

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS) und der Erreger HIV

Zu Beginn der achtziger Jahre beschrieb ein Arzt aus Los Angeles mehrere Fälle einer schweren Lungenentzündung, hervorgerufen durch eine Infektion mit *Pneumocystis carinii*, einem normalerweise apathogenen Pilz (Gottlieb *et al.*, 1981). Weitere Berichte aus amerikanischen Großstädten wie San Francisco und New York von plötzlichen Erkrankungen mit diesem oder ähnlichen Erregern wie *Candida albicans* oder von Immunschwäche-assoziierten Tumorerkrankungen führten zu der Erkenntnis, daß die Betroffenen an einer neuartigen, erworbenen Immunschwächekrankheit litten. Zunächst schienen nur homosexuelle Männer und Drogenabhängige von der Krankheit betroffen; zunehmend traten aber Infektionen durch heterosexuelle Kontakte, durch Bluttransfusionen und unter Hämophilen auf. Dadurch wurde der Krankheit und der Suche nach dem Erreger ein immer größeres, öffentliches Interesse zuteil.

Anfang des Jahres 1983 wurde der Begriff AIDS (Acquired Immuno-Deficiency Syndrom) geprägt, im Oktober 1983 gelang Luc Montagnier und Mitarbeitern am Institut Pasteur in Paris die elektronenmikroskopische Darstellung des Erregers aus Lymphgewebe eines Infizierten (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Der Erreger stellte sich als neuartiger Typ von Retrovirus heraus, welches zunächst als LAV (Lymphadenopathy-Associated Virus) bezeichnet wurde. Die Entdeckung wurde von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Gallo *et al.*, 1984; Popovic *et al.*, 1984; Sarngadharan *et al.*, 1984), das Virus als Lentivirus aus der Familie der Retroviren klassifiziert und schließlich umbenannt in HIV (Human Immunodeficiency Virus). Durch weiter entwickelte Nachweismethoden konnte mittlerweile in afrikanischen Blutplasma-Proben aus dem Jahr 1959 die Kontamination durch HIV nachgewiesen werden (Zhu *et al.*, 1998).

Unmittelbar nach einer Infektion kommt es zur primären HIV-Erkrankung, deren Symptome einer Grippe gleichen und die von selbst wieder abklingt. Nach einer asymptomatische Latenzphase von durchschnittlich 8-10 Jahren beginnt die AIDS-Erkrankung mit typischen opportunistischen Infektions-Krankheiten, letztendlich resultiert das Vorhandensein von HIV in der Zerstörung des lymphatischen Gewebe, Degeneration im Gehirn und im Rückenmark, Gewichtsverlust und Diarrhoe (Wasting Syndrom) sowie in einem drastischen Abfall der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten (Dalglish *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1993;

Schellekens *et al.*, 1992). Die damit einhergehende Immundefizienz führt in erster Linie zu opportunistischen Infektionen und letztlich zum Tod der infizierten Personen (Fauci and Lane, 1984; Moss and Bacchetti, 1989; Stahl *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1986).

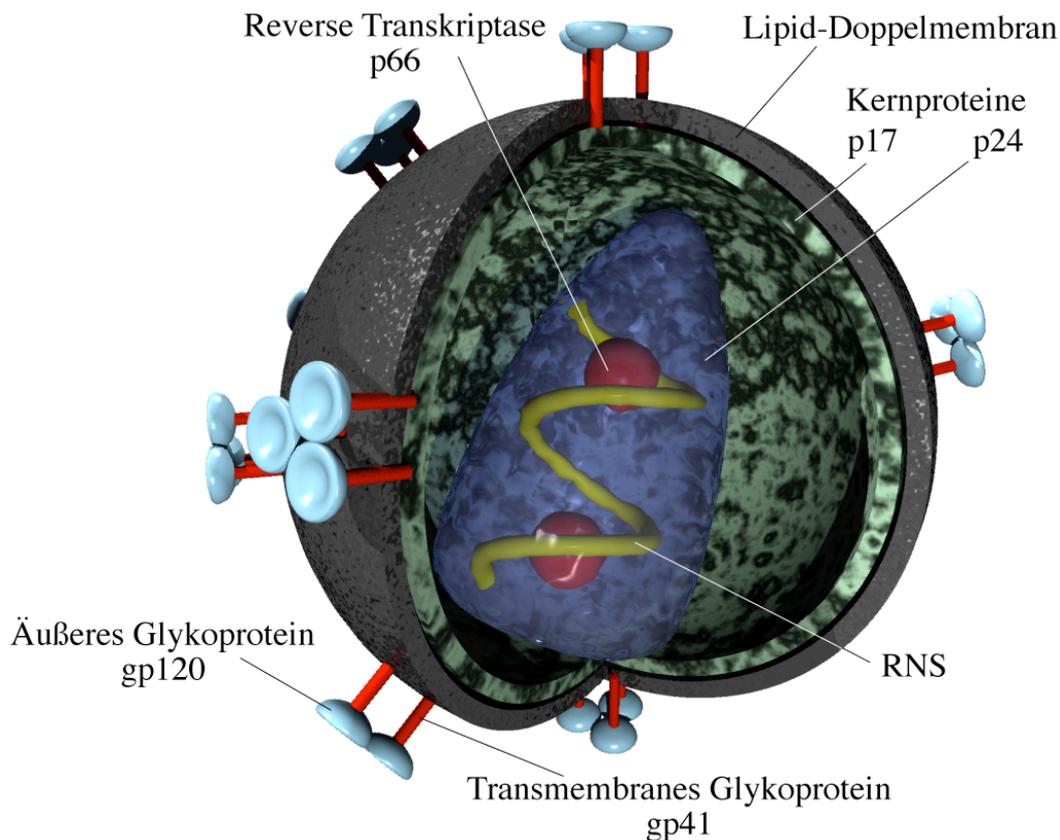
Obwohl der Lebenszyklus und die Organisation des Virus einige Ansatzpunkte zur medikamentösen Behandlung bietet, steht noch keine Therapie zur Verfügung, mittels derer eine vollständige Viruseliminierung möglich ist. Durch die Entwicklung von Azidothymidin (AZT), einem Nukleosid-Analogen, das die Reverse Transkriptase, ein virales Schlüsselenzym, hemmt, stand 1987 die erste kausale Therapie zur Verfügung. Die Monotherapie mit Nukleosid-Analoga war allerdings von starken Nebenwirkungen begleitet und brachte nur kurzfristige Erfolge (Aboulker and Swart, 1993; Fischl *et al.*, 1987; Volberding *et al.*, 1990). Mit modernen Therapieansätzen aus Kombinationen von Inhibitoren der Reversen Transkriptase und der viralen Protease ist es bei einem Teil der Patienten möglich geworden, die Virusreplikation dauerhaft unter die Nachweisgrenze zu senken. In den meisten Fällen allerdings resultiert eine Unterbrechung der Therapie in einem raschen Anstieg der Plasmavirusbelastung. Somit wird deutlich, daß selbst während einer langen antiretroviralen Kombinationstherapie infektiöses Virus persistiert.

Die Anzahl der Infizierten nach Schätzungen des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) liegt im Jahr 2001 weltweit bei 40 Millionen, trotz intensiven Aufklärungskampagnen über die Übertragungswege und Aufrufen zur Prävention bleibt die Zahl der Neuinfizierten pro Jahr nahezu konstant bei ca. 5 Millionen. Über 90% der HIV-Infizierten leben in Entwicklungsländern, vorwiegend in Afrika und Asien, wobei zunehmend Kinder und Jugendliche betroffen sind. Gerade in diesen Ländern ist aufgrund der finanziellen Lage die medizinische Betreuung und Therapie am schwierigsten, viele Infizierte sind sich nicht bewußt, Träger des Virus zu sein. Auch in Osteuropa verbreitet sich die Krankheit zunehmend. Da die Zahl der AIDS-Toten weiter exponentiell ansteigen wird, werden die bereits heute dramatischen persönlichen, sozialen und ökonomischen Konsequenzen weltweit katastrophale Auswirkungen haben.

Weiterhin wird die Suche nach einem Impfstoff als unbedingt notwendig erachtet, nur durch Impfkampagnen, ähnlich der weltweiten Pockenschutzimpfung, kann der Bedrohung durch AIDS effektiv begegnet werden.

### 1.1.1 Struktur und Morphologie

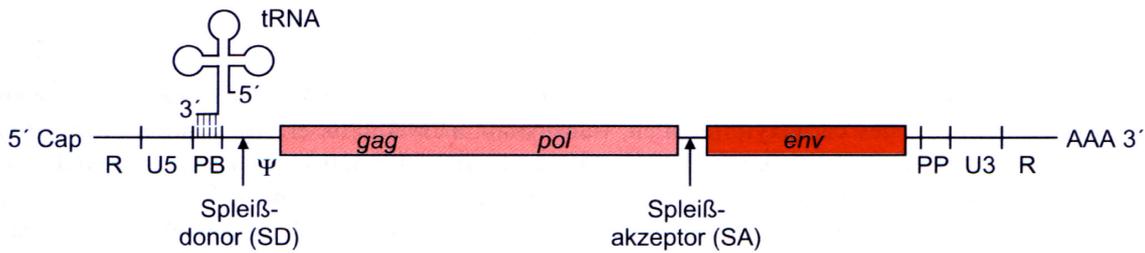
Der grundsätzliche Aufbau der Immundefizienzviren aus Membranhülle, äußerer Proteinhülle, Kapsidproteinhülle und RNA/Enzymkomplex entspricht dem der übrigen Retroviren.



