

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung von AIDS und dessen Erreger HIV

Im Dezember 1981 berichtete eine Gruppe von Ärzten aus Los Angeles von vier Fällen einer bis dahin unbekanntem Immundefizienz (Gottlieb *et al.*, 1981). Bei den betroffenen Patienten handelte es sich um zuvor gesunde Männer mittleren Alters, welche alle mehrfach, schwer zu behandelnde Lungenentzündungen durch *Pneumocystis carinii* Infektionen aufwiesen. Zusätzlich traten extensive mukosale Candidiasen und schwere virale Infektionen (insbesondere durch humanes Cytomegalie Virus, hCMV) auf. Die Erreger dieser Infektionen sind in gesunden Menschen meist harmlos und entfalten vor allem in immungeschwächten Personen ihr pathogenes Potential. Ebenfalls auffällig war ein drastischer Abfall der CD4⁺ T-Zellzahlen in allen vier Patienten. Noch während der Veröffentlichung dieser Fälle wurden in der gleichen Klinik weitere Patienten mit ähnlichen Symptomen dokumentiert; auch aus anderen amerikanischen Städten häuften sich die Meldungen über das Auftreten dieser neuartigen Immundefizienz beim CDC (Center of Disease Control and Prevention) in Atlanta. Zunächst waren vor allem homosexuelle Männer betroffen, bald aber verbreitete sich die Krankheit auch in der heterosexuellen Bevölkerung. Es zeichnete sich immer deutlicher ab, dass diese neue Immunschwächekrankheit übertragbar war und durch einen noch unbekanntem Erreger verursacht wurde. Die daraus entstandene weltweite Bedrohung für die Menschheit führte zu einer beispiellosen, bis heute andauernden, intensiven Erforschung dieser Krankheit und ihres Erregers.

Nachdem sich Anfang 1983 die neue Krankheit mit dem Kürzel AIDS (Acquired Immuno-deficiency Syndrome) einen Namen gemacht hatte, konnte gegen Ende des gleichen Jahres der Erreger im Labor von Luc Montagnier am Pasteur Institut in Paris isoliert werden (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Es handelte sich um einen offenbar neuen Vertreter der humanen Retroviren. Andere Arbeitsgruppen bestätigten in der nachfolgenden Zeit die Entdeckung des Virus (Gallo *et al.*, 1984); (Popovic *et al.*, 1984); (Sarngadharan *et al.*, 1984), das zunächst als LAV (Lymphadenopathy Associated Virus) oder HTLV-III (humanes T-Zell Leukämie Virus III) bezeichnet, schließlich in HIV (Human Immunodeficiency Virus) umbenannt wurde. Mittlerweile gelang der Nachweis von HIV in afrikanischen Blutplasmaproben aus dem Jahr 1959 (Zhu *et al.*, 1998).

Die HIV Infektion beginnt mit einer akuten Phase, in deren Verlauf oft Symptome auftreten, die einer Grippe gleichen. Nach Abklingen dieser primären Symptome beginnt die, in der

Regel zwischen 8 und 12 Jahren dauernde, asymptomatische Latenzphase und mündet schließlich in die AIDS Erkrankung mit ihren typischen Symptomen wie der Zerstörung des lymphatischen Gewebes, Degenerationserscheinungen im Gehirn und Rückenmark sowie Gewichtsverlust und Diarrhöe (Wasting Syndrome), welche mit einem starken Abfall der Anzahl von CD4⁺ T-Lymphozyten einhergehen (Dalglish *et al.*, 1984; Lang *et al.*, 1989; Pantaleo *et al.*, 1993; Schellekens *et al.*, 1992). Die durch fortschreitende Immundefizienz hervorgerufenen opportunistischen Infektionen lassen sich immer weniger kontrollieren und führen in letzter Konsequenz zum Tod des Patienten (Fauci and Lane, 1984; Moss and Bacchetti, 1989; Stahl *et al.*, 1982; Taylor *et al.*, 1986).

In dem über zwei Jahrzehnte umspannenden Zeitraum seit der Entdeckung von HIV haben sich bis zum Jahr 2003 nach Schätzung der WHO etwa 68 Millionen Menschen mit dem Virus infiziert, von denen bereits 26 Millionen an AIDS gestorben sind. Trotz intensiver Aufklärungs- und Präventionskampagnen liegt die Rate der Neuinfektionen immer noch bei etwa fünf Millionen pro Jahr. Von den derzeit 42 Millionen Infizierten lebt der überwiegende Teil in Afrika, wo zunehmend junge Menschen und Kinder betroffen sind. Ebenfalls alarmierend ist die rasante Ausbreitung von HIV in Osteuropa, hier liegt die Anzahl an Neuinfizierten weit über dem globalen Durchschnitt. Breitet sich die Epidemie wie bisher weiter aus, können die bereits heute in Afrika spürbaren sozialen und ökonomischen Konsequenzen (UNAIDS/WHO, 2002) weltweit dramatische Auswirkungen haben.



Abb. 1.1: Globale HIV-1 Epidemie: Die Zahlen geben die geschätzte Anzahl der HIV Infizierten in der entsprechenden Region an (AIDS Epidemic Update, UNAIDS/WHO 2003)

Erste Erfolge in der Bekämpfung von AIDS konnten 1987 mit der Einführung von Azidothymidin (AZT) verbucht werden. Mit AZT, bei dem es sich um ein Nukleosid-analogon handelt, das die Reverse Transkriptase, ein virales Schlüsselenzym hemmt, stand die erste kausale Therapie zur Verfügung. Die Monotherapie mit Nukleosidanaloga wies jedoch starke Nebenwirkungen auf und brachte auf Grund der schnellen Resistenzbildung nur kurzfristige Erfolge (Aboulker and Swart, 1993; Fischl *et al.*, 1987; Volberding *et al.*, 1990)). Moderne Therapieansätze, bestehend aus einer Kombination mehrerer Inhibitoren, vor allem der Reversen Transkriptase und der viralen Protease, ermöglichen eine dauerhafte Reduzierung der Virusreplikation unter die Nachweisgrenze. Eine Unterbrechung hat jedoch in der Regel einen raschen Wiederanstieg der Plasma-Viruslast zur Folge. Die derzeit im Einsatz befindlichen Therapien können also effektiv den Ausbruch von AIDS verzögern oder womöglich sogar verhindern, sind aber dennoch nicht in der Lage, die Infektion zu klären. Die direkten Kosten für die Therapie eines Patienten werden aktuell mit etwa 24.000 Euro pro Jahr veranschlagt (Stoll *et al.*, 2002). Die entstehenden Kosten sind für die vor allem betroffenen armen Länder in Afrika nicht tragbar. Folglich hat die überwiegende Mehrheit der HIV Infizierten nur unzureichenden oder überhaupt keinen Zugang zu dieser Therapie.

Wenn also weder die antiretroviralen Therapien noch Anstrengungen des öffentlichen Gesundheitswesens zur Verminderung des Risikoverhaltens es bislang vermochten die Ausbreitung von HIV/AIDS zu kontrollieren, muss die Suche nach einem Impfstoff weiterhin voran getrieben werden.

1.2 Phylogenetik der Primaten-Lentiviren

Das humane Immundefizienz Virus (HIV) und dessen nahe Verwandte, die simianen Immundefizienz Viren (SIV), gehören zur Gattung der Lentiviren, welche wiederum in die Familie der Retroviridae eingeordnet sind. Gemeinsames Merkmal aller Retroviren ist die Fähigkeit der reversen Transkription, d.h. die Umschreibung von RNA in DNA. Die humanen Lentiviren bestehen aus den beiden Hauptgruppen oder Typen HIV-1 und HIV-2, deren Sequenzidentität etwa 55 % beträgt (Guyader *et al.*, 1987).

Bislang konnten in etwa 30 afrikanischen Primatenspezies simiane Immundefizienzviren (SIV) nachgewiesen werden (Peeters *et al.*, 2002). Davon infiziert die Mehrheit dieser Viren ihren Wirt in freier Wildbahn, die entsprechenden Primaten sind also Träger des Virus. Es wurde bisher in keiner dieser natürlich infizierten Primatenspezies ein durch SIV verursachter pathogener Effekt dokumentiert, d.h. sie scheinen durch eine SIV Infektion nicht an AIDS zu

erkranken. Dennoch beherbergen afrikanische Primaten ein gewaltiges Reservoir an Lentiviren, welche potentiell Zoonosen im Menschen erzeugen können.

Der folgende phylogenetische Baum zeigt die aktuellen Hauptgruppen der Primaten-Lentiviren:

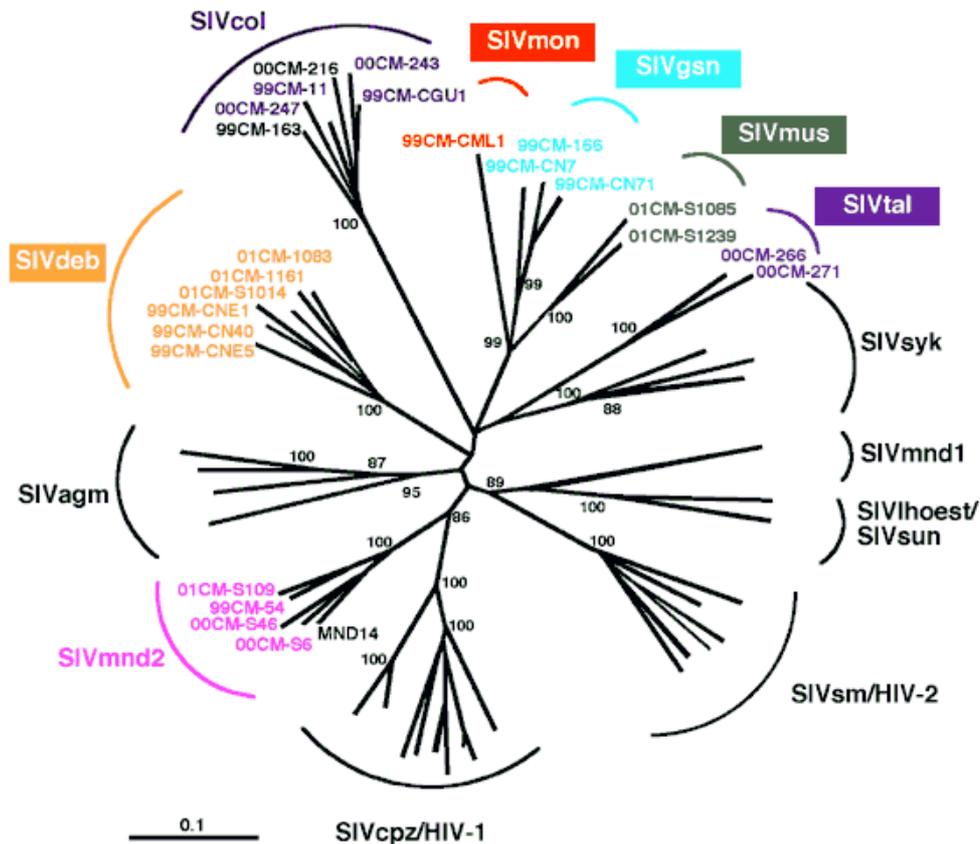


Abb. 1.2: Bisher bekannte entdeckte SIV Gruppen. Die jüngst bestimmten Gruppen sind farblich unterlegt. Der phylogenetische Baum beruht auf der Sequenzen eines 650 bp langen Fragmentes aus *pol* und der Anordnung anhand der neighbor joining Methode. Der dargestellte 0.1 Balken entspricht in der Länge einer Divergenz von 10 %. (Peeters *et al.*, 2002)

Die verschiedenen SIV Sequenzen einer Primatenart bilden Cluster, die für ihre Wirtsspezies spezifisch sind, d.h. die größte Sequenzidentität besteht jeweils zwischen den SIV Isolaten einer Wirtsspezies. Dies spricht für eine phylogenetisch lange Koevolution zwischen der jeweiligen SIV Subspezies und ihrer Primatenspezies.

Kommt es zu einer Kreuzspeziestransmission eines Primaten-Lentivirus auf einen neuen Träger, kann dieses Virus einen pathogenen Effekt auf ihn haben. Ist das Virus zudem noch auf andere Individuen der neuen Wirtspopulation übertragbar, kann eine Epidemie ausgelöst werden. So führt die experimentelle Infektion von asiatischen Rhesus- und Schweinsaffen mit

SIVsm zu einer übertragbaren Form der AIDS Erkrankung (Hirsch *et al.*, 1989; Letvin *et al.*, 1985).

Die beiden HIV Typen des Menschen sind ebenfalls durch Kreuzspeziestransmissionen entstanden. Während die Sequenzidentität von SIVcpz und HIV-1 dafür spricht, dass SIVcpz der Vorfahre des humanen Immundefizienz Virus Typ 1 ist und damit das Vorläufervirus von HIV-1 möglicherweise vom Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde, deutet analog die Ähnlichkeit von SIVsm und HIV-2 auf eine Übertragung von grauen Halsbandmangaben (natürlicher Wirt des SIVsm) auf den Menschen. Nach bisherigen Erkenntnissen ist der Schimpanse *Pan troglodytes troglodytes* der natürliche Wirt von SIVcpz. Das Virus könnte durch die Jagd auf Schimpansen und der Verarbeitung ihres Fleisches auf den Menschen übertragen worden sein (Gao *et al.*, 1999). Diese These muss allerdings noch durch weitere Isolationen von SIV aus in freier Wildbahn lebenden Schimpansen untermauert werden. Möglich wäre nämlich auch, dass *Pan troglodytes troglodytes* prinzipiell kein natürlicher Wirt von SIV ist, sondern lediglich einzelne Tiere dieser Art selbst durch eine Kreuzspeziestransmission infiziert wurden. Schimpansen jagen und verzehren selbst kleinere Affenspezies und können sich folglich mit SIV einer anderen Primatenart infizieren. Die Entstehung von HIV-1 im Menschen könnte somit auch durch Schimpansen als Zwischenwirt oder von einer bislang nicht identifizierten, von Menschen und Schimpansen gleichermaßen gejagten Wirtspezies verursacht worden sein.

Vieles spricht dafür, dass die Übertragung von SIV auf den Menschen durch direkten verletzungsbedingten oder mukosalen Kontakt mit infektiösem Affenblut geschehen ist (Gao *et al.*, 1999). Das Jagen, Schlachten und der Verzehr von rohem Fleisch verschiedener Affenarten mit unbekanntem Infektionsstatus ist in einigen Ländern Afrikas gängige Ernährungspraxis, stellt somit eine plausible Transmissionsroute dar. Der solchermaßen hergestellte Kontakt von Menschen mit infiziertem Blut grauer Halsbandmangaben und Schimpansen könnte zu den Zoonosen geführt haben.

Für die anschließende weltweite Ausbreitung von HIV-1 werden verschiedene Ursachen diskutiert. Vor allem der soziale, gesellschaftliche und ökonomische Wandel in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts wird als Fundament für die globale Ausbreitung von AIDS in Betracht gezogen (Perrin *et al.*, 2003). Die häufigsten Übertragungswege sind nach wie vor der ungeschützte Geschlechtsverkehr und die gemeinsame Benutzung HIV-kontaminierter Nadeln bei Drogenabhängigen.

Als Grundlage für die systematische Nomenklatur der HIV-1 und HIV-2 Isolate dient die Sequenzanalyse des *env* Gens, welches für das virale Hüllprotein kodiert. Demnach werden bei HIV-1 die drei Gruppen M (main), O (outlier) und N (non-main, non-outlier) unterschieden. Die Gruppe M, deren Isolate die globale Epidemie dominieren, wird nochmals in die Subtypen A bis K und einige rekombinante Formen dieser Subtypen unterteilt. In Europa und den USA ist Subtyp B prävalent, während Subtyp E in Afrika und Subtyp C auf dem indischen Subkontinent überwiegt. HIV-2 ist überwiegend in Westafrika endemisch und wird direkt in die fünf Subtypen A bis E unterteilt (Myers, 1994). Die Existenz der drei Gruppen M, N und O bei HIV-1 legt mindestens drei unabhängige Übertragungsereignisse von SIV auf den Menschen nahe, bei HIV-2 sind dies in Abhängigkeit von den Subtypen mindestens vier (Hahn *et al.*, 2000).

Zu Beginn der neunziger Jahre wurden erstmals Varianten von HIV-1 isoliert, deren Genom aus Teilen mehrerer Subtypen zusammengesetzt ist, bei denen es sich also um rekombinante Formen der zuvor definierten Subtypen handelt. Wenn es zu zwei, in kurzem Abstand erfolgten Infektionen mit Viren verschiedener Subtypen kommt, kann durch die sogenannte copy choice Rekombination während der reversen Transkription eine rekombinante Form des Virus (CRF: Circulating Recombinant Form) entstehen (Negroni and Buc, 2000).

1.3 Struktur und Morphologie

Die infektiösen Partikel von HIV bzw. SIV haben einen für Retroviren typischen Aufbau mit einem Durchmesser von etwa 110 nm. Das RNA Genom wird von einem konischen Capsid eingeschlossen, welches seinerseits von einer Hüllmembran umgeben ist, die sich von der Cytoplasmamembran der Wirtszelle ableitet. Mit ihr sind die viralen Glykoproteine assoziiert, von denen eines als transmembranes Glykoprotein (gp41) in der Hüllmembran verankert ist, während das sogenannte externe Glykoprotein (gp120) nicht kovalent mit dem darunter liegenden transmembranen Protein verbunden ist. Diese Heterodimere bilden in der Virushülle vermutlich Homotrimere (Lu *et al.*, 1995) und vermitteln so bei der Infektion einer Zelle die Kontaktaufnahme mit ihrem zellulären Rezeptor sowie die anschließende Fusion der viralen und zellulären Membran.

An die Innenseite der viralen Membran sind die Matrixproteine (p17) angelagert, die über Myristinsäurereste mit der Membran verbunden sind. Bei den Lentiviren liegen sie als Trimere vor und bilden miteinander eine netzähnliche Proteinschicht mit ikosaedrischer Struktur aus. Im Partikelinneren findet man das Viruscapsid oder Core, das bei Lentiviren

zentral gelagert ist und konische Form aufweist. Es besteht aus einem Capsidprotein (p24 bei HIV-1, p27 bei SIVmac) und umschließt das virale Genom, das innerhalb des Cores mit weiteren Strukturproteinen, den Nucleocapsidproteinen komplexiert ist. Außerdem finden sich dort noch Moleküle der Reversen Transkriptase, der Integrase und einer viralen Protease (Gelderblom, 1991).

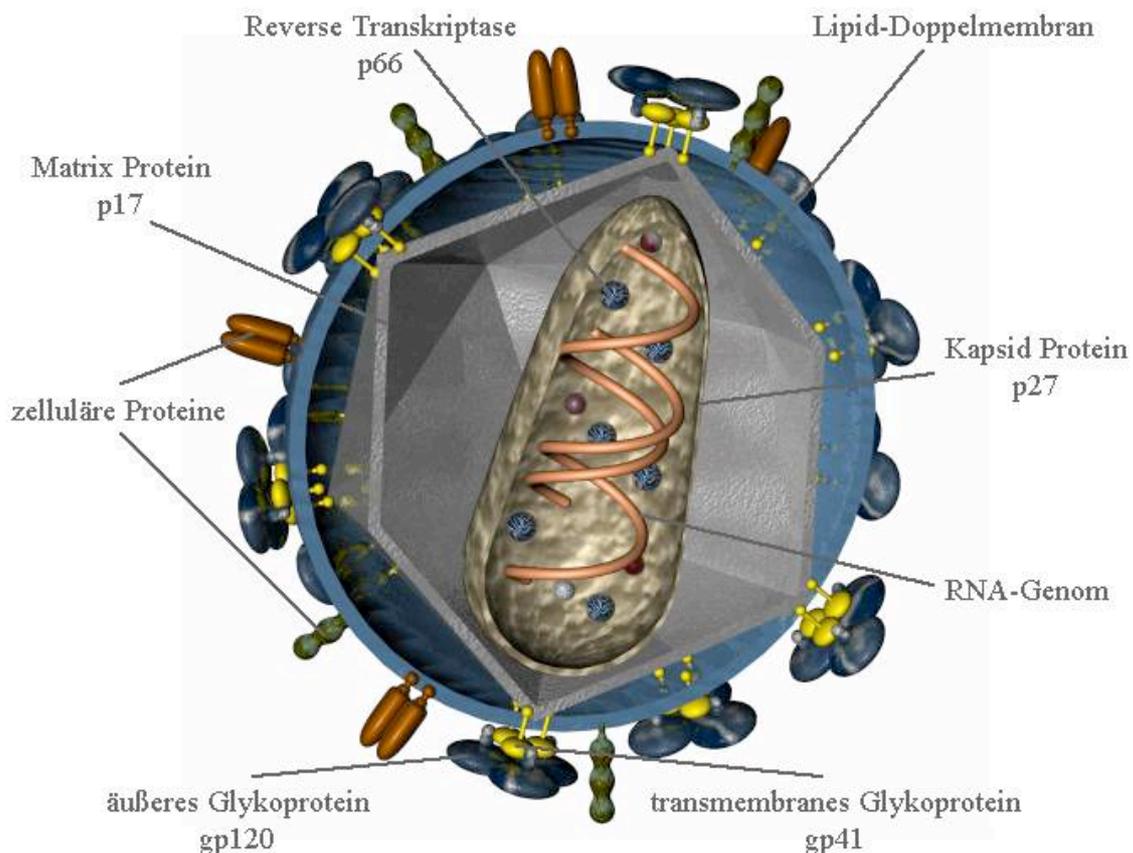


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines SIV Partikels (von Dr. S. Norley, RKI)

Das Genom von Lentiviren besteht aus zwei identischen, jeweils etwa 9,7 kb großen RNA Einzelsträngen, die weder nicht-kovalent noch über Basenpaarungen assoziiert sind (Abb. 1.4). Beide RNA Moleküle weisen die typischen Merkmale einer eukaryontischen mRNA auf, d.h. einen 7-Methylguanin-Rest am 5'-Ende sowie ein polyadenyliertes 3'-Ende. Dementsprechend weisen beide RNA Moleküle eine positive Polarität auf.

In den äußeren Regionen der viralen RNA finden sich zahlreiche regulatorische Bereiche, die für die Integration der viralen Erbinformation in das Genom der infizierten Zelle und die Regulation der Transkription nach der Integration zuständig sind. Jede virale mRNA ist mit

einer aus der vorherigen Wirtszelle stammenden tRNA versehen, die über die Bindung an komplementäre Basen des RNA Moleküls als Primer für die reverse Transkription fungiert.

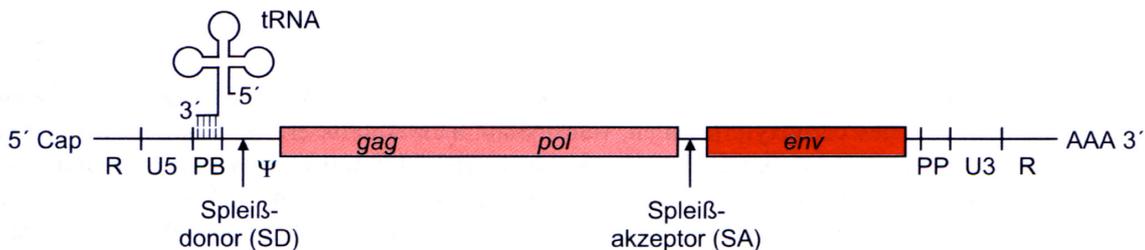


Abb. 1.4: RNA Genom eines Lentivirus (aus (Modrow and Falke, 1997))

Das Genom der Lentiviren der Primaten enthält wie alle Retroviren die drei Gene *gag*, *pol* und *env*. *Gag* (Engl.: group specific antigen) kodiert für ein Vorläuferprotein, das durch die virale Protease während der Virusmorphogenese in die inneren Nucleocapsidproteine, das Capsidprotein p27 und das Matrixprotein p17 gespalten wird. Das *pol* Gen (Engl.: polymerase) enthält die Information zur Synthese der Reversen Transkriptase, der Integrase und einer Protease, die ebenfalls zunächst gemeinsam als Polypeptid translatiert und anschließend von der Protease gespalten werden. Das *env* Gen (Engl.: Envelope) kodiert für die mit der Virushülle assoziierten Glykoproteine gp41 und gp120, die erst im Laufe der Knospung aus der Wirtszelle durch proteolytische Spaltung aus dem Vorläuferprotein gp160 hervorgehen.

Die Familie der Lentiviren weist die essentiellen regulatorischen Gene *tat* und *rev* auf, die *in trans* an der Regulation der RNA Transkription, des alternativen Spleißens und am Nucleus-export der viralen mRNA beteiligt sind. Primaten-Lentiviren besitzen vier weitere akzessorische Gene: *Nef*, *vif*, *vpr* und *vpu* bei HIV-1, während letzteres bei HIV-2 und SIV durch *vpx* ersetzt ist. Die von diesen akzessorischen Genen kodierten Proteine sind für die Replikation *in vitro* nicht notwendig, nehmen *in vivo* aber Einfluss auf die Replikationsfähigkeit und Pathogenität (Greene, 1991; Haseltine, 1991). Der zum Teil vielfältige Phänotyp dieser akzessorischen Proteine ist noch immer Gegenstand aktueller Forschung; eine Zusammenfassung der bisher untersuchten Funktionen findet sich in Tab.1.1.

Akzessorisches Protein	Merkmale	Literatur
Vif	Induziert die Degradation von APOBEC3G, einem antiviralen Faktor.	(Marin <i>et al.</i> , 2003)
Vpr	Ist am nucleären Import des Präintegrationskomplexes beteiligt; arretiert bei Überexpression den Zellzyklus in der G ₂ -Phase; induziert so auch Apoptose.	(Popov <i>et al.</i> , 1998) (Sherman <i>et al.</i> , 2003)
Vpu (nur HIV-1)	Phosphoryliert, mit der Membran des ER assoziiert; verhindert die intrazelluläre Komplexbildung zwischen gp160 und CD4 Rezeptoren.	(Bour and Strebel, 2003)
Nef	Verringert die Oberflächenmengen von CD4 und MHC-I Molekülen; vermittelt Zellaktivierung; verbessert die Infektiosität der Viruspartikel; Induktion von FasL; Schutz vor Apoptose.	(Arora <i>et al.</i> , 2002) (Geleziunas <i>et al.</i> , 2001)

Tab. 1.1: Funktionen der akzessorischen HIV/SIV Proteine

1.4 Lebenszyklus

Die Adsorption von HIV/SIV an die Zielzelle wird durch das externe Glykoprotein gp120 vermittelt, das mit dem zellulären Oberflächenrezeptor CD4 wechselwirkt. In der frühen Phase der systemischen Infektion repliziert das Virus denn auch hauptsächlich in aktivierten CD4⁺ T-Zellen des darmassoziierten lymphatischen Gewebes (Veazey *et al.*, 2000). Es können im Verlauf der Infektion aber auch andere T-Zellen sowie Makrophagen und Mirkogliazellen infiziert werden (Weiss, 2002).

