

**Analyse von Surrogatmarkern
zur Beurteilung der Effizienz der
antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART)**

und

**Entwicklung einer
HIV-1-Immunisierungsstrategie
mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich für
Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Jeanette Neumann
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2002

***Der Zweifel ist der Beginn der Wissenschaft. Wer nichts anzweifelt, prüft nichts.
Wer nichts prüft, entdeckt nichts. Wer nichts entdeckt, ist blind und bleibt blind.***

Teilhard de Chardin (1881-1955)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS (HIV)	1
1.1.1	ENTDECKUNG DER IMMUNDEFIZIENZVIREN	1
1.1.2	GENOMSTRUKTUR UND MORPHOLOGIE VON HIV-1	3
1.1.3	REPLIKATIONSZYKLUS VON HIV-1	5
1.1.4	HIV-PATHOGENESE	7
1.1.5	HIV UND IMMUNITÄT	9
1.1.5.1	HUMORALE IMMUNANTWORT	10
1.1.5.2	ZELLULÄRE IMMUNANTWORT	11
1.2	STRATEGIEN ZUR BEKÄMPFUNG DES HUMANEN IMMUNDEFIZIENZVIRUS	14
1.2.1	ANTIRETROVIRALE THERAPIE	14
1.2.2	STRATEGIEN ZUR IMPFSTOFFENTWICKLUNG GEGEN HIV	16
1.3	RETROVIRALE VEKTOREN	19
1.3.1	PSEUDOTYPISIERUNG RETROVIRALER VEKTOREN	20
1.3.2	GENTRANSFER IN PRIMÄRE PERIPHERE MONONUKLEÄRE BLUTZELLEN	21
1.4	ZIELSETZUNG	23
2	MATERIALIEN UND METHODEN	24
2.1	MATERIALIEN UND METHODEN DER MOLEKULARBIOLOGIE	24
2.1.1	PLASMIDE UND VEKTOREN	24
2.1.1.1	VERWENDETE PLASMIDE ZUR HERSTELLUNG DES TRANSFERVEKTORS PMGΔENV/TAT/REV/ΔLNGF	24
2.1.1.2	VERWENDETE PLASMIDE FÜR TRANSIENTE TRANSFEKTIONEN	25
2.1.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION	26
2.1.3	OLIGONUKLEOTIDE	27
2.1.4	FUSIONS-PCR	28
2.1.5	NUKLEOTIDSEQUENZBESTIMMUNG	30
2.1.6	RESTRIKTION, LIGATION UND DEPHOSPHORYLIERUNG VON PLASMID-DNA	30
2.1.7	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	31
2.1.8	AUFREINIGUNG VON PCR-AMPLIFIKATEN	31
2.1.9	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	31
2.1.10	TRANSFORMATION	32
2.1.11	PLASMIDPRÄPARATION	32
2.1.12	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS EUKARYOTISCHEN ZELLEN	33
2.2	MATERIALIEN UND METHODEN DER ZELLKULTUR	33
2.2.1	ZELLEN UND MEDIEN	33
2.2.1.1	KULTIVIERUNG VON ADHÄRENTEN ZELLINIEN	33
2.2.1.2	KULTIVIERUNG VON SUSPENSIONSZELLINIEN	34