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

Als Erbsubstanz besitzt das HI-Virus zwei identische, jeweils etwa 9,7 kb große Einzelstränge RNA (Abb. 1.2). Die zwei RNA-Moleküle liegen in Form einer eukaryontischen mRNA vor, d.h. mit einem 7-Methylguanin-Rest und polyadenyliertem 3'-Ende.

An beiden Enden ist die virale mRNA mit regulatorischen Sequenzen (U5, U3 = untranslated 5' bzw. 3' gelegen) ausgestattet. Diese sind für die Initiation und Termination der Transkription sowie für die Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNA der Wirtszelle zuständig. Nach Integration gehen diese Bereiche in die LTR (long terminal repeats) mit ein. Weiterhin ist jede mRNA mit einer von der vorherigen Wirtszelle stammenden tRNA versehen, welche an komplementäre Basensequenzen angelagert ist und Primerfunktion besitzt.



**Abb. 1-2:** RNA-Genom eines infektiösen HIV-1 Partikels (aus Modrow and Falke, 1997)

Die Immundefizienzviren der Primaten enthalten wie alle Retroviren die drei Gene *gag*, *pol* und *env*. Gag (group specific antigen) kodiert für die inneren Kernproteine, die an die virale RNA binden, und das Matrixprotein p17. Das *pol*-Gen (polymerase) enthält die Information zur Synthese der Reversen Transkriptase, der Integrase und einer Protease. Das *env*-Gen (envelope) kodiert für die Glykoproteine der Virushülle, die in die äußere Lipid-Doppelschicht integriert werden. Die Familie der Lentiviren zeichnet sich durch die essentiellen regulatorischen Gene *tat* und *rev* aus, die an der Regulation der RNA-Transkription, des Spleißens und am Export der viralen mRNA aus dem Nukleus beteiligt sind. Bei den Primaten-Lentiviren sind vier weitere akzessorische Gene vorhanden, *nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* bei HIV-1, während letzteres bei HIV-2 und SIV durch *vpx* ersetzt ist. Diese akzessorischen Gene nehmen *in vivo* Einfluß auf die Replikationsfähigkeit (Greene, 1991; Haseltine, 1991), sind aber für die *in vitro* Replikationsfähigkeit nicht notwendig. Dem Nef-Protein wird eine entscheidende Rolle für die Replikation und Pathogenität, sowie vielfältige Funktionen in der Immunmodulation zugeschrieben (Trono, 1995). Das *vif*-Gen kodiert für einen „virion infectivity factor“, der die Infektiosität des Virus steigert (Cann and Karn, 1989). Das *vpr*-Gen sorgt u.a. für den Transport des sogenannten Präintegrationskomplexes (virale DNA nach reverser Transkription, komplexiert mit Proteinen) in den Kern (Heinzinger *et al.*, 1994) und transaktiviert eine Reihe verschiedener zellulärer Gene (Refaeli *et al.*, 1995). Das *vpu*-Gen (viral protein out) kodiert für ein Protein mit hydrophobem aminoterminalen Bereich, welcher für die Einlagerung in das zytoplasmatische Retikulum sorgt. Das Protein verbessert die Fähigkeit des Virus die Wirtszelle zu verlassen (Klimkait *et al.*, 1990). Das *vpx*-Gen (viral protein x) ist wichtig für die Virusvermehrung in sich nicht-teilenden Zellen wie Makrophagen und spielt eine Rolle beim Transport des Präintegrationskomplexes in den Kern.

Wie alle Retroviren haben reife HIV-Partikel einen Durchmesser von etwa 110 nm (Frank *et al.*, 1978) und sind von einer Lipid-Doppelmembran umgeben, welche sie von der

Wirtszellplasmamembran übernommen haben. Die glykosylierten Hüllproteine, die als Trimere vorliegen (Lu *et al.*, 1995), sind in diese Lipid-Doppelschicht eingebettet und elektronenmikroskopisch als Spikes sichtbar (Gelderblom *et al.*, 1987). Das Hüllprotein besteht aus zwei Untereinheiten, dem externen Glykoprotein SU (gp 120) und dem Transmembranprotein TM (gp41). Sie sind durch nicht-kovalente Bindung miteinander assoziiert.

Die aus dem Matrixprotein p17 bestehende äußere Proteinhülle grenzt an die Lipid-Membran und ist mit dem TM des Hüllproteins verbunden. Das Nukleokapsid, die innere konische Proteinhülle, wird aus dem Hauptprotein des Gag (p24) gebildet. Die endgültige, reife Form entsteht erst nach dem Ausknospen. Im Inneren des Nukleokapsids liegt das virale Genom, bestehend aus zwei identischen RNA-Molekülen positiver Polarität.

Eng assoziiert mit einer als Primer fungierenden tRNA und einigen Molekülen der Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase, liegt die genomische RNA als Ribonucleokomplex vor. Weiterhin sind im Kernbereich kleine Gag-Proteine und einige virale, akzessorische regulatorische Proteine enthalten (Gelderblom, 1991).

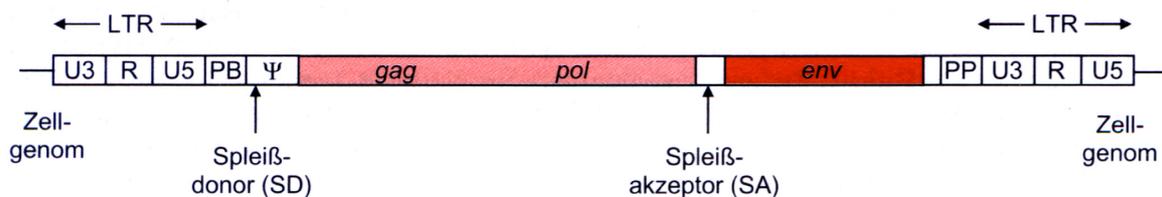
### 1.1.2 Lebenszyklus

Mit der Anheftung des HIV an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle beginnt die Infektion. Dabei kommt es zu einer hochaffinen Wechselwirkung zwischen dem viralen Glykoprotein (gp120) und dem CD4-Rezeptor der Zielzelle. Es handelt sich dabei in erster Linie um T-Lymphozyten, aber auch um Makrophagen, Monozyten, dendritische Zellen und Mikrogliazellen (Clapham *et al.*, 1991; Dalgleish *et al.*, 1984).

Unter Mitwirkung des Transmembranproteins gp41 von HIV kommt es zur Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran (Doyle *et al.*, 1995; Kowalski *et al.*, 1987; McCune *et al.*, 1988; Moore and Ho, 1993; Moore and Nara, 1991). Zusätzlich zum primären CD4-Rezeptor dienen bestimmte Chemokin-Rezeptoren der Familie der CC- bzw. CXC-Rezeptoren als essentielle Ko-Rezeptoren für HIV (Alkhatib *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Die Verwendung unterschiedlicher Ko-Rezeptoren bestimmt den Tropismus der unterschiedlichen HIV-Stämme. Insbesondere in der kritischen frühen Phase der HIV-Infektion existieren vorwiegend den CCR5-Rezeptor benutzende (ehemals aufgrund von *in vitro* Befunden als Makrophagen-trophe bezeichnete) Viren, die in der späteren symptomatischen Phase der Infektion ihren Phänotyp zu CXCR4-Rezeptor benutzende Virusstämmen (analog ehemals als T-Zell-troph bezeichnet) hin verändern (Gartner *et al.*, 1986). Es werden dann bevorzugt Zielzellen infiziert, die den Ko-Rezeptor CXCR4 (Fusin) exprimieren (Feng *et al.*, 1996;

Koyanagi *et al.*, 1987). Allerdings wurde dieser Wechsel der Ko-Rezeptorennutzung in der Regel nur bei etwa 30% - 40% der Infektionen durch den HIV-1 Subtyp B beobachtet, bei Infektionen durch den Subtyp C konnte dieser Wechsel nicht gezeigt werden. Die physiologischen Liganden des CCR5-Rezeptors sind die  $\beta$ -Chemokine RANTES, MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  (D'SD'Souza and Harden, 1996). Diese drei Chemokine werden von CD8-Zellen sezerniert und sind *in vitro* in der Lage, die Expression von HIV zu inhibieren (Cocchi *et al.*, 1995). Weitere, dem CCR5-Rezeptor ähnliche Rezeptoren wie CCR2b und CCR3 wurden bislang identifiziert (Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996).

Das Nukleokapsid gelangt durch die Rezeptor-vermittelte Infektion ins Zytoplasma der Zielzelle und nach „uncoating“ werden die virale RNA und Enzyme, welche zur Initiation der Replikation und Integration notwendig sind, freigesetzt. Die virale RNA wird unter Verwendung der als Primer dienenden tRNA von der viruseigenen Reversen Transkriptase (RT), einer RNA abhängigen DNA-Polymerase, in DNA umgeschrieben (Morrow *et al.*, 1994). Die reverse Transkription ist sehr fehlerbehaftet, da kein „proof reading“ erfolgt und trägt somit zur Variabilität von HIV bei (Preston *et al.*, 1988). Anschließend kommt es durch die RNaseH-Aktivität der trifunktionellen RT zur Hydrolyse des RNA-Stranges der Heteroduplex und nachfolgend durch DNA-Polymerase Aktivität zur Komplettierung des DNA-Einzelstranges zum Provirus. Nach Transport der DNA-Doppelhelix in den Wirtszellkern erfolgt mittels Integrase die Integration in das Wirtsgenom.



**Abb. 1.3:** Provirales HIV-Genom (aus Modrow and Falke, 1997)

Im Wirtsgenom liegt die provirale DNA flankiert von regulatorischen Kontrollsequenzen vor, die unter dem Begriff LTR zusammengefaßt sind. Man unterteilt die LTR in die Regionen U3, R und R5, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen. Das Provirus wird dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt, hängt vom Aktivierungszustand der Zelle ab (Stevenson *et al.*, 1990). Im Falle einer T-Zell-Aktivierung kommt es zur Transkription der integrierten DNA und nachfolgend zur Translation der viralen RNA. Hierbei werden über 30 verschiedene

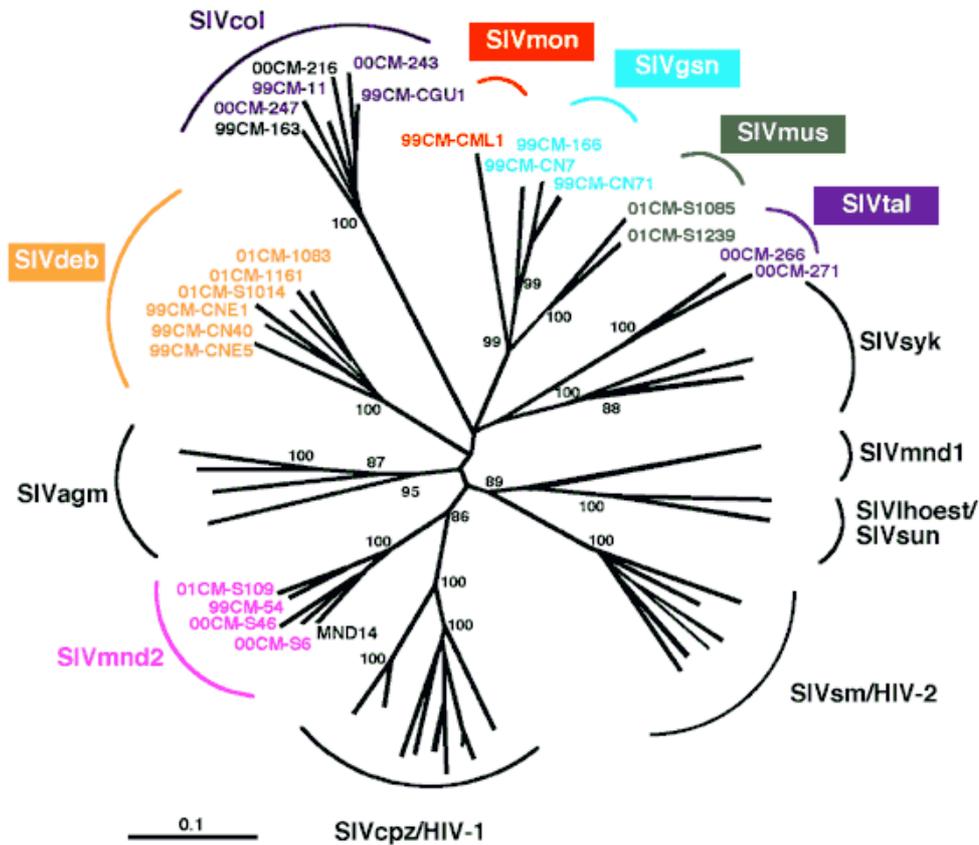
RNA-Spezies aus der viralen 9 kb RNA durch differenzielles Spleißen gebildet (Luukkonen *et al.*, 1995). Dabei entstehen unter anderem virale mRNA-Moleküle, die für die essenziellen regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Tat und Rev regulieren die Bildung von Vollängen-RNA und einfach gespleißter RNA. Die Vollängen-RNA dient entweder als genomische RNA, welche in neue Viruspartikel verpackt wird oder als mRNA zur Translation von Gag- und Pol-Vorläuferproteinen. Für die Gene *env* und *vif*, *vpr*, *vpu* dient einfach gespleißte mRNA. Mit Hilfe der viralen Protease werden die viralen Gag- und Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen, funktionellen Proteine gespalten. Das Env-Vorläuferprotein wird aus einer gespleißten viralen mRNA synthetisiert. Die Selbstaggregation der viralen Proteine zu neuen Viruspartikeln erfolgt an der Zellmembran. Als Erbinformation für einen neuen Infektionszyklus wird ungespleißte Vollängen-mRNA in das Viruspartikel verpackt und die neugebildeten Viren knospen aus der Wirtszelle aus (budding).

### 1.1.3 Phylogenetik der Primaten-Lentiviren

HIV und SIV gehören zur Gattung der Lentiviren, welche zur Familie der Retroviridae zählen. Die humanen Lentiviren werden in zwei Gruppen eingeteilt, HIV-1 und HIV-2, die ca. 55% Sequenz-Homologie zueinander aufweisen (Guyader *et al.*, 1987). Die Genomorganisation zeigt nur in HIV-1 und SIVcpz das akzessorische Gen *vpu* (Huet *et al.*, 1990).

Bislang konnte bei 30 afrikanischen Primatenspezies eine Infektion mit simianen Immundefizienzviren nachgewiesen werden (Peeters *et al.*, 2002). Mindestens 18 dieser bekannten Primaten-Lentiviren infizieren ihren Wirt natürlich, d.h. die in ihrem natürlichen Habitat lebenden Tiere sind Träger des Virus. Unumstritten ist heute, daß afrikanische Primaten ein extrem großes Reservoir an Lentiviren beherbergen, welche großes Potential besitzen andere Spezies, insbesondere den Menschen, zu infizieren. Zwei dieser Viren, SIVcpz von Schimpansen und SIVsm von grauen Halsbandmangaben fungieren nach momentanen Wissensstand als Verursacher von AIDS in Menschen, wobei SIVcpz selbst auch möglicherweise erst durch Infektion der Schimpansen von anderen Spezies aus entstanden sein könnte (siehe weiter unten).

Derzeit teilt man Primaten-Lentiviren in folgende Hauptgruppen ein :



**Abb. 1-4:** Bisher bekannte verschiedene SIV-Linien.

Das Drei-Buchstaben Kürzel bezeichnet den Ursprung, z. B. **HIV-1/SIVcpz** von Schimpansen (*Pan troglodytes*) oder **HIV-2/SIVsm** von grauen Halsbandmangaben (*Cercocebus atys*). Farblich unterlegt die jüngst (aus Affenfleisch als Nahrungsmittel in Kamerun) bestimmten Gruppen. Der phylogentische Baum beruht auf der Sequenzen eines 650bp langen Fragmentes aus *pol* und der Anordnung anhand der neighbor-joining-Methode. Der dargestellte 0.1-Balken entspricht in der Länge einer Divergenz von 10%. (Peeters *et al.*, 2002)

Auffällig ist, daß die Homologie der verschiedenen SIV innerhalb einer Primatenspezies am größten ist, d.h. SIV bildet wirtsspezifische Kluster innerhalb des Evolutionszweiges. Dies spricht dafür, daß die Infektion vor sehr langer Zeit stattgefunden hat. Die Evolution von SIV lief wirtsabhängig ab, d.h. die Differenzierung der SIV-Subspezies ging einher mit der Differenzierung der Primaten.

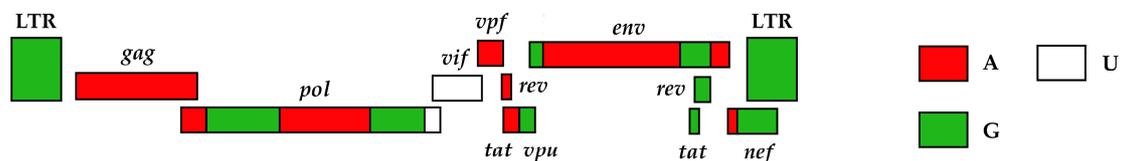
Prinzipiell kann sich eine Kreuzspezies-Transmission von Primaten-Lentiviren in einer großen Vielfalt im neuen Wirt manifestieren. Das Spektrum reicht dabei von unbemerkten Infektionen bis hin zu Epidemien. Die SIVsm-Infektion von in Asien beheimateten Rhesusaffen und Schweinsaffen resultiert beispielsweise in einer AIDS-Erkrankung (Hirsch *et al.*, 1989; Letvin *et al.*, 1985).

Die HIV-Infektion des Menschen resultiert ebenfalls aus einer Kreuzspezies-Transmission. Die genetische Homologie von SIVcpz und HIV-1 spricht dafür, daß SIVcpz der Ursprung des humanen Immundefizienzvirus ist. Nach vorherrschender Meinung ist der Schimpanse (*Pan troglodytes troglodytes*) der natürliche Wirt von SIVcpz, das Virus wurde durch Jagd auf Schimpansen und Verarbeitung von Affenfleisch (s.u.) auf den Menschen übertragen (Gao *et al.*, 1999). Allerdings müssen noch mehr infizierte Tiere in freier Wildbahn gefunden werden um eine eindeutige Aussage zu treffen. Möglich wäre auch, daß Schimpansen an sich kein natürlicher Wirt von SIV sind, sondern in einigen Fällen selbst infiziert wurden. Schimpansen jagen kleinere Affen-Spezies und könnten sich somit vor relativ kurzer Zeit infiziert haben. Der Beginn von HIV in Menschen könnte somit durch Schimpansen, als auch parallel von der ursprünglichen, von Schimpansen gejagten Spezies verursacht sein. Sehr vieles spricht dafür, daß der Mensch kutan oder mukosal mit infektiösem Tierblut in Kontakt trat (Gao *et al.*, 1999). Das Jagen, Schlachten und der Verzehr von rohem Fleisch infizierter Tiere ist in Afrika gängige Praxis und stellt somit eine plausible Transmissionsroute dar. Der direkte Kontakt von Menschen mit infizierten Sooty mangabeys und Schimpansen könnte so in einer Transspezies-Transmission resultieren.

