

2. Material und Methoden

2.1 Immunisierung/Belastung

2.1.1 Tiere

14 adulte Tiere (3-5 Jahre alt, beiderlei Geschlechts) der Gattung *Macaca mulatta* wurden für diese Studie ausgewählt. Die Haltung und Behandlung erfolgte im Paul-Ehrlich-Institut (Langen, Deutschland) durch das dortige Personal in Übereinstimmung mit den bestehenden Tierschutzbestimmungen. Alle Affen waren vor Beginn der Studie seronegativ für SIVmac, simianes Typ D Retrovirus (SRV), simianes T-Zell Leukämie Virus (STLV) und simianes Herpes B Virus. Sie zeigten darüber hinaus keine T-Zellantworten für SIV Antigene. Die Tiere wurden regelmäßig medizinisch untersucht, die Immunisierungen und die Blutentnahmen erfolgten unter Betäubung mit Ketamin Hydrochlorid (10 mg/kg Körpergewicht i.m.) vor der morgendlichen Fütterung. Dabei wurden zusätzlich das Körpergewicht sowie die Körpertemperatur gemessen.

Um eine gleichmäßige Verteilung von Tieren mit bestimmten MHC Allelen zu gewährleisten, wurde zentralisiert im Deutschen Primatenzentrum (DPZ) in Göttingen eine Haplotypisierung aller Tiere durchgeführt. Die 14 Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt, wobei die Impfstoffgruppe aus sechs Tieren bestand. Vier weitere Tiere bildeten die sogenannte Vektor Kontrollgruppe; diese erhielten jeweils die entsprechenden Wildtyp Konstrukte der viralen Vektoren bzw. den leeren DNA Vektor an den Immunisierungstagen. Die letzten vier Affen bildeten die naive Kontrollgruppe, welche bis zur viralen Belastung unbehandelt blieb.

Gruppe	Tiere
Impfstoffgruppe	Rh A5, Rh A6, Rh A7, Rh 214, Rh 224, Rh224
Vektor Kontrollgruppe	Rh 173, Rh 184, Rh 209, Rh 216
Naive Kontrollgruppe	Rh A2, Rh A4, Rh A10, Rh A11

2.1.2 Impfstoffkandidaten

DNA Vakzine: Die DNA Vakzine besteht aus folgenden sechs Plasmiden: pTH.UbgagPk, pTH.UbpolPk, pTH.UbnefPk, pTH.rev, pTH.tat, welche die Gene *gag*, *pol*, *nef*, *rev* und *tat* von SIVmacJ5 enthalten und unter der Kontrolle des humanen Cytomegalievirus immediate-early (hCMV IE) Enhancer/Promotors stehen. Das Plasmid pND14-G4 enthält die Sequenz

des SIVmac251 *env* (gp120) Gens ebenfalls unter der Kontrolle des hCMV IE Enhancer/Promotor. Alle Konstrukte enthalten außerdem die hCMV Intron A Sequenz am 5'-Ende der exprimierten Gene, um deren Expression zu steigern sowie die BGA (engl.: Bovine Growth Hormone) polyA Signal/Terminator Sequenz. Die Tiere der Vektor Kontrollgruppe wurden mit dem leeren Plasmid pTHempty immunisiert.

Rekombinantes Modifiziertes Vaccinia Ankara (rMVA): Dieser Impfstoffkandidat besteht aus fünf rekombinanten MVA Konstrukten, die folgende SIVmacJ5 Gene tragen: *gag/pol*, *env*, *tat*, *rev* und *nef*. Diese Gene stehen unter der Kontrolle des P7.5 Vaccinia virus early/late Promotors. Als Vektor Kontrolle wurde Wildtyp MVA verwendet.

Rekombinantes Semliki Forest Virus (rSFV): Die rSFV Vakzine besteht aus sechs rekombinanten SFV Konstrukten mit folgenden SIVmacJ5 Genen: *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev* und *nef*. Die Gene werden durch einen Expressionsvektor expremiert, der auf dem SFV Replikon basiert. Dafür wurden die eingefügten Gene zunächst in RNA transkribiert und daraufhin in nicht replikationsfähige SFV Partikel verpackt. Die Vektor Kontrolltiere wurden mit einem SFV LacZ Konstrukt immunisiert.

Alle Immunogene dieser Studie wurden unter Vertrag des Programms EVA hergestellt und qualitätsgeprüft. Der Test auf Immunogenität erfolgte in Mäusen.

2.1.3 Immunisierung der Affen

Die sechs Tiere der Impfstoffgruppe erhielten die DNA, rMVA und rSFV Immunisierungen wie in Abbildung 2.1 gezeigt. Die vier Tiere der Vektor Kontrollgruppe wurden nach dem gleichen Schema mit den entsprechenden Vektorkontrollen immunisiert. Die vier Tiere der naiven Kontrollgruppe blieben bis zur Belastung unbehandelt. Alle Immunisierungen wurden von Tierärzten des Paul-Ehrlich-Instituts in Langen durchgeführt.

Die insgesamt vier Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils acht Wochen. Die DNA Immunisierung bestand aus insgesamt sechs intradermalen Injektionen, dabei wurden die DNA Plasmide zuvor gemischt und dann zu je 100 µl pro Injektionsstelle proxolateral in der Leistenregion appliziert. Dies entspricht insgesamt 100 µg DNA pro Konstrukt, die Tiere der Vektor Kontrollgruppe erhielten entsprechend 600 µg pTHempty auf die gleiche Weise.

Die rMVA Immunisierung bestand aus zwei intramuskulären Injektionen des rMVA Gemischs mit je 500 µl pro Injektionsstelle (M. semimembranosus, M. semitendinosus). Dies entspricht für beide Injektionen einer Dosis von 1×10^8 pfu pro Konstrukt des Impfstoffes. Die Vektor Kontrolltiere erhielten 5×10^8 pfu rMVA Wildtyp auf die gleiche Weise

Die rSFV Immunisierungen bestanden jeweils aus zwei subkutanen Injektionen à 150 µl (insgesamt 1×10^8 infektiöse Einheiten pro Konstrukt), die gleichfalls proxolateral in der Leistenregion erfolgten. Die Tiere der Vektor Kontrollgruppe erhielten auf die gleiche Weise 6×10^8 infektiöse Einheiten rSFV-LacZ.

Die Tiere der Vektor Kontrollgruppe (s.o.) erhielten jeweils die entsprechende Gesamtmenge der Vektorkontrollen.

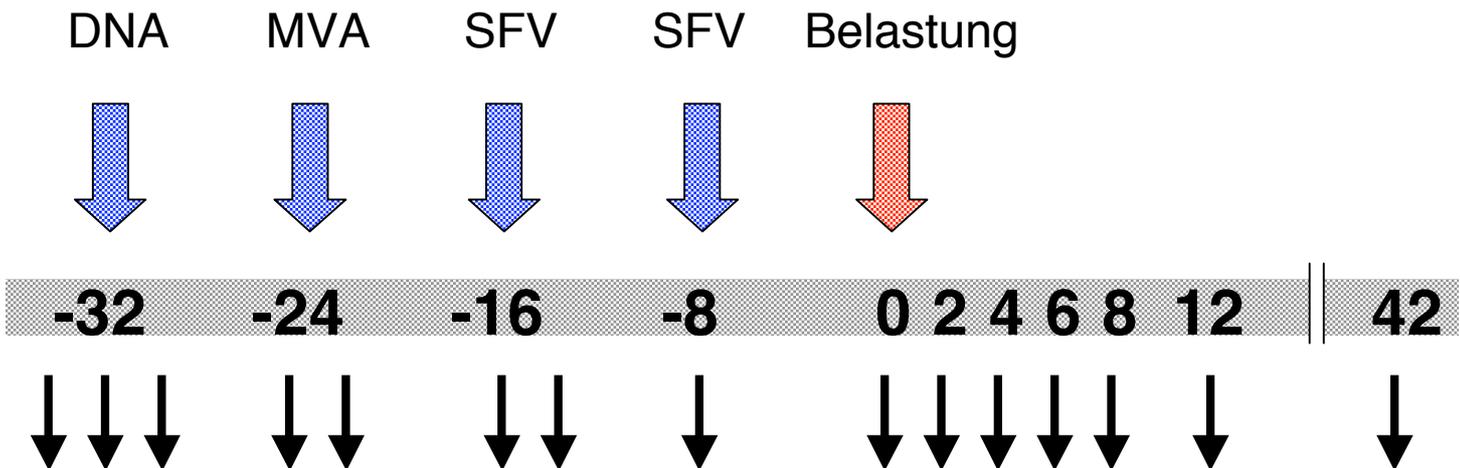


Abb. 2.1: Immunisierungs- und Belastungsschema. Auf der Zeitskala ist die Woche der Belastung mit Woche 0 angegeben; die bunten Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Immunisierungen bzw. der Belastung, die schwarzen Pfeile Zeitpunkte der Blutungen.