2.2.2.	PRÄPARATION PRIMÄRE PERIPHERER MONONUKLEÄRE BLUTZELLEN (PBMC)	34
2.2.3	KULTIVIERUNG VON PBMC	35
2.2.4	PLASMAGEWINNUNG NACH PBMC-ISOLATION	35
2.2.5	ETABLIERUNG EINER STABILEN VERPACKUNGSZELLINIE	36
2.2.6	EINFRIEREN UND LAGERUNG VON ZELLEN	36
2.2.7	AUFTAUEN VON ZELLEN	36
2.2.8	TRANSFEKTION MITTELS LIPOFEKTAMIN™	37
2.2.9	GENERIERUNG VON [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN	37
2.2.10	HERSTELLUNG RETRONEKTIN-BESCHICHTETER ZELLKULTURPLATTEN ZUR TRANSDUKTION VON RHESUS-PBMC	38
2.2.11	TRANSDUKTION PRIMÄRE LYMPHOZYTEN	38
2.2.12	TRANSDUKTION VON ZELLINIEN	39
2.2.13	VEKTORTITRATION	39
2.2.14	SYNZYTIENINDUKTIONSSASSAY	40
2.2.15	MAGNETISCHE ZELLSORTIERUNG (MAGNETIC CELL SORTING, MACS)	40
3.2.16	ANALYTISCHE DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING, FACS)	41
3.2.17	TEST AUF VIRALE REVERSE TRANSKRIPTASE AKTIVITÄT (RT-TEST)	43
2.3	METHODEN DER SEROLOGIE UND IMMUNOLOGIE	44
2.3.1	VERWENDETE SEREN FÜR DIE KLINISCHE STUDIE	44
2.3.2	VERWENDETE SEREN ZUR MESSUNG DER HUMORALEN IMMUNANTWORT NACH IMMUNISIERUNG	44
2.3.3	IN-SITU-IMMUN-PEROXIDASE-ASSAY (IPA)	44
2.3.4	ENZYME-LINKED-IMUNO-SORBANT-ASSAY (ELISA)	45
2.3.4.1	NACHWEIS DER β -CHEMOKINE MIP-1 α , MIP-1 β UND RANTES UND DES INTERLEUKINS IL-16	45
2.3.4.2	NACHWEIS TRANSFERGEN-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	46
2.3.4.3	NACHWEIS HIV- 1-GP120-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	47
2.3.4	NACHWEIS NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER	47
2.3.5	NACHWEIS VON CYTOTOXISCHEN T-LYMPHOZYTEN (CTLs) IM ELISPOT	48
2.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	49
2.4.1	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	49
2.4.1.1	AUFBEREITUNG DER PROBEN	49
2.4.2	WESTERN-BLOT	50
3	ERGEBNISSE	52
3.1	ANALYSE VON SURROGATMARKERN ZUR BEURTEILUNG DER EFFIZIENZ DER ANTIRETROVIRALEN KOMBINATIONSTHERAPIE (HAART)	52
3.1.1	AUFBAU DER KLINISCHEN STUDIE	52
3.1.2	VERGLEICH DES AKTIVIERUNGSSTATUS CD8 ⁺ T-ZELLEN VON HAART-RESPONDERN UND -NON-RESPONDERN	53
3.1.3	VERGLEICH DER β -CHEMOKIN- UND IL-16-SERUMKONZENTRATIONEN VON HAART-RESPONDERN UND -NON RESPONDERN	55