Für die anschließende Ausbreitung des Virus werden verschiedene Gründe angenommen. Unter anderem könnten die sozialen, ökonomischen und gesellschaftlichen Änderungen im frühen und mittleren 20. Jahrhundert den Grundstein für eine AIDS-Epidemie gelegt haben. Hauptsächliche Verbreitungsgründe sind weiterhin der ungeschützte Geschlechtsverkehr oder die Wiederbenutzung von gebrauchten Nadeln bei Drogenabhängigen.

Basierend auf genetischen Analysen des Hüllproteins Env wird bei HIV-1 folgende Nomenklatur eingesetzt (Robertson *et al.*, 1999) : Es werden die Hauptgruppen M (main), O (outlier) und N (non-main, non-outlier) unterschieden, in M werden die Virusstämme eingeordnet, welche die globale Epidemie dominieren. Diese werden wiederum in die Subtypen A - K und die rekombinanten Formen (CRF, siehe weiter unten) unterschieden. In der Einteilung A - K wurden die Bezeichnungen E und I herausgenommen, der ehemalige Subtyp E ist durch vollständige Sequenzierungen von Isolaten seit 1998 als A/E rekombinate Form identifiziert und eingeordnet. Die ehemals als Subtyp I eingestuften Isolate erwiesen sich nach neueren Analysen ebenfalls als rekombinanten Formen von A/G/K/H. In Europa und USA ist der HIV Subtyp B prävalent, während der Subtyp A/E in Afrika und Subtyp C in Indien überwiegt. HIV-2 ist hauptsächlich in Westafrika endemisch und wird in 5 Subtypen (A-E) unterteilt (Myers, 1994).

Anfang der neunziger Jahre wurden erste Varianten von HIV aus Patienten isoliert, die in ihrem Genom größere oder kleinere Teile von verschiedenen Subtypen vereinen. Durch zwei, in kurzem Abstand erfolgte Infektionen mit zwei verschiedenen Subtypen können in einer Zelle zwei verschiedene Proviren vorliegen, die bei beginnender Virusproduktion der Zelle als heterozygoten Genom in ein Virion verpackt werden. In einer von solchen Viruspartikeln infizierten Zellen produziert die Reverse Transkriptase durch Wechsel zwischen beiden RNA-Strängen ein rekombinantes Provirus, das sich zunächst lokal als rekombinante Form (CRF = „Circulating Recombinant Forms“) etablieren kann. Nach der Entdeckung der A/E rekombinanten Form in Zentral-Afrika (Murphy *et al.*, 1993) wurde 1996 von Howard und Rasheed eine in West- und Zentral-Afrika verbreitete A/G-rekombinante Form beschrieben (Howard and Rasheed, 1996).



**Abb. 1-5:** Genomorganisation der A/G-rekombinanten HIV-Isolaten = "Circulating Recombinant Forms 02". U entspricht bisher nicht eingeordneter Sequenzabschnitte.

Mittlerweile sind 14 verschiedene CRFs beschrieben, die Anteile von bis zu 4 verschiedenen Subtypen enthalten.

Für die Bemühungen, einen vielseitig einsetzbaren, effizienten Impfstoff herzustellen, wirkt sich das Auftreten der CRFs nachteilig aus. Solche Mosaikgenome führen dazu, das z. B. eine im gag als Subtyp A eingestufte Virusvariante ein Nef-Protein exprimiert, das sonst nur bei Subtyp G Viren zu finden ist. Da momentan davon ausgegangen wird, dass eine massive, gegen spezifische Epitope gerichtete Immunantwort eher protektiv wirken kann als eine weit gestreute, sind die zur Zeit getesteten Impfstoff-Kandidaten subtyp-spezifisch ausgelegt. Das bedeutet, dass ein Impfstoff gegen Subtyp A seine Effektivität z.B. in Bezug auf das Nef-Protein einer A/G-rekombinanten Form verlieren würde.

## 1.2 Immunantwort und Pathogenese

### 1.2.1 Humorale Immunantwort

Innerhalb der ersten vier Wochen bis Monate nach Infektion mit HIV kommt es zur Bildung spezifischer Antikörper. Diese sind hauptsächlich gegen verschiedene Epitope der Strukturproteine Gag und Env von HIV gerichtet. In der späteren asymptomatischen Phase sind Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar (Burton and Montefiori, 1997). Darunter befinden sich auch Virus-neutralisierende Antikörper (Moore and Nara, 1991 Robert-Guroff *et al.*, 1985 Weiss *et al.*, 1985), welche *in vitro* in der Lage sind, die Infektion von CD4-Zellen mit HIV-Laborstämmen zu verhindern. Dies geschieht, indem sie an das Hauptneutralisationsepitop von HIV-1, den V3-Loop im Hüllprotein gp120, binden. Einer effizienten Virusneutralisation steht allerdings entgegen, daß das Virus eine hohe Mutationsrate aufweist (Roberts *et al.*, 1988 Preston *et al.*, 1988) und somit ständig neue Phänotypen mit veränderten Epitopen entstehen (Verani *et al.*, 1993). Der V3-Loop des gp120 liegt genau in einem solchen Bereich (Rusche *et al.*, 1988 Javaherian *et al.*, 1989 Palker *et al.*, 1988) und ist somit diesem Teil der Immunantwort nicht mehr zugänglich. Diese neuen Virustypen werden auch als Fluchtmutanten bezeichnet (Albert *et al.*, 1990; McKeating *et al.*, 1989; Nara *et al.*, 1990; Reitz *et al.*, 1988).

Für Env-spezifische Antikörper konnte eine infektionsverstärkende Wirkung aufgezeigt werden (Fust *et al.*, 1995). Man kennt dieses Phänomen auch von anderen retroviralen Infektionen in verschiedenen Tiermodellen, wie Pferden, Katzen und Affen (Mitchell *et al.*, 1995; Siebelink *et al.*, 1995 Montelaro *et al.*, 1996).

Infizierte Zellen und von einer Lipidhülle umgebene Viruspartikel können durch Aktivierung der Komplementkaskade zerstört werden. Diese Virolyse kann direkt durch das Komplementsystem oder unter Vermittlung von Antikörpern erfolgen (Sissons and Oldstone, 1980). Dieser Teil der Immunantwort ist allerdings bei HIV-Infizierten nur schwach ausgeprägt (Lyerly *et al.*, 1987 Norley and Kurth, 1992; Spear *et al.*, 1990; Toth *et al.*, 1991). Bei HIV liegen entsprechende Antikörper-Bindungsstellen im viralen Hüllprotein, insbesondere im Transmembranbereich gp41 (Marschang *et al.*, 1997). Obwohl alle getesteten HIV-Stämme *in vitro* eine Komplementaktivierung in Patientenseren induzieren (Spear *et al.*, 1990; Stoiber *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1996), scheint HIV *in vivo* eine Resistenz gegen die lytische Attacke aufzuweisen (Banapour *et al.*, 1986; Dierich *et al.*, 1996). Möglicherweise bietet die Integration bestimmter zellulärer Membranproteine wie CD46, CD55 und CD59 in die Hülle dem Virus Schutz vor Angriff des Komplementsystems (Marschang *et al.*, 1995;

Montefiori *et al.*, 1994; Saifuddin *et al.*, 1995). Nebenbei konnte auch eine infektionsverstärkende Wirkung der Virolyse-vermittelnden Antikörper gezeigt werden (June *et al.*, 1991). Die Bindung von Komplementfaktoren an HIV-Ko-Rezeptoren kann die Infektion verschiedener Zelltypen erleichtern.

Die Antikörper-abhängige zelluläre Zytolyse (ADCC) ist früh im Verlauf der Infektion *in vitro* nachweisbar und besitzt breite Spezifität (Ljunggren *et al.*, 1989; Norley *et al.*, 1990). ADCC beruht auf der Bindung der variablen Region von Antikörpern an die Oberfläche von Virus-infizierten Zellen, worauf die Fc-Region dieser Antikörper von spezialisierten Killerzellen erkannt wird, welche die infizierten Zellen durch Perforation der Membran und DNA-Abbau zerstören (Yagita *et al.*, 1992). Dieser Mechanismus spielt bei anderen viralen Erkrankungen, wie Masern und Herpes, eine entscheidende Rolle (Balachandran *et al.*, 1982; Forthal *et al.*, 1993). Die Bedeutung bei einer HIV-Infektion ist allerdings noch nicht geklärt.

### 1.2.2 Zelluläre Immunabwehr

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) spielen bei der Bekämpfung viraler Infektionen eine entscheidende Rolle (Rouse *et al.*, 1988). CTL erkennen Fragmente der exprimierten viralen Proteine nur im Komplex mit körpereigenen Molekülen des Haupt-Histokompatibilitäts-Komplexes (Braciale *et al.*, 1987). Es handelt sich bei CTL um CD8-T-Lymphozyten. Der T-Zell-Rezeptor der CD8-Zellen bindet an den Peptid/MHC-Komplex, es findet eine Aktivierung der CTL statt und schließlich kann die infizierte Zelle zerstört werden. CTL sind in der Regel MHC-Klasse I restringiert. Die Anwesenheit von CD4-Helfer-Zellen ist in den meisten Fällen zur Aktivierung der CTL-Vorläuferzellen notwendig (Nabholz *et al.*, 1980).