Zusätzlich zum primären Rezeptor CD4 dienen bestimmte Chemokinrezeptoren der Familie der CC- bzw. CXC-Rezeptoren als essentielle Korezeptoren für HIV und SIV (Alkhatib *et al.*, 1996; Feng *et al.*, 1996), die ebenfalls einen Einfluss auf deren Tropismus haben. Insbesondere in der frühen Phase der HIV Infektion existieren vorwiegend den CCR5-rezeptorbenutzende (CCR5-trope) Viren, die in der späteren, symptomatischen Phase der Infektion ihren Phänotyp zu CXCR4-rezeptorbenutzenden Virusstämmen (CXCR4-trope) hin verändern können. Es werden dann bevorzugt Zielzellen infiziert, die den Korezeptor CXCR4 (Fusin) exprimieren. Dieser Wechsel der Korezeptorbenutzung ist allerdings abhängig vom vorliegenden Subtyp nicht immer zu beobachten. Die physiologischen Liganden des CCR5

Rezeptoren sind die β -Chemokine RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β ; sie werden von CD8+ T-Lymphozyten sezerniert und sind *in vitro* fähig die Replikation von HIV zu inhibieren (Cocchi *et al.*, 1995). Weitere Chemokin Rezeptoren der CCR- und CXCR-Familien wurden bislang als Korezeptoren für die HIV Infektion identifiziert (Choe *et al.*, 1996; Doranz *et al.*, 1996).

Nachdem das Capsid durch die rezeptorvermittelte Fusion der viralen und zellulären Membran ins Zellinnere gelangt ist, wird es dort entpackt und die virale RNA mit den zur reversen Transkription und Integration notwendigen Enzymen 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), als Zwischenprodukt entsteht ein DNA/RNA Hybrid. Die Kopiergenauigkeit der Reversen Transkriptase ist im Vergleich zu DNA Polymerasen eher gering; dies resultiert in einer relativ hohen Fehlerrate. Die Ursache hierfür liegt im Fehlen einer 3'-5' Exonucleaseaktivität, die das sogenannte Korrekturlesen (Engl.: proof-reading) beim Einbau von Nucleotiden durchführt. Die Reverse Transkriptase trägt so zur hohen Variabilität von HIV bei (Preston *et al.*, 1988). Der RNA Strang des DNA/RNA Hybrids wird anschließend durch die RNaseH Aktivität der RT hydrolysiert und nachfolgend zu einem DNA Doppelstrang komplementiert. Nach Transport der DNA Doppelhelix in den Zellkern erfolgt deren unspezifische Integration in das Wirtsgenom. Für diesen Vorgang zeichnet sich die virale Integrase verantwortlich.

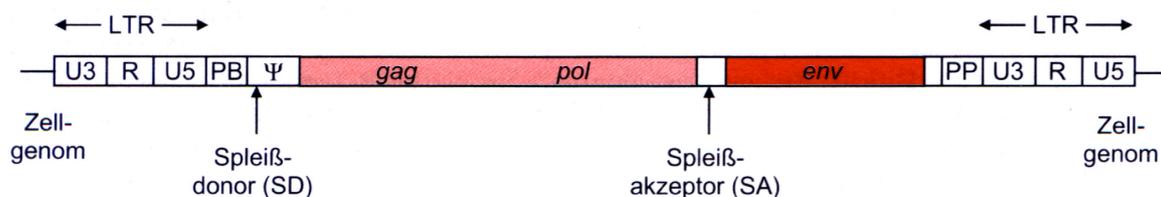


Abb. 1.5: Proviraies Genom der Lentiviren (aus (Modrow and Falke, 1997))

Das ins Wirtsgenom integrierte virale Genom wird Provirus genannt, es wird im folgenden bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. An den Flanken des Provirus liegen die sogenannten LTR (Long Terminal Repeat), die bestehend aus den Regionen U3, R und U5 an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen. In der 5' LTR ist der Promotor lokalisiert unter dessen Kontrolle sich alle Gene des proviralen Genoms befinden. Darüber hinaus können in der U3 Region dieser LTR zahlreiche zelluläre Faktoren binden, welche die Transkription des proviralen Genoms durch die zelluläre RNA Polymerase II ermöglichen.

Unter diesen gehören die Transkriptionsfaktoren NF κ B - dieser wird nach der Aktivierung der infizierten T-Lymphozyten durch das Immunsystem in seine aktive Form überführt - und SP1 zu den für die Transkription wichtigen zellulären Proteinen. Ob das Provirus transkribiert wird oder latent vorliegt hängt deshalb vom Aktivierungszustand der Zelle ab (Stevenson *et al.*, 1990). Aus der zunächst transkribierten 9 kb großen mRNA können durch differentielles Spleißen über 30 verschiedene RNA Spezies gebildet werden (Luukkonen *et al.*, 1995), die unter anderem für die *in vivo* essentiellen regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef kodieren. Tat und Rev selbst regulieren die Bildung der Vollängen RNA und einfach gespleißter RNA. Die von der zellulären RNA Polymerase II synthetisierte Vollängen RNA findet entweder als genomische RNA für die neu entstehenden Viruspartikel oder als mRNA zur Synthese der Gag- und Pol-Vorläuferproteine Verwendung. Da die RNA Polymerase II ebenso wie die Reverse Transkriptase über keinen Korrekturmechanismus verfügt, trägt auch sie in einem hohen Maße zur Variabilität des HIV Genoms bei. Einfach gespleißte, virale mRNA dient ausschließlich der Translation der Gene *vif*, *vpr*, *vpu* und *env*. Mit Hilfe der viralen Protease werden die viralen Gag- und Pol-Vorläuferproteine in die einzelnen funktionellen Proteine gespalten. Die Verpackung des Virusgenoms und die Selbstaggregation der Strukturproteine erfolgt an der Zellmembran. Bei der anschließenden Knospung verlassen die gebildeten Viruscapside durch Exozytose die Zelle und umhüllen sich dabei mit einer der Wirtszelle entstammenden Lipidmembran in die, neben zellulären, hauptsächlich virale Hüllproteine eingebettet sind.

1.5 HIV und Immunantwort

1.5.1 Humorale Immunantwort

Die Bildung HIV-spezifischer Antikörper (Serokonversion) erfolgt in den ersten drei Monaten nach der Infektion, häufig schon nach zwei Wochen. In dieser akuten Phase der Infektion richten sich die Antikörper hauptsächlich gegen Epitope der Strukturproteine Env und Gag. Unter den Antikörpern gegen Env finden sich auch solche, die HIV-neutralisierend wirken (Moore and Nara, 1991; Robert-Guroff *et al.*, 1985; Weiss *et al.*, 1985). Dabei richten sich die neutralisierenden Antikörper gegen drei Bereiche der Hüllproteine: Den hypervariablen Teil der V3 Schleife des gp120, die CD4 Bindungsstelle im gp120 und den zentralen Bereich des gp41. Der überwiegende Teil der neutralisierenden Antikörper bindet an die V3 Schleife (Vogel *et al.*, 1994), da aber HIV auf Grund seines Replikationsmechanismus eine äußerst hohe Mutationsrate besitzt (Preston *et al.*, 1988; Roberts *et al.*, 1988) und die V3 Schleife hypervariabel ist (Javaherian *et al.*, 1989; Palker *et al.*, 1988; Rusche *et al.*, 1988), können

mutierte Viren der Neutralisation durch Antikörper, die gegen die V3 Schleife gerichtet sind, im Laufe der Infektion immer wieder entkommen. Solche Viren 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 auch der gegenteilige Effekt, nämlich eine infektionsverstärkende Wirkung gezeigt werden (Fust *et al.*, 1995). Dieses Phänomen ist für viele retrovirale Infektionen von Tieren wie Pferden, Katzen und Affen beschrieben (Mitchell *et al.*, 1995; Montelaro *et al.*, 1996; Siebelink *et al.*, 1995).

Die Komplementaktivierung und anschließende Virolyse, die bei anderen Viren beschrieben wurde (Sissons and Oldstone, 1980), konnte bei HIV nur in geringem Umfang beobachtet werden (Spear *et al.*, 1990; Stoiber *et al.*, 1997; Sullivan *et al.*, 1996). Eine Erklärung für diese Resistenz bietet die Tatsache, dass sich wegen ihres Ursprungs in der viralen Hüllmembran auch zelluläre Membranproteine finden von denen einige wie beispielsweise CD46, CD55 und CD59 die Komplementkaskade hemmen (Marschang *et al.*, 1995; Montefiori *et al.*, 1994; Saifuddin *et al.*, 1995).