3.1.4	VERGLEICH DER β -CHEMOKIN- UND IL-16-KONZENTRATIONEN IM ZELLKULTURÜBERSTAND AKTIVIERTER CD8 ⁺ T-ZELLEN VON HAART-RESPONDERN UND -NON-RESPONDERN.....	57
3.1.5	DER EINFLUSS DER VIRUSLAST AUF DIE CYTOKIN-SEZERNIERUNG VON CD8 ⁺ T-ZELLEN IN VITRO	59
3.2	ENTWICKLUNG EINER HIV-1-IMMUNISIERUNGSSTRATEGIE MITTELS [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN	60
3.2.1	ENTWICKLUNG EINES MLV-ABGELEITETEN TRANSFERVEKTORS FÜR DIE VIRALEN ANTIGENE TAT, REV UND ENV	60
3.2.2	GENERIERUNG VON [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN	62
3.2.2.1	NACHWEIS DER EXPRESSION DER VIRALEN TRANSFERGENE NACH TRANSIENTER TRANSFEKTION DES MLV-ABGELEITETEN TRANSFERVEKTORS pMG Δ ENV/TAT/REV/ Δ LN Δ FR	62
3.2.2.2	FUNKTIONALITÄT DES IM TRANSFERVEKTOR KODIERTEN SHIV-HÜLLPROTEINS IM SYNZYTIENINDUKTIONSSASSAY	63
3.2.2.3	VERPACKBARKEIT DES TRANSFERVEKTORS IN [MLV(VSV-G/SHIV)]-VEKTORPARTIKEL	64
3.2.2.4	GENTRANSFER-EFFIZIENZ DER TRANSIENT HERGESTELLTEN [MLV(SHIV)]-VEKTORPARTIKEL IN CD4 ⁺ T-ZELLEN	65
3.2.2.5	ETABLIERUNG EINER STABILEN VERPACKUNGSZELLINIE FÜR DEN TRANSFERVEKTOR pMG Δ ENV/TAT/REV/ Δ LN Δ FR	66
3.2.2.6	EXPRESSION DER SHIV-TRANSFERGENE IN DER VERPACKUNGSZELLINIE	67
3.2.2.7	FUNKTIONALITÄT DES IM TRANSFERVEKTOR KODIERTEN UND AUF DER OBERFLÄCHE DER VPCL EXPRIMIERTEN SHIV-HÜLLPROTEINS IM SYNZYTIENINDUKTIONSSASSAY	68
3.2.2.8	TRANSDUKTION VON [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN IN CD4 ⁺ CXCR4 ⁺ BZW. CD4 ⁺ CCR5 ⁺ GHOST-ZELLEN UND CD4 ⁺ CCR5 ⁺ MYELOIDEN U937-ZELLEN.....	68
3.2.3	GENTRANSFER VON [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN IN PBMC (PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS) AUS RHESUSAFFEN.....	69
3.2.3.1	OPTIMIERUNG DER TRANSDUKTIONSBEDINGUNGEN FÜR EINEN EFFIZIENTEN GENTRANSFER IN RHESUS-PBMC	69
3.2.3.2	TRANSDUKTION VON RHESUS-PBMC MIT [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN	71
3.2.3.3	<i>IN VITRO</i> KINETIK DER MIT [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN TRANSDUZIERTEN RHESUS-PBMC	73
3.2.3.4	AUSSCHLUß VON REPLIKATIONSKOMPETENTEN RETROVIREN (RCRs)	75
3.2.4	IMMUNISIERUNGSSTUDIE IM RHESUSAFFEN-TIERMODELL	77
3.2.4.1	EXPERIMENTELLES DESIGN DER IMMUNISIERUNGSTUDIE.....	77
3.2.4.2	PARAMETER ZUR ANALYSE DER ZUR TRANSPLANTATION EINGESETZTEN AUTOLOGEN PBMC	78
3.2.4.2.1	AKTIVIERUNG UND PROLIFERATION DER RHESUS-PBMC	78
3.2.4.2.2	VIABILITÄT DER RHESUS-PBMC.....	80
3.2.4.2.3	ANZAHL DER ZUR TRANSPLANTATION EINGESETZTEN TRANSFERGEN-POSITIVEN RHESUS-PBMC.....	82
3.2.5	NACHWEIS DER TRANSPLANTIERTEN TRANSFERGEN-POSITIVEN ZELLEN <i>IN VIVO</i>	83
3.2.6	INDUKTION EINER HUMORALEN UND ZELLULÄREN IMMUNANTWORT NACH TRANSPLANTATION DER TRANSFERGEN-EXPRIMIERENDEN AUTOLOGEN PBMC IN EINEN RHESUSAFFEN ..	85
3.2.6.1	INDUKTION EINER HUMORALEN IMMUNANTWORT.....	85
3.2.6.1.1	NACHWEIS VON TRANSFERGEN-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN.....	85
3.2.6.1.2	NACHWEIS VON HIV-1-GP120-SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN.....	87
3.2.6.1.3	NACHWEIS HIV-1-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER MITTELS WESTERN-BLOT-ANALYSE	88
3.2.6.1.4	NACHWEIS NEUTRALISIERENDER ANTIKÖRPER	89