Bei der HIV-Infektion treten spezifische CTL früh auf, d.h. schon innerhalb einer Woche nach Exposition (Reimann *et al.*, 1994; Yasutomi *et al.*, 1993). Dieser Zeitpunkt korreliert mit einem drastischen Abfall der primären Virämie, sowohl im Plasma als auch in den PBMC (Borrow *et al.*, 1994; Koup *et al.*, 1994; Safrit *et al.*, 1994). Die CTL-Antwort gegen HIV ist in der akuten und der asymptomatischen Phase stark ausgeprägt (Hoffenbach *et al.*, 1989; Venet *et al.*, 1992). CTL können dabei in vielen verschiedenen Geweben wie Blut, Lunge, Milz, Gehirn und Lymphgewebe nachgewiesen werden (Hadida *et al.*, 1992; Jassoy *et al.*, 1992; Plata *et al.*, 1987; Walker and Plata, 1990). CTL-Aktivität wurde hauptsächlich gegen die viralen Proteine Gag, Pol, Env und Nef nachgewiesen, aber auch gegen die regulatorischen Proteine Vif, Tat und Rev (Riviere *et al.*, 1994). Bekannt sind mittlerweile mehr als 300 Epitope von HIV mit den entsprechenden MHC-I-Typen. Obwohl diese Epitope in zum Teil stark konservierten Bereichen der Virusproteine liegen (Norley *et al.*, 1993), ist

noch nicht geklärt, weshalb eine vollständige Eliminierung der HIV produzierenden Zellen durch die CTL nicht erreicht wird. Ungeklärt ist, ob CTL das Virus kontrollieren können. Bei *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, daß die CTL-vermittelte Lyse der Zielzellen trotz des schnellen Replikationszyklus von sechs Stunden schnell genug erfolgt, um die Produktion neuer Virionen zu verhindern (Yang *et al.*, 1996). Für eine Beteiligung der CTL an der Kontrolle der Infektion spricht weiterhin der Nachweis HIV-spezifischer CTL-Aktivität bei Personen, die häufiger Virusexposition ausgesetzt sind und trotzdem seronegativ bleiben ("Highly exposed, persistently seronegative", HEPS). Diese Personen zeigen keine spezifische humorale Immunantwort im Plasma (Langlade-Demoyen *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 1995; Rowland-Jones *et al.*, 1995). Allerdings konnten viruspezifische IgA an der Oberfläche der Mukosa gefunden werden (Clerici *et al.*, 2002; Devito *et al.*, 2000). Starke Evidenz für eine Beteiligung von CD8-T-Lymphozyten an der Kontrolle der Viruslast im peripheren Blut zeigt ein Studie im SIV/Rhesusaffen-Modell, in welcher mit SIVmac infizierte Tiere von CD8-positiven Zellen depletiert wurden (Schmitz *et al.*, 1999). Kontrolltiere konnten nach dem initialen Peak die Viruslast senken, während diese sich bei den CD8-depletierten Tieren auf eine deutlich höhere Kopienzahl/Milliliter Plasma einstellte.

Neben der lytischen antiviralen Aktivität besitzen CTL einen weiteren, nicht MHC-restringierten Mechanismus. CD8-Zellen sekretieren Faktoren, die sich inhibierend auf die Virusreplikation auswirken und außer beim Menschen (Mackewicz and Levy, 1992) auch bei Primaten untersucht wurden (Emau *et al.*, 1991; Ennen *et al.*, 1994a; Ennen *et al.*, 1994b; Kannagi *et al.*, 1988; Powell *et al.*, 1993). Zunächst konnten die drei  $\beta$ -Chemokine MIP-1 $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , und RANTES identifiziert werden (Cocchi *et al.*, 1995). Deren zellulärer Rezeptor CCR5 wird von CCR5-tropen HIV-Stämmen als Ko-Rezeptor genutzt (Alkhatib *et al.*, 1996; Deng *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996; Dragic *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996). Ebenso konnte gezeigt werden, daß IL-16 die Replikation von HIV und SIV in infizierten PBMC inhibiert (Baier *et al.*, 1995). In verschiedenen Studien wurden relativ hohe Konzentrationen dieser Faktoren bei LTNP gemessen (Brinchmann *et al.*, 1990). Trotzdem ist davon auszugehen, daß auch andere Mechanismen bzw. Faktoren bei der Inhibition beteiligt sind (Clerici *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1997), neuste Untersuchungen ordnen den als  $\alpha$ -Defesinen bezeichneten löslichen Faktoren der CD8-T-Lymphozyten eine wichtige Rolle zu (Zhang *et al.*, 2002). Bekannt ist, daß bei Eintritt in die symptomatische Phase der HIV-Infektion die CTL-Antwort absinkt und schließlich verschwindet (Carmichael *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002).

### 1.2.3 Pathogenese der HIV/SIV-Infektion

Nachdem das HIV in den Wirt eingedrungen ist und sich in das Genom integriert hat, ist die Infektion durch den Verlauf dreier Phasen gekennzeichnet. In der akuten Phase, der virämischen Phase, die etwa 2-6 Wochen anhält, kommt es meist zu Grippe-ähnlichen Symptomen, in einigen Fällen kann diese aber auch subklinisch verlaufen (Cooper *et al.*, 1985). Die Virusbelastung im Blut zeigt etwa zwei Wochen nach Infektion einen hohen Anstieg, die zellassoziierte Virusbelastung liegt bei  $10^2$ - $10^4$  infizierten Zellen/Millionen PBMC, die Plasmavirusbelastung bei  $10^5$ - $10^8$  Partikeln/ml Plasma. Parallel dazu kann das Virus schon sehr früh in den Lymphknoten nachgewiesen werden und breitet sich schnell im gesamten lymphatischen Gewebe aus (Pantaleo *et al.*, 1998). Während dieser Zeit kommt es zu einem deutlichen Abfall der CD4-Zellzahlen, die nach der akuten Phase wieder leicht ansteigen (Clark *et al.*, 1991; Graziosi and Pantaleo, 1998; Reimann *et al.*, 1994).

In der asymptomatischen Phase fällt nach Einsetzen der antiviralen Immunantwort die Virusbelastung wieder ab und bleibt oft für Jahre auf einem niedrigen Niveau von  $10^4$ -bis  $10^5$  Partikeln pro Milliliter Plasma bestehen (Mellors *et al.*, 1996). Die Anzahl der HIV-RNA Kopien ca. 6-12 Monate nach Infektion ist in der Regel von Patient zu Patient unterschiedlich, erlaubt aber eine relativ präzise Voraussage der weiteren Krankheitsprogression (Katzenstein *et al.*, 1997; Mellors *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum peripheren Blut bleibt die Virusbelastung in den lymphatischen Organen auch während der asymptomatischen Phase hoch und steigt sogar beständig an (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993). Große Virusmengen werden in Antikörper-Komplexen an die Follikulär Dendritischen Zellen (FDC) der Lymphknoten gebunden. Simultan kommt es zu einem Absinken der CD4-Zellzahl. Während der initialen Infektionsphase steht HIV ein nahezu unlimitiertes Kontingent an Zielzellen zur Verfügung. Die Virusvermehrung steigt an, da jedes freigesetzte Virion im Durchschnitt mehr als ein Nachkommen produziert. Es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht (steady state) zwischen Virusproduktion und Elimination ein. Pro Tag werden von einem infizierten Patienten in der asymptomatischen Phase, in der die Virusbelastung stabil ist, etwa  $10^{10}$  Viren produziert und vom Immunsystem eliminiert. Infiziert werden dabei hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-Zellen, die zur überwiegenden Mehrheit an der Virusreplikation beteiligt sind. Ihre Halbwertszeit liegt bei 1,6 Tagen, die von freien Viruspartikeln im Plasma bei sechs Stunden (Ho *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1997; Perelson *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1995). Daraus resultiert eine Erhöhung des gesamten CD4-Zellumsatzes um den Faktor 25 (Ho *et al.*, 1995). Der enorme Zellumsatz ist wahrscheinlich mitverantwortlich für den graduellen Verlust der Funktion des Immunsystems, insbesondere der Helferzellen. In jüngster Zeit gibt

es allerdings verstärkt Hinweise darauf, daß eine persistierende Hyperaktivierung des Immunsystems verantwortlich ist für den Verlust der CD4<sup>+</sup>-Zellen. Diese Aktivierung ist anhand verschiedener Leukozyten-Aktivierungsmarker und der Produktion proinflammatorischer Zytokine messbar (Hazenberg *et al.*, 2000). Die Funktionen dieser Immunzellen, die normalerweise eine wichtige Rolle bei der Aktivierung und Regulation des Immunsystems spielen, sind dadurch stark beeinträchtigt (Gruters *et al.*, 1990). Die T-Helferzellen exprimieren in diesem Stadium Lymphokine, die die Replikation von HIV fördern. Die zelluläre Immunantwort wird immer stärker geschwächt und es kommt nach durchschnittlich 8-10 Jahren zum Beginn der symptomatischen Phase (Copeland *et al.*, 1996; Pantaleo and Fauci, 1994). Etwa 10% der Infizierten zeigen eine besonders schnelle Krankheitsprogression (RP, rapid progressors), 5% hingegen gehören zu den Langzeitüberlebenden (LTNP, long-term non progressors) (Graziosi and Pantaleo, 1998). Die symptomatische Phase ist gekennzeichnet durch einen starken Anstieg der infektiösen Viren im Plasma und einen dramatischen Abfall der CD4-Zellzahl. Bei weniger als 200 CD4-positiven Zellen/ $\mu$ l und Einsetzen der Symptome spricht man von der Krankheit AIDS, es sinken die Antikörpertiter und die Zahl der HIV-spezifischen CTL durch die Zerstörung der lymphatischen Gewebe. In den Lymphknoten wird die funktionelle morphologische Struktur des Gewebes zerstört und dadurch die Effektivität des Immunsystems weiter beeinträchtigt. Aufgrund der hohen Virusreplikation in diesem Stadium, bei immer weniger zur Verfügung stehenden Wirtszellen, werden scheinbar Virusvarianten mit erweitertem Wirtszellspektrum selektiert, die sich wahrscheinlich über die Verwendung verschiedener Ko-Rezeptoren neue Wirtszellpopulationen zugänglich machen.