Eine andere Form der humoral vermittelten Immunabwehr, die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (Engl.: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, ADCC), ist *in vitro* auch für HIV Infektionen gezeigt worden (Ljunggren *et al.*, 1989; Norley *et al.*, 1990). ADCC basiert auf der spezifischen Bindung von Antikörpern an ihre Epitope auf der Oberfläche von infizierten Zellen und anschließender Abtötung der Zielzellen durch spezialisierte Killerzellen, welche die Fc Region der gebundenen Antikörper erkennen (Yagita *et al.*, 1992). Ob dieser Mechanismus bei HIV Infektionen *in vivo* eine ähnlich große Bedeutung wie für andere virale Erkrankungen (z.B. Masern und Herpes) besitzt, ist noch nicht geklärt.

1.5.2 Zelluläre Immunantwort

Die CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (Engl.: Cytotoxic T-Lymphocyte, CTL) erkennen virusinfizierte Zellen, töten diese und tragen so entscheidend zur Begrenzung der Infektion im Organismus bei (Waterhouse and Trapani, 2002). Sie lagern sich dabei über ihren T-Zellrezeptorkomplex und den CD8 Rezeptor an MHC-Klasse-I Proteine der infizierten Zielzelle an. Diese MHC-Klasse-I Moleküle präsentieren kurze, acht bis zwölf Aminosäuren lange Peptide, die unter anderem den viralen Proteinen entstammen. Erkennt ein für das präsentierte Fremdpeptid spezifischer CTL diesen MHC-Peptid Komplex (Braciale *et al.*, 1987), bildet er eine immunologische Synapse zur Zielzelle aus und leitet anschließend deren Zerstörung ein (Bossi *et al.*, 2002).

HIV-spezifische CTLs treten bereits etwa eine Woche nach der Infektion auf (Reimann *et al.*,

1994; Yasutomi *et al.*, 1993), wobei der Anstieg dieser spezifischen CTL Antwort mit einem starken Abfall der Viruslast korreliert (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). Mittlerweile sind über 400 Epitope von HIV mit den entsprechenden Haplotypen bekannt; sie entstammen sämtlichen HIV Proteinen, hauptsächlich aber Gag, Pol, Env und Nef (Riviere *et al.*, 1994). Auch hier konnten im Verlauf von Infektionen HIV Fluchtmutanten isoliert werden, deren mutiertes Epitop entweder nicht mehr vom T-Zellrezeptorkomplex erkannt oder erst gar nicht mehr von dem MHC-Klasse-I Protein gebunden wird (Jamieson *et al.*, 2003). Da aber auch Epitope existieren, die in stark konservierten Bereichen der Virusproteine liegen (Norley *et al.*, 1993), ist immer noch unklar, weshalb eine vollständige Eliminierung der HIV-produzierenden Zellen durch die CTLs nicht erreicht wird. In Frage kommen hierfür die durch Nef vermittelte verringerte Expression von MHC-Klasse-I Molekülen, der möglicherweise eingeschränkte Zugang von CTLs zum Ort der Virusreplikation und eventuell das Unvermögen von CTLs frisch infizierte Zellen zu töten, bevor diese neue Viren produzieren. Es mehren sich außerdem Hinweise, dass HIV-spezifische CTLs gegenüber CTLs anderer viraler Spezifität in ihrer Entwicklung und Aktivität eingeschränkt sind (Appay *et al.*, 2000). Nach Eintritt in die symptomatische Phase der HIV Infektion sinkt die CTL Antwort ab und verschwindet schließlich (Carmichael *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2002).

Einen guten Beleg für die Beteiligung von CTLs an der Kontrolle einer HIV Infektion liefert eine Studie, in der Rhesusaffen vor einer SIVmac Infektion die CD8⁺ Zellen entfernt wurden (Schmitz *et al.*, 1999). Während die unbehandelten Kontrolltiere ihre Viruslast nach dem initialen Spitzenanstieg senken konnten, stellte sich die Viruslast in den CD8-depletierten auf einen deutlich höheren Wert ein. Ein weiterer Hinweis könnte sich aus Untersuchungen von Personen ergeben, die trotz mehrfachen Virusexpositionen anscheinend uninfiziert bleiben. Diese sogenannten HEPS (Engl.: Highly Exposed Persistently Seronegative) zeichnen sich durch eine im Serum fehlende Antikörperantwort gegen HIV und eine mit Standardmethoden oftmals nicht nachweisbare Virämie aus (Langlade-Demoyen *et al.*, 1994; Pinto *et al.*, 1995; Rowland-Jones *et al.*, 1995). In einigen dieser HEPS konnten mukosale Antikörper und spezifische CTLs gegen HIV nachgewiesen werden (Clerici *et al.*, 2002; Devito *et al.*, 2000; Rowland-Jones *et al.*, 2001). Die Existenz spezifischer CTLs kann allerdings nur schwerlich ohne eine zuvor erfolgte Infektion dieser Personen erklärt werden. In solchen Fällen könnte die CTL Antwort tatsächlich dazu geführt haben, dass die HIV Infektion geklärt oder zumindest die Replikationsrate des Virus sehr stark reduziert wurde. Mittlerweile gelang der

Nachweis von HIV in äußerst geringen Mengen durch hochsensitive Nachweisverfahren in einigen HEPS (Zhu *et al.*, 2003).

Zytotoxische T-Lymphozyten produzieren darüber hinaus die Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β , und RANTES, deren Freisetzung nicht MHC-restringiert ist. Alle drei hemmen die Replikation von HIV-1 *in vitro* durch kompetitive Hemmung seines Korezeptors CCR5. Ein weiteres Chemokin, IL-16 inhibiert ebenfalls die HIV-1 Replikation (Baier *et al.*, 1995) auf eine bislang nicht eindeutig geklärte Weise. In verschiedenen Studien wurden relativ hohe Konzentrationen dieser Faktoren bei HIV-1 infizierten Langzeitüberlebenden, sogenannten LTNPs (Engl.: Long Term Non Progressors) gemessen (Brinchmann *et al.*, 1990). Es ist davon auszugehen, dass noch weitere Mechanismen bzw. Faktoren an der Inhibition der HIV Replikation beteiligt sind (Clerici *et al.*, 1996; Greenberg *et al.*, 1997). CTLs sezernieren auch das Zytokin IFN γ , das anders als die zuvor genannten Chemokine antigenspezifisch freigesetzt wird (Su, 2003). Zwar kann dem IFN γ keine direkte HIV-inhibierende Aktivität zugeschrieben werden, seine antigenspezifische Sezernierung macht es jedoch zu einem hervorragenden Kandidaten für Methoden, die HIV-spezifische CTLs nachweisen.

1.6 Pathogenese der HIV/SIV Infektion

Eine HIV Infektion wird in drei Phasen eingeteilt, die erste (akute Phase) dauert zwischen zwei und sechs Wochen, in denen es in etwa 50 % der Fälle zu grippeähnlichen Erscheinungen kommt (Cooper *et al.*, 1985). Das Virus kann sich in wenigen Tagen vom Infektionsort in die lymphatischen Gewebe ausbreiten (Pantaleo *et al.*, 1998) und entsprechend schnell in den Lymphknoten nachgewiesen werden. Die Virusbelastung im Blut erreicht nach etwa zwei Wochen Spitzenwerte, die zellassoziierte Viruslast liegt dann bei 10^2 bis 10^4 infizierten Zellen pro Millionen PBMC, die Plasma-Viruslast bei 10^5 bis 10^8 Viruspartikeln pro Milliliter Plasma. Dadurch scheint es zeitgleich zu einem deutlichen Abfall der Anzahl von CD4⁺ T-Zellen zu kommen, die nach der akuten Phase wieder leicht ansteigt (Clark *et al.*, 1991; Graziosi and Pantaleo, 1998; Reimann *et al.*, 1994).

Mit dem Einsetzen der antiviralen Immunantwort, vor allem der Bildung HIV-spezifischer CTLs, beginnt der Übergang in die asymptomatische Phase, die Virusbelastung sinkt wieder und bleibt oft über Jahre hinweg auf einem niedrigen Niveau von 10^3 bis 10^5 Partikeln pro Milliliter Plasma (Mellors *et al.*, 1996). Nach heutigem Kenntnisstand bildet die Anzahl der Viren im Plasma zu Beginn der asymptomatischen Phase den besten quantitativen Indikator für den weiteren Verlauf der Krankheit (Katzenstein *et al.*, 1997; Mellors *et al.*, 1996; O'Brien *et al.*, 1996). Im Gegensatz zum peripheren Blut bleibt die Viruslast in den lymphatischen

Organen auch während der asymptomatischen Phase hoch, steigt sogar stetig an (Embretson *et al.*, 1993; Pantaleo *et al.*, 1993).

Die Infektion mündet nach durchschnittlich acht bis zehn Jahren in die symptomatische Phase, mit der sich die Krankheit AIDS manifestiert. 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 kennzeichnet sich durch einen starken Anstieg der infektiösen Viren im Plasma und einen dramatischen Abfall der CD4 Zellzahl weit unter 200 Zellen pro Mikroliter Blut. In den Lymphknoten wird die funktionelle und morphologische Struktur des Gewebes zerstört und dadurch die Effektivität des Immunsystems weiter beeinträchtigt, die Antikörpertiter und die Zahl der HIV-spezifischen CTLs sinken.

Der kausale Zusammenhang dieser Symptome konnte bislang nicht genau geklärt werden, einzig der Zusammenhang zwischen viraler Replikation und der Depletion der CD4⁺ T-Lymphozyten ist relativ gut belegt (Ho *et al.*, 1995). Auch ist noch immer unklar, ob der auftretende Schaden an der T-Zellpopulation durch direktes Abtöten der infizierten Zellen entsteht oder eine indirekte Folge der viralen Replikation ist. Ein zytopathischer Effekt des Virus wurde bislang für sein Hüllprotein *in vitro* nachgewiesen (Lifson *et al.*, 1986; Sodroski *et al.*, 1986). Dabei scheint die Fusionsfähigkeit der unterschiedlichen Env Proteine mit der viralen Zytogenität zu korrelieren (Etemad-Moghadam *et al.*, 2001; LaBonte *et al.*, 2000). Andere Studien legen einen apoptosebedingten kollateralen Zellschaden nahe (Meyaard *et al.*, 1992), (Finkel *et al.*, 1995). Die Apoptose von uninfizierten Zellen wird möglicherweise durch die erhöhte Expression von Fas Ligand (FasL) auf der Oberfläche von HIV-1 infizierten Zellen induziert, wobei das virale Nef hierbei eine Schlüsselrolle spielen könnte, da es die FasL Expression induziert und gleichzeitig die infizierte Zelle vor demselben apoptotischen Signal schützt (Geleziunas *et al.*, 2001). Über die Apoptose hinaus mehren sich die Anzeichen, dass eine durch die Infektion ausgelöste, persistierende Hyperaktivierung des Immunsystems zu den beobachteten Schäden führt. Dieses Modell lässt die Vermutung zu, dass die infektionsbedingte Aktivierung des Immunsystems die treibende Kraft sowohl hinter der Virusreplikation als auch der allmählichen Depletion ruhender CD4⁺ T-Zellen ist und durch letzteres die Krankheitsprogression verursacht (Grossman *et al.*, 2002). Obwohl noch nicht geklärt ist wie dieser Aktivierungszustand des Immunsystems in einer HIV Infektion erreicht wird, kann der Anteil dieser Hyperaktivierung an der Pathogenese möglicherweise durch Untersuchung der Interaktion von SIV mit seinen natürlichen Wirten aufgeklärt werden. SIV ist in seinen natürlichen Wirten anscheinend apathogen, obwohl die

Virämie vergleichbare Ausmaße wie bei einer HIV-1 Infektion im Menschen erreicht (Holzammer *et al.*, 2001; Rey-Cuille *et al.*, 1998). Die apathogene SIV Infektion von grauen Halsbandmangaben und Afrikanischen Grünen Meerkatzen zeigt keine übersteigerte Immunaktivierung, welche charakteristisch für die pathogenen lentiviralen Infektionen in Primaten ist (Silvestri *et al.*, 2003).

Durch die stete Schwächung des Immunsystems treten bei den Patienten Krankheiten mit opportunistischen Pathogenen auf, die normalerweise apathogen sind. Häufige Vertreter sind beispielsweise *Pneumocystis carinii* Pneumoniae (PCP), *Candida albicans* Infektionen des Mund-, Rachen- und Bronchialraumes, Tuberkulose sowie *Herpes zoster* und humanes Cytomegalievirus (Levy, 1993). Darüber hinaus kann es zu einer aggressiven Form des Kaposi Sarkoms oder B-Zell Lymphomen kommen. Außerdem können durch die virale Infektion von Mikrogliazellen im Gehirn neurodegenerative Erscheinungen auftreten.

In letzter Konsequenz führen diese Erkrankungen, die vom stark geschwächten Immunsystem nicht mehr kontrolliert werden, zum Tod des Patienten.

1.7. Impfstoffstrategie gegen HIV

1.7.1 Das Modellsystem SIV im Tier

Ein enormes Hindernis für eine AIDS Vakzine bildet der Umstand, dass es bislang nicht gelungen ist, eine Korrelation zwischen der Immunantwort gegen HIV und dem Schutz vor einer Infektion zu finden (Engl.: correlate of immunity). Die Effektivität und Immunogenität von Impfstoffkandidaten sollte deshalb intensiv im Tiermodell erforscht werden. Die experimentelle Infektion von Rhesusmakaken mit SIVmac ist das wohl am weitesten verbreitete Tiermodell zur Erforschung von HIV/AIDS. Die humanen und simianen Immundefizienzviren besitzen eine ähnliche Genomorganisation und Morphologie sowie einen vergleichbaren Zelltropismus. Als Primärrezeptor fungiert in beiden Fällen das CD4 Molekül (Clapham *et al.*, 1991) und auch der Korezeptor CCR5 wird von Stämmen beider Immundefizienzviren benutzt (Alkhatib *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996).

Das von SIVmac verursachte Krankheitsbild in infizierten Rhesusaffen ist mit demjenigen HIV-infizierter Menschen vergleichbar (Gardner *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 1994), der Verlauf ist jedoch im Tiermodell stark beschleunigt. In Rhesusaffen verursacht eine SIV Infektion nach sechs Monaten bis drei Jahren sogenanntes simianes AIDS (SAIDS) mit der

charakteristischen Depletion der CD4⁺ T-Zellen und den darauf folgenden opportunistischen Infektionen, die zum Tod der Tiere führen.

Bedauerlicherweise beschränkt die Verfügbarkeit von Einrichtungen und Ressourcen zur Haltung dieser Tiere unter den geeigneten Sicherheitsbedingungen in Europa stark die Anzahl und Größe solcher Studien. Die vorliegende Studie versucht diese Schwäche durch die Bildung eines vertikalen und horizontalen Netzwerkes aus europäischen Primatenzentren auszugleichen, um so besonders den Umfang der Studie stark auszuweiten.

1.7.2 Entwicklung von AIDS Impfstoffen

Auch über zwei Jahrzehnte nach Beginn der AIDS Epidemie konnte bislang trotz aufwendiger Forschung kein Impfstoff gegen HIV entwickelt werden, der die beiden wichtigsten Anforderungen an eine Vakzine erfüllt: Effektivität und Sicherheit.

In Hinblick auf die Effektivität wäre es erstrebenswert einen Impfstoff zu entwickeln, der eine sterile Immunität verleiht. Hierfür muss die induzierte Immunantwort sämtliche eingedrungene Viren eliminieren, es darf kein Reservoir in Form eines zellulär integrierten, viralen Genoms (Provirus) im Organismus verbleiben. Die Ergebnisse jahrzehntelanger, intensiver Bemühungen in dieser Richtung sind eher ernüchternd. Derzeit sind hauptsächlich Impfstoffkandidaten in der klinischen Erprobung, deren im Tiermodell erzeugte Immunantwort zwar die Replikation des Virus kontrollieren kann und so die Krankheitsprogression zumindest verlangsamt, es jedoch nicht vermag, die Infektion im Sinne einer sterilen Immunität zu klären.

Besonders bei einer Infektionskrankheit wie AIDS, die auf Grund der hohen Therapiekosten in den Entwicklungsländern die meisten Todesfälle verursacht, sollte ein Impfstoff auch logistischen Anforderungen genüge tun. Darunter fällt eine kostengünstige Produktion, geringe Ansprüche an die Lagerung und eine einfache Handhabung, um möglichst schnell in medizinisch unterversorgten Gebieten eingesetzt werden zu können.

Eine der ersten Strategien zur Entwicklung einer AIDS Vakzine beruhte auf der Herstellung von inaktivierten Viruspartikeln, die hauptsächlich eine humorale Immunantwort erzeugen. Diese für viele Impfstoffe bewährte Methode, den Erregers zu inaktivierten und als Immunogen zu verwenden, schien zunächst ein voller Erfolg zu sein, da sich der gewünschte Schutz bei immunisierten Rhesusmakaken vor einer SIV Infektion einstellte (Murphey-Corb *et al.*, 1989). Schnell kristallisierte sich jedoch heraus, dass die schützende Immunantwort ein Artefakt der Virusproduktion für den Impfstoff war, sie richtete sich nicht gegen die viralen

Bestandteile der Viruspartikel, sondern gegen humane Antigene in der Virushülle. Diese stammten aus den humanen Zelllinien, in welchen das Virus für den Impfstoff und die spätere Infektion der immunisierten Affen angezüchtet wurde (Stott, 1991). Wurden solche Tiere mit einem Virus infiziert, das nicht in einer humanen, sondern simianen Zelllinie gezüchtet wurde, konnte kein Impfschutz erreicht werden (Norley *et al.*, 1998). Der Schutz basiert also auf einer xenogenen Immunantwort und war damit für einen Impfstoff ungeeignet.