3.2.6.2	INDUKTION EINER HIV-SPEZIFISCHEN ZELLULÄREN IMMUNANTWORT NACH TRANSPLANTATION AUTOLOGER <i>EX VIVO</i> TRANSDUZierter PBMC.....	91
3.2.6.2.1	NACHWEIS EINER REV-SPEZIFISCHEN CTL-AKTIVITÄT	92
3.2.6.2.2	NACHWEIS EINER ENV-SPEZIFISCHEN CTL-AKTIVITÄT	93
3.2.6.2.3	BESTIMMUNG DER CTL-DETERMINANTEN IN DEN ZUR IMMUNISIERUNG EINGESETZTEN SHIV-TRANSFERGENEN	96
4	DISKUSSION	98
4.1	ANALYSE VON SURROGATMARKERN ZUR BEURTEILUNG DER EFFIZIENZ DER ANTI- RETROVIRALEN KOMBINATIONSTHERAPIE (HAART).....	98
4.1.1	VERGLEICH DES AKTIVIERUNGSSTATUS CD8 ⁺ T-ZELLEN VON HAART-RESPONDERN UND -NON-RESPONDERN.....	98
4.1.2	VERGLEICH DER β-CHEMOKIN- UND IL-16-SERUMKONZENTRATIONEN VON HAART- RESPONDERN UND -NON-RESPONDERN	99
4.1.3	VERGLEICH DER β-CHEMOKIN- UND IL-16-KONZENTRATIONEN IM ZELLKULTURÜBER- STAND AKTIVIERTER CD8 ⁺ T-ZELLEN VON HAART-RESPONDERN UND -NON- RESPONDERN	101
4.1.4	AUSBLICK	102
4.2	ENTWICKLUNG EINER HIV-1-IMMUNISIERUNGSSTRATEGIE MITTELS [MLV(SHIV)]- PSEUDOTYPVEKTOREN	104
4.2.1	EFFIZIENTER GENTRANSFER DER VIRALEN TRANSFERGENE <i>Tat</i> , <i>Rev</i> UND <i>Env</i> MITTELS EINES MLV-ABGELEITETEN TRANSFERVEKTORS.....	104
4.2.2	<i>IN VITRO</i> KINETIK DER MIT [MLV(SHIV)]-PSEUDOTYPVEKTOREN TRANSDUZIERTEN RHESUS-PBMC	107
4.2.3	AUSSCHLUß VON REPLIKATIONSKOMPETENTEN RETROVIREN (RCRs)	107
4.2.4	IMMUNISIERUNGSSTUDIE IM RHESUSAFFEN-TIERMODELL	108
4.2.5	NACHWEIS DER TRANSPLANTIERTEN TRANSFERGEN-POSITIVEN ZELLEN <i>IN VIVO</i>	109
4.2.6	INDUKTION EINER HIV-1-SPEZIFISCHEN HUMORALEN UND ZELLULÄREN IMMUNANTWORT NACH TRANSPLANTATION DER TRANSFERGEN-EXPRIMIERENDEN AUTOLOGEN PBMC.....	110
4.2.6.1	NACHWEIS EINER HIV-1-GP120-SPEZIFISCHEN HUMORALEN IMMUNANTWORT	111
4.2.6.2	NACHWEIS EINER HIV-1-REV-UND ENV-SPEZIFISCHEN ZELLULÄREN IMMUNANTWORT	113
4.2.7	AUSBLICK.....	114
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	118
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	134
8	DANKSAGUNG	137
9	LEBENS LAUF	138

1 Einleitung

Die weltweite Ausbreitung des humanen Immundefizienzvirus (Human Immunodeficiency Virus, HIV) hält seit seiner Entdeckung im Jahr 1983 trotz intensiver Anstrengungen in der Prävention und Entwicklung neuer Therapeutika mit dramatischer Geschwindigkeit an. Nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) liegt die Anzahl der HIV-Infizierten derzeit weltweit bei über 40 Millionen Menschen, von denen 90% in den Entwicklungsländern, vor allem in Afrika und Asien, leben. Die Zahl der Neuinfektionen wurde allein im Jahr 2001 auf rund 5 Millionen geschätzt. Man nimmt an, dass bis heute ca. 20 Millionen Menschen an den Folgen des „Acquired Immunodeficiency Syndrome“ (AIDS) gestorben sind (UNAIDS und WHO, 2001).

1.1 Das humane Immundefizienzvirus (HIV)

1.1.1 Entdeckung der Immundefizienzviren

Die zunächst als Immundefizienz-Syndrom definierte Erkrankung des Immunsystems wurde 1981 in den USA bei jungen amerikanischen Homosexuellen erstmals dokumentiert (Gottlieb *et al.*, 1981, Masur *et al.*, 1981). Neben einer voranschreitenden Abnahme der CD4-positiven (+) T-Zellen war diese Immundefizienz darüber hinaus in der symptomatischen Phase mit opportunistischen Infektionen, wie z. B. *Pneumocystis carinii*, *Candida albicans* und *Toxoplasma gondii*, neurologischