D. J. 1992. Pathologic features of SIV-induced disease and the association of macrophage infection with disease evolution. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 8, 327-37.
- SIPO, I., KNAUF, M., FECHNER, H., POLLER, W., PLANZ, O., KURTH, R. & NORLEY, S. 2011. Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine*, 29, 1690-9.
- SONNENBERG, P., GLYNN, J. R., FIELDING, K., MURRAY, J., GODFREY, K., FAUSSETT, P. & SHEARER, S. 2005. How soon after infection with HIV does the risk of tuberculosis start to increase? A retrospective cohort study in South African gold miners. *Journal of Infectious Diseases*, 191(15): 150-8.
- STEINMAN, R. M., GRANELLI-PIPERNO, A., POPE, M., TRUMPFHELLER, C., IGNATIUS, R., ARRODE, G., RACZ, P. & TENNER-RACZ, K. 2003. The interaction of immunodeficiency viruses with dendritic cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, 276, 1-30.
- STREECK, H., FRAHM, N. & WALKER, B. D. 2009. The role of IFN-gamma Elispot assay in HIV vaccine research. *Nat Protoc*, 4, 461-9.
- TEN HAAFT, P., VERSTREPEN, B., UBERLA, K., ROSENWIRTH, B. & HEENEY, J. 1998. A pathogenic threshold of virus load defined in simian immunodeficiency virus- or simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol*, 72, 10281-5.
- TENBUSCH, M., KUATE, S., TIPPLER, B., GERLACH, N., SCHIMMER, S., DITTMER, U. & UBERLA, K. 2008. Coexpression of GM-CSF and antigen in DNA prime-adenoviral vector boost immunization enhances polyfunctional CD8+ T cell responses, whereas expression of GM-CSF antigen fusion protein induces autoimmunity. *BMC Immunol*, 9, 13.
- TENENBAUM, L., LEHTONEN, E. & MONAHAN, P. E. 2003. Evaluation of risks related to the use of adeno-associated virus-based vectors. *Curr Gene Ther*, 3, 545-65.
- THOMSEN, L. L., TOPLEY, P., DALY, M. G., BRETT, S. J. & TITE, J. P. 2004. Imiquimod and resiquimod in a mouse model: adjuvants for DNA vaccination by particle-mediated immunotherapeutic delivery. *Vaccine*, 22, 1799-809.
- TITOMIROV, A. V., SUKHAREV, S. & KISTANOVA, E. 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1088, 131-4.
- TROYER, R. M., MCNEVIN, J., LIU, Y., ZHANG, S. C., KRIZAN, R. W., ABRAHA, A., TEBIT, D. M., ZHAO, H., AVILA, S., LOBRITZ, M. A., MCEL RATH, M. J., LE GALL, S., MULLINS, J. I. & ARTS, E. J. 2009. Variable fitness impact of HIV-1

- escape mutations to cytotoxic T lymphocyte (CTL) response. *PLoS Pathog*, 5, e1000365.
- TSURUYAMA, T., NAKAI, T., HIRATSUKA, T., JIN, G., NAKAMURA, T. & YOSHIKAWA, K. 2010. In vitro HIV-1 selective integration into the target sequence and decoy-effect of the modified sequence. *PLoS One*, 5, e13841.
- UGEN, K. E., BOYER, J. D., WANG, B., BAGARAZZI, M., JAVADIAN, A., FROST, P., MERVA, M. M., AGADJANYAN, M. G., NYLAND, S., WILLIAMS, W. V., CONEY, L., CICCARELLI, R. & WEINER, D. B. 1997. Nucleic acid immunization of chimpanzees as a prophylactic/immunotherapeutic vaccination model for HIV-1: prelude to a clinical trial. *Vaccine*, 15, 927-30.
- UGEN, K. E., NYLAND, S. B., BOYER, J. D., VIDAL, C., LERA, L., RASHEID, S., CHATTERGOON, M., BAGARAZZI, M. L., CICCARELLI, R., HIGGINS, T., BAINE, Y., GINSBERG, R., MACGREGOR, R. R. & WEINER, D. B. 1998. DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine*, 16, 1818-21.
- ULMER, J. B., DONNELLY, J. J., PARKER, S. E., RHODES, G. H., FELGNER, P. L., DWARKI, V. J., GROMKOWSKI, S. H., DECK, R. R., DEWITT, C. M., FRIEDMAN, A. & ET AL. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259, 1745-9.
- UN-GENERALVERSAMMLUNG 2000. 55. Sitzung der UN Genralversammlung: Millenniums-Erklärung der Vereinten Nationen.
- VACCARI, M., POONAM, P. & FRANCHINI, G. 2010. Phase III HIV vaccine trial in Thailand: a step toward a protective vaccine for HIV. *Expert Rev Vaccines*, 9, 997-1005.
- VERON, P., ALLO, V., RIVIERE, C., BERNARD, J., DOUAR, A. M. & MASURIER, C. 2007. Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2. *J Virol*, 81, 5385-94.
- VOGELS, R., ZUIJDEEST, D., VAN MEERENDONK, M., COMPANJEN, A., GILLISSEN, G., SIJTSMA, J., MELIS, I., HOLTERMAN, L., RADOSEVIC, K., GOUDSMIT, J. & HAVENGA, M. J. 2007. High-level expression from two independent expression cassettes in replication-incompetent adenovirus type 35 vector. *J Gen Virol*, 88, 2915-24.
- WALKER, B. D. & KORBER, B. T. 2001. Immune control of HIV: the obstacles of HLA and viral diversity. *Nat Immunol*, 2, 473-5.
- WALKER, L. M., HUBER, M., DOORES, K. J., FALKOWSKA, E., PEJCHAL, R., JULIEN, J. P., WANG, S. K., RAMOS, A., CHAN-HUI, P. Y., MOYLE, M., MITCHAM, J. L., HAMMOND, P. W., OLSEN, O. A., PHUNG, P., FLING, S., WONG, C. H., PHOGAT, S., WRIN, T., SIMEK, M. D., PRINCIPAL INVESTIGATORS, P. G., KOFF, W. C., WILSON, I. A., BURTON, D. R. & POIGNARD, P. 2011. Broad neutralization coverage of HIV by multiple highly potent antibodies. *Nature*.
- WANG, B., BOYER, J., SRIKANTAN, V., CONEY, L., CARRANO, R., PHAN, C., MERVA, M., DANG, K., AGADJANYAN, M., GILBERT, L. & ET AL. 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol*, 12, 799-805.
- WANG, B., MERVA, M., DANG, K., UGEN, K. E., BOYER, J., WILLIAMS, W. V. & WEINER, D. B. 1994. DNA inoculation induces protective in vivo immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen-expressing cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 10 Suppl 2, S35-41.
- WANG, S., FARFAN-ARRIBAS, D. J., SHEN, S., CHOU, T. H., HIRSCH, A., HE, F. & LU, S. 2006. Relative contributions of codon usage, promoter efficiency and leader

- sequence to the antigen expression and immunogenicity of HIV-1 Env DNA vaccine. *Vaccine*, 24, 4531-40.
- WANG, Y., SMITH, J. A., KAMRADT, T., GEFTER, M. L. & PERKINS, D. L. 1992. Silencing of immunodominant epitopes by contiguous sequences in complex synthetic peptides. *Cell Immunol*, 143, 284-97.
- WANG, Z., MA, H. I., LI, J., SUN, L., ZHANG, J. & XIAO, X. 2003. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 10, 2105-11.
- WANG, Z., YANG, S., ZHOU, L., DU, H., MO, W. & ZENG, Y. 2011. Specific cellular immune responses in mice immunized with DNA, adeno-associated virus and adenoviral vaccines of Epstein-Barr virus-LMP2 alone or in combination. *Sci China Life Sci*, 54, 263-6.
- WATKINS, D. I., BURTON, D. R., KALLAS, E. G., MOORE, J. P. & KOFF, W. C. 2008. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat Med*, 14, 617-21.
- WILSON, N. A., KEELE, B. F., REED, J. S., PIASKOWSKI, S. M., MACNAIR, C. E., BETT, A. J., LIANG, X., WANG, F., THORYK, E., HEIDECKER, G. J., CITRON, M. P., HUANG, L., LIN, J., VITELLI, S., AHN, C. D., KAIZU, M., MANESS, N. J., REYNOLDS, M. R., FRIEDRICH, T. C., LOFFREDO, J. T., RAKASZ, E. G., ERICKSON, S., ALLISON, D. B., PIATAK, M., JR., LIFSON, J. D., SHIVER, J. W., CASIMIRO, D. R., SHAW, G. M., HAHN, B. H. & WATKINS, D. I. 2009. Vaccine-induced cellular responses control simian immunodeficiency virus replication after heterologous challenge. *J Virol*, 83, 6508-21.
- WODARZ, D. & NOWAK, M. A. 2002. Mathematical models of HIV pathogenesis and treatment. *Bioessays*, 24, 1178-87.
- WOODLAND, D. L. 2004. Jump-starting the immune system: prime-boosting comes of age. *Trends Immunol*, 25, 98-104.
- XIAO, X., LI, J. & SAMULSKI, R. J. 1998. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol*, 72, 2224-32.
- XIN, K. Q., JOUNAI, N., SOMEYA, K., HONMA, K., MIZUGUCHI, H., NAGANAWA, S., KITAMURA, K., HAYAKAWA, T., SAHA, S., TAKESHITA, F., OKUDA, K., HONDA, M., KLINMAN, D. M. & OKUDA, K. 2005. Prime-boost vaccination with plasmid DNA and a chimeric adenovirus type 5 vector with type 35 fiber induces protective immunity against HIV. *Gene Ther*, 12, 1769-77.
- XIN, K. Q., OOKI, T., MIZUKAMI, H., HAMAJIMA, K., OKUDELA, K., HASHIMOTO, K., KOJIMA, Y., JOUNAI, N., KUMAMOTO, Y., SASAKI, S., KLINMAN, D., OZAWA, K. & OKUDA, K. 2002. Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum Gene Ther*, 13, 1571-81.
- XIN, K. Q., SEKIMOTO, Y., TAKAHASHI, T., MIZUGUCHI, H., ICHINO, M., YOSHIDA, A. & OKUDA, K. 2007. Chimeric adenovirus 5/35 vector containing the clade C HIV gag gene induces a cross-reactive immune response against HIV. *Vaccine*, 25, 3809-15.
- XIN, K. Q., URABE, M., YANG, J., NOMIYAMA, K., MIZUKAMI, H., HAMAJIMA, K., NOMIYAMA, H., SAITO, T., IMAI, M., MONAHAN, J., OKUDA, K. & OZAWA, K. 2001. A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther*, 12, 1047-61.
- YABE, Y., TRENTIN, J. J. & TAYLOR, G. 1962. Cancer induction in hamsters by human type 12 adenovirus. Effect of age and of virus dose. *Proc Soc Exp Biol Med*, 111, 343-4.

- YANG, C. C., XIAO, X., ZHU, X., ANSARDI, D. C., EPSTEIN, N. D., FREY, M. R., MATERA, A. G. & SAMULSKI, R. J. 1997. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro. *J Virol*, 71, 9231-47.
- YASUTOMI, Y., ROBINSON, H. L., LU, S., MUSTAFA, F., LEKUTIS, C., ARTHOS, J., MULLINS, J. I., VOSS, G., MANSON, K., WYAND, M. & LETVIN, N. L. 1996. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction through DNA vaccination of rhesus monkeys. *J Virol*, 70, 678-81.
- ZHANG, Z., SCHULER, T., ZUPANCIC, M., WIETGREFE, S., STASKUS, K. A., REIMANN, K. A., REINHART, T. A., ROGAN, M., CAVERT, W., MILLER, C. J., VEAZEY, R. S., NOTERMANS, D., LITTLE, S., DANNER, S. A., RICHMAN, D. D., HAVLIR, D., WONG, J., JORDAN, H. L., SCHACKER, T. W., RACZ, P., TENNER-RACZ, K., LETVIN, N. L., WOLINSKY, S. & HAASE, A. T. 1999. Sexual transmission and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*, 286, 1353-7.
- ZHOU, L., ZHU, T., YE, X., YANG, L., WANG, B., LIANG, X., LU, L., TSAO, Y. P., CHEN, S. L., LI, J. & XIAO, X. 2010. Long-term protection against human papillomavirus e7-positive tumor by a single vaccination of adeno-associated virus vectors encoding a fusion protein of inactivated e7 of human papillomavirus 16/18 and heat shock protein 70. *Hum Gene Ther*, 21, 109-19.
- ZINCARELLI, C., SOLTYS, S., RENGO, G. & RABINOWITZ, J. E. 2008. Analysis of AAV Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol Ther*.

7 Anhang

7.1 Plasmid-Vektoren

pTH-gagCO

CMV-Promotor = Promotor des
Cytomegalievirus

Intron = β -Globin-Intron

gagCO-Gen = codonoptimiertes HIV-1 *gag*
Gen

V5-Tag = V5-Affinitätsmarkierung

hGH pA = Polyadenylierungssignal des
humanes Wachstumshormon

pUC ori = Ursprung der vegetativen
Replikation

AmpR = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen
(bla)

pTH-HIV/SIV Pol/RevNefTatgag

pUC ori = Ursprung der vegetativen
Replikation

AmpR = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen
(bla)

CMV-Promotor

HIV/SIV Insert = codonoptimierte HIV bzw.

SIV RevNefTatGag oder Pol-Konstrukte

Intron = β -Globin-Intron

V5-Tag = V5-Affinitätsmarkierung

hGH pA = Polyadenylierungssignal des
humanes Wachstumshormon

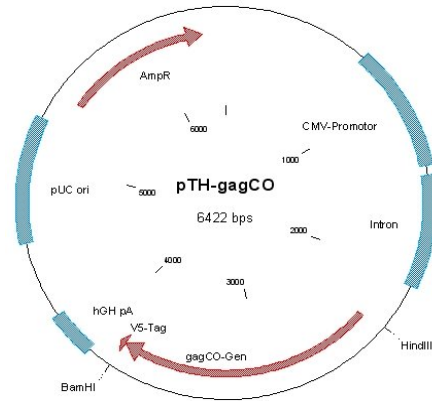
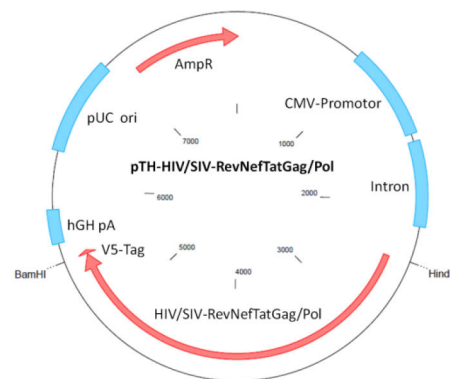


Abbildung 2.1 Plasmidkarte von pTH-gagCO (gagCO zur Verfügung gestellt von Dr. Hohn, RKI; pTH-Vektor von Hanke et al., 1998).



p5E18 VD2/9

AAV 2 Rep = *Rep*-Gen von AAV Serotyp 2

AAV 9 Cap = *Kapsid*-Gen von AAV Serotyp 9

LacZ Promotor = LacZ-Promotor des Lac-Operons

Amp^R = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen (bla)

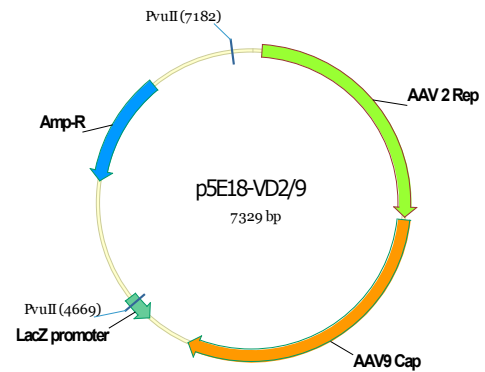


Abbildung 6.1.1 Plasmidkarte von p5E18 VD2/9

(zur Verfügung gestellt von Dr. Isaac Sipo, RKI).

pHelper

adeno E2A = Adenovirus *E2A*-Gen

adeno E4 = Adenovirus *E4*-Gen

adeno VA = Adenovirus *VA*-Gen

pUC ori = Ursprung der vegetativen Replikation

Ampicillin = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen (bla)

f1 ori = Ursprung der ssDNA-Replikation

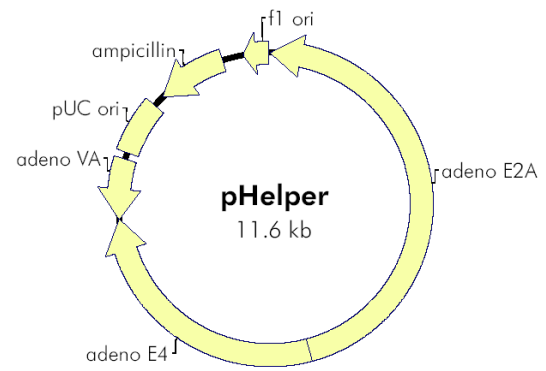


Abbildung 6.1.2 Plasmidkarte von pHelper (Stratagene).

pscAAV-GFP

5'-ITR = 5'-„inverted terminal repeat“

CMV-Promotor = CMV-Promotor

hrGFP = Gen für humanisiertes Renilla

reniformis grün fluoreszierendes Protein

hGH pA = Polyadenylierungssignal des

humanes Wachstumshormon

3'-ITRm = 3'-„inverted terminal repeat“ mit Deletion der „terminal resolution site“ (trs) und D-Sequenz

f1 ori = Ursprung der ssDNA-Replikation

Amp^R = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen (bla)

pUC ori = Ursprung der vegetativen Replikation

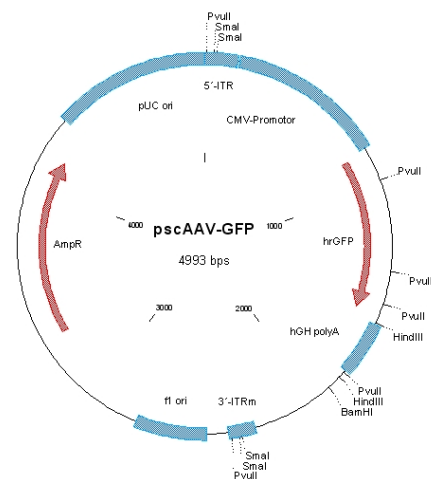


Abbildung 6.1.3 Plasmidkarte von pscAAV-GFP

(sc = „self-complementary“ = dimerisch) (Sipo et al., 2007).

pAAV-MCS

P CMV = CMV-Promotor

Intron = β -Globin-Intron

MCS = multiple cloning site

hGH pA = Polyadenylierungssignal des
humanes Wachstumshormon

L/R-ITR = 5'- und 3'- „inverted terminal
repeat“

f1 ori = Ursprung der ssDNA-Replikation

Ampicillin = Selektionsmarker β -Lactamase-
Gen (bla)

pUC ori = Ursprung der vegetativen
Replikation

pAAV-HIV/SIV Pol/RevNefTatGag

AmpR = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen
(bla)

pUC ori = Ursprung der vegetativen
Replikation

5'-ITR = 5'-„inverted terminal repeat“

CMV-Promotor

Intron = β -Globin-Intron

HIV/SIV Insert = codonoptimierte HIV bzw.

SIV RevNefTatGag oder Pol-Konstrukte

V5-Tag = V5-Affinitätsmarkierung

hGH pA = Polyadenylierungssignal des
humanes Wachstumshormon

3'-ITRm = 3'- „inverted terminal repeat“

f1 ori = Ursprung der ssDNA-Replikation

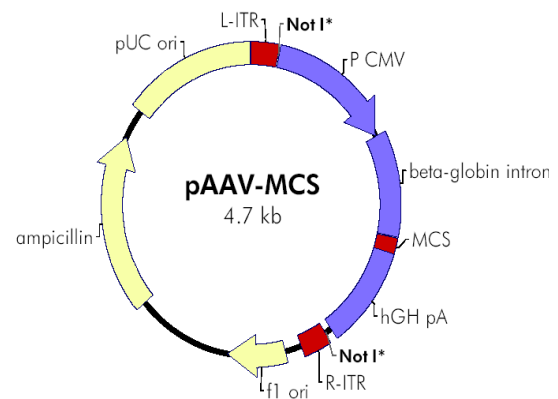


Abbildung 6.1.4 Plasmidkarte des
pAAV-MCS Klonierungsvektors
(Stratagene).

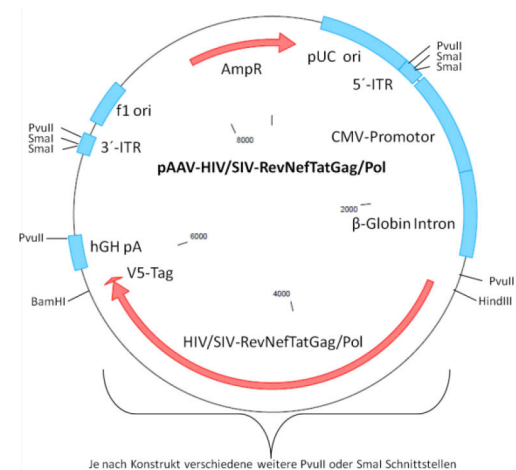


Abbildung 6.1.4 Plasmidkarte der
pAAV-HIV/SIV-Pol/RevNefTatGag
Plasmidvektoren

pAAV-HIV/SIV halbiert Pol 1./2. Teil oder Revneftat bzw. Gag

AmpR = Selektionsmarker β -Lactamase-Gen (bla)

pUC ori = Ursprung der vegetativen Replikation

5'-ITR = 5'-„inverted terminal repeat“

CMV-Promotor

Intron = β -Globin-Intron

HIV/SIV Insert = halbierte und codonoptimierte HIV bzw. SIV RevNefTat- und Gag- oder Pol1- oder Pol2-Konstrukte

V5-Tag = V5-Affinitätsmarkierung

hGH pA = Polyadenylierungssignal des humanes Wachstumshormon

3'-ITRm = 3'- „inverted terminal repeat“

f1 ori = Ursprung der ssDNA-Replikation

pAdEasy-1

Left/right arm homology = homologe Bereiche zu pShuttle

Kanamycin = Kanamycin Resistenz-Gen

pBR322 ori = Ursprung der vegetativen Replikation

Ad5 (E1/E3-deleted) = Ad5 Genom mit Deletion des *E1* (Replikation) und *E3* (Immunmodulation) Gens

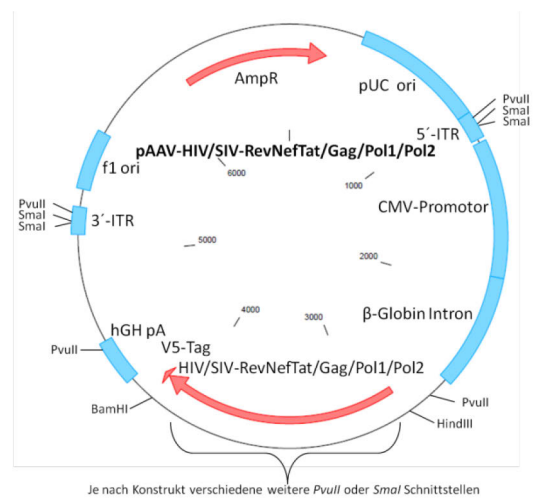


Abbildung 6.1.5 Plasmidkarte der halbierten pAAV-HIV/SIV-RevNefTat/Gag und Pol1/Pol2 Plasmidvektoren

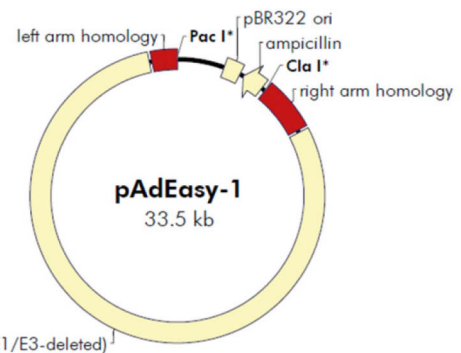


Abbildung 6.1.6 Plasmidkarte von pAdEasy-1 (Stratagene)

pShuttle-CMV

L-LTR/R-LTR = linker und rechter „long terminal repeat“

MCS = multiple cloning site

Left/right arm homology = homologe Bereiche zu pAdEasy-1

KanR = Kanamycin Resistenz-Gen

pBR322 ori = Ursprung der vegetativen Replikation

ES = Verkapselungssignal

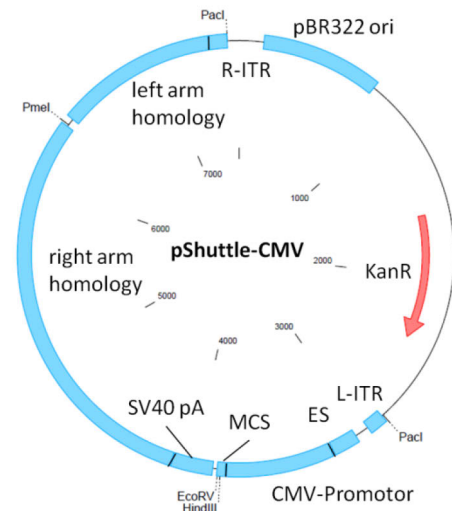


Abbildung 6.1.7 Plasmidkarte des pShuttle-CMV Klonierungsvektors (Stratagene).

pShuttle-CMV-HIV/SIV Pol/Revneftatgag

L-LTR/R-LTR = linker und rechter „long terminal repeat“

HIV/SIV Insert = codonoptimierte HIV bzw. SIV RevNefTatGag oder Pol-Konstrukte

Left/right arm homology = homologe Bereiche zu pAdEasy-1

KanR = Kanamycin Resistenz-Gen

pBR322 ori = Ursprung der vegetativen

Replikation

ES = Verkapselungssignal

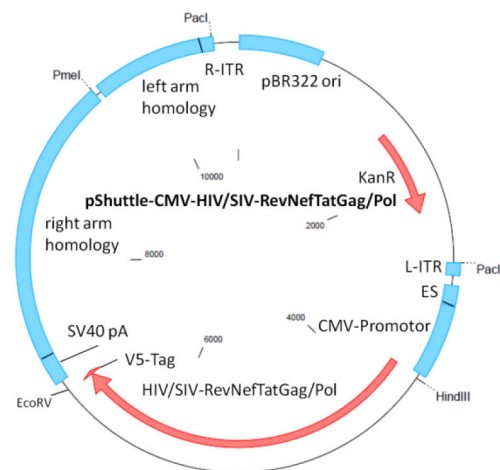


Abbildung 6.1.7 Plasmidkarte der pShuttle-CMV-HIV/SIV-Pol/RevNefTatGag Plasmidvektoren

7.2 Primersequenzen

Tabelle 2.8 Nukleotidsequenz der verwendeten PCR-Primer.

Halbierungsprimer	Sequenz (5'-3')
HIV1 1f	GCAGCGGCAGAAGAAGATGCAG
HIV1 2r	CAGTCCAATCCCAGCAAAGG
HIV1 1r	ATTGGATCC-GCGTGCCTACTTACCT
HIV1 2f	ATGAAGCTTGCCACCATG-GGGCAGGGCCAATGGAC
HIV2 1r	GTAGGATCC-CACGGCGAATCTTTCC
HIV2 2f	TCAAAGCTTGCCACCATG-CTGCGCCCAGGGGGGCAAAA
SIV1 1r	GCGGATCC-CTGTTCCCTGGGACAGA
SIV1 2f	GCTAAGCTTGCCACCATG-TGGGCCGCCAGATCTA
SIV2 1r	CTGGATCC-GTTAGGCCGCGAGTCTG
SIV2 2f	TGAAAGCTTGCCACCATG-TCCAACCGGACAAGACT

Detektionsprimer RCA	Sequenz (5'-3')
RCA-f	TGACATGACCATGAAGATCT
RCA-r	GAATCATGTAAAATCTTGG

Primer und Sonde	Sequenz (5'-3')
CMV-TaqMan Vorwärtsprimer (Invitrogen)	TGGAGTTCGCGTTACATAACTTAC
CMV-TaqMan Rückwärtsprimer (Invitrogen)	CTATTGGCGTACTATGGGAACATAC
CMV FAM-Sonde (TIB MOLBIOL)	6FAM-CCTGGCTGACCGCCCAACGAC-BHQ1

7.3 Peptidsequenzen

Die bei der EliSpot Epitopenkartierung bestimmten reaktiven Peptide wurden gelb markiert.

HIV-1 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set (reactive Pe

1	FFREDLAFPQGKARE	41	ETVPVKLKPGMDGPK	81	KILEPFRKQNPDIVI
2	DLAFPQGKAREFSSE	42	VKLKPGMDGPKVKQW	82	PFRKQNPDIVIYQYM
3	PQGKAREFSSEQTRA	43	PGMDGPKVKQWPLTE	83	QNPDIVIYQYMDDLY
4	AREFSSEQTRANSPT	44	GPKVKQWPLTEEKIK	84	IVIYQYMDDLYVGS
5	SSEQTRANSPTRREL	45	KQWPLTEEKIKALVE	85	QYMDDLYVGSLEIG
6	TRANSPTRRELQVWG	46	LTEEKIKALVEICTE	86	DLYVGSLEIGQHRT
7	SPTRELQWGRDNN	47	KIKALVEICTEMEKE	87	GSDLEIGQHRTKIEE
8	RELQWGRDNNLSE	48	LVEICTEMEKEGKIS	88	EIGQHRTKIEELRQH
9	VWGRDNNLSEAGAD	49	CTEMEKEGKISKIGP	89	HRTKIEELRQHLLRW
10	DNNLSEAGADRQGT	50	EKEGKISKIGPENPY	90	IEELRQHLLRWGFTT
11	LSEAGADRQGTVSFS	51	KISKIGPENPYNTPV	91	RQHLLRWGFTTPDKK
12	GADRQGTVSFSFPQI	52	IGPENPYNTPVFAIK	92	LRWGFTTPDKKHQKE
13	QGTVSFSFPQITLWQ	53	NPYNTPVFAIKKDS	93	FTTPDKKHQKEPFL
14	SFSFPQITLWQRPLV	54	TPVFAIKKDKSTKWR	94	DKKHQKEPFLWMGY
15	PQITLWQRPLVTIKI	55	AIKKDKSTKWRKLV	95	QKEPFLWMGYELHP
16	LWQRPLVTIKIGGQI	56	KDKSTKWRKLVDFREL	96	PFLWMGYELHPDKWT
17	PLVTIKIGGQIKEAL	57	KWRKLVDFRELNKRT	97	MGYELHPDKWTVQPI
18	IKIGGQIKEALLDTG	58	LVDFRELNKRTQDFW	98	LHPDKWTVQPIVPE
19	GQIKEALLDTGADDT	59	RELNKRTQDFWEVQL	99	KWTVQPIVPEKDSW
20	EALLDTGADDTVLEE	60	KRTQDFWEVQLGIPH	100	QPIVPEKDSWTVND
21	DTGADDTVLEEMNLP	61	DFWEVQLGIPHPAGL	101	LPEKDSWTVNDIQKL
22	DDTVLEEMNLPGRWK	62	VQLGIPHPAGLKKKK	102	DSWTVNDIQKLVGKL
23	LEEMNLPGRWKPKMI	63	IPHPAGLKKKKSSTV	103	VNDIQKLVGKLNWAS
24	NLPGRWKPKMIGGIG	64	AGLKKKKSSTVLDVG	104	QKLVGKLNWASQIYA
25	RWKPKMIGGIGGFIK	65	KKKKSSTVLDVGDAYF	105	GKLNWASQIYAGIKV
26	KMIGGIGGFIKVRQY	66	VTVLDVGDAYFSVPL	106	WASQIYAGIKVKQLC
27	GIGGFIKVRQYDQIL	67	DVGDAYFSVPLDKDF	107	IYAGIKVKQLCKLLR
28	FIKVRQYDQILIEIC	68	AYFSVPLDKDFRKYT	108	IKVKQLCKLLRGTKA
29	RQYDQILIEICGHKA	69	VPLDKDFRKYTAFTI	109	QLCKLLRGTKALTEV
30	QILIEICGHKAIGTV	70	KDFRKYTAFTIPSIN	110	LLRGTKALTEVIPLT
31	EICGHKAIGTVLVGP	71	KYTAFTIPSINNETP	111	TKALTEVIPLTEEAE
32	HKAIGTVLVGPTPVN	72	FTIPSINNETPGIRY	112	TEVIPLTEEAELELA
33	GTVLVGPTPVNIIGR	73	SINNETPGIRYQYNV	113	PLTEEAELELAENRE
34	VGPTPVNIIGRNLLT	74	ETPGIRYQYNVLPQG	114	EAELELAENREILKE
35	PVNIIGRNLLTQIGC	75	IRYQYNVLPQGWKGS	115	ELAENREILKEPVHG
36	IGRNLLTQIGCTLNF	76	YNVLPQGWKGSIPAIF	116	NREILKEPVHGVVYD
37	LLTQIGCTLNFPISP	77	PQGWKGSIPAIFQSSM	117	LKEPVHGVVYDPSKD
38	IGCTLNFPISPIETV	78	KGSPAIFQSSMTKIL	118	VHGVVYDPSKDLIAE
39	LNFPISPIETVPVKL	79	AIFQSSMTKILEPFR	119	YDPSKDLIAEIQKQ
40	ISPIETVPVKLKPGM	80	SSMTKILEPFRKQNP	120	SKDLIAEIQKQGGQ

HIV-1 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set

121	IAEIQKQGQGQWTYQ	161	LQDSGLEVNIVTDSQ	201	AEVIPAETGQETAYF
122	QKQGQGQWTYQIYQE	162	GLEVNIVTDSQYALG	202	PAETGQETAYFLLKL
123	QGQWTYQIYQEPFKN	163	NIVTDSQYALGIIQA	203	GQETAYFLLKLAGRW
124	TYQIYQEPFKNLKTG	164	DSQYALGIIQAQPKD	204	AYFLLKLAGRWPVK
125	YQEPFKNLKTGKYAR	165	ALGIIQAQPKSESE	205	LKLAGRWPVKTIHTD
126	FKNLKTGKYARMRGA	166	IQAQPKSESELVSQ	206	GRWPVKTIHTDNQSN
127	KTGKYARMRGAHTND	167	PKSESELVSQIIIEQ	207	VKTIHTDNQSNFTST
128	YARMRGAHTNDVKQL	168	ESELVSQIIIEQLIKK	208	HTDNQSNFTSTTVKA
129	RGHTNDVKQLTEAV	169	VSQIIIEQLIKKEKVV	209	GSNFTSTTVKAACWW
130	TNDVKQLTEAVQKIA	170	IEQLIKKEKVYLAWV	210	TSTTVKAACWWAGIK
131	KQLTEAVQKIATESI	171	IKKEKVYLAWVPAHK	211	VKAACWWAGIKQEFQ
132	EAVQKIATESIVIWG	172	KVYLAWVPAHKGIGG	212	CWWAGIKQEFQIPYN
133	KIATESIVIWGKTPK	173	AWVPAHKGIGGNEQV	213	GIKQEFQIPYNPQSQ
134	ESIVIWGKTPKFKLP	174	AHKGIGGNEQVDKLV	214	EFGIPYNPQSQGVVE
135	IWGKTPKFKLPIQKE	175	IGGNEQVDKLVSAGI	215	PYNPQSQGVVESMKN
136	TPKFKLPIQKETWEA	176	EQVDKLVSAGIRKVL	216	QSQGVVESMKNKELK
137	KLPIQKETWEAWWTE	177	KLVSAGIRKVLFLDG	217	VVESMKNKELKKIIGQ
138	QKETWEAWWTEYWQA	178	AGIRKVLFLDGIDKA	218	MKNKELKKIIGQVRDQ
139	WEAWWTEYWQATWIP	179	KVLFLDGIDKAQEEH	219	LKKIIGQVRDQAEHL
140	WTEYWQATWIPEWEF	180	LDGIDKAQEEHEKYH	220	IGQVRDQAEHLKTAV
141	WQATWIPEWEFVNT	181	DKAQEEHEKYHSNWR	221	RDQAEHLKTAVQMAV
142	WIPEWEFVNTPLVK	182	EEHEKYHSNWRAMAS	222	EHLKTAVQMAVFIHN
143	WEFVNTPLVKLWYQ	183	KYHSNWRAMASDFNL	223	TAVQMAVFIHNFKRK
144	NTPPLVKLWYQLEKE	184	NWRAMASDFNLPPVV	224	MAVFIHNFKRKGGIG
145	LVKLWYQLEKEPIVG	185	MASDFNLPPVVAKEI	225	IHNFKRKGIGGYSA
146	WYQLEKEPIVGAETF	186	FNLPPVVAKEIVASC	226	KRKGIGGYSAGERI
147	EKEPIVGAETFYVDG	187	PVVAKEIVASCDCQ	227	GIGGYSAGERIVDII
148	IVGAETFYVDGAANR	188	KEIVASCDCQQLKGE	228	YSAGERIVDIIATDI
149	ETFYVDGAANRETKL	189	ASDCQQLKGEAMHG	229	ERIVDIIATDIQTKE
150	VDGAANRETKLGKAG	190	KCQLKGEAMHGQVDC	230	DIIATDIQTKELQKQ
151	ANRETKLGKAGYVTD	191	KGEAMHGQVDCSPGI	231	TDIQTKEQKQITKI
152	TKLGKAGYVTDGRGRQ	192	MHGQVDCSPGIWQLD	232	TKELQKQITKIQNFR
153	KAGYVTDGRGRQKVV	193	VDCSPGIWQLDCTHL	233	QKQITKIQNFRVYYR
154	VTDGRGRQKVVSLTDT	194	PGIWQLDCTHLEGKI	234	TKIQNFRVYYRDSRD
155	GRQKVVSLDTTNNQK	195	QLDCTHLEGKIILVA	235	NFRVYYRDSRDPLWK
156	VVSLDTTNNQKTELQ	196	THLEGKIILVAVHVA	236	YYRDSRDPLWKGPAK
157	DTTNNQKTELQAIHL	197	GKIILVAVHVASGYI	237	SRDPLWKGPAKLLWK
158	NQKTELQAIHLALQD	198	LVAVHVASGYIEAEV	238	LWKGPAKLLWKGEGA
159	ELQAIHLALQDSGLE	199	HVASGYIEAEVIPAE	239	PAKLLWKGEGAVVIQ
160	IHLALQDSGLEVNIV	200	GYIEAEVIPAETGQE	240	LWKGEGAVVIQDNSD

HIV-1 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set

241	EGAVVIQDNSDIKVV
242	VIQDNSDIKVVPRRK
243	NSDIKVVPRRKAKII
244	KVVPRRKAKIIRDYG
245	RRKAKIIRDYGKQMA
246	KIIRDYGKQMAGDDC
247	DYGKQMAGDDCVASR
248	QMAGDDCVASRQDED
249	DDCVASRQDED

HIV-1 Consensus B Rev (15-mer) Peptid Set

1	MEPVDPRLEPWKHPG
2	DPRLEPWKHPGSQPK
3	EPWKHPGSQPKTACT
4	HPGSQPKTACTNCYC
5	QPKTACTNCYCKKCC
6	ACTNCYCKKCCFHCQ
7	CYCKKCCFHCQVCFI
8	KCCFHCQVCFITKGL
9	HCQVCFITKGLGISY
10	CFITKGLGISYGRKK
11	KGLGISYGRKKRRQR
12	ISYGRKKRRQRRRAP
13	RKKRRQRRRAPQDSQ
14	RQRRRAPQDSQTHQV
15	RAPQDSQTHQVLSK
16	DSQTHQVLSKQPAS
17	HQVLSKQPASQPRG
18	LSKQPASQPRGDPTG
19	PASQPRGDPTGPKES
20	PRGDPTGPKESKKKV
21	PTGPKESKKKVERET
22	KESKKKVERETETDP
23	KKVERETETDPVDQ

HIV-1 Consensus B Gag (15-mer) Peptid Set

1	MGARASVLSGGELDR	43	IPMFSALSEGATPQD	85	LGPAATLEEMMTACQ
2	ASVLSGGELDRWEKI	44	SALSEGATPQDLNTM	86	ATLEEMMTACQGVGG
3	SGGELDRWEKIRLRP	45	EGATPQDLNTMLNTV	87	EMMTACQGVGGPGHK
4	LDRWEKIRLRPGGKK	46	PQDLNTMLNTVGGHQ	88	ACQGVGGPGHKARVL
5	EKIRLRPGGKKKYKL	47	NTMLNTVGGHQAMQ	89	VGGPGHKARVLAEAM
6	LRPGGKKKYKLKHIV	48	NTVGGHQAMQMLKE	90	GHKARVLAEAMSQVT
7	GKKKYKLKHIVWASR	49	GHQAAMQMLKETINE	91	RVLAEAMSQVTNSAT
8	YKLKHIVWASRELER	50	AMQMLKETINEEAAE	92	EAMSQVTNSATIMMQ
9	HIVWASRELERFAVN	51	LKETINEEAAEWDR	93	QVTNSATIMMQRGNF
10	ASRELERFAVNPGLL	52	INEEAAEWDRLHPVH	94	SATIMMQRGNFRNQR
11	LERFAVNPGLLETSE	53	AAEWDRLHPVHAGPI	95	MMQRGNFRNQRKTVK
12	AVNPGLLETSEGRQ	54	DRLHPVHAGPIAPGQ	96	GNFRNQRKTVKCFNC
13	GLLETSEGRQILGQ	55	PVHAGPIAPGQMPREP	97	NQRKTVKCFNCGKEG
14	TSEGRQILGQLQPS	56	GPIAPGQMREPRGSD	98	TVKCFNCGKEGHIK
15	CRQILGQLQPSLQTG	57	PGQMREPRGSDIAGT	99	FNCGKEGHIKNCRA
16	LGQLQPSLQTGSEEL	58	REPRGSDIAGTTSTL	100	KEGHIKNCRAPRKK
17	QPSLQTGSEELRSLY	59	GSDIAGTTSTLQEQI	101	IAKNCRAPRKKGCWK
18	QTGSEELRSLYNTVA	60	AGTTSTLQEQIGWMT	102	CRAPRKKGCWKCGKE
19	EELRSLYNTVATLYC	61	STLQEQIGWMTNPP	103	RKKGCWKCGKEGHQM
20	SLYNTVATLYCVHQR	62	EQIGWMTNPPPIVG	104	CWKCGKEGHQMKDCT
21	TVATLYCVHQRIEVK	63	WMTNPPPIVGEIYK	105	GKEGHQMKDCTERQA
22	LYCVHQRIEVKDTKE	64	NPPIVGEIYKRWII	106	HQMKDCTERQANFLG
23	HQRIEVKDTKEALEK	65	PVGEIYKRWIILGLN	107	DCTERQANFLGKIWP
24	EVKDTKEALEKIEEE	66	IYKRWIILGLNKIVR	108	RQANFLGKIWP SHKG
25	TKEALEKIEEEQNKS	67	WIILGLNKIVRMYS	109	FLGKIWP SHKGRPGN
26	LEKIEEEQNKSKKKA	68	GLNKIVRMYSPTSIL	110	IWP SHKGRPGN FLQS
27	EEEQNKSKKKAQQA	69	IVRMYSPTSILDIRQ	111	HKGRPGN FLQSRPEP
28	NKSKKKAQQAADTG	70	YSPTSILDIRQGPKE	112	PGN FLQSRPEPTAPP
29	KKAQQAADTGNSSQ	71	SILDIRQGPKEPFRD	113	LQSRPEPTAPPEESF
30	QAADTGNSSQVSQN	72	IRQGPKEPFRDYVDR	114	PEPTAPPEESFRFGE
31	DTGNSSQVSQNYPIV	73	PKEPFRDYVDRFYKT	115	APPEESFRFGEETTT
32	SSQVSQNYPIVQNLQ	74	FRDYVDRFYKTLRAE	116	ESFRFGEETTTPSQK
33	SQNYPIVQNLQGMV	75	VDRFYKTLRAEQASQ	117	FGEETTTPSQKQEPI
34	PIVQNLQGMVHQAI	76	YKTLRAEQASQEVKN	118	TTTPSQKQEPIDKEL
35	NLQGMVHQAI SPRT	77	RAEQASQEVKNWMT	119	SQKQEPIDKELYPLA
36	QMVHQAI SPRTLNAW	78	ASQEVKNWMTETLLV	120	EPIDKELYPLASLRS
37	QAISPRTLNAWVKV	79	VKNWMTETLLVQAN	121	KELYPLASLRS LFGN
38	PRTLNAWVKVVEEKA	80	MTETLLVQANPDCK	122	PLASLRS LFGNDPSS
39	NAWVKVVEEKAFSPE	81	LLVQANPDCKTILK	123	LRSLFGNDPSSQ
40	KVVEEKAFSPEVIPM	82	NANPDCKTILKALGP		
41	EKA FSPEVIPMFSAL	83	DCKTILKALGPAATL		
42	SPEVIPMFSALSEGA	84	ILKALGPAATLEEMM		

HIV-1 Consensus B Nef (15-mer) Peptid Set

1	MGGKWSKRSVVGWPT	43	SLHGMDDPEREVLEW
2	WSKRSVVGWPTVRER	44	MDDPEREVLEWKFDS
3	SVVGWPTVRERMRA	45	EREVLEWKFDSRLAF
4	WPTVRERMRAEPAA	46	LEWKFDSRLAFHHMA
5	RERMRAEPAADGVG	47	FDSRLAFHHMARELH
6	RRAEPAADGVGAVSR	48	LAFHHMARELHPEYY
7	PAADGVGAVSRDLEK	49	HMARELHPEYYKDC
8	GVGAVSRDLEKHGAI		
9	VSRDLEKHGAITSSN		
10	LEKHGAITSSNTAAN		
11	GAITSSNTAANNADC		
12	SSNTAANNADCAWLE		
13	AANNADCAWLEAQEE		
14	ADCAWLEAQEEEEVG		
15	WLEAQEEEEVGFPVR		
16	QEEEEVGFPVRPQVP		
17	EVGFPVRPQVPLRPM		
18	PVRPQVPLRPMTYKA		
19	QVPLRPMTYKAAVDL		
20	RPMTYKAAVDLSHFL		
21	YKAAVDLSHFLKEKG		
22	VDLSHFLKEKGGLEG		
23	HFLKEKGGLEGLIYS		
24	EKGGLEGLIYSQKRQ		
25	LEGLIYSQKRQDILD		
26	IYSQKRQDILDWVY		
27	KRQDILDWVYHTQG		
28	ILDWVYHTQGYFPD		
29	VYHTQGYFPDWQNY		
30	TQGYFPDWQNYTPGP		
31	FPDWQNYTPGPGIRY		
32	QNYTPGPGIRYPLTF		
33	PGPGIRYPLTFGWCF		
34	IRYPLTFGWCFKLP		
35	LTFGWCFKLPVEPE		
36	WCFKLPVEPEKVEE		
37	LVPVEPEKVEEANEG		
38	EPEKVEEANEGENNS		
39	VEEANEGENNSLLHP		
40	NEGENNSLLHPMSLH		
41	NNSLLHPMSLHGMD		
42	LHPMSLHGMDPERE		

SIVmac239 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set

1	VLELWERGTLCKAMQ	43	KNVEIEVLGKRIKGT	85	AFTLPSVNNNAEPGKR
2	WERGTLCKAMQSPKK	44	IEVLGKRIKGTIMTG	86	PSVNNNAEPGKRYIYK
3	TLCKAMQSPKKTGML	45	GKRIKGTIMTGDTPI	87	NAEPGKRYIYKVLQP
4	AMQSPKKTGMLEMWK	46	KGTIMTGDTPINIFG	88	GKRYIYKVLPPQGWKG
5	PKKTGMLEMWKNGPC	47	MTGDTPINIFGRNLL	89	IYKVLPPQGWKGSPA
6	GMLEMWKNGPCYQGM	48	TPINIFGRNLLTALG	90	LPQGWKGSPAIFQYT
7	MWKNGPCYQGMQRQT	49	IFGRNLLTALGMSLN	91	WKGSPAIFQYTMRHV
8	GPCYQGMQRQTGGFF	50	NLLTALGMSLNFPIA	92	PAIFQYTMRHVLEPF
9	GQMPRQTGGFFRPWS	51	ALGMSLNFPIAKVEP	93	QYTMRHVLEPFRRKAN
10	RQTGGFFRPWSMGKE	52	SLNFPIAKVEPVKVA	94	RHVLEPFRRKANPDVT
11	GFFRPWSMGKEAPQF	53	PIAKVEPVKVALKPG	95	EPFRKANPDVTLVQY
12	PWSMGKEAPQFPHGS	54	VEPVKVALKPGKDG	96	KANPDVTLVQYMDDI
13	GKEAPQFPHGSSASG	55	KVALKPGKDGPKLKQ	97	DVTLVQYMDDILIAS
14	PQFPHGSSASGADAN	56	KPGKDGPKLKQWPLS	98	VQYMDDILIASDRTD
15	HGSSASGADANCS	57	DGPKLKQWPLSKEKI	99	DDILIASDRTDLEHD
16	ASGADANCSRG	58	LKQWPLSKEKIVALR	100	IASDRTDLEHDRVVL
17	DANCSRG	59	PLSKEKIVALREICE	101	RTDLEHDRVVLQSKE
18	SRG	60	EKIVALREICEKMEK	102	EHDRVVLQSKELLNS
19	PSCGSAKELH	61	ALREICEKMEKDGQL	103	VVLQSKELLNSIGFS
20	SAKELH	62	ICEKMEKDGQLEEAP	104	SKELLNSIGFSTPEE
21	LH	63	MEKDGQLEEAPPTNP	105	LNSIGFSTPEEKFKQ
22	GQA	64	GQLEEAPPTNPYNT	106	GFSTPEEKFKQDPPF
23	ERKA	65	EAPPTNPYNTPTFAI	107	PEEKFKQDPPFQWMG
24	ERKQ	66	TNPYNTPTFAIKKD	108	FQKDPPFQWMGYELW
25	REAL	67	NTPTFAIKKDKNKW	109	PPFQWMGYELWPTKW
26	QGG	68	FAIKKDKNKWRMLI	110	WMGYELWPTKWKLQK
27	RGFA	69	KKDKNKWRMLIDFRE	111	ELWPTKWKLQKIELP
28	APQF	70	NKWRMLIDFRELNRV	112	TKWKLQKIELPQRET
29	SLW	71	MLIDFRELNRVTQDF	113	LQKIELPQRETWTVN
30	RPV	72	FRELNRVTQDFTEVQ	114	ELPQRETWTVNDIQK
31	TAH	73	NRVTQDFTEVQLGIP	115	RETWTVNDIQKLVGV
32	EGQ	74	QDFTEVQLGIPHPAG	116	TVNDIQKLVGVLNWA
33	VEV	75	EVQLGIPHPAGLAKR	117	IQKLVGVLNWAAQIY
34	LDT	76	GIPHPAGLAKRKRT	118	VGVLNWAAQIYPGIK
35	ADD	77	PAGLAKRKRTVLDI	119	NWAAQIYPGIKTKHL
36	IVT	78	AKRKRTVLDIGDAY	120	QIYPGIKTKHLCLRI
37	IEL	79	RITVLDIGDAYFSIP	121	GIKTKHLCLRLIRGKM
38	PHY	80	LDIGDAYFSIPLDEE	122	KHLCLRLIRGKMTLTE
39	PKI	81	DAYFSIPLDEEFRQY	123	RLIRGKMTLTEEVQW
40	GGI	82	SIPLDEEFRQYTAFT	124	GKMTLTEEVQWTEMA
41	GFINT	83	DEEFRQYTAFTLPSV	125	LTEEVQWTEMAEAEY
42	TKEY	84	RQYTAFTLPSVNNAE	126	VQWTEMAEAEYEENK

SIVmac239 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set

127	EMAEAEYEENKIILS	169	VKVLQTTNQQAELE	211	IVAVHVASGFIEAEV
128	AEEYENKIILSQEQE	170	EQTNNQQAELAFML	212	HVASGFIEAEVIPQE
129	ENKIILSQEQEGCYY	171	NQQAELAFMLALTD	213	GFIEAEVIPQETGRQ
130	ILSQEQEGCYYQEGK	172	ELEAFMLALTDSGPK	214	AEVIPQETGRQTALF
131	EQEGCYYQEGKPLEA	173	FLMALTDSGPKANII	215	PQETGRQTALFLLKL
132	CYYQEGKPLEATVIK	174	LTDSGPKANIIVDSQ	216	GRQTALFLLKLAGRW
133	EGKPLEATVIKSQDN	175	GPKANIIVDSQYVMG	217	ALFLLKLAGRWPITH
134	LEATVIKSQDNQWSY	176	NIIVDSQYVMGIITG	218	LKLAGRWPITHLHTD
135	VIKSQDNQWSYKIHQ	177	DSQYVMGIITGCPT	219	GRWPITHLHTDNGAN
136	QDNQWSYKIHQEDKI	178	VMGIITGCPTESER	220	ITHLHTDNGANFASQ
137	WSYKIHQEDKILKVG	179	ITGCPTESERLVNQ	221	HTDNGANFASQEVKM
138	IHQEDKILKVGKFAK	180	PTESESRLVNIIEE	222	GANFASQEVKMVAWW
139	DKILKVGKFAKIKNT	181	ESRLVNIIEEMIKK	223	ASQEVKMVAWWAGIE
140	KVGKFAKIKNTHTNG	182	VNIIEEMIKKSEIY	224	VKMVAWWAGIEHTFG
141	FAKIKNTHTNGVRL	183	IEEMIKKSEIYVAWV	225	AWWAGIEHTFGVPYN
142	KNTHTNGVRLLAHVI	184	IKKSEIYVAWVPAHK	226	GIEHTFGVPYNPQSQ
143	TNGVRLLAHVIQKIG	185	EIYVAWVPAHKGIGG	227	TFGVPYNPQSQGVVE
144	RLLAHVIQKIGKEAI	186	AWVPAHKGIGGNQEI	228	PYNPQSQGVVEAMNH
145	HVIQKIGKEAIVIWG	187	AHKGIGGNQEIDHLV	229	QSQGVVEAMNHHLKN
146	KIGKEAIVIWGQVPK	188	IGGNQEIDHLVSQGI	230	VVEAMNHHLKNQIDR
147	EIVIWGQVPKFHLP	189	QEIDHLVSQGIRQVL	231	MNHHLKNQIDRIREQ
148	IWGQVPKFHLPVEKD	190	HLVSQGIRQVLFLEK	232	LKNQIDRIREQANSV
149	VPKFHLPVEKDVWEQ	191	QGIRQVLFLEKIEPA	233	IDRIREQANSVETIV
150	HLPVEKDVWEQWWTD	192	QVLFLEKIEPAQEEH	234	REQANSVETIVLMAV
151	EKDVWEQWWTDYWQV	193	LEKIEPAQEEHDKYH	235	NSVETIVLMAVHCMN
152	WEQWWTDYWQVTWIP	194	EPAQEEHDKYHSNVK	236	TIVLMAVHCMNFKRR
153	WDYWQVTWIPEWDF	195	EEHDKYHSNVKELVF	237	MAVHCMNFKRRGGIG
154	WQVTWIPEWDFISTP	196	KYHSNVKELVFKFGL	238	CMNFKRRGGIGDMTP
155	WIPEWDFISTPPLVR	197	NVKELVFKFGLPRIV	239	KRRGGIGDMTPAERL
156	WDFISTPPLVRLVFN	198	LVFKFGLPRIVARQI	240	GIGDMTPAERLINMI
157	STPPLVRLVFNLVKD	199	FGLPRIVARQIVDTC	241	MTPAERLINMITTEQ
158	LVRLVFNLVKDPIEG	200	RIVARQIVDTCDKCH	242	ERLINMITTEQEIQF
159	VFNLVKDPIEGEETY	201	RQIVDTCDKCHQKGE	243	NMITTEQEIQFQQSK
160	VKDPIEGEETYTDG	202	DTCDKCHQKGEAIGH	244	TEQEIQFQQSKNSKF
161	IEGEETYTDGSCNK	203	KCHQKGEAIGHQANS	245	IQFQQSKNSKFNFR
162	ETYYTDGSCNKQSKE	204	KGEAIGHQANSDLGT	246	QSKNSKFNFRVYYR
163	TDGSCNKQSKEGKAG	205	IHQANSDLGTWQMD	247	SKFNFRVYYREGRD
164	CNKQSKEGKAGYITD	206	ANSDLGTWQMDCTHL	248	NFRVYYREGRDQLWK
165	SKEGKAGYITDRGKD	207	LGTWQMDCTHLEGKI	249	YYREGRDQLWKGPG
166	KAGYITDRGKDKVKV	208	QMDCTHLEGKIIVA	250	GRDQLWKGPGELLWK
167	ITDRGKDKVKVLEQT	209	THLEGKIIVAVHVA	251	LWKGPGELLWKGEGA
168	GKDKVKVLEQTTNQQ	210	GKIIVAVHVASGFI	252	PGELLWKGEGAVILK

SIVmac239 Consensus B Pol (15-mer) Peptid Set

253	LWKGEGAVILKVGTD
254	EGAVILKVGTDIKVV
255	ILKVGTDIKVPPRK
256	GTDIKVPPRKAKII
257	KVPPRKAKIIKDYG
258	RRKAKIIKDYGGGKE
259	KIIKDYGGGKEVDSS
260	DYGGGKEVDSSSHME
261	GKEVDSSSHMEDTGE
262	DSSSHMEDTGEAREV
263	HMEDTGEAREVA

SIVmac239 Rev (15-mer) Peptid Set

1	MSNHEREEELRKRLR
2	EREEELRKRLRLIHL
3	ELRKRLRLIHLHQT
4	RLRLIHLHQTNPYP
5	IHLHQTNPYPTGPG
6	HQTNPYPTGPGTANQ
7	PYPTGPGTANQRRQR
8	GPGTANQRRQRKRRW
9	ANQRRQRKRRWRRRW
10	RQRKRRWRRRWQQLL
11	RRWRRRWQQLLALAD
12	RRWQQLLALADRIYS
13	QLLALADRIYSFPDP
14	LADRIYSFPDPPTDT
15	IYSFPDPPTDTPLDL
16	PDPPTDTPLDLAIQQ
17	TDTPLDLAIQQQLNL
18	LDLAIQQQLNLAIES
19	IQQLNLAIESIPDP
20	IESIPDPPTNTPEAL
21	QNLAIIESIPDPPTNT
22	PDPPTNTPEALCDPT
23	TNTPEALCDPTEDSR
24	EALCDPTEDSRSPQD
25	DPTEDSRSPQD

SIVmac239 Gag (15-mer) Peptid Set

1	MGVRNSVLSGKKADE	43	EVVPGFQALSEGCTP	85	GLGVNPTLEEMLTAC
2	NSVLSGKKADELEKI	44	GFQALSEGCTPYDIN	86	NPTLEEMLTACQGVG
3	SGKKADELEKIRLRP	45	LSEGCTPYDINQMLN	87	EEMLTACQGVGGPGQ
4	ADELEKIRLRPNGKK	46	CTPYDINQMLNCVGD	88	TACQGVGGPGQKARL
5	EKIRLRPNGKKKYML	47	DINQMLNCVGDHQA	89	GVGGPGQKARLMAEA
6	LRPNGKKKYMLKHVV	48	MLNCVGDHQAAMQII	90	PGQKARLMAEALKEA
7	GKKKYMLKHVVWAAN	49	VGDHQAAMQIIRDII	91	ARLMAEALKEALAPV
8	YMLKHVVWAANELDR	50	QAAMQIIRDIINEEA	92	AEALKEALAPVPIPF
9	HVVWAANELDRFGLA	51	QIIRDIINEEAADWD	93	KEALAPVPIPFAAAQ
10	AANELDRFGLAESLL	52	DIINEEAADWDLQHP	94	APVPIPFAAAQQRGP
11	LDRFGLAESLLENKE	53	EEAADWDLQHPQPAP	95	IPFAAAQQRGPRKPI
12	GLAESLLENKEGCQK	54	DWDLQHPQPAPQQGQ	96	AAQQRGPRKPIKCWN
13	SLLENKEGCQKILSV	55	QHPQPAPQQGQLREP	97	RGPRKPIKCWNCGKE
14	NKEGCQKILSVLAPL	56	PAPQQGQLREPSGSD	98	KPIKCWNCGKEGHS
15	CQKILSVLAPLVPTG	57	QGQLREPSGSDIAGT	99	CWNCGKEGHSARQCR
16	LSVLAPLVPTGSENL	58	REPSGSDIAGTTSSV	100	GKEGHSARQCRAARR
17	APLVPTGSENLKSLY	59	GSDIAGTTSSVDEQI	101	HSARQCRAARRQGCW
18	PTGSENLKSLYNTVC	60	AGTTSSVDEQIQWMY	102	QCRAARRQGCWKCGK
19	ENLKSLYNTVCVIWC	61	SSVDEQIQWMYRQQN	103	PRRQGCWKCGKMDHV
20	SLYNTVCVIWCIAE	62	EIQWMYRQQNPIPV	104	GCWKCGKMDHVMAKC
21	TVCVIWCIAEAEKVK	63	WMYRQQNPIPVGNII	105	CGKMDHVMAKCPDRQ
22	IWCIAEAEKVKHTEE	64	QQNPIPVGNIYRRWI	106	DHVMAKCPDRQAGFL
23	HAEEKVKHTEEAQKI	65	IPVGNIIYRRWIQLGL	107	AKCPDRQAGFLGLGP
24	KVKHTEEAQIVQRH	66	NIYRRWIQLGLQKCV	108	DRQAGFLGLGPWGKK
25	TEEAQIVQRHLVVE	67	RWIQLGLQKCVRMYN	109	GFLGLGPWGKKPRNF
26	KQIVQRHLVETGTT	68	LGLQKCVRMYNPTNI	110	LGPWGKKPRNFPMAQ
27	QRHLVETGTTTETMP	69	KCVRMYNPTNILDVK	111	GKKPRNFPMAQVHQG
28	VVETGTTTETMPKTSR	70	MYNPTNILDVKQGPK	112	RNFPMAQVHQGLMPT
29	GTTTETMPKTSRPTAP	71	TNILDVKQGPKPEPFQ	113	MAQVHQGLMPTAPPE
30	TMPKTSRPTAPSSGR	72	DVKQGPKPEPFQSYVD	114	HQGLMPTAPPEDPAV
31	TSRPTAPSSGRGGNY	73	GPKEPFQSYVDRFYK	115	MPTAPPEDPAVDLLK
32	TAPSSGRGGNYPVQQ	74	PFQSYVDRFYKSLRA	116	PPEDPAVDLLKNYMQ
33	SGRGGNYPVQQIGGN	75	YVDRFYKSLRAEQTD	117	PAVDLLKNYMLGKQ
34	GNYPVQQIGGNVHL	76	FYKSLRAEQTDAAVK	118	LLKNYMLGKQQREK
35	VQQIGGNVHPLPLSP	77	LRAEQTDAAVKNWMT	119	YMLGKQQREKQRES
36	GGNVHPLPLSPRTL	78	QTDAAVKNWMTQTLL	120	GKQQREKQRESREKP
37	VHPLSPRTLNAWVK	79	AVKNWMTQTLLIQNA	121	REKQRESREKPYKEV
38	LSPRTLNAWVKLIEE	80	WMTQTLLIQNANPDC	122	RESREKPYKEVTEDL
39	TLNAWVKLIEEKKFG	81	LLIQNANPDCKLVL	123	EKPYKEVTEDLLHLN
40	VWVKLIEEKKFGAEVV	82	QNANPDCKLVLKGLG	124	KEVTEDLLHLNSLFG
41	IEEKKFGAEVVPGFQ	83	PDCKLVLKGLGVNPT	125	EDLLHLNSLFGGDQ
42	KFGAEVVPGFQALSE	84	LVLKGLGVNPTLEEM		

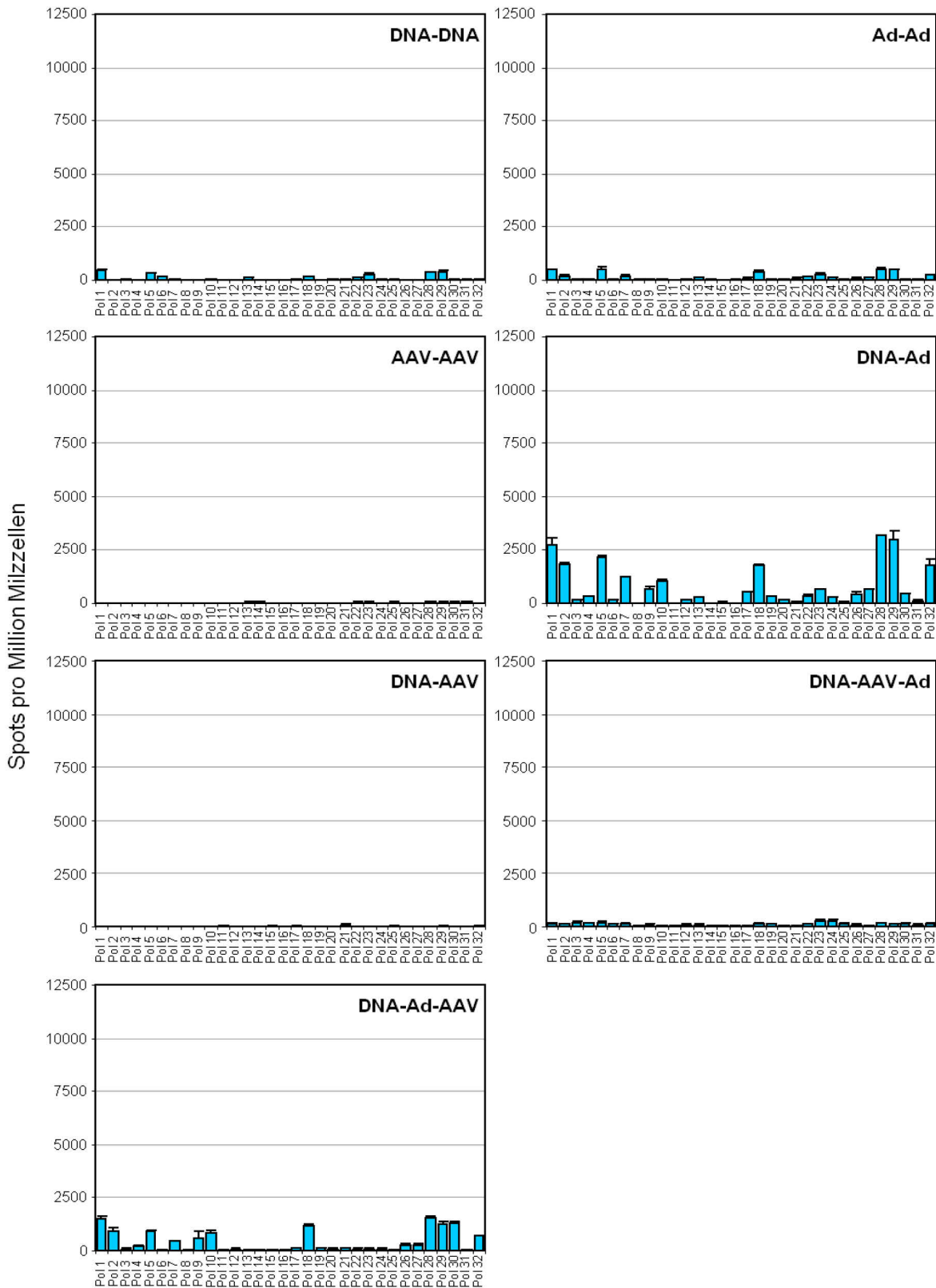
SIVmac239 Nef (15-mer) Peptid Set

1	MGGAISMRRSRPSGD	43	KTFGWLWKLVPVNVS
2	ISMRRSRPSGDLRQR	44	WLWKLVPVNVSDEAQ
3	RSRPSGDLRQRLRA	45	LVPVNVSDEAQEED
4	SGDLRQRLRARGET	46	NVSDEAQEEDHYLM
5	RQRLRARGETYGR	47	EAQEEDHYLMHPAQ
6	LRARGETYGRLLGEV	48	DEEHYLMHPAQTSQW
7	GETYGRLLGEVEDGY	49	YLMHPAQTSQWDDPW
8	GRLLEVEDGYQS	50	PAQTSQWDDPWGEVL
9	GEVEDGYQSPGGLD	51	SQWDDPWGEVLAWKF
10	DGYSQSPGGLDKGLS	52	DPWGEVLAWKFDPTL
11	QSPGGLDKGLSSLSC	53	EVLAWKFDPTLAYTY
12	GLDKGLSSLSCGQK	54	WKFDPTLAYTYEAYV
13	GLSSLSCGQKYNQG	55	PTLAYTYEAYVRYPE
14	LSCEGQKYNQGQYMN	56	YTYEAYVRYPEEFGS
15	GQKYNQGQYMNTPWR	57	AYVRYPEEFGSKSGL
16	NQGQYMNTPWRNPAE	58	YPEEFGSKSGLSEEE
17	YMNTPWRNPAEEREK	59	FGSKSGLSEEEVRRR
18	PWRNPAEEREKLAYR	60	SGLSEEEVRRRLTAR
19	PAEEREKLAYRKQNM	61	EEEVRRRLTARGLLN
20	REKLAYRKQNMDDID	62	RRRLTARGLLNMAK
21	AYRKQNMDDIDEEDD	63	TARGLLNMAKKETR
22	QNMDDIDEEDDDL	64	LLNMAKKETR
23	DIDEEDDLVGVSVR		
24	EDDDLVGVSVPKVP		
25	LVGVSVRPKVPLRTM		
26	SVRPKVPLRTMSYKL		
27	KVPLRTMSYKLAIM		
28	RTMSYKLAIMSHFI		
29	YKLAIMSHFIKEKG		
30	IDMSHFIKEKGGLEG		
31	HFIKEKGGLEGIYYS		
32	EKGGLEGIYYSARRH		
33	LEGIYYSARRHRILD		
34	YYSARRHRILDIYLE		
35	RRHRILDIYLEKEEG		
36	ILDIYLEKEEGIIPD		
37	YLEKEEGIIPDWQDY		
38	EEGIIPDWQDYTSGP		
39	IPDWQDYTSGPGIRY		
40	QDYTSGPGIRYPKTF		
41	SGPGIRYPKTFGWLW		
42	IRYPKTFGWLWKLVP		

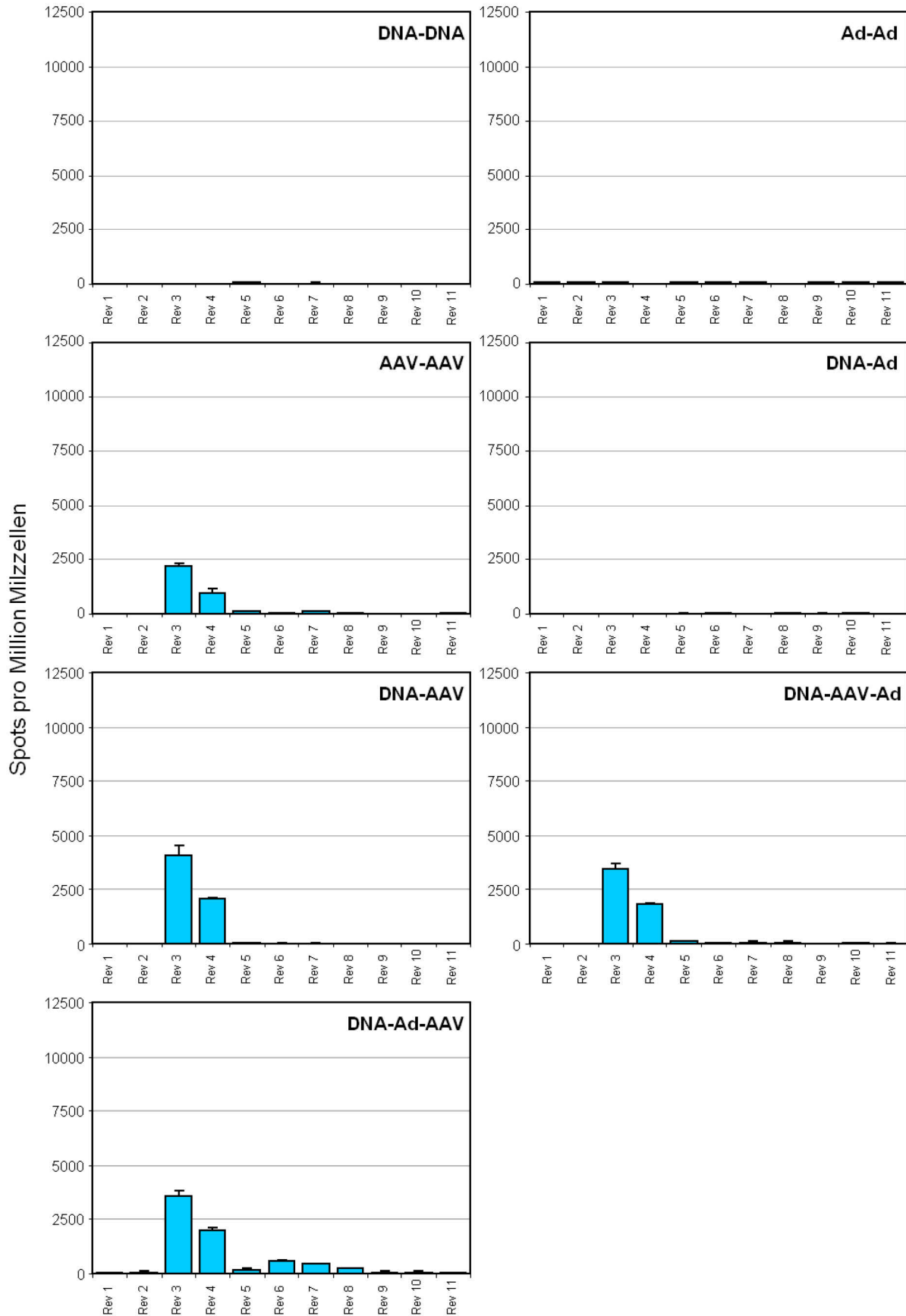
7.4 EliSpot

Weitere Darstellungen der Peptidpool-spezifischen EliSpot Ergebnisse für alle HIV-1 und SIV Immunogenen und Immunisierungsregimen. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Doppelbestimmungen wieder.

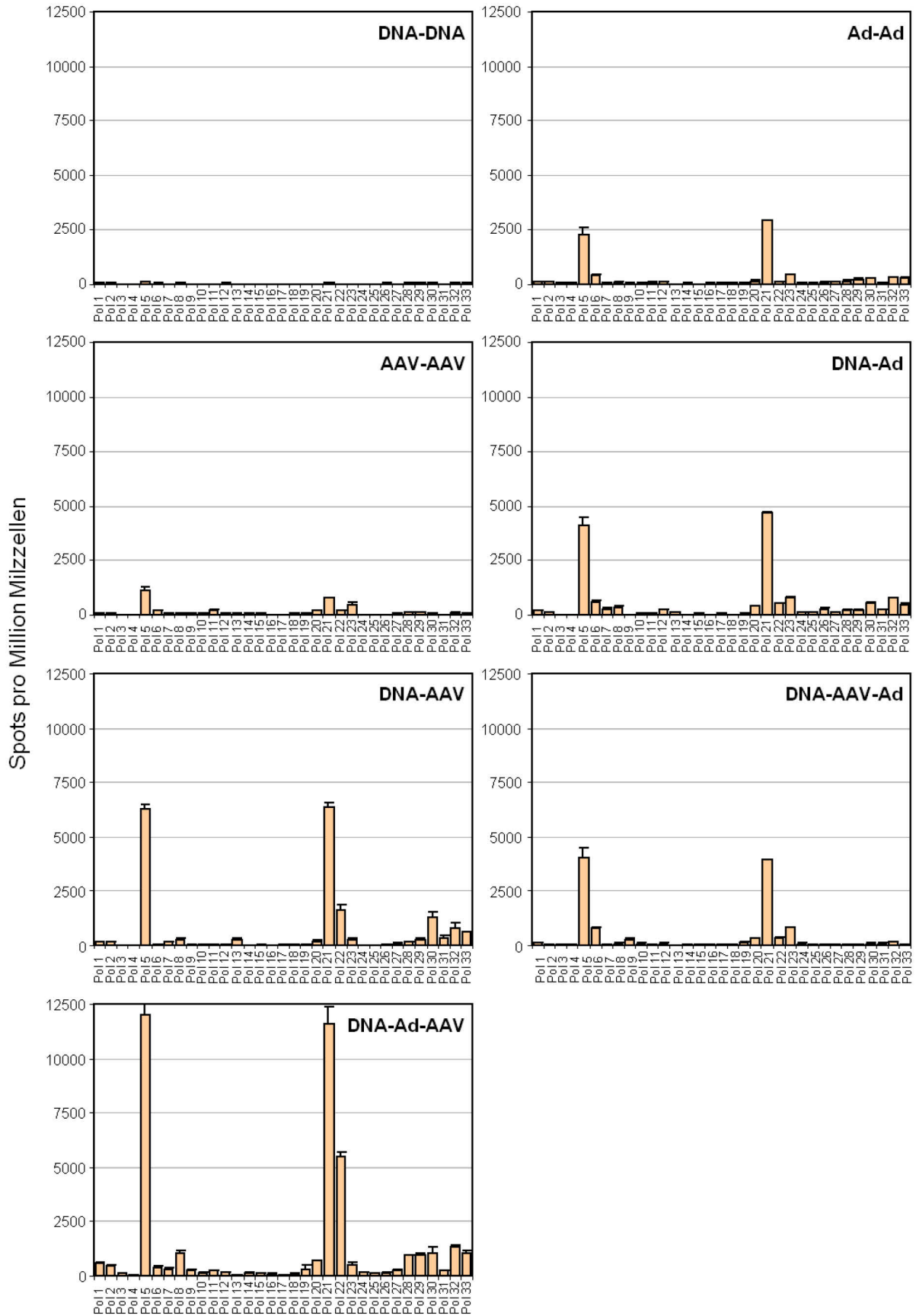
HIV-1 Pol



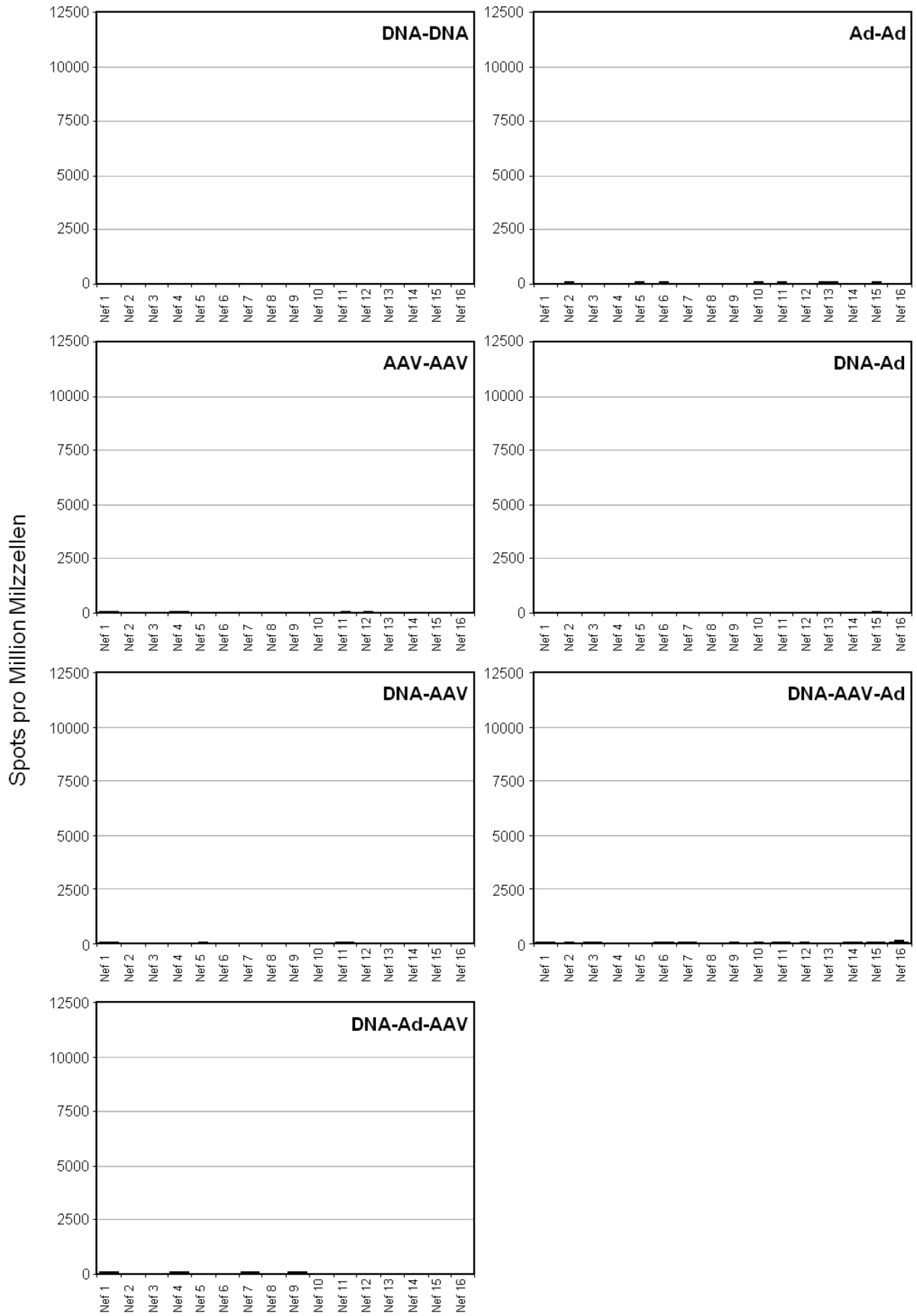
HIV-1 Rev



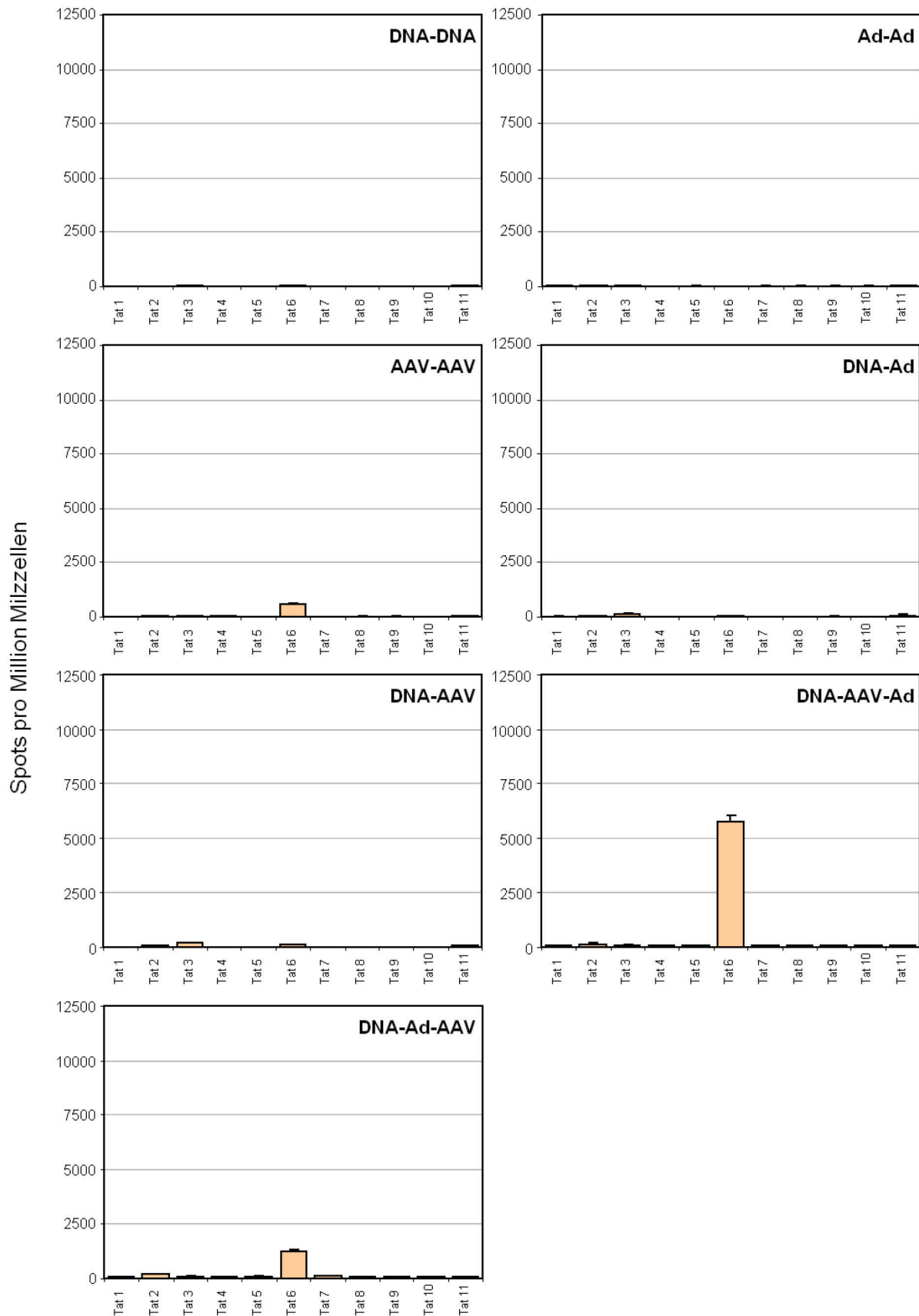
SIVmac Pol



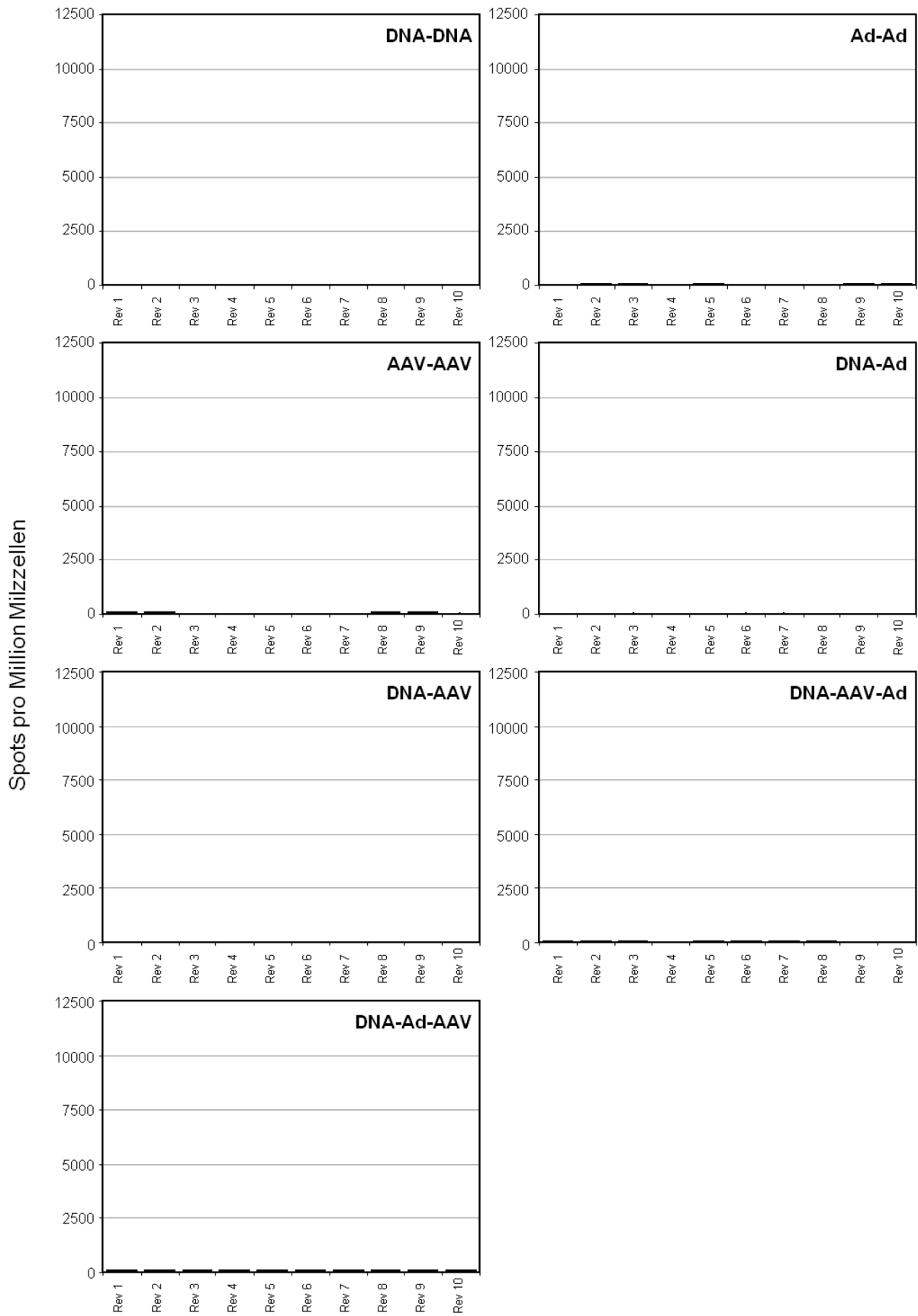
SIVmac Nef



SIVmac Tat

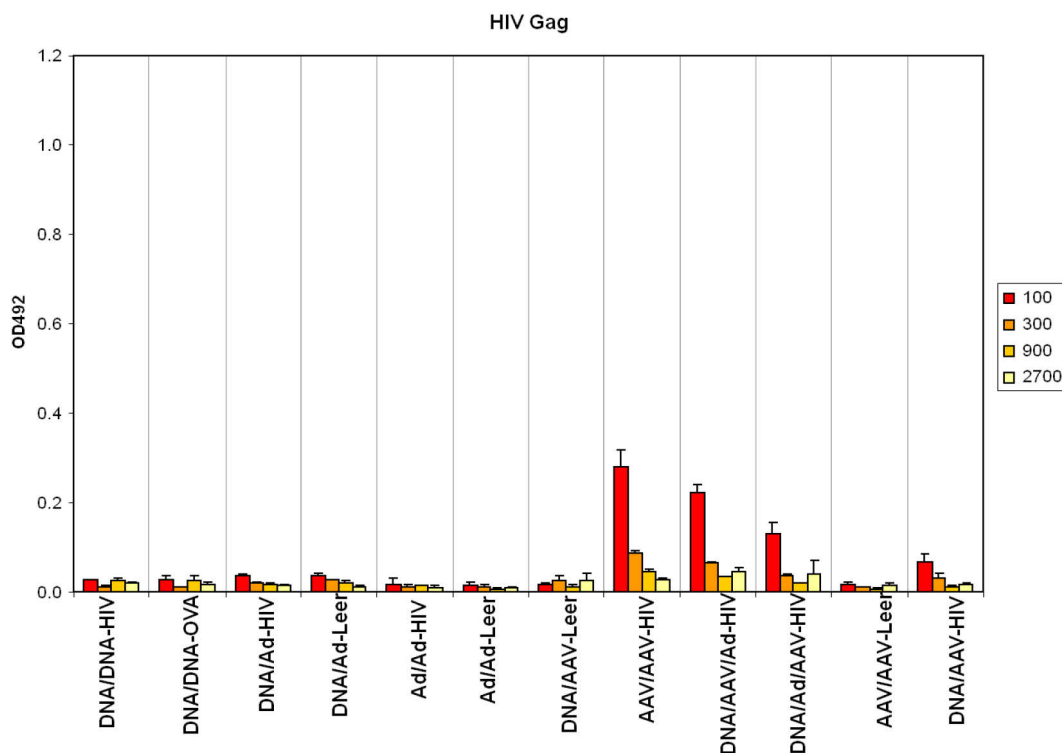
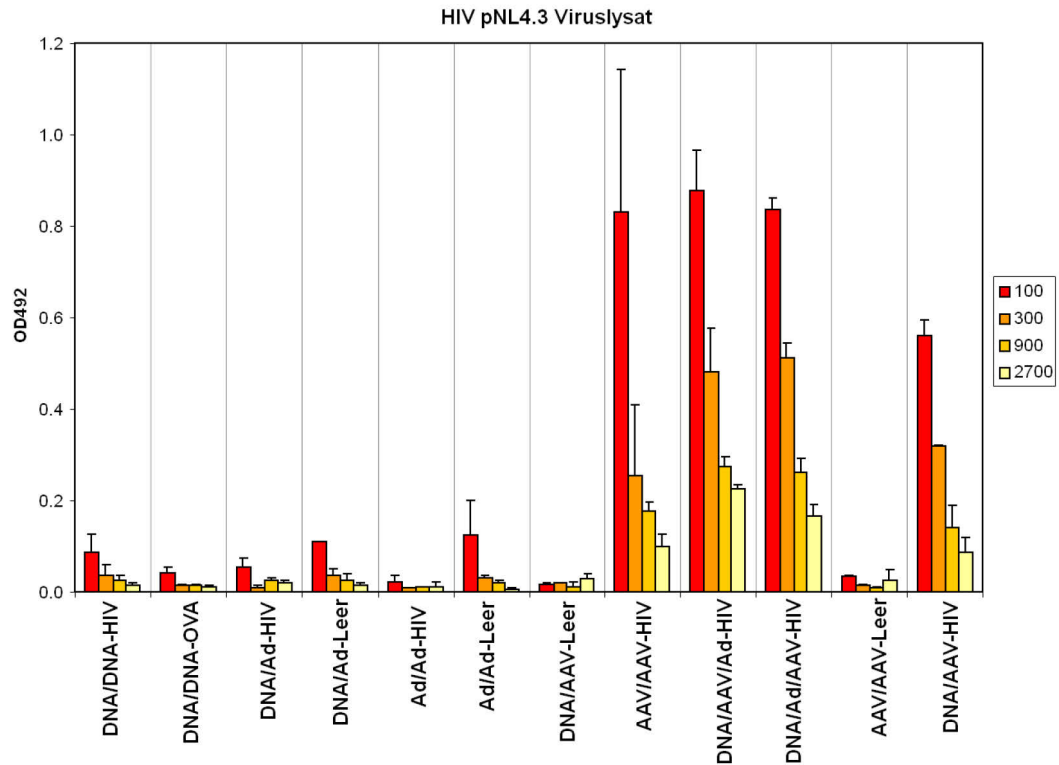


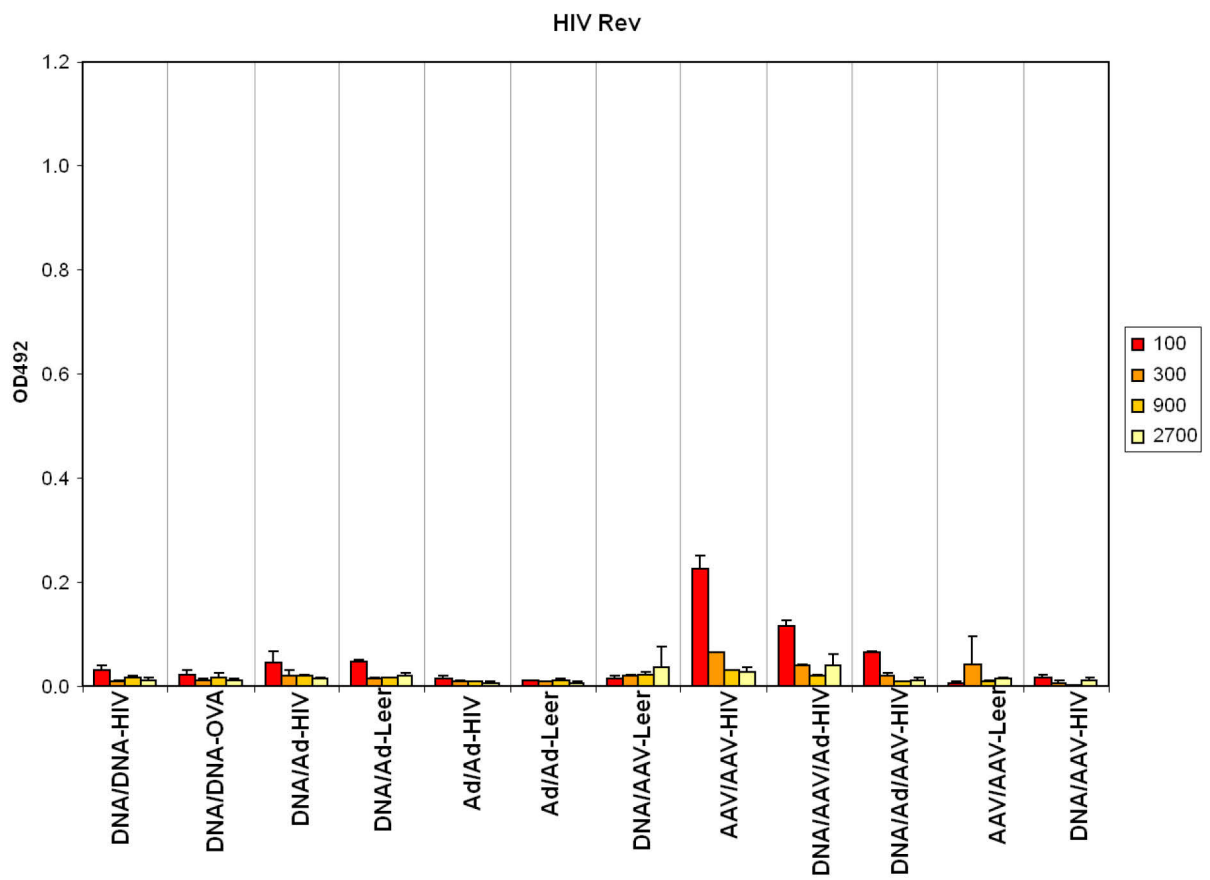
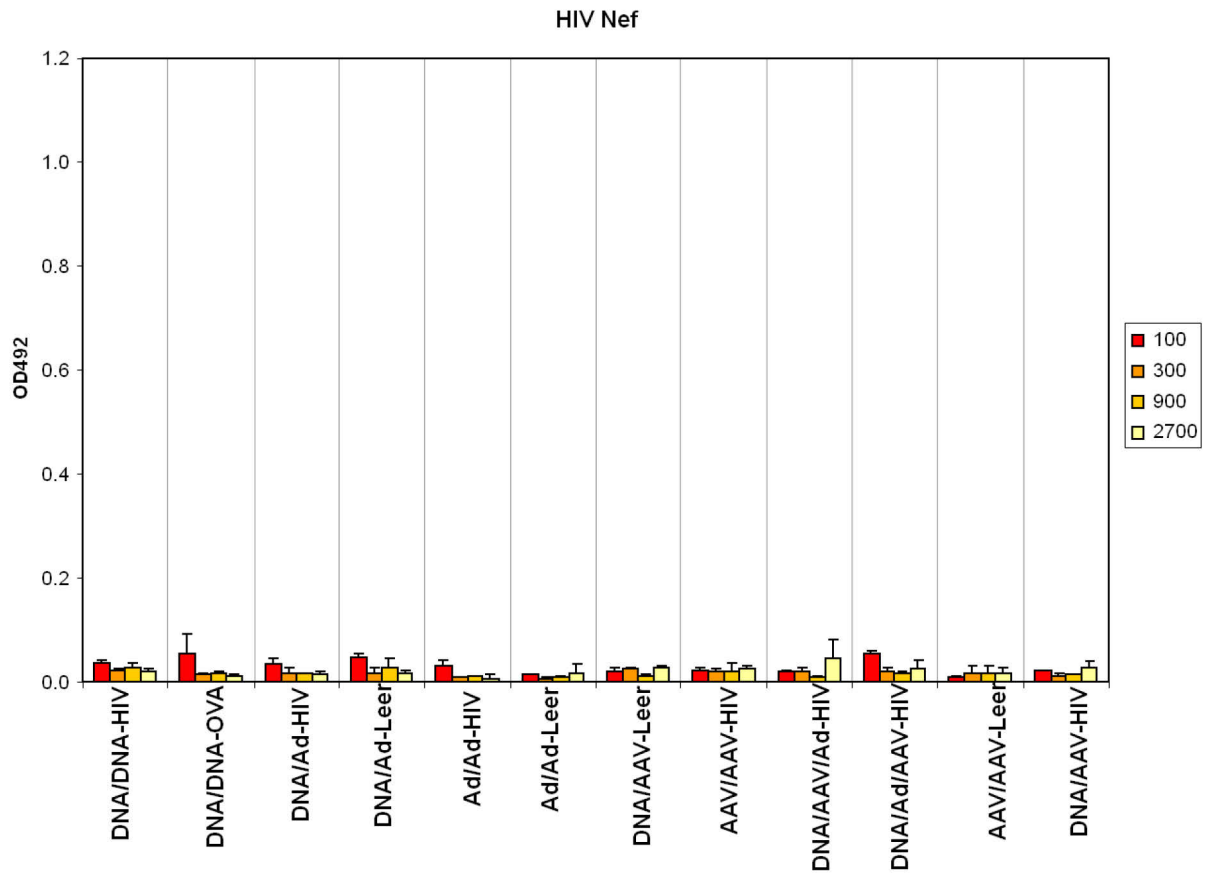
SIVmac Rev



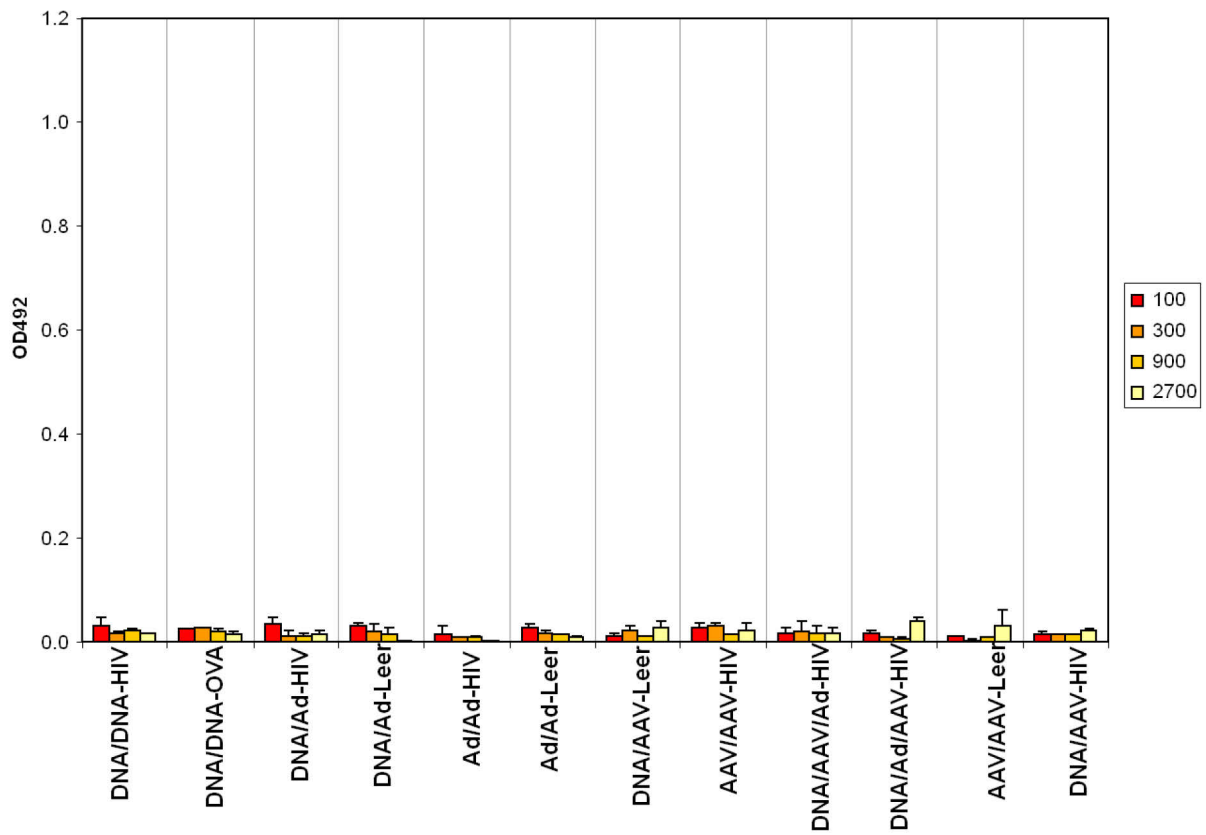
7.5 ELISA

Ergebnisse der Untersuchung der humoralen Immunreaktion gegen verschiedene rekombinante und natürliche HIV- und SIV-Antigene. Die Fehlerindikatoren geben die Abweichungen der Doppelbestimmungen wieder, die unterschiedlichen Balkenfarben geben die Serumverdünnungen von 1:100-1:2700 an. Zur Kontrolle der Beschichtung der ELISA-Platten wurde ein anti His-Tag Antikörper zur Detektion verwendet.