Die Stimulierung einer starken humoralen Immunantwort lässt sich auch durch aufgereinigte oder rekombinant hergestellte Proteine des Erregers erreichen. Da solche Immunogene *per se* nicht infektiös sind, erreichten die ersten auf dem Hüllprotein gp120 basierenden Impfstoffkandidaten sehr schnell Phase I und Phase II Studien (Klein, 2001). Bedauerlicherweise bewirkt die von solchen Immunogenen ausgelöste humorale Antwort kaum einen Infektionsschutz in den gängigen Tiermodellen, obwohl durchaus hohe Titer HIV-neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden können (Norley *et al.*, 1998). Die einzige Phase III Studie (AIDSVax, Thailand), mit einem auf gp120 Proteinen verschiedener HIV Subtypen basierenden Impfstoffkandidaten, kam zu dem enttäuschenden, jedoch nicht unerwarteten Ergebnis, dass Impflinge im Mittel keinen verbesserten Schutz gegenüber einer HIV Infektion besitzen. Die nächste Generation von antikörperinduzierenden Immunogenen wird bereits mit einer anderen Strategie entwickelt. Hierfür wird in Langzeitüberlebenden mit einer rigiden Kontrolle der Virusreplikation nach neutralisierenden Antikörpern gesucht. Einige dieser Antikörper sind in der Lage viele verschiedene Subtypen zu neutralisieren (Engl.: cross-clade specific) und die Resistenzbildung ihnen gegenüber ist gering. Diese Gruppe von Antikörpern hat ihre Schutzfähigkeit einzeln oder in Kombination durch passiven Transfer im Tiermodell schon unter Beweis gestellt (Ruprecht *et al.*, 2003). Wenn das Epitop eines solchen Antikörpers bekannt ist, wird versucht dieses so nachzubilden, dass es als Immunogen eingesetzt den gleichen neutralisierenden Antikörper induziert, welcher ursprünglich im Langzeitüberlebenden gefunden wurde (Check, 2003).

Eine andere, oft angewendete Immunisierungsmethode besteht in der Impfung mit einer lebenden, jedoch abgeschwächten (attenuierten) Form des Erregers. Diese Impfstoffe, die bereits gegen Viren wie Polio und Pocken entwickelt wurden, führen dem Immunsystem durch ihre Replikationsfähigkeit im Impfling Antigene auf verschiedenen Routen zu. So sollen sie eine sehr breite zelluläre und humorale Immunantwort induzieren. Die Verwendung attenuierter Retroviren als Impfstoffe wirft jedoch ein grundsätzliches Problem auf, da lebende Formen dieser Viren in das Genom ihrer Wirtszelle integrieren und so neben der Möglichkeit einer Insertionsmutagenese vor allem die Gefahr der Reversion des

persistierenden Provirus in die pathogene Wildtypform besteht. So können im SIV/Rhesusmakaken-Modell im *nef* Gen deletierte und so attenuierte SIV einen guten Schutz vor Infektion mit SIV vermitteln (Daniel *et al.*, 1992), doch erzeugen diese abgeschwächten Viren in neugeborenen Makaken simianes AIDS und auch adulte, zunächst geschützte Affen zeigen später durch das Impfvirus eine langsame Krankheitsprogression (Baba *et al.*, 1995; Baba *et al.*, 1999). In einer australischen Patientengruppe (Sydney Blood Bank Cohort) konnte eine natürliche Δ *nef* Mutante von HIV-1 gefunden werden, welche gleichfalls eine stark verzögerte Krankheitsprogression bedingt. Der Einsatz von attenuiertem HIV auf der Basis von *nef* Deletionen ist deshalb eher auszuschließen, weil ein solcher Impfstoff die an ihn gestellten Sicherheitskriterien womöglich nicht erfüllen würde.

Ein neuer Weg in der Impfstoffentwicklung wird mit der Entwicklung von rekombinanten Vektoren beschritten, die HIV-1 Proteine exprimieren. Der bekannteste Vertreter dieser neuen Impfstoffklasse ist die sogenannte DNA Vakzine, die lediglich aus einem Expressionsplasmid mit Sequenzen viraler Gene unter Kontrolle eines eukaryotischen Promotors besteht. Solche Impfstoffe haben unter logistischen Gesichtspunkten wie Haltbarkeit und Herstellungskosten große Vorteile. Sie sind darüber hinaus leicht zu applizieren und vermögen eine robuste zelluläre Immunantwort zu induzieren, da ihre viralen Gene in Zellen des Impflings expremiert und so die entsprechenden viralen Epitope, ähnlich einer Infektion der Zelle, über den endogenen MHC-Klasse-I Präsentationsweg dem Immunsystem dargestellt werden. So konnten im SIV/Rhesusaffen-Tiermodell durchgeführte DNA Immunisierungen neben einer humoralen auch eine starke spezifische CTL Antwort induzieren (Fuller *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1996; Shiver *et al.*, 1995; Yasutomi *et al.*, 1996). In 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 (ein aus SIV und HIV durch Rekombination erzeugtes 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 homologem SHIV geschützt (Letvin *et al.*, 1997). Durch die unmittelbare Aneinanderreihung der Sequenzen einzelner Epitope zu einem sogenannten Multiepitop-Strang werden die Immunogene der DNA Vakzine komprimiert, und darüber hinaus lassen sich nachteilige Effekte auf die Zielzellen durch die Expression ganzer viraler Proteine vermeiden (Hanke *et al.*, 2002b; Hanke *et al.*, 1998). Die Schutzwirkung von DNA Vakzinen lässt sich durch die Zugabe von immunstimulatorischen

Molekülen wie den Zytokinen IL-2 oder IL-12 nochmals deutlich steigern (Ahlers *et al.*, 2003; Barouch *et al.*, 2000).

Eine andere Möglichkeit die Expression von rekombinanten Immunogenen zu verbessern besteht in der Codonoptimierung der viralen Sequenzen. Dabei werden die Codons der HIV Sequenzen auf genomischer Ebene so verändert, dass stattdessen die von Säugetierzellen in stark exprimierten Genen am häufigsten vorkommenden Basentriplets verwendet werden, ohne dabei die Aminosäuresequenz der viralen Proteine zu beeinflussen. Die Ursache für die gesteigerten Expression findet sich in der erhöhten Verfügbarkeit von tRNA Molekülen der korrespondierenden Codons in Säugetierzellen. Mit solcherart veränderten HIV Sequenzen konnte die Expression von Gag Protein in Säugetierzellen erhöht sowie die Immunogenität im Mäusemodell verbessert werden (Deml *et al.*, 2001). Zusätzlich werden bei der Codonoptimierung die in HIV Genen vorhandenen regulatorischen oder inhibitorischen Sequenzmotive eliminiert. Es ist gelungen, durch solche Änderungen das „Rev Responsive Element“ (RRE) in dem Bereich *gag-pol* zu entfernen, um damit eine Rev-unabhängige Expression zu ermöglichen, die zudem stark gesteigert wird (Kotsopoulou *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2000). Für HIV sind in *gag-pol* und *env* neben dem RRE weitere inhibitorische Sequenzen beschrieben, die wahrscheinlich durch Einfluss auf die Stabilität des RNA Transkripts die Expression beeinträchtigen.

Neben der „nackten“ DNA werden auch immer mehr virale oder bakterielle Vektoren als Träger für Immunogene entwickelt. Einige dieser Vektoren befinden sich als AIDS Impfstoffkandidaten bereits in Phase I/II Studien. Diese Vektoren sind in ihrer jeweils verwendeten Form für den Menschen nicht pathogen. Sie können große Bereiche des HIV Genoms aufnehmen und sind in gewissem Umfang replikationskompetent, ohne das hierbei weitere Infektionseinheiten des Vektors entstehen. Replizieren also solche rekombinanten Vektoren in der Zielzelle, werden HIV Epitope über den MHC-Klasse-I Weg dem Immunsystem präsentiert, wodurch unter anderem eine starke zelluläre Immunantwort erzeugt wird (Natuk *et al.*, 1992; Natuk *et al.*, 1993; Prevec *et al.*, 1991). Werden auch Proteine des Vektors repliziert, entsteht ebenfalls eine Immunantwort gegen den Vektor. Das Unvermögen dieser Vektoren, *in vivo* infektiöse Einheiten zu bilden, spiegelt ihre Attenuierung wieder, welche die Gefahr einer Krankheitsbildung durch den Vektor selbst auszuschließen versucht. Bislang konnten über 13 verschiedene, attenuierte Viren experimentell als „antigen delivery systems“ eingesetzt werden (Hanke, 2001). An dieser Stelle sollen zwei davon eingehender betrachtet werden, da sie in der vorliegenden Studie als Impfstoffkandidaten Verwendung gefunden haben.