In dieser Phase erkranken AIDS-Patienten an opportunistischen Infektionen, beispielsweise *Pneumocystis carinii* Pneumoniae (PCP), *Candida albicans* Infektionen des Mund-, Rachen- und Bronchialraumes, Tuberkulose sowie *Herpes zoster* (Levy, 1993). Auch ohne weitere Infektionen wird der Körper durch das Auftreten von neuronalen AIDS, der Zerstörung von Neuronen durch virale Replikation in diesen Zellen weiter geschädigt. Normalerweise apathogene, ubiquitär vorkommende Krankheitserreger können nicht mehr adäquat bekämpft werden, opportunistische wie nicht opportunistische Krankheitserreger führen letztendlich zum Tod des Erkrankten.

## 1.3 Impfstoffstrategie gegen HIV

### 1.3.1 Das Modell-System SIV im Tier

In den Schätzungen der WHO spiegelt sich wieder, das trotz aller Bemühungen zur Aufklärung sich immer weiter Menschen mit HIV infizieren. Ebenso haben alle wissenschaftlichen Bemühungen es bis heute nicht ermöglicht, die Infektion vollständig zu heilen oder gar durch Impfstoffe zu verhindern. Obwohl viele Menschen sich nicht mehr unmittelbar durch AIDS bedroht fühlen, ist die Erforschung eines effizienten, sicheren, kostengünstig produzierbaren und gut handhabbaren Impfstoffs gegen HIV weiterhin dringend notwendig. Nicht nur für die Entwicklung und Erprobung von Impfstoffen gegen HIV werden vergleichbare Tiermodelle benötigt (Daniel *et al.*, 1990; Kurth *et al.*, 1988) sondern auch zur Erforschung der Pathogenese und den Ursachen des Infektionsverlaufs von HIV (Levy, 1996; Schultz and Hu, 1993). Die humanen und simianen Immundefizienzviren besitzen ähnliche Genomorganisation, Morphologie und spezifischen Zelltropismus. Als Primärrezeptor fungiert in beiden Fällen das CD4-Molekül (Clapham *et al.*, 1991) und auch der Ko-Rezeptor CCR5 ist bei Makrophagen-tropen HIV-Stämmen und SIV identisch (Alkhatib *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996).

Die Pathologie von SIVmac in infizierten Rhesusaffen ist mit derjenigen HIV-infizierter Menschen vergleichbar (Gardner *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1994), jedoch bezüglich der Krankheitsprogression deutlich schneller. In diesem Wirt verursacht SIV ein halbes bis drei Jahre nach der Infektion eine schwere Immundefizienz (simianes AIDS) mit der charakteristischen Verminderung der CD4-T-Helferzellen, opportunistischen Infektionen und letalem Ausgang. Aus diesem Grund wird ein beträchtlicher Teil der Immunisierungsstudien in diesem Makaken-Modell durchgeführt (Norley and Kurth, 1997; Schultz and Stott, 1994). Es können in diesem Modell weitergehend auch gentechnisch entwickelte Hybrid-Viren eingesetzt werden, aus SIV und HIV bestehen (SHIV). Diese besitzen die zur Infektion und Replikation notwendigen SIV-Elemente sowie bestimmte HIV-Anteile, wie zum Beispiel Env oder die Reverse Transkriptase. Durch das Einbringen solcher primären Ziele der Impfstoff-Forschung in das Rhesusaffen/SIV-Modell können spezifische Immunreaktionen beobachtet werden und die gewonnenen Erkenntnisse lassen sich direkter auf HIV in Menschen übertragen.

### 1.3.2 Ansätze der Impfstoff-Entwicklung gegen HIV

Ende des 17. Jahrhunderts wurde von Edward Jenner, einem englischen Arzt, der erste Impfstoff überhaupt entwickelt, ohne dass auch nur der Erreger identifiziert oder die Funktionsweise des Immunsystems bekannt war. Durch das Infizieren einer Versuchsperson, einem achtjährigen Jungen mit den Kuhpocken (Vaccinia-Viren) konnte Jenner in einem ersten Experiment diesen gegen den normalerweise tödlichen Verlauf einer späteren, absichtlich unternommene Infektion mit Pockenviren (Variola-Viren) schützen. Dieses damalige spekulative Verfahren der "Vakzination" wurde wesentlich später zu einem Schwerpunkt der Medizin; bei jeder neuartigen Krankheit ist immer wieder die Identifizierung des Erregers, die Entwicklung einer Therapie und die Forschung nach einer möglichen Vakzine geboten. In einer weltweiten Kampagne der WHO konnte die Pockeninfektion durch Identifizieren der Patienten und Vakzinierung ganzer Bevölkerungsteile besiegt und am 8. Mai 1980 offiziell für ausgerottet erklärt werden.

Obwohl frühzeitig das tödliche Potential von HIV erkannt wurde und seitdem mit hohem finanziellen Aufwand nach einer Möglichkeit zur Vakzination geforscht wird, konnte noch kein Impfstoff gegen HIV entwickelt werden. Wünschenswert wäre die Entwicklung eines Impfstoffes, der eine sterile Immunität verleiht. Dazu muß es zu einer direkten Eliminierung sämtlicher eingedrungener Viruspartikel kommen, es darf kein virales Genom in Form eines integrierten Provirus im Organismus verbleiben. Die Elimination von freien Viruspartikeln wäre nur mittels einer effektiven humoralen Immunantwort zu erreichen. Neueste, Erfolg versprechende Ansätze beruhen auf der Induktion von Antikörpern gegen ein Epitop, welches nur bei dem Eintritt des Virus in die Zelle auftritt (R. Gallo, Vortrag im RKI, Dezember 2002). Zu diesem Zeitpunkt kann die eigentliche Infektion der betreffenden Zelle noch verhindert werden. Aufgrund der Schwierigkeiten, eine schützende humorale Immunantwort zu induzieren, wurde innerhalb der letzten Jahre verstärkt an dem Erreichen einer protektiven Immunität geforscht. Bei dieser ist das Immunsystem in der Lage, durch eine ausgeprägte zelluläre Immunantwort das eingedrungenen Virus in der Replikation zu kontrollieren und somit die Krankheitsprogression zu verhindern.

Besonders bei einer Infektionskrankheit wie AIDS, die aufgrund der hohen Therapiekosten in den sogenannten „Dritte Welt“-Ländern die meisten Todesfälle verursacht, sollte ein Impfstoff auch in eher logistischen Punkten geeignet sein. Darunter fällt eine kostengünstige Produktion in großen Maßstäben, geringe Ansprüche an Lagerung und eine einfache Handhabung, um möglichst schnell auch in den medizinisch nicht gut versorgten Gebieten einsatzbereit zu sein.

Die ersten Vakzinierungs-Experimente im SIV/Rhesusaffen-Modell beruhten auf den „klassischen“ Methoden, die vielen bisherigen Impfstoffen zugrunde liegen. Inaktiviertes Gesamtvirus als Immunogen induzierte eine schützende Immunantwort (Murphey-Corb *et al.*, 1989), jedoch konnte gezeigt werden, dass der Schutz nicht auf einer Immunantwort gegen SIV-Anteile beruhte. Durch humane Zelloberflächenproteine, unter anderem z.B. MHC-Klasse-I Moleküle in der Virusmembran, die aus der zur Virusanzucht benutzten humanen Zell-Linie stammten wurde eine starke xenogene Immunantwort ausgelöst, die keinen Schutz gegen Virus aus einer allogenen Zelle darstellt (Stott, 1991). Immunisierungen mit inaktiviertem Gesamtvirus zielen hauptsächlich auf die Induktion einer starken humoralen Immunantwort ab. Aufgrund dieser Überlegung wurde in einer weiteren Studie der mögliche Schutz durch passiven Antikörper-Transfer untersucht. In Rhesusaffen konnte so kurz vor der Belastung ein hoher Titer von neutralisierenden Antikörper (IgG) erreicht werden, der aber in keinem Fall einen Schutz vor Infektion nach Belastung erbrachte (Norley *et al.*, 1998).

Weitere Studien, die sich auf die Stimulierung einer starken humoralen Immunantwort konzentrieren basieren auf aufgereinigten oder rekombinant hergestellten viralen Struktur- und Nichtstruktur-Proteinen bzw. Untereinheiten dieser Virusproteine. Da durch diese Immunogene keine Gefahr einer Infektion ausgeht, wurden sehr schnell Phase I und Phase II Studien mit auf Hüllproteinen basierenden Immunogenen gestartet (Klein, 2001). Obwohl mittlerweile die Meinung vertreten wird, daß eine größtenteils humorale Immunantwort gegen Virusbestandteile keinen Schutz bieten kann, ist z.B. „AIDSVAX“ (VaxGen, USA), eine bivalente Form von in Hamsterzellen produzierten HIV-1 gp120 derzeit in einer Phase III Studie in Thailand. Eine zelluläre Immunantwort kann durch den Einsatz von Lipopeptiden oder entsprechenden Adjuvantien bei Immunisierung mit Proteinen induziert werden, doch ergab sich daraus kein Schutz im SIV/Rhesusaffen-Modell (Sastry and Arlinghaus, 1991; Vogel *et al.*, 2002). Es befinden sich drei weiterentwickelte Lipopeptid-Vakzine momentan in Phase I Studien.