2.1.4 Belastung mit pathogenem SIVmac251

Acht Wochen nach der letzten Immunisierung wurden alle 14 Tiere mit 50 MID₅₀ (MID₅₀, engl.: Monkey Infectious Dose) des pathogenen SIVmac251 intrarektal belastet. Die Affen wurden hierfür mit Ketamin Hydrochlorid betäubt und mit leicht gehobenen Becken auf den Bauch gelegt. Dann wurde eine Zufuhrkanüle 4 cm in das Rektum eingeführt und 3 ml des verdünnten Virus (1:60 in sterilem, pyrogenfreiem RPMI1640 mit 20% FKS) langsam eingeleitet. Die Belastung wurde von Tierärzten im Paul-Ehrlich-Instituts durchgeführt.

2.1.5 Blutungen, Probenentnahme

In den Wochen -2, 0, usw. wurden die Affen geblutet und rektale Abstriche angefertigt. Aus dem entnommenen Citratblut bzw. Vollblut wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) und Plasmaproben bzw. Serum isoliert. Die Proben wurden im Einklang mit nationalen Bestimmungen zur Versendung biologischen Materials an das Robert Koch-Institut versendet,

wo diese untersucht wurden.

2.2 Zellkultur, Probengewinnung

2.2.1 Zellen und Medien

Für die unterschiedlichen Nachweisverfahren wurden C8166-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine durch HTLV-I immortalisierte, CD4⁺ T-Zell-Linie. Diese Zellen wurden in RPMI 1640-Medium, 10% FKS (Biother, Kelkheim), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) und einer Antibiotikakombination (10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B) im Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit gehalten, der Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage.

2.2.2 Lymphozytenseparation, Plasma- und Serumisolierung

Periphere, mononukleäre Zellen (PBMC) und Plasma aus Citrat-Vollblut werden durch eine Dichtezentrifugation in Ficoll (Polysaccharose-Lösung mit einer von Dichte 1.077 g/ml) isoliert. Aufgrund ihrer höheren Dichte wandern dabei die Erythrozyten und neutrophilen Granulozyten durch die Membran nach unten, während die PBMCs oberhalb der Membran einen weißen Ring im Plasma bilden.

Material:

- Ficoll (Histopaque 1077, Sigma)
- PBS
- 0.86% Ammoniumchlorid-Lösung
- RPMI-10%: RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FKS, 2mM L-Glutamin, 10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B.

- Zentrifuge (Megafuge, Hereus)
- 50 ml Röhrchen mit Fritte
- 50 ml Röhrchen

Methode:

1. Ein 50 ml Röhrchen mit Fritte wird zunächst mit 15 ml Ficoll befüllt und 1 min mit 1000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
2. Anschließend werden 15-35 ml Citrat-Vollblut auf die Fritte gegeben und 10 min mit 1000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert
3. Mit einer Pipette wird der Ring aus PBMC der Interphase entnommen, in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit 50 ml aufgefüllt. Das Plasma wird separat weiter verarbeitet. Dazu wird es aus dem Isolationsansatz in ein neues Röhrchen gegeben und zentrifugiert für 30 min mit 2000 g bei 4°C zentrifugiert, um eventuell vorhandene Zelltrümmer zu pelletieren; danach wird der Überstand aliquotiert und bei -20°C gelagert.
4. Die PBMC-Suspension wird nun für 10 min mit 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

5. Anschließend wird das Zellpellet in hypotoner 0,86%iger Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert (Erythrozyten-Lyse) und dann für 10 min mit 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.
6. Die PBMC-Suspension wird noch zweimal mit PBS (Schritt 4) gewaschen und in RPMI-10% aufgenommen und ausgezählt.

Serum-Gewinnung

Serum wird durch Gerinnung aus Vollblut gewonnen. Hierfür wird das Serum nach Abschluss der Blutgerinnung durch Zentrifugation bei 450 g für 20 min aus 2-3 ml Vollblut separiert.

Zur Komplement- und Virusinaktivierung wird das Serum infizierter Affen für 30 min bei 56°C im Wasserbad inaktiviert.

2.2.3 Herstellung von Eluaten rektaler Abstriche

Diese eluierten Abstriche dienen dem Nachweis von (SIV-spezifischen) Antikörpern auf der rektalen Mukosa. Der Nachweis der Antikörper erfolgt mit einem ELISA oder im Western Blot.

Material:

- Ketamin
- sterile Wattestäbchen (Medical Wire & Equipment Co., UK)
- 1 ml Aliquots steriler PBS in 15 ml Röhrchen
- Tischzentrifuge: Megafuge 1.0 R (Hereus, Hanau, Deutschland)

Methode:

1. Der Affe wird nach Vorschrift mit Ketamin sediert und bäuchlings positioniert.
2. Das mit PBS angefeuchtete Wattestäbchen wird behutsam etwa 40 mm in das Rektum eingeführt, vorsichtig gedreht und dann in ein vorbereitetes Röhrchen mit 1 ml PBS überführt.
3. Das Röhrchen mit dem rektalen Abstrich wird für 30 min bei 4°C inkubiert, damit sich die Bestandteile des Abstrichs im PBS verteilen können.
4. Das Wattestäbchen wird nun entfernt und die Probe mit 3300 g für 20 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert.
5. Der Überstand wird in ein steriles Röhrchen transferiert und bei -70°C gelagert

2.3 Immunologische Methoden

2.3.1 Nachweis von SIV-spezifischen Antikörpern I: SIVmac ELISA

Dieser Test dient der qualitativen Bestimmung spezifischer Antikörper gegen retrovirale Proteine in Plasmaproben bzw. im Eluat der rektalen Abstriche. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels Peroxidase-gekoppeltem Anti-Antikörper nachgewiesen wird. Dabei wird das Antigen zunächst an einen Träger adsorbiert,

anschließend können für das Antigen spezifische Antikörper in der Probe dieses binden. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wird ein sekundärer, enzymgekoppelter Antikörper, der sich gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers richtet, eingesetzt. Nach Zugabe des Substrats katalysiert das konjugierte Enzym (Peroxidase) eine Farbreaktion, welche mit Schwefelsäure gestoppt wird. Die Intensität der Färbung verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und wird photometrisch bestimmt. In der vorliegenden Studie wurde dabei nach IgG-Antikörper in den Plasmaproben sowie IgG- und IgA-Antikörper in den rektalen Eluaten gesucht. Bei dem verwendeten Antigen handelt es sich um mit 0,2 % Tween 20 inaktivierte SIV Partikel.