Einer der am häufigsten in AIDS Impfstoff Studien verwendeten viralen Vektoren ist das rekombinante Modified Vaccinia Ankara (rMVA), ein stark attenuiertes Impfpockenvirus mit breitem Wirtsspektrum, das durch vielfache serielle Passagierung auf Hühnerembryofibroblasten große Teile seines Genoms eingebüßt hat und sich nur noch in wenigen Zelllinien vermehrt. Die Deletionen in seinem Genom haben zu der starken Attenuierung im Menschen geführt (es bildet in Menschen keine infektiösen Partikel) und ermöglichen es außerdem fremde DNA in einem Umfang von bis zu 26 kb einzubringen. MVA wurde ursprünglich als Pockenimpfstoff entwickelt und hat seine Sicherheit bereits in Impfstoffkampagnen unter Beweis gestellt: In den Siebzigern des letzten Jahrhunderts wurden etwa 150 000 Personen in der damaligen Bundesrepublik mit MVA immunisiert, ohne dass es dabei zu gesundheitlichen Komplikationen bei einem der Impflinge kam (Sutter, 1992). Einige der durchgeführten Studien im SIV/Makaken Modell haben ermutigende Resultate mit rekombinantem MVA erbracht, das SIV Gene trägt (Amara *et al.*, 2002a; Barouch *et al.*, 2001) Diese Vektoren mit den entsprechenden HIV Genen befinden sich zur Zeit in einer Phase II Studie in Großbritannien.

Ein weiteres virales Trägersystem wird aus rekombinantem Semliki Forest Virus (rSFV) hergestellt. Bei diesem Vektor fehlen alle viralen Strukturgene, in deren Bereich die Fremd DNA integriert wird. Hierbei können problemlos Gene mit einer Größe von 7 kb von dem Vektor aufgenommen und exprimiert werden. Da SFV Vektoren auf Grund der fehlenden Strukturgene nicht mehr replikationskompetent sind, müssen sie mit einem Verpackungssystem (two helper RNA system) hergestellt werden. SFV Vektoren, die SIV Gene tragen, wurden bereits im SIV/Makaken Modell getestet und erzeugten eine starke Immunantwort gegen SIV (Nilsson *et al.*, 2001).

Neben den viralen Vektoren werden auch in Zellen replizierende Bakterien wie attenuierte Shigellen, Listerien oder auch Salmonellen (Aldovini and Young, 1991; Berggren *et al.*, 1995) als Träger eingesetzt, um HIV Gene in Körperzellen einzuschleusen und zu exprimieren. Die HIV Gene werden dabei von einem Plasmid kodiert, welches von den Bakterien mitgeführt wird. Nachdem das Bakterium von der Zelle aufgenommen worden ist, können die HIV Gene entweder direkt durch die bakterielle oder nach Lyse des Bakteriums durch die eukaryotische Proteinbiosynthese expremiert werden. In beiden Fällen kommt es zu einer endogenen MHC-Klasse-I Präsentation der viralen Epitope. Erfolgt die Expression der HIV Gene direkt im Bakterium, bedarf es einer auf die Codon-Usage des betreffenden Bakteriums abgestimmten Codonoptimierung. Bakterien besitzen als Carriersysteme den Vorteil, dass sie kostengünstig hergestellt, einfach gelagert und oral verabreicht werden

können (Lieberman and Frankel, 2002).

Die entstehende Immunantwort gegen Proteine des verwendeten Vektors kann zur Einschränkung der Immunogenität führen, wenn dieser wiederholt bei aufeinander folgenden Impfungen benutzt wird. So hat die mehrfache Immunisierung von Rhesus Makaken mit rMVA Vakzin zur Folge, dass nach der zweiten keine zusätzliche Steigerung der Immunantwort gegen SIV auftritt (Amara *et al.*, 2002b). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden Immunisierungsschemata entwickelt, die unter dem Namen Prime Boost Immunisierung mit verschiedenen Vektoren zusammengefasst werden. Dabei können für die einzelnen Immunisierungen verschiedene Verabreichungsmethoden (z.B. oral, intravenös, subkutan usw.), verschiedene Adjuvantien und unterschiedliche Vektoren miteinander kombiniert werden. Prinzipiell sieht ein solches Schema eine Grund- oder Prime-Immunisierung mit einem Vektor vor, gefolgt von mehreren Verstärkungs- oder Boost-Immunisierungen, bei denen andere Vektoren die entsprechenden Immunogene tragen. Bei vielen AIDS Impfstoff Experimenten, welche die Prime Boost Strategie anwenden, werden DNA Plasmide für die Prime Immunisierung eingesetzt und für die Boost Immunisierungen virale Trägersysteme, z.B. rekombinantes Modified Vaccinia Ankara, dabei expremiert jeder dieser Vektoren dieselben HIV- bzw. SIV-Gene (Hanke *et al.*, 1999). Bisher konnte auf diesem Weg im Tiermodell die ausgeprägtesten zellulären und humoralen Immunantworten induziert werden, ohne die Antwort gegen Bestandteile der viralen Träger zu verstärken. Es befindet sich derzeit wenigstens ein Prime Boost Verfahren mit DNA und rMVA in einer Phase I Studie in Oxford und Nairobi (Hanke *et al.*, 2002a).

Bei der Vielzahl der zu Verfügung stehenden Vektortypen, Applikationsrouten und Adjuvantien ergeben sich entsprechend viele mögliche Kombinationen bei Prime Boost Immunisierungen. Viele dieser Kombinationen werden im Augenblick im Tiermodell getestet, um bei Erfolg in klinischen Studien Anwendung zu finden.

1.8. Zielsetzung

Das von dem European Network for Vaccine Evaluation in Primates (ENVEP) ausgearbeitete EU Projekt soll der Evaluierung von rekombinanten Impfstoffkandidaten in Rhesusaffen zur Entwicklung eines AIDS Impfstoffes dienen. Dabei werden an dieser Studie koordiniert acht europäische Institute teilnehmen, von denen jedes eine andere Kombination von verschiedenen Impfstoffkandidaten zur Immunisierung der Affen anwendet (siehe Tabelle 1.2). Die Bildung dieses horizontalen und vertikalen Netzwerkes vergrößert den Umfang der Studie in einem in Europa bislang nicht möglichen Maße. Nach der

Immunisierung werden die Tiere mit dem in Rhesusaffen SAIDS-verursachenden SIVmac infiziert, um einen durch die Impfstoffkandidaten vermittelten Schutz vor der Infektion zu prüfen. Ziel hierbei ist, diejenige Kombination rekombinanter Impfstoffkandidaten zu identifizieren, welche den besten Schutz vermittelt. Darüber hinaus sollen die erhobenen Daten auf einen Zusammenhang zwischen einer Protektion der Tiere vor SIV/AIDS und ihrer Immunantwort untersucht werden.

Institut	1. Immunisierung	2. Immunisierung	3. Immunisierung	4. Immunisierung
NIBSC	DNA	DNA	SFV	SFV
ISS	DNA	SFV	SFV	MVA
SIIDC	DNA	DNA	SFV	MVA
CEA	DNA	DNA	MVA	SFV
DPZ	DNA	SFV	MVA	MVA
CAMR	DNA	DNA	MVA	MVA
PEI/RKI	DNA	MVA	SFV	SFV
BPRC	DNA	MVA	SFV	MVA

Tab. 1.2: Immunisierungsschemata der ENVEP Studie

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse werden die benötigten Reagenzien zentral produziert und qualitätsgeprüft, Protokolle für die notwendigen Prozeduren und Untersuchungen ausgetauscht und ein Teil der anfallenden immunologischen und virologischen Untersuchungen zentral von jeweils einem der acht Partnerinstitute durchgeführt.

Für die von uns durchzuführende Kombination werden zunächst sechs Rhesusmakaken mit einem Gemisch von DNA Plasmiden immunisiert, die jeweils eines der folgenden SIVmac Gene tragen: *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev* und *nef*. Im Abstand von jeweils acht Wochen folgen dann eine Immunisierung mit rekombinantem Modified Vaccinia Ankara (rMVA) und zwei Immunisierungen mit rekombinantem Semliki Forest Virus (rSFV). Diese auf viralen Vektoren basierenden Impfstoffkandidaten exprimieren die gleichen SIVmac Gene wie die DNA Plasmide. Zur Kontrolle wird eine andere Gruppe nach dem gleichen Schema mit Kontrollvektoren (ohne SIV Gene) immunisiert, eine weitere Kontrollgruppe verbleibt unbehandelt. Vier Wochen nach der letzten SFV Immunisierung erfolgt die rektale Belastung

aller Tiere mit pathogenem SIVmac.

Im Verlauf der gesamten Studie werden zu bestimmten Zeitpunkten die humorale und zelluläre Immunantwort der Affen gegen SIV gemessen, um einen Immunisierungseffekt vor der Belastung durch die Impfstoffkandidaten zeigen zu können, vor allem aber um bei einem eventuell auftretenden Schutz nach der Infektion einen Zusammenhang zwischen diesem und einer der gemessenen Immunantworten zu finden.

Nach der Belastung werden die Tiere mit verschiedenen Methoden regelmäßig auf Infektion mit dem Belastungsvirus getestet, um so entweder einen Schutz vor Infektion zeigen zu können oder aber zumindest einen Impfstoffeffekt, der sich in einer reduzierten Viruslast ausdrücken sollte. Außerdem wird wiederholt die absolute Anzahl der CD4⁺ T-Zellen gemessen, um Hinweise auf eine durch die Immunisierungen bedingte Verzögerung des Krankheitsverlaufs zu erhalten.