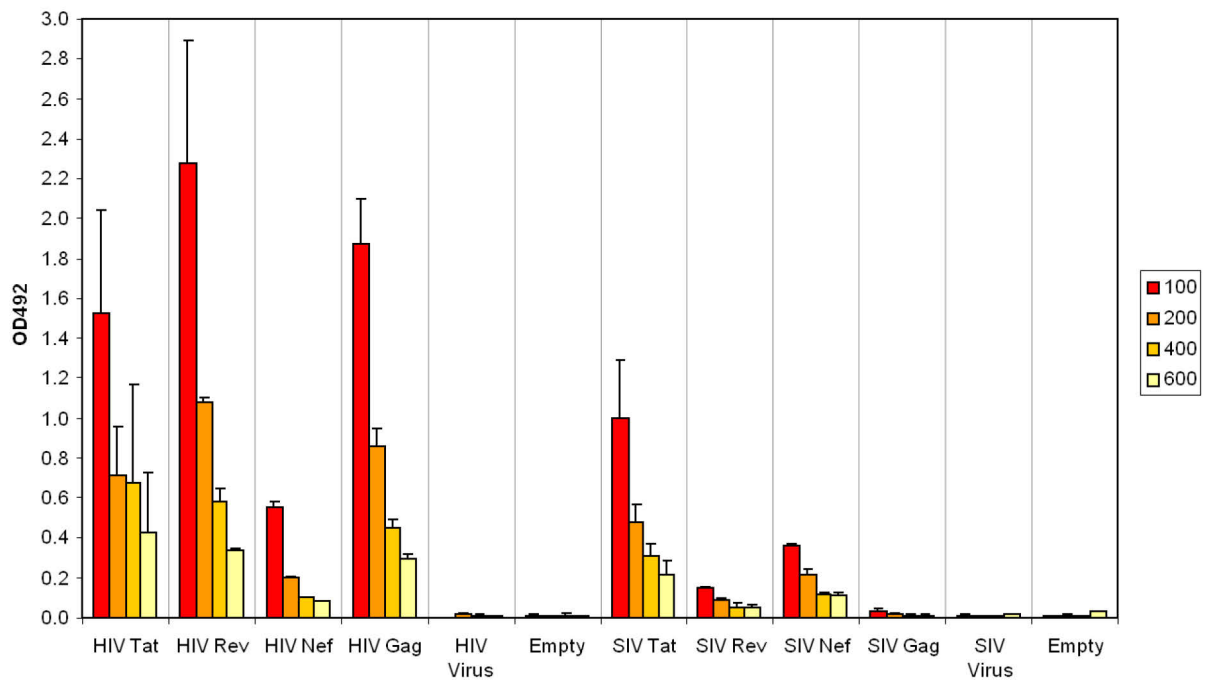


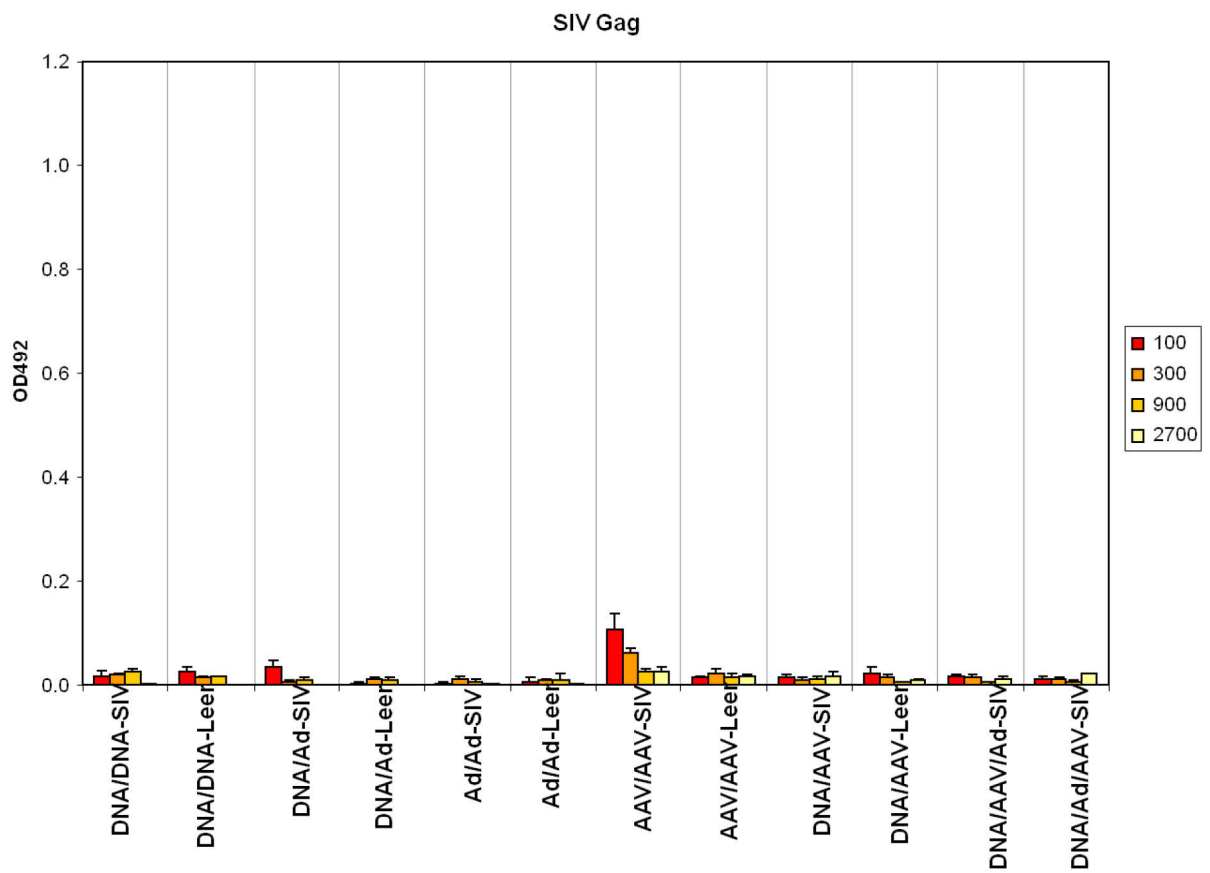
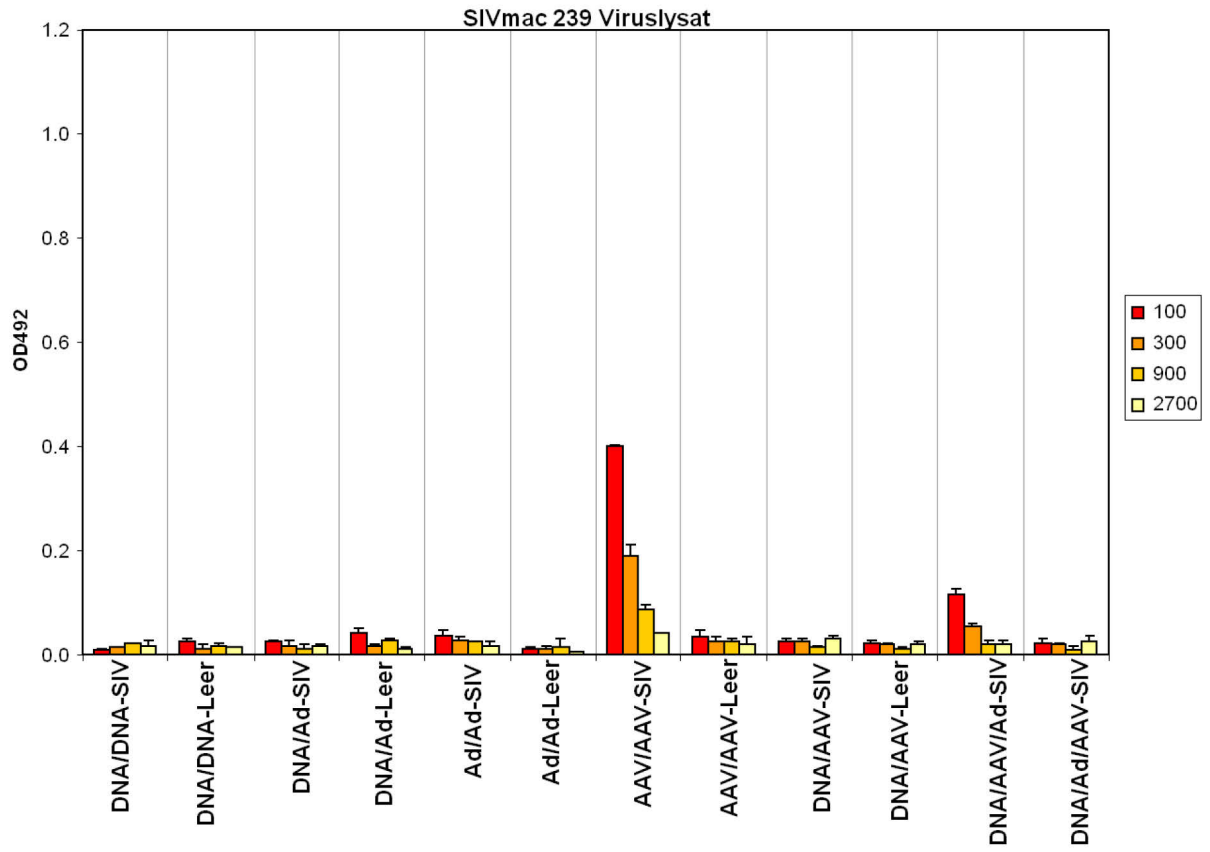


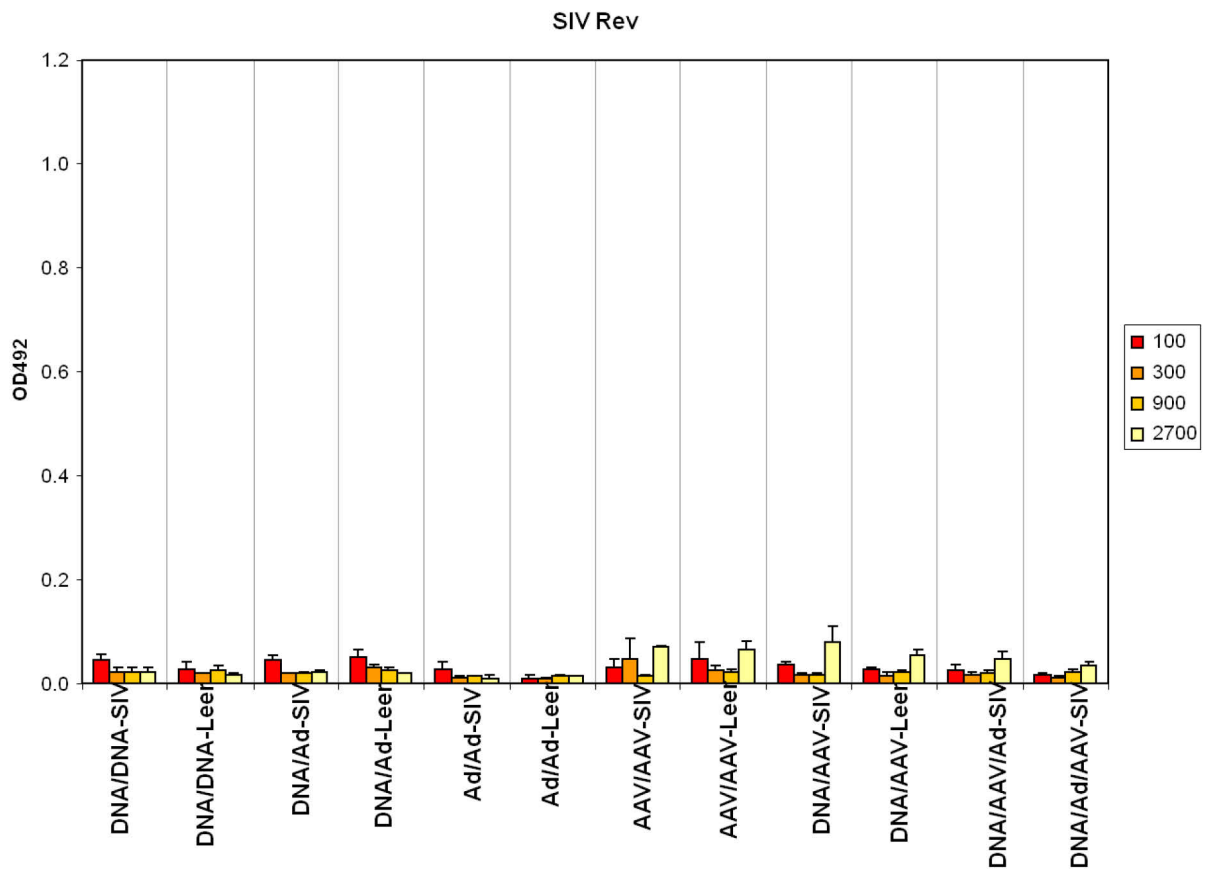
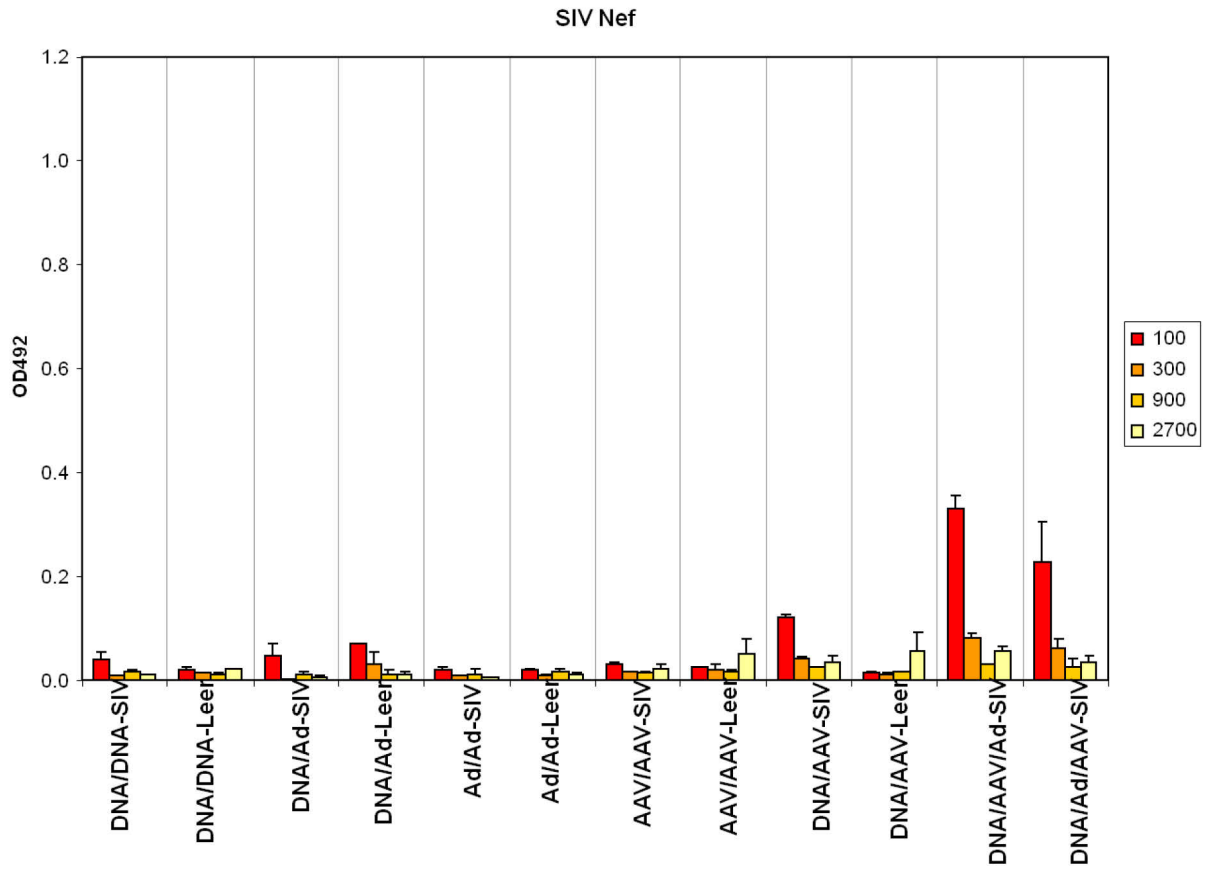
HIV Tat

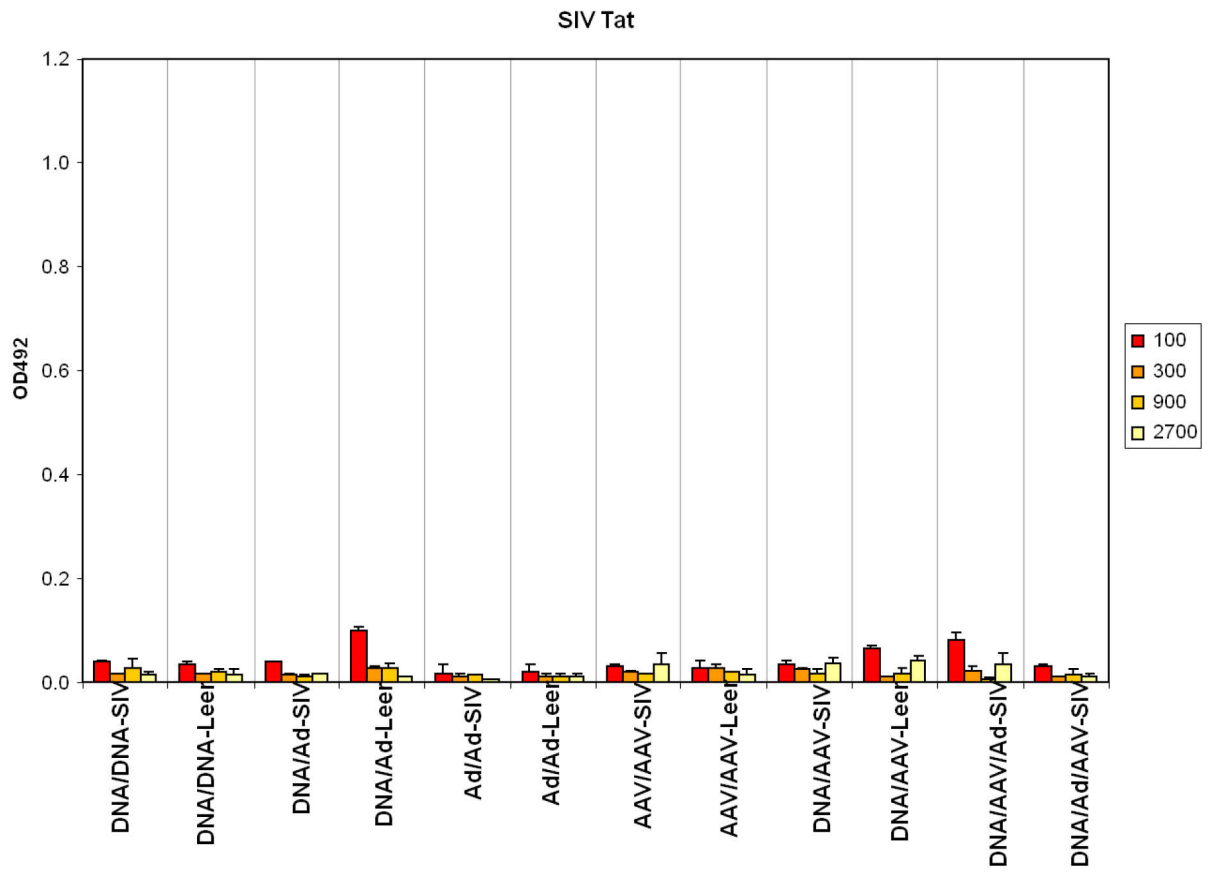


Anti His Tag









7.6 Abkürzungen

AAV	Adeno-associated virus (Adeno-assoziiertes Virus)
ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität)
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome (erworbenes Immunschwächesyndrom)
APC	Antigen-presenting cell (Antigen-präsentierende Zellen)
CMV	Cytomegalovirus (Cytomegalievirus)
CTL	Cytotoxic T lymphocyte (zytotoxischer T-Zell Lymphozyt)
FKS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GALT	Gut-associated lymphoid tissue (Darm-assoziiertes lymphatisches Gewebe)
HAART	Highly active antiretroviral therapy (hochaktive antiretrovirale Therapie)
HEPS	Highly exposed persistently seronegatives (hochgradig expositioniert langanhaltend seronegativ)
HIV	Human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienz-Virus)
HLA	Human leukocyte antigen (humane Leukozyten-Antigene)
HSV	Herpes simplex virus (Herpes-Simplex-Virus)
LCMV	Lymphocytic choriomeningitis Virus (lymphozytäres Choriomeningitis-Virus)
LTNP	Long-term non-progressors (Langzeit Nichtprogressor)
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MVA	Modified vaccinia Ankara (modifizierter Vaccinia-Virus Typ Ankara)
NHP	Non-human primate (nichthumane Primaten)
NYVAC	Modified vaccinia Copenhagen (modifizierter Vaccinia-Virus Typ Kopenhagen)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PEI	Polyethylenimine (Polyethylenimin)
PyV	Polyomavirus (Polyoma Virus)