Materialien:

- PM: PBS mit 2% (w/v) Milchpulver (Marvel, GB)
- PT: PBS mit 0,2% Tween 20
- PMT: PM mit 0,1% (v/v) Tween 20
- 2% Tween 20
- Substrat-Lösung: PBS pH 6.0 mit 1 mg/ml o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) und 1 µl/ml H₂O₂
- 2,5 N Schwefelsäure

- Ziege anti-human IgG Peroxidase Konjugat (Sigma)
- Ziege anti-human IgA Peroxidase Konjugat (Sigma)
- SIVmac Lysat, inaktiviert mit 0,2% Tween20

- 96-Loch Platten mit flachem Boden; Falcon Micro test III Probind (Becton Dickinson)
- ELISA-Lesegerät: Tecan Sunrise Photospektrometer (Tecan)

Methode:

1. Das in Vorversuchen titrierte SIV Antigen wird in seiner optimalen Konzentration (der Richtwert beträgt 1µg/ml) in Aqua dest.. in einem Volumen von 50 µl pro Loch in 96-Loch Platten pipettiert und über Nacht eingetrocknet. Die Verwendung eines Zimmerventilators kann diesen Vorgang entscheidend beschleunigen
2. Die Platten werden mit 100 µl pro Loch PM durch 45 min Inkubation bei Raumtemperatur blockiert.
3. Es werden nun die Platten dreimal mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
4. Die Seren werden 1:50 in PMT verdünnt in einem Volumen von 50 µl pro Loch in Duplikaten 1:3 ausverdünnt. Es folgt eine 60 min Inkubation bei 37°C.
5. Die Platten werden erneut dreimal mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
6. Der Detektionsantikörper (anti IgG- oder anti IgA-Peroxidase Konjugat) wird in einer Verdünnung von 1:1000 in PMT verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch pipettiert. Die Platten werden nun für 30 min bei 37°C inkubiert.
7. Die Platten werden nochmals mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
8. Es folgt der Färbeschritt, bei dem die frisch angesetzte Substrat-Lösung mit je 50 µl pro Loch zugegeben wird und die Farbentwicklung mit 25 µl pro Loch 2,5 N Schwefelsäure abgestoppt wird.
9. Die entwickelten Platten werden abschließend in einem ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) eingelesen.

Zur Titration von SIV-spezifischen Antikörpern wurden die Plasmaproben in Duplikaten zunächst 1:50 verdünnt und dann 1:3 weiter ausverdünnt (insgesamt acht Verdünnungsstufen). Die Pufferkontrolle (PMT) wird zur Bildung des Schwellenwerts (Mittelwert plus 5 x Standardabweichung) verwendet.

2.3.2 Nachweis von SIV-spezifischen Antikörpern II: SIVmac Dot Blot

Mit dieser Methode können ebenfalls SIV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Im Unterschied zum ELISA erfolgt die Immobilisierung des SIV-Antigens auf einer Membran, welche in einem Filtrationsapparat mit 96-Loch Format eingespannt ist, mit dessen Hilfe die einzelnen Reagenzien und Waschlösungen abgesaugt werden können. Der Nachweis einer Antikörperbindung geschieht durch einen unlöslichen Chemielumineszenz-Farbstoff. Mit dieser Methode lassen sich zwar Antikörper nur schlecht quantifizieren, sie ist jedoch etwa 60-fach sensitiver als ein vergleichbarer ELISA und stellt daher ein gutes Screening-Verfahren zum Aufspüren geringer Antikörpermengen in Proben dar. In der vorliegenden Studie wurden nur mit den rektalen Proben Dot Blots durchgeführt, da zuvor mit dem SIVmac-ELISA keine SIV Antikörper in diesen Proben nachgewiesen werden konnten

Material:

- PBS
- PT: PBS mit 0,05% Tween 20
- PB: PBS mit 1% BSA
- PTB: PBS mit 0,05% Tween 20 und 1% BSA
- Chemilumineszenz-Farbstoff: ECL Reagents (Amersham-Pharmacia)
- Inaktivierungslösung: PBS mit 15% H₂O₂

- Ziege anti-human IgG Peroxidase Konjugat, Detektionsantikörper (Sigma)
- Ziege anti-human IgA Peroxidase Konjugat, Detektionsantikörper (Sigma)
- SIVmac-Partikel, inaktiviert mit 0,2% Tween 20,

- Bio-Dot Mikrofiltrationsapparatur (Bio Rad)
- Nitrozellulose Membran (0,45 µm) 9x12 cm (Bio Rad)
- Vakuumpumpe: VacuSafe (INTEGRA Biosciences)
- Röntgenfilm: Hyperfilm ECL (Amersham-Pharmacia)
- Entwicklungskassette: X-Omatic Regular (Kodak)
- Entwickler: Curix60 (Agfa)

Methode:

1. Die Nitrozellulose Membran wird nach Vorschrift des Herstellers in die Mikrofiltrationsapparatur eingesetzt.
2. Das Antigen wird in PBS verdünnt zu je 100 µl pro Loch auf die Membran gegeben und durch Schwerkraftwirkung filtriert. Dieser Vorgang nimmt etwa 30-40 min in Anspruch

3. Nach vollständigem Abfluss der Antigenlösung wird die Membran durch Zugabe von 200 µl PB pro Loch blockiert. Auch diese Lösung wird mittels Schwerkraft filtriert (Zeitdauer ca. 60 min)
4. Die Membran wird nun zweimal mit je 300 µl PT pro Loch gewaschen. Der Waschpuffer wird dabei durch Anlegen eines Vakuums an den Filtrationsapparat abgesaugt. Es ist darauf zu achten, dass die Membran bei diesem Vorgang nicht austrocknet.
5. Es erfolgt die Zugabe der Proben, in diesem Fall der rektalen Eluate, welche 1:5 in PB verdünnt und vorfiltriert (0,22 µm PVDF-Filter, Low Protein Binding) zu je 100 µl pro Loch pipettiert werden. Wieder erfolgt die Filtration durch Schwerkraftwirkung innerhalb von 30-40 min.
6. Die Membran wird anschließend dreimal mit je 300 µl PT pro Loch mit angelegtem Vakuum gewaschen.
7. Der PB verdünnte Detektionsantikörper wird zu je 100 µl pro Loch auf die Membran gegeben und gleichfalls mittels Schwerkraft filtriert.
8. Wieder wird zweimal mit je 300 µl PT pro Loch mit angelegtem Vakuum gewaschen, daraufhin wird die Membran nach Vorschrift des Herstellers aus der Apparatur entfernt und nochmals in einem Waschbehälter dreimal 5 min mit PT und zweimal 5 min mit PBS behandelt.
9. Die Membran kann nun mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff behandelt werden; dies erfolgt nach Vorschrift mit einem kommerziellen Kit (ECL, Amersham-Pharmacia). Die Expositionszeit der Filme beträgt 1 bzw. 10 min. Die entwickelten Filme werden eingescannt und am Computer mit einem Programm (NIHIMAGE) ausgewertet. Der Schwellenwert ergibt sich aus dem Mittelwert der Negativkontrolle (PBS ohne Probe) und dem fünffachen ihrer Standardabweichung. Als Positivkontrolle wird ein Serum mit SIV-spezifischen Antikörpern verwendet.

Wenn ein rektales Eluat im Dot Blot positiv war, wurde mit einer SDS-PAGE mit anschließendem Westernblot eine feinere Analyse der SIV-spezifischen Antikörper durchgeführt. Zur SDS-PAGE wurde ein diskontinuierliches Gelsystem (4% Sammelgel, 10% Trenngel) verwendet, in dem die Auftrennung der Proteine eines SIVmac251 Viruslysats nach ihrem Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen erfolgte (Sambrook and Gething, 1989). Das Übertragen der SIV-Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (BioRad) erfolgte mit der Trans-Blot SD[®]-Semi Dry Transfer Cell (BioRad) nach Angaben des Herstellers. Es wurde eine Stunde bei 10 Volt geblottet. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran in Blockierungspuffer (PBS mit 0,1% Tween20, 1% BSA, 5% Trockenmilch und 10% FKS) 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die im Dot Blot positiven Proben wurden nun 1:5 in Blockierungspuffer verdünnt und 1 h mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nachweis von SIV-spezifischen Antikörpern in diesen Proben erfolgte im Anschluss immunchemisch unter Verwendung eines Detektionsantikörpers (Ziege anti-human IgG-Peroxidase Konjugat) und eines Chemilumineszenz-Farbstoff (siehe SIVmac Dot Blot). Als Kontrolle diente ein SIVmac-positives Rhesusaffenserum.