Ein Nachteil der bisher genannten Impfstrategien besteht darin, daß jeweils nur ein kleiner Teil des HI-Virus dem Immunsystem dargestellt wird, während die Replikation eines lebenden Virus im Organismus auch sehr viele andere Strukturen erzeugen kann. Es wird angenommen, daß neutralisierende Antikörper gegen eine Struktur, die nur während der Fusion von Virus und CD4-Molekül auf der Zelloberfläche entsteht durchaus in der Lage wären, den Infektionsvorgang zu unterbinden. Bisher erschien es als zu schwierig, diese Struktur synthetisch darzustellen, dadurch fehlte ein Immunogen zur Induktion solcher Antikörper. Wie oben bereits erwähnt, erzielte hier die Arbeitsgruppe um R. Gallo jüngst

vielversprechende Fortschritte. Weiterhin könnte eine zelluläre Immunantwort gegen die früh exprimierten, regulatorischen Proteine wie Tat bedeutend sein, um effektiv die infizierten Zellen zu erkennen und das Viruspotential im Organismus selbst zu eliminieren.

Eine Vakzinierung mit einer abgeschwächten, lebenden (= attenuierten) Form des Erregers konfrontiert das Immunsystem mit möglichst vielen immunogenen Epitopen des Wildtyp-Erregers und kann somit eine umfassende humorale und zelluläre Immunantwort auslösen. Dieses Prinzip wird bei Impfungen gegen z.B. Polio und Pocken beibehalten. Da es sich bei HIV um einen Retrovirus handelt, bedeutet es, daß jede lebende Form eines solchen Virus seine Erbinformation in das Genom der Wirtszelle integriert. Somit besteht die Gefahr der Integrationsmutagenese und, da das Provirus der attenuierten Viren lebenslang im Genom persistiert, die Gefahr der Rückmutation. Durch große, multiple Deletionen im HIV/SIV Genom ist es nahezu auszuschließen, daß spontane Rückmutationen erfolgen können. Erste erfolgversprechende Vakzinierungsstudien wurden mit im *nef*-Gen unterschiedlich stark deletierten SI-Viren im Rhesusaffenmodell durchgeführt. Die immunisierten Tiere wiesen einen starken Schutz gegen die Belastung mit dem Wildtyp-Stamm auf, bei einer nicht nachweisbaren Viruslast durch das Immunisierungsvirus (Daniel *et al.*, 1992). Es wurde beobachtet, daß der Zeitraum, der nach der Immunisierung benötigt wurde, um einen Schutz zu induzieren mit der Größe der Deletion im *nef*-Gen und auch der Vitalität des benutzten Virus-Stammes war (Norley *et al.*, in Press). Kleinere Deletion von nur 12 Basenpaare wie zum Beispiel in der SIVmac 32H C8-Mutante induzieren schon ab 10-20 Wochen nach Immunisierung Schutz, während eine 182 Basenpaar Deletion erst ab 40 Wochen nach Immunisierung Schutz vor Belastung mit dem Wildtyp erzielen. Doch konnten in diesen Studien keine Immunparameter ermittelt werden, die nicht geschützte Tiere von geschützten Tieren unterschieden haben, oder anhand deren zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Immunisierung der Schutz voraus gesagt werden konnte. Weiterhin wurde in Australien eine Gruppe von Patienten (Sydney Blood Bank Cohort) beschrieben, die sich mit einer natürlich entstandenen  $\Delta$ *nef*-HIV-Mutante infizierten und frei von Krankheitssymptomen blieben. Doch bei weiteren Studien stellte sich heraus, daß attenuierte SIV in neugeborenen Rhesusaffen eine schnelle Krankheitsprogression induzieren. Durch fortgesetzte Beobachtung der damals „geschützten“ Tiere zeigte sich, daß das  $\Delta$ *nef*-Immunisierungsvirus selbst auch in adulten Rhesusaffen eine spätere, langsame Krankheitsprogression induzieren (Baba *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 1999). Auch die infizierten Personen der Sydney-Kohorte entwickelten nach längerer Zeit Krankheitssymptome, womit der Einsatz von attenuierten Immundefizienzviren auf Basis des *nef*-Gens in Menschen nahezu ausgeschlossen werden muß. Doch konnte auch

nicht befriedigend geklärt werden, worauf der anfängliche Schutz beruhte. Wenn eine bisher noch nicht genau charakterisierte Art von Immunantwort Ursache war, ist diese vielleicht auch durch andersartige Impfstoffe zu stimulieren. Ebenso könnte der Schutz vor dem Belastungsvirus erklärt werden durch das Vorhandensein eines lebenden Virus im Organismus, welches die potentiellen Orte der Replikation bereits infiziert hat. Denkbare wäre, dass sich dadurch eine letale Infektion des Wildtyp-Virus nicht manifestieren kann.

Gentechnisch erzeugte Impfstoffe, die sogenannten DNA-Vakzine würde auch unter den oben genannten logistischen Gesichtspunkten betreffs Haltbarkeit, Herstellungskosten sowie gute Verträglichkeit und verhältnismäßig einfache Applizierungsmethoden vorteilhaft sein für weltweite Impf-Kampagnen. Immunisierung mit „nackter“ DNA, also nur mit Expressionsvektoren, die die Gensequenzen viraler Struktur- und Nichtstruktur-Proteine enthalten, induziert zum Teil eine starke zelluläre Immunantwort. Zu Beginn der 90ziger Jahre wurden erste Daten erhoben wie DNA alleine schon eine Immunantwort gegen die codierten Gene auslösen kann. Dadurch, daß die Vektoren nach Verabreichung auf einen unbekanntem Weg in den Zellkern gelangen und von dort aus die Proteine durch die zelleigene Proteinbiosynthese hergestellt werden, werden Epitope genauso über den endogenen MHC-Klasse-I Präsentationsweg dem Immunsystem dargestellt wie bei einer Infektion der Zelle. Die Verabreichung kann durch intradermalen oder intramuskulären Injektion erfolgen, aber auch durch die ballistische Methode (Gene Gun) (Fuller *et al.*, 1997). Bei den im SIV/Rhesusaffen-Tiermodell durchgeführten DNA-Immunisierungen konnte neben einer humoralen auch eine starke spezifische CTL-Antwort induziert werden (Fuller *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Shiver *et al.*, 1995; Yasutomi *et al.*, 1996). Bei Schimpansen konnte nach einer Immunisierung mit DNA-Plasmiden zur Expression von HIV-1-Env ein Schutz vor nachfolgender Belastung mit einem schwach replizierenden HIV-1 erzielt werden (Boyer *et al.*, 1997). Makaken, die mit HIV-1-env DNA-Expressionsplasmiden immunisiert wurden, waren nach Belastung mit einem chimären infektiösen SHIV-Stamm, ein rekombinantes, chimäres Virus, zum Teil (Boyer *et al.*, 1996) bzw. bei zusätzlicher Immunisierung mit HIV-1-env-Protein zur Verstärkung der humoralen Immunantwort ganz vor einer Infektion mit SHIV geschützt (Letvin *et al.*, 1997). Um die möglichen Effekte der Expression kompletter Gene eines Erregers im Organismus zu minimieren, wurden Immunisierungsvektoren konstruiert, die nur CTL-Epitope von verschiedenen HIV/SIV Proteinen als hintereinander angeordnete Polypeptide exprimieren. Im Mausmodell konnte durch die Multi-epitop-Vektoren eine zelluläre Immunantwort gegen HIV/SIV induziert werden (Hanke *et al.*, 2002b; Hanke *et al.*, 1998). Die Gruppe um Letvin (Barouch *et al.*, 2000) kombinierte die DNA-

Immunisierung mit einer Stimulation des Immunsystems über die Zugabe von einem rekombinanten, modifizierten IL2/Ig-Proteins, selbe Ergebnisse ergaben die Ko-Injektion von den Immunisierungsvektoren mit HIV- bzw. SIV-Genen und einem für das oben genannte rekombinante IL2/Ig-Konstrukt codierenden Expressionsvektor. Diese Strategie erwies sich in den bisher durchgeführten Vakzinierungsstudien in Tiermodellen als Erfolg versprechend.

Bei nackter DNA als Impfstoff oder auch bei "Carrier-Systemen" (s.u.) kann die Basensequenz des Immunogens als auch des Vektors in weitem Umfang modifiziert werden. Die sogenannte Codon-Optimierung modifiziert art-fremde Gensequenzen derart, daß sie im immunisierten Organismus wie autologe Gene erscheinen. Durch die fortschreitende Analyse des menschlichen Genoms konnten Tabellen erstellt werden, die belegen, welches der jeweiligen in Frage kommenden Basentriplets für eine bestimmte Aminosäure am häufigsten benutzt wird, bzw. weitergehend, ob in stark exprimierten zellulären Genen andere Basentriplets als in schwächer exprimierten Genen zu finden sind. Solche Tabellen existieren auch für andere Spezies, die Benutzung bestimmter Codons ist bei Säugetieren sehr ähnlich und differiert dann stark gegenüber derjenigen von Bakterien, welche auf deren eigenen, bakteriellen Proteinbiosynthese-Apparat abgestimmt ist. Letztendlich liegt der besseren Expression bestimmter Codons die höhere Verfügbarkeit der entsprechenden t-RNA zu Grunde. Ein Modell zur Codon-Optimierung ist die gesteigerte Expression des green-fluorescent-protein (GFP, aus der Qualle *Aequorea victoria*) durch die Anpassung an die in Säugetieren oder auch Pflanzen verwendeten Codons.

Die Codon-Optimierung von viralen oder bakteriellen Genen hat für die Konstruktion von Vakzinierungs- bzw. Immunisierungsvektoren auch andere Vorteile. Wie für das GFP beschrieben, kann zum einen durch Neuschreiben der Basensequenz bei Beibehalten der Aminosäuresequenz eine im menschlichen Organismus art-fremde Gensequenz in der gleichen Stärke exprimiert werden wie ein in der Zell-Physiologie dafür vorgesehenes zelluläres Gen. Somit wird eine große Menge des Proteins erzeugt, woraus sich eine starke Präsentation der Epitope dieses Immunogen über die endogene Antigenprozessierung ergibt. Durch den Umschreibe-Prozeß ergibt sich weiterhin, daß in viralen oder bakteriellen Genen vorhandene regulatorische oder inhibitorische Sequenzmotive eliminiert werden können. Es wurde demonstriert, daß durch Codon-Optimierung das Rev-responsive-Element (RRE) in *gag-pol* entfernt werden konnte und somit eine effiziente Expression in Abwesenheit von Rev stattfindet (Kotsopoulou *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000). Für HIV sind in *gag-pol* und *env* neben dem RRE weitere inhibitorische Sequenzen (INS) beschrieben, die wahrscheinlich durch Einfluß auf die Stabilität des RNA-Transkripts die Expression beeinträchtigen.

Ein Vorteil für die Praxis der Impfstoffkonstruktion ist die Einführung von stillen Mutationen, um so Restriktionsschnittstellen nach Wunsch einführen zu können. Dabei werden, abweichend von der „Ideal“-Sequenz in Bezug auf die stark exprimierten Codons andere, aber für dieselbe Aminosäure codierende Codons eingesetzt, um bestimmte Sequenzmotive zu erzeugen. Über den Effekt absichtlicher Einführung von CpG-Motiven in die Immunisierungs-Konstrukte, aufgrund deren Vorhandensein bakterielle DNA im Säugetier-Organismus das Immunsystem stimuliert (Review : Hacker *et al.*, 2002) existieren noch unterschiedliche Thesen (Deml *et al.*, 2001). Selbst wenn eine Codon-Optimierung nicht zwingend erforderlich ist, kann diese Veränderung auf Ebene der DNA auch keinen nachteiligen Effekt auf die Struktur des Proteins haben und ist somit eine risikolose, aber zeitaufwendige Methode in der moderneren Impfstoffforschung.

Die DNA zur Expression von HIV-Genen kann auch durch bakterielle oder virale Träger gezielt in bestimmte Zellpopulationen im Organismus gebracht werden. Es sind mehrere „Carrier-Systeme“ oder „Antigen Delivery Systems“ beschrieben, die für zukünftige HIV-Impfstoffe getestet werden. Durch den Einsatz von rekombinanten apathogenen Viren zur intrazellulären Expression von HIV-bzw. SIV-Proteinen läßt sich, wie bei allen Lebendimpfstoffen, eine starke zelluläre Immunantwort induzieren (Natuk *et al.*, 1992; Natuk *et al.*, 1993; Prevec *et al.*, 1991). Diese Viren, die durch ihre eigenen, mehr oder weniger spezifischen Hüllproteine bestimmte Zellen infizieren, tragen in ihren Genomen zusätzlich HIV-Sequenzen. Bei der Replikation dieser rekombinanten Viren werden die HIV-Proteine mit gebildet und somit eine Immunantwort über den MHC-Klasse-I Antigen-Präsentationsmechanismus gegen die Trägerviren selbst, als auch gegen die HIV-Bestandteile induziert. Um die Gefahr einer Krankheit durch das „Carrier“-Virus bei z.B. immunsupprimierten Empfängern zu vermindern, wurden zunehmend virale Vektoren verwendet, bei denen die virale Erbinformation der Vektoren nur noch zum Teil vorhanden ist. Dadurch ergibt sich eine Attenuierung, d.h. an unterschiedlichen Stellen im Replikationszyklus erfolgt eine Blockierung, damit zwar die eingebrachten Antigen gebildet werden, aber keine neuen infektiösen Viruspartikel entstehen. Für diesen Zweck sind bereits experimentell über 13 verschiedene Viren als „Antigen Delivery Systems“ eingesetzt worden (Übersichts-Artikel von Hanke, 2001). In USA und Europa befinden sich mehrere Ansätze in Phase-I/ -II Studien, unter anderen von Kanarienvogel-Pocken-Vektoren in Kombination mit Immunisierung mit rekombinanten Hüllprotein-Untereinheiten (Klein, 2001). Diese Kombination soll bald zu einer Phase-III Studie in Thailand führen. Ebenso sind Studien mit

Modified-Vaccinia-Ankara (MVA) als hoch-attenuierten viralen Vektor für HIV-Gene im Laufe (siehe auch „Prime-Boost“ Strategien).

Neben den apathogenen Viren werden auch Bakterien wie zum Beispiel Shigella, Listeria oder auch rekombinante Salmonellen (Aldovini and Young, 1991; Berggren *et al.*, 1995) als Träger eingesetzt, um in Körperzellen HIV/SIV-Gene einzuschleusen und zu exprimieren. Dabei können die Plasmidvektoren von den Bakterien im Cytoplasma der Zelle freigesetzt werden, oder aber durch die bakterielle Proteinbiosynthese werde virale Proteine direkt in die Zelle gebracht; beides führt zu einer endogenen MHC-Klasse-I Präsentation der viralen Epitope und somit zur Auslösung einer starken zellulären Immunantwort. Bei der Proteinexpression durch Bakterien bedarf es einer auf die Codon-Usage des betreffenden Bakteriums abgestimmten Codon-Optimierung. Bakterien als Carrier-Systeme besitzen den Vorteil, daß sie relativ günstig in großen Mengen hergestellt werden können, einfach gelagert und zumeist oral verabreicht werden können.

Auf den Ergebnissen der Immunisierung mit nackter DNA und den lebenden, attenuierten rekombinanten „Carrier“-Viren basieren die Kombinationsimpfungen oder „Prime-Boost“ Strategien. Dabei können verschiedene Verabreichungsmethoden (z.B. oral, intravenös, intrarektal usw.), verschiedene Adjuvanzien und unterschiedliche Vektoren miteinander kombiniert werden. Prinzipiell sieht eine solche Strategie eine oder mehrere Grund- oder Prime-Immunisierungen vor, später werden gegen dieselben Antigene mittels anderer Vektoren mehrere Verstärkungs- oder Boost-Immunisierungen durchgeführt. In den meisten Experimenten zu Prime-Boost Immunisierungen werden DNA-Impfstoffe für die Prime-Immunisierungen eingesetzt und für die Boost-Immunisierung virale, attenuierte Lebendimpfstoffe wie z.B. Modified-Vaccinia-Ankara (MVA) (Sutter and Moss, 1992), welche dieselben HIV- bzw. SIV-Gene exprimieren (Hanke *et al.*, 1999). Bisher konnte auf diesem Weg im Tiermodell die ausgeprägtesten zellulären und humoralen Immunantworten induziert werden. Prime-Boost Verfahren haben den bedeutenden Vorteil, daß durch Wechsel der Vektoren keine verstärkte Immunantwort gegen den Träger selbst ausgelöst wird, aber das Immunogen dem Immunsystem öfters dargestellt wird. Mehrere Immunisierungen mit MVA zum Beispiel führen zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen das MVA selbst als gegen die mit eingebrachten SIV-Bestandteile. Es befindet sich zumindest ein Prime-Boost Verfahren mittles DNA und MVA in einer Phase I- Studie in Oxford und Nairobi, die Ergebnisse zusammen mit den Immunogenitäts-Untersuchungen rechtfertigen weiteres Vorgehen mit diesem Ansatz (Hanke *et al.*, 2002a).

## 1.4 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit genetischen Impfstoffen gegen HIV. Dazu gehört die Untersuchung der Wirkungsweise der bereits früh in der Entwicklung von HIV/SIV-Impfstoffkandidaten molekularbiologisch hergestellten Deletionsmutante als auch die Methoden zur Konstruktion von neuartigen Impfstoffen.

Als erstes Projekt soll durch molekularbiologische Methoden zwei SIV mac-Deletionsmutanten erzeugt werden, die für eine weiterführende Rhesusaffen-Studie benötigt werden. In dieser Arbeitsgruppe wurde bereits 1996 am Rhesusaffen/SIV Modell der durch *nef*-Deletionsmutanten induzierte Schutz vor Belastung durch Wildtyp-Viren gezeigt. Um genauere Untersuchungen der Mechanismen zu erlauben, soll in einem SIV/HIV Hybrid-Genom (SHIV) Deletionen im *nef*-Gen eingeführt werden. Das benutzte SHIV trägt im SIV-Genom die aus HIV-1 stammende Reverse Transkriptase, welche gegenüber dem SIV-Wildtyp sensitiv für Non-Nukleosid-Analoga-Inhibitoren ist. Die in diesem RTSHIV einzufügenden Deletionen sollen den bereits früher verwendeten SIV BK28 Mutanten entsprechen. Die Produktion von infektiösen Viren aus  $\Delta$ *nef*-RTSHIV Moleklarklonen, die Stabilität der Deletion sowie die Sensitivität gegenüber dem Inhibitor soll *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden.

Das zweite Projekt dieser Doktorarbeit ergab sich aus den Kontakten des Robert Koch-Institutes zu Wissenschaftlern aus Nigeria. Basierend auf primären Isolaten des HIV-1 A/G-rekombinaten Subtyps IbNG (neuere Bezeichnung CRF02\_AG) sollen die Techniken zur Herstellung eines HIV-1 Subtyp spezifischen, genetischen Impfstoff in Form von "nackter DNA" etabliert werden. Dazu sollen einzelne Gene eines IbNG-typischen Isolates ausgewählt und in einen zur Verfügung gestellten Expressions- oder Immunisierungsvektor kloniert werden. Um eine entsprechende Expression der Immunogene zu gewährleisten, soll die Konstruktion von Codon-optimierten, synthetischen Genen am Beispiel dieser HIV-Gene durchgeführt werden. Die Effektivität der Codon-Optimierung sollte *in vitro* gezeigt werden.