2.3.3 SIVmac Neutralisationsassay

Der verwendete Test basiert auf einer Wachstumshemmung von SIVmac32H in der Zell-Linie C8166 durch die eingesetzten Seren, in denen so die neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden. Bei diesem Neutralisationsassay wird eine Serumverdünnung auf verschiedenen Verdünnungen des Virus getestet. Die Virusvermehrung wird mit einem Gag Antigen (p27) bindenden ELISA gemessen, der im Anschluss an die hier beschriebene Kultivierung durchgeführt wird.

Material:

- RPMI-10%: RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FKS, 2mM L-Glutamin, 10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B.
- C8166 Zellen, kultiviert in RPMI-10%, gewaschen, gezählt und auf einen Titer von $1,33 \times 10^4$ /ml in RPMI-10% eingestellt.
- 96-Loch Kulturplatten (U-Form)
- 8-Kanal Reservoir
- 12-Kanal Reservoir

Methode:

1. 40 µl jedes Serum wird in eine entsprechende Spur eines 12-Kanal Reservoirs pipettiert; als Negativkontrolle werden zwei Spuren mit je 40 µl RPMI-10% belegt
2. Zu jeder Serumspur werden anschließend 1,96 ml RPMI-10% gegeben und gut gemischt
3. Jedes der so verdünnten Seren wird nun auf 96 Löcher einer 96-Loch Kulturplatte verteilt. Dazu pipettiere man 25 µl verdünnten Serums pro Loch direkt auf dessen Boden.
4. Auf die vorgelegten Seren werden nun Verdünnungsreihen des Virusstammes gegeben; die Verdünnungsreihe wird wie folgt angelegt: Um das notwendige Endvolumen von 30 ml pro Verdünnung zu erreichen, werden zunächst 4,5 ml des Virusstammes mit 40,5 ml RPMI-10% versetzt (1:10 Startverdünnung) und folgend je 15 ml der vorherigen Verdünnung mit 30 ml RPMI-10% (1:3 Folgeverdünnungen).
5. Von jeder Virus-Verdünnung werden je 25 µl pro Loch in eine zwölfer Reihe der 48-Loch Kulturplatte transferiert (12 Replikate). Danach werden beide Volumen wenn möglich auf einem Horizontalschüttler für 10 s gemischt. Die Kulturplatten werden anschließend für 45 min bei 37° C in einem CO₂- Brutschrank inkubiert um eine eventuelle Neutralisation zu ermöglichen.
6. Nach dieser kurzen Inkubation werden noch die C8166 Zellen in einem Volumen von 150 µl (enthält 2×10^3 Zellen) pro Loch hinzugefügt und dann für sieben Tage in einem CO₂- Brutschrank bei 37° C inkubiert.
7. An die Kultivierung schließt sich die Zell-Lyse und ein qualitativer p27 ELISA an (siehe separates Protokoll)
8. Mit den Ergebnissen des p27 ELISA wird die TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) jeder Probe einschließlich der Negativkontrollen berechnet.
9. Die Berechnung der Wachstumshemmung erfolgt durch Division der TCID₅₀ der Negativkontrolle (ohne Serum) durch die TCID₅₀ eines Ansatzes mit Serum.

2.3.4 Qualitativer p27 Nachweis (p27 ELISA)

Bei diesem Nachweis wird das SIVmac Capsidprotein p27 in einem sogenannten Sandwich-ELISA nachgewiesen, d.h. das Antigen wird zunächst von einem auf der Platte befindlichen Antikörper gebunden und anschließend durch einen hinzugefügten nachgewiesen.

Material:

- PM: PBS mit 2% (w/v) Milchpulver (Marvel Co)
- PT: PBS mit 0,2% Tween 20
- PMT: PM mit 0,1% (v/v) Tween 20
- 2% Tween 20
- Substrat Lösung: PBS pH 6.0 mit 1 mg/ml o-Phenylendiamindihydrochlorid (OPD) und 1 µl/ml 30 % H₂O₂
- 2,5 N Schwefelsäure

- Protein-G gereinigter monoklonaler Antikörper AG 3.0 (Maus anti SIVmac p27)
- SIVmac positives Plasma aus Rhesusaffe mit einem nachgeprüft hohem anti p27 Antikörper Titer
- Ziege anti-human IgG Peroxidase Konjugat (Sigma)

- 96-Loch Platten mit flachem Boden; Falcon Probind (Millipore)
- 25 ml Reservoir
- ELISA-Lesegerät: Tecan Sunrise Photospektrometer (Tecan)

Methode:

1. Der in Vorversuchen titrierte Antikörper AG 3.0 wird in seiner optimalen Konzentration in Aqua dest. in einem Volumen von 50 µl pro Loch in 96-Loch Platten pipettiert und über Nacht eingetrocknet.
2. Die Platten werden mit 100 µl pro Loch PM durch 45 min Inkubation bei Raumtemperatur blockiert.
3. Es werden nun die Platten dreimal mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen und darauf 50 µl pro Loch PMT vorgelegt.
4. Virus und Zellen aus dem Neutralisationsassay (siehe separates Protokoll) werden inaktiviert bzw. lysiert. Dies geschieht durch Zugabe von 2 % Tween 20 in einem Volumen das möglichst genau 10 % des in den Kulturplatten des Neutralisationsassay vorgelegten Volumen entspricht, um eine Endkonzentration von 0.2 % Tween 20 in den Proben zu erreichen. Die so behandelten Platten werden für 30 min bei Raumtemperatur (unter einer Sicherheitsbank) gelagert.
5. Das entstandene Zell-Lysat wird gemischt und zu je 50 µl in die entsprechenden Löcher der vorbereiteten ELISA-Platte transferiert. Nach jedem Transfer werden die Spitzen zweimal mit Aqua dest. und einmal mit PBS gewaschen. Es wird von der niedrigsten Virusmenge zu den Reihen größerer Virusmengen gearbeitet. Der Spitzenwechsel erfolgt nach Probentransfer der gesamten Platte.
6. Die ELISA-Platte, in der sich mittlerweile 50µl PMT sowie 50µl Probe befinden müssen, wird für 2 h bei 37° C oder über Nacht bei 4° C inkubiert.
7. Es wird nun dreimal mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
8. Das in PMT verdünnte SIVmac positive Rhesusaffen-Serum, dessen optimale Konzentration zuvor bestimmt wurde, wird zu je 50 µl pro Loch auf die Platten gegeben.
9. Die Platten werden wieder mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
10. Der Detektionsantikörper (Ziege anti-human IgG Peroxidase Konjugat) wird 1:1000 in PMT verdünnt und in einem Volumen von 50 µl pro Loch pipettiert. Die Platten werden nun für 30 min bei 37°C inkubiert.
11. Die Platten werden nochmals mit je 200 µl pro Loch PT gewaschen.
12. Es folgt der Färbeschritt, bei dem die frisch angesetzte Substrat-Lösung mit je 50 µl pro Loch zugegeben wird und die Farbentwicklung mit 25 µl pro Loch 2,5 N Schwefelsäure abgestoppt wird.
13. Die entwickelten Platten werden abschließend in einem ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) eingelesen. Der Schwellenwert für ein positives Signal wird durch den Mittelwert der Negativkontrolle zuzüglich dem fünffachen der Standardabweichung festgelegt.

2.3.5 Messung der proliferativen T-Zell Antwort, Lymphoproliferationsassay (LPA)

Diese Methode dient dem Nachweis SIV-spezifischer T-Zellen, die auf Grund eines SIV Antigen zur Proliferation stimuliert werden. Die Proliferation dieser Zellen wird in der Durchfluss-Zytometrie durch die Anfärbung der Zellen mit einem in die Zellmembran interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff (PKH26) nachgewiesen. Teilt sich eine Zelle nach der Anfärbung so wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Nachkommenzellen verteilt, d.h. das von PKH26 ausgehende Fluoreszenzsignal halbiert sich mit jeder Teilung einer Zelle. So können also Zellen, die spezifisch auf einen Antigen-Stimulus hin proliferieren anhand ihrer geringeren Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Material:

- PBS pH 6,8
- RPMI1640
- RPMI-10%: RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FKS, 2mM L-Glutamin, 10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B
- FKS
- Diluent C (Sigma)
- Farbstoff: PKH26 (Sigma)
- Cellfix (BD)

- anti-rhesus CD3-FITC
- anti-human CD4-APC (kreuzreaktiv mit Rhesus CD4)

- Phytohämagglutinin , PHA (Murex Biotech)
- SIV rTat (Von Programm EVA zur Verfügung gestellt)
- SIV Partikel, AT-2 inaktiviert (Von Programm EVA zur Verfügung gestellt)
- Microvesikel (Von Programm EVA zur Verfügung gestellt)

- 48-Loch Kulturplatten
- Durchfluss-Zytometer, FACS-Calibur (BD)

Methode:

1. Aus den Citrat-Blutproben werden die PBMCs über einen Ficoll Gradienten (siehe Isolation von PBMC) isoliert, zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI1640 (serumfrei) resuspendiert. Der Titer wird auf 5×10^6 /ml eingestellt. Das Medium muss serumfrei sein, da die Lipide und Proteine des Serums mit der Färbereaktion interferieren.
2. 1 ml dieser Zellsuspension (entspricht 5×10^6 Zellen) wird für 5 min bei 300 g und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand durch vorsichtiges Absaugen möglichst vollständig entfernt; es sollten nicht mehr als 25 µl Überstand zurückbleiben.
3. Unmittelbar vor der Färbung wird die Arbeitslösung des PKH26 mit einer Konzentration von 4×10^{-6} M in Diluent C hergestellt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt und sollte innerhalb von 15 min verbraucht werden. Es wird nun 1 ml der Arbeitslösung in einem 15 ml Röhrchen vorgelegt
4. Das zuvor gewonnene Zellpellet wird nun behutsam in 1 ml Diluent C resuspendiert um den ursprünglichen Titer wieder herzustellen. Die Zellen werden nun für 30 s inkubiert und dann unverzüglich zu der vorbereiteten 1 ml Farbstofflösung in das 15 ml Röhrchen pipettiert und sofort gemischt. Niemals sollte man den Farbstoff auf die Zellen geben, da so einen gleichmäßige Färbung nicht gewährleistet werden kann.
5. Die Zellen werden nun dem Farbstoff für 3 min unter mehrfachem Mischen ausgesetzt.
6. Die Färbereaktion wird durch Zugabe von 2 ml FKS und Vermischung gestoppt.

7. Durch Zugabe von 4 ml RPMI-10% wird die Probe verdünnt und bei Raumtemperatur für 10 min bei 300 g zentrifugiert.
8. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml RPMI-10% resuspendiert. Die Zellsuspension wird in ein neues Röhrchen überführt und so noch zweimal gewaschen.
9. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen mit RPMI-10% auf einen Titer von 1×10^6 /ml eingestellt.
10. Die Zellsuspension wird nun mit 1 ml pro Loch auf eine 48-Loch Kulturplatte wie folgt verteilt und stimuliert:

Ansatz	Endkonzentration	Bemerkung
nur Medium	-	Negativkontrolle
PHA	10 µg/ml	Positivkontrolle
rTat	0,2 µg/ml	SIV Protein
SIV (AT-2)	5 µg/ml	SIV, inaktivierte Partikel
Mikrovesikel	5 µg/ml	SIV-Partikel Kontrolle

11. Die Ansätze werden für 6 Tage bei 37°C in einem CO₂-Inkubator kultiviert.
12. Nach der 6-tägigen Kultivierung werden die Zellen wie oben einmal mit 1 ml PBS gewaschen und in 300 µl Cellfix resuspendiert. Diese 300 µl werden in ein Röhrchen überführt in das 10 µl anti CD3-FITC und 10 µl anti CD4-APC Antikörper vorgelegt wurden. Die Suspension wird für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen, dann mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und anschließend mit 350 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 300 µl Cellfix aufgenommen.
13. Die Proben können nun mit einem Durchfluss-Zytometer vermessen werden.

Analyse:

1. Die Negativ- und Positivkontrolle werden zur Festlegung der Auswerterrahmen (Engl.: Gate) verwendet, in denen die relative Anzahl von proliferierenden Zellen gemessen wird.
2. Die relative Anzahl Antigen-spezifischer Proliferation wird aus der Differenz der Anzahl proliferierender Zellen in einem Antigen- bzw. Mitogenansatz und der Anzahl proliferierender Zellen im Mediumansatz gebildet.

Der Schwellenwert wurde durch dreimaliges messen der Proliferation der CD3⁺ CD4⁺ PBMC der uninfizierten, nicht immunisierten Affen in Anwesenheit von SIV-AT2 bzw. -rTat ermittelt (Mittelwert + 5 x Standardabweichung). Er beläuft sich demnach auf 0,56 %.

2.3.6 INF γ -ELISpot

Dieser Assay wird verwendet, um durch Antigene zur Produktion von INF γ angeregte PBMCs zu detektieren und quantifizieren. Dafür werden anti-INF γ Antikörper an eine Membran geheftet und auf dieser PBMCs mit Antigen stimuliert. Befinden sich unter den PBMCs T-Zellen, die spezifisch für das dargebotene Antigen sind, so kann dies zu einer Produktion und Freisetzung von INF γ durch ebendiese Zellen führen. Die sezernierten INF γ -Moleküle werden von den zuvor aufgebrauchten Antikörpern in unmittelbarer Umgebung zur produzierenden Zelle eingefangen und nach dem Entfernen der PBMC immunchemisch als Fleck (Engl.: Spot) sichtbar gemacht. Eine sogenannte Spot Forming Unit (SFU) repräsentiert deshalb in der Regel eine zuvor INF γ -produzierende T-Zelle.

Material:

- PBS
- FPBS: PBS mit 0,5% FKS
- TPBS: PBS mit 0,02% Tween 20
- 70% Ethanol
- RPMI-10%: RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FKS, 2mM L-Glutamin, 10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B

- 96-Loch Filterplatten (MAIP S45 ELISpot-Platte, Millipore)
- anti-human INF γ (Mab GZ-4, Mabtech), Beschichtungsantikörper
- anti-human INF γ -Biotin(Mab 7-B6-1, Mabtech), Detektionsantikörper
- Streptavidin-alkalische Phosphatase (Mabtech AB)
- BCIP/NBT (Biorad), Substrat
- ELISpot-Reader (Autoimmun Diagnostika GmbH)

- SIV Partikel, AT-2 inaktiviert (Programm EVA), Endkonzentration 5 µg Protein/ml
- SIV Peptide (Programm EVA), Endkonzentration 2 µg/ml pro Peptid (Liste im Anschluss an die Methode)

Methode:

1. Am Vortag werden die 96-Loch Filterplatten 20 min mit 70 % Ethanol (200 µl pro Loch) inkubiert. Anschließend werden die Platten 6x mit PBS (200 µl pro Loch) gewaschen und nach dem finalen Waschgang auf einem sterilen saugfähigen Papier ausgeklopft.
2. Danach werden sofort 100 µl einer bereits vorbereiteten PBS-Lösung des Beschichtungsantikörpers (Klon Mab GZ-4) mit einer Konzentration von 15 µg/ml in jede Vertiefung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.
3. Nach Entfernen der Antikörperlösung werden die Platten sechsmal mit PBS (200 µl pro Loch) gewaschen und nach dem finalen Waschgang auf einem sterilen, saugfähigen Papier ausgeklopft. Um die Platten zu blockieren werden 100 µl 0,2 µm-sterilfiltriertes RPMI-10% in jede Vertiefung gegeben und die Platten für 2 h in einem CO₂-Inkubator bei 37°C inkubiert.
4. Die Blockierungslösung (R10++ Medium) wird durch Ausschütten und Ausklopfen auf sterilem, saugfähigem Papier entfernt.
5. Anschließend werden 50 µl der Peptid-Lösungen (10 µg/ml in RPMI-10%) in die jeweiligen Vertiefungen der 96-Loch Platte pipettiert, jeweils mindestens in Triplikaten. In die Negativ-Kontroll-Ansätze werden 50 µl RPMI-10% pipettiert, in die Positiv-Kontroll-Ansätze 50 µl PWM (4 µg/ml, Sigma)
6. Nun werden die PBMC-Suspensionen (Titer 4x10⁶/ml in RPMI-10%) zu je 50 µl pro Vertiefung auf die Platte gegeben und bei 37°C für 14 h in einem CO₂-Inkubator kultiviert. Die Platten dürfen in diesem Zeitraum nicht erschüttert oder bewegt werden.
7. Nach der Inkubationszeit werden die Zellen mittels einer Multikanalpipette aus den Vertiefungen entfernt und die Platte 1x mit TPBPBS (200 µl pro Loch) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden die Platten sechsmal mit TPBS (200 µl pro Loch) gewaschen, nach dem finalen Waschgang werden die Platten auf saugfähigem Papier ausgeklopft.
8. Danach werden sofort 100 µl eines in FPBS verdünnten Detektionsantikörpers gegen INF γ (Mab 7-B6-1-Biotin) mit einer Konzentration von 1µg/ml in jede Vertiefung gegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert.
9. Danach werden die Platten sechsmal mit PBS gewaschen (200 µl pro Loch) und nach dem finalen Waschgang auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Nach dem Waschen werden 100 µl vorbereitete Streptavidin-alkalische Phosphatase (Mabtech AB) in jede Vertiefung gegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Verdünnt wird das Enzym mit FPBS, 10 µl der Stammlösung in 10 ml FPBS.

10. Es folgt nochmals ein Waschgang (sechsmal 200 µl PBS pro Vertiefung) und anschließendes Ausklopfen der Platte auf saugfähigem Papier. Dann werden 100 µl des Substrates (BCIP/NBT) in jede Vertiefung gegeben. Die Platten werden bis zur Entwicklung (20-40 min) mit dem Substrat inkubiert und danach dreimal mit dest.illiertem Wasser gespült. Die Trocknung erfolgt im Dunkeln. Abschließend werden die Platten mit Hilfe des ELISpot-Readers der Fa. AID (Autoimmun Diagnostika GmbH) digital fotografiert und mit der AID elispot 3.1 Software ausgewertet.

Der Schwellenwert für signifikante Reaktionen (Mittelwert x 2 und Mittelwert + 150 Spots) wurde in Anlehnung an die in anderen Impfstoffstudien (Mwau *et al.*, 2002) für IFN γ -ELISpots ausgewählt

SIV Peptide, Sequenzen und Gruppen:

Ausgewählte SIVmac32H Tat Peptide mit einer Überlappung von 7 Aminosäuren:

Peptid	Position	Sequenz	Kennummer
Tat 15mer	1 – 15	METPLREQENSLESS	EVA7069.1
Tat 15mer	14 – 28	SSNERSSCISEADAT	EVA7069.2
Tat 15mer	21 – 35	CISEADATTPESANL	EVA7069.3
Tat 15mer	28 – 42	TTPESANLGEEILSQ	EVA7069.4
Tat 15mer	35 – 49	LGEEILSQLYRPLEA	EVA7069.5
Tat 15mer	48 – 62	EACYNTCYCKKCCYH	EVA7069.6
Tat 15mer	55 – 69	YCKKCCYHCQFCFLK	EVA7069.7
Tat 15mer	62 – 76	HCQFCFLKKGGLICY	EVA7069.8
Tat 15mer	90 – 104	KANTSSASNNRPISN	EVA7069.9
Tat 15mer	117 – 131	ETVEKAVATAPGLGR	EVA7069.10

Peptid Gruppen vor der Belastung

Tat Pool 1: EVA7069.1-5 5x15mere
Tat Pool 2: EVA7069.6-10 5x15mere

Peptid Gruppen nach der Belastung

Tat Pool I: EVA7069.1-10 10x15 mere

Ausgewählte SIVmac32H Rev Peptide mit einer Überlappung von 7 Aminosäuren:

Peptid	Position	Sequenz	Kennummer
Rev 15mer	1 – 15	MSSHEREEELRKRLR	EVA7068.1
Rev 15mer	8 – 22	EELRKRLRLIHLHQ	EVA7068.2
Rev 15mer	41 – 55	RRRWRRRWQQLLALA	EVA7068.3
Rev 15mer	48 – 62	WQQLLALADRIYSFP	EVA7068.4
Rev 15mer	69 – 83	PLDLAIQQLQNLAIIE	EVA7068.5
Rev 15mer	74 – 88	IQQLQNLAIIESIPDP	EVA7068.6
Rev 15mer	81 – 95	AIESIPDPPTNTPEA	EVA7068.7
Rev 15mer	88 – 102	PPTNTPEALCGPTEN	EVA7068.8

Peptid Gruppen vor der Belastung

Rev Pool 1: EVA7068.1-4 4x15mere
Rev Pool 2: EVA7068.5-8 4x15mere

Peptid Gruppen nach der Belastung

Rev Pool I: EVA7068.1-8 8x15mere

Ausgewählte SIVmacJ5 Nef Peptide mit einer Überlappung von 7 Aminosäuren:

Peptid	Position	Sequenz	Kennummer
Nef 15mer	1 – 15	MGGAISRRRSKSAGD	EVA7067.1
Nef 15mer	8 – 22	RRSKSAGDLRQRLLR	EVA7067.2

Peptid	Position	Sequenz	Kennnummer
Nef 15mer	5 – 29	DLRQRLLRARGETYG	EVA7067.3
Nef 15mer	22 – 36	RARGETYGRLLGEVE	EVA7067.4
Nef 15mer	29 – 43	GRLLEGEVEDGYSQSL	EVA7067.5
Nef 15mer	36 – 50	EDGYSQSLGGLDKGL	EVA7067.6
Nef 15mer	43 – 57	PGGLDKGLSSLSCEG	EVA7067.7
Nef 15mer	57 – 71	GQKYNQGQYMNTPW	EVA7067.8
Nef 15mer	63 – 77	GQYMNTPWWRNPAAER	EVA7067.9
Nef 15mer	70 – 84	WRNPAAEREKLAYRK	EVA7067.10
Nef 15mer	105 – 119	RVPLRTMSYKLAVD	EVA7067.11
Nef 15mer	112 – 126	SYKLAVDMSHFIKEK	EVA7067.12
Nef 15mer	119 – 133	MSHFIKEKGGLEGIY	EVA7067.13
Nef 15mer	140 – 154	RILDMYLEKEEGIIP	EVA7067.14
Nef 15mer	147 – 161	EKEEGIIPDWQDYTS	EVA7067.15
Nef 15mer	154 – 168	PDWQDYTSGPGRYP	EVA7067.16
Nef 15mer	161 – 175	SGPGRYPKTFGWLW	EVA7067.17
Nef 15mer	175 – 189	WKLVPVNVSDEAQED	EVA7067.18
Nef 15mer	182 – 196	VSDEAQEDERHYLMQ	EVA7067.19
Nef 15mer	189 – 203	DERHYLMQPAQTSKW	EVA7067.20
Nef 15mer	195 – 209	MHPAQTSKWDDPWGE	EVA7067.21
Nef 15mer	201 – 215	SQWDDPWGEVLAWKF	EVA7067.22
Nef 15mer	208 – 222	GEVLAWKFDPTLAYT	EVA7067.23
Nef 15mer	215 – 229	FDPTLAYTYEAYVRY	EVA7067.24
Nef 15mer	222 – 236	TYEAYVRYPEEFGSK	EVA7067.25
Nef 15mer	229 – 243	YPEEFGSKSGLPEEE	EVA7067.26
Nef 15mer	236 – 250	KSGLPEEEVRRRLTA	EVA7067.27
Nef 15mer	243 – 257	EVRRLTARGLLNMA	EVA7067.28
Nef 15mer	249 – 263	TARGLLNMAKDKETR	EVA7067.29

Peptid Gruppen vor der Belastung

Nef Pool 1 EVA7067.1-5 5x15mere
 Nef Pool 2 EVA7067.6-10 5x15mere
 Nef Pool 3 EVA7067.11-15 5x15mere
 Nef Pool 4 EVA7067.16-20 5x15mere
 Nef Pool 5 EVA7067.21-25 5x15mere
 Nef Pool 6 EVA7067.26-29 4x15mere

Peptid Gruppen nach der Belastung

Nef Pool I EVA7067.1-15 5x15mere
 Nef Pool II EVA7067.16-29 5x15mere

Ausgewählte SIVmac32H Gag Peptide mit einer Überlappung von 7 Aminosäuren:

Peptid	Position	Sequenz	Kennnummer
Gag 15mer	36 – 50	WAANELDRFGLAESL	EVA7066.1
Gag 15mer	57 – 71	CQKILSVLAPLVPTG	EVA7066.2
Gag 15mer	64 – 78	LAPLVPTGSENKSL	EVA7066.3
Gag 15mer	71 – 85	GSENKSLYNTVLCVI	EVA7066.4
Gag 15mer	134 – 148	NYPVQQIGGNYVHLP	EVA7066.5
Gag 15mer	148 – 162	PLSPRTLNAWVKLIE	EVA7066.6
Gag 15mer	169 – 183	EVVPGFQALSEGCTP	EVA7066.7
Gag 15mer	176 – 190	ALSEGCTPYDINQML	EVA7066.8
Gag 15mer	216 – 230	LQHPQPAPQQGQLRE	EVA7066.9
Gag 15mer	244 – 258	DEQIQWMYRQQNPIP	EVA7066.10
Gag 15mer	251 – 265	YRQQNPIPVGNIYRR	EVA7066.11

Peptid	Position	Sequenz	Kennnummer
Gag 15mer	258 – 272	PVGNIYRRWIQLGLQ	EVA7066.12
Gag 15mer	271 – 285	LQKCVRMYNPTNILD	EVA7066.13
Gag 15mer	292 – 306	EPFQSYVDRFYKSLR	EVA7066.14
Gag 15mer	356 – 370	GPGQKARLMAEALKE	EVA7066.15
Gag 15mer	427 – 441	CPDRQAGFLGLGPWG	EVA7066.16

Peptid Gruppen vor der Belastung

Gag Pool 1 EVA7066.1-4 4x15mere
 Gag Pool 2 EVA7066.5-8 4x15mere
 Gag Pool 3 EVA7066.9-12 4x15mere
 Gag Pool 4 EVA7066.13-16 4x15mere

Peptid Gruppen nach der Belastung

Gag Pool I EVA7066.1-8 4x15mere
 Gag Pool II EVA7066.9-16 4x15mere

2.4 Virologische und klinische Methoden

2.4.1 Zellassozierte Viruslast

Mit dieser Methode lässt sich die Anzahl produktiv SIV-infizierter PBMCs ermitteln. Hierfür werden PBMCs aus SIV-infizierten Rhesusaffen mit C8166-Zellen in verschiedenen Verdünnungen kultiviert, um damit die Anzahl der infizierten Zellen zu titrieren; der Virusnachweis erfolgt mit einem p27 ELISA.

Material:

- PBS
- RPMI-10%: RPMI 1640 supplementiert mit 10 % FKS, L-Glutamin, 2mM L-Glutamin, 10 u/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin, 0,25 µg/ml Amphotericin B.
- FKS
- C8166 Zellen, kultiviert in RPMI-10%, gewaschen, gezählt und auf einen Titer von $1,33 \times 10^4$ /ml in RPMI-10% eingestellt.
- 96-Loch Kulturplatten (U-Form)

Methode:

1. Zunächst werden die PBMC infizierter Affen über einen Ficoll-Gradienten isoliert und auf einen Ausgangstiter von 4×10^6 PBMCs/ml in RPMI-10% eingestellt.
2. Mit dieser PBMC-Suspension wird nun eine Verdünnungsreihe mit 1:5 Verdünnungen angelegt (insgesamt acht Verdünnungen).
3. Die Verdünnungen werden nun in Triplikaten mit je 100 µl pro Loch auf 24-Loch Kulturplatten gegeben, in welche zuvor 1000 µl pro Loch einer C8166-Suspension mit einem Titer von 1×10^6 /ml gegeben wurde.
4. Die Zellen werden nun sieben Tage bei 37°C in einem CO₂ Brutschrank kokultiviert
5. Nach der Kultivierung werden der resuspendierten Kokultur 90 µl entnommen, die durch Zugabe von 10 µl 2% Tween20-Lösung lysiert werden. Das entstandene Lysat wird für einen p27 ELISA verwendet. Es wird die TCID₅₀ der PBMC-Proben ermittelt und damit die Anzahl infizierter Zellen/ Millionen PBMCs.

2.4.2 Messung der Viruslast im Plasma (real time RT-PCR)

Um die periphere Plasmaviruslast in SIVagm-infizierten AGM zu quantifizieren wurde eine quantitative RT-PCR etabliert. Bei der real time PCR werden die akkumulierenden PCR-Produkte während der Reaktion laufend detektiert, dadurch wird ein Detektionssystem im Anschluss an die PCR überflüssig. Möglich wird dies durch den Einsatz einer fluoreszenzmarkierten Sonde in Kombination mit der 5'-3'-Nuklease-Aktivität der Taq-Polymerase. Die Verwendung einer Standardreihe ermöglicht eine Quantifizierung der in den Proben vorhandenen Viruslast.

Herstellung der Standards

Mit Hilfe der *in vitro* Transkription (SP6 Kit, Promega) wurde ein zuvor kloniertes 301 bp Fragment aus SIVmac *gag* (Plasmid: pCR-Blunt II Topo, Invitrogen) aus einzelsträngiger RNA hergestellt. Diese Nucleinsäure wurde mit DNase I behandelt und mit Silicagelsäulen gereinigt (QIAquick, QIAGEN). Dessen Reinheit und Konzentration in wässriger Lösung wurde photometrisch bestimmt, die Länge des Fragments in einem Formaldehyd/MESA-Agarosegel kontrolliert. Anschließend wurde eine Standardreihe hergestellt (10^2 - 10^7 Kopien/25 μ l).

Isolierung retroviraler RNA

Die Detergenz-Lyse setzt aus den Viruspartikeln das virale RNA-Genom frei. In Anwesenheit von chaotropen Salzen (Guanidin-HCl) bindet diese virale RNA selektiv an Glassfieberpartikel spezieller Zentrifugenröhrchen und bleibt während der folgenden Waschschrte gebunden. Eluiert wird mit Lösungen niedriger Salzkonzentration.

Eingesetzt wurde der High Pure Viral RNA Kit (Roche, Mannheim) und es wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurden 800 μ l Heparinplasma eingesetzt und mit 80 μ l Wasser eluiert.

Durchführung

Durchgeführt wurde eine Ein-Schritt-RT-PCR unter zu Hilfenahme eines OneStep-RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden).

Für die RT-PCR-Reaktion wurden 25 µl pro Reaktionsgefäß des folgenden 2x Reaktionsmix zugegeben:

Reagenzien:	Endkonzentration/50 µl:
5 x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	1x
Primer AVF (15 µM)	1,5 µM
Primer AVR (15 µM)	1,5 µM
Sonde AVS (20 µM)	1 µM
dNTP Mix (10mM)	jeweils 400 µM
MgCl ₂	3 mM
rRNase Inhibitor (Promega)	20 U
Qiagen Enzymmix (2 µl)	-
Rox Farbstoff	0,5 µM

Folgende Primer bzw. Sonde (Eurogentec, Belgien) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt:

SMGF-Primer: 5'-CTA GTG GTG GAA ACA GGA ACA-3'

SMGR-Primer: 5'-TGT TCT CGG GCT TAA TGG CA-3'

SMG-Sonde: 5'-**FAM** CCA ACA GCA CCA TCT AGC GGC AGA GGT **TAMRA**-3'

Die Sonde war am 3'-Ende phosphoryliert, um eine Extension zu verhindern. Nach Vorlage des Reaktionsmixes wurden je 25 µl Probe (isolierte Virus-RNA) bzw. Standard zugegeben. Die RT-Reaktion wurde für 30 min bei 50°C durchgeführt. Für die anschließende PCR wurde die Hotstart-Taq Polymerase durch Erhitzung auf 95°C für 15 min aktiviert. Dann folgten 45 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 94°C und 60 s Annealing/Extension bei 60°C.

Auswertung

Durchgeführt wurde die Reaktion in einem MX4000 real time PCR System (Stratagene, La Jolla, USA). Das Gerät detektiert nach jedem Zyklus die sich durch die Amplifikation verstärkende Fluoreszenz, wodurch letztlich die initiale Kopienzahl des Templates in einer Probe berechnet werden kann. Je weniger Zyklen dabei notwendig sind um ein Fluoreszenzsignal über einem festgelegten Schwellenwert zu generieren, desto größer ist die initiale Kopienzahl. Während der PCR-Reaktion kommt es durch eine Halogenlampe zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Die Emission zwischen 500 nm und 660 nm wird im Anschluss an jeden Annealing-/Extensions-Schritt gemessen.

Der Threshold Cycle (C_T) gibt den PCR-Zyklus an, bei dem zum ersten Mal ein über der Basislinie liegendes Fluoreszenzsignal gemessen wurde. Anhand der C_T -Werte der

Standardreihe kann eine Eichkurve erstellt werden, mit der sich die Start-Kopienzahlen in den Proben ermittelt lässt.

Die Detektionsgrenze für ein signifikantes Signal dieser real time RT-PCR liegt bei 100 Kopien/50 µl.

2.4.3 Messung der Provirusbelastung (real time PCR)

Um die provirale Virusbelastung zu quantifizieren wurde eine SIVmac-spezifische quantitative real time PCR verwendet. Zum Prinzip der real time PCR siehe 2.4.2. Es wurde hierfür die gleiche Primer/Sonden-Kombination wie für die real time RT-PCR eingesetzt.

Herstellung des Standards

Für die Erstellung der Standardkurve wurde Plasmid-DNA (mit dem SIVmac *gag* Gen) benutzt. Die Konzentration des Plasmids wurde photometrisch bestimmt und es wurde anschließend durch Verdünnung eine Standardreihe hergestellt (10^1 - 10^6 Kopien/25 µl).

DNA-Isolierung

Unter Verwendung eines DNA Isolierungs-Kits (QIAamp Blood Kit, Qiagen, Hilden) wurde aus 5×10^5 PBMCs laut Protokoll des Herstellers DNA präpariert, welche später in der PCR eingesetzt wurde. Hierbei wurden die Zellen zunächst lysiert und auf eine Silica-Membran zur Adsorption der DNA überführt. Anschließend wurden Proteine, Salze und andere Verunreinigungen durch Waschen entfernt und die DNA konnte mit 100 µl Aqua dest. eluiert werden.

Durchführung

Für die PCR-Reaktion wurden 25µl pro Reaktionsgefäß des folgenden 2x Reaktionsmix zugegeben:

Reagenzien:	Endkonzentration/50 µl:
10 x PCR-Puffer	1x
Primer AVF (15 µM)	1,5 µM
Primer AVR (15 µM)	1,5 µM
Sonde AVS (20 µM)	1 µM
dNTP Mix (10mM)	jeweils 400 µM
MgCl ₂	3 mM
HotStart Taq-Polymerase, QIAgen (5U/µl)	0,025 U/µl
Rox Farbstoff	0,5 µM

Folgende Primer bzw. Sonde (Eurogentec, Belgien) wurden für die PCR-Reaktion eingesetzt:

SMGF-Primer: 5'-CTA GTG GTG GAA ACA GGA ACA-3'

SMGR-Primer: 5'-TGT TCT CGG GCT TAA TGG CA-3'

SMG-Sonde: 5'-FAM CCA ACA GCA CCA TCT AGC GGC AGA GGT TAMRA-3'

Nach Vorlage des Reaktionsmixes wurden je 25 µl Probe (isolierte DNA) bzw. Standard zugegeben.

Die PCR wurde mit der Aktivierung der Hotstart-Taq Polymerase durch Erhitzung auf 95°C für 15 min gestartet. Dann folgten 45 Zyklen mit je 15 s Denaturierung bei 94°C und 60 s Annealing/Extension bei 60°C.

Die Auswertung erfolgt wie zuvor bei der real time RT-PCR. Als Nachweisgrenze für eine signifikante Reaktion lag hier bei 10 Kopien/50 µl PCR-Reaktionsansatz.

2.4.4 Analyse der absoluten CD4⁺ T-Zell und CD8⁺ T-Zell Zahlen in PBMCs

Ein klinischer Parameter bei der Beobachtung von HIV/SIV Infizierten ist die absolute Anzahl der CD4⁺ T-Zellen. Mit fortschreitender Infektion sinkt diese Zahl stetig bis bei einem Abfall von unter 200 CD4⁺ T-Zellen die klinische Phase beginnt. Im späteren Verlauf dieser Phase fällt auch die Zahl der CD8⁺ T-Zellen immer weiter ab. Durch die regelmäßige Messung, vor allem der CD4⁺ T-Zellzahlen, lässt sich also die Krankheitsprogression relativ gut darstellen. Die Anzahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wird durch Färbung mit markierten Antikörpern im Durchfluss-Zytometer festgestellt, gleichzeitig wird das hierfür benötigte Volumen durch Beads ermittelt, deren Anzahl während der Messung ebenfalls festgehalten wird und deren Gesamtzahl im Ansatz bekannt ist.

Material:

- TruCount Röhrchen (BD), enthält eine definierte Anzahl von Beads
- MultiTEST CD3 FITC/CD8 PE/CD45 PerCP (BD)
- MultiTEST CD3 FITC/CD4 PE/CD45 PerCP (BD)
- 1xFACS Lysing Solution (BD)

- Durchfluss-Zytometer, FACS-Calibur (BD)

Methode:

1. 20 µl der jeweiligen MultiTEST Antikörperlösung wird auf die Blende eines TruCount Röhrchens pipettiert.
2. 50 µl gut gemischtes Vollblut wird ebenfalls auf die Blende des Röhrchens gegeben
3. Das geschlossenen Röhrchen wird gut durchmischt und 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.
4. 450 µl 1x FACS Lysing Solution werden in das Röhrchen gegeben und gemischt. Danach erfolgt nochmals eine Inkubation im Dunkeln von 15 min bei Raumtemperatur
5. Die gefärbte Probe kann nun im Durchfluss-Zytometer vermessen werden.
6. Die Auswertung erfolgt nach Herstellerangabe (BD, Protokoll 23-3600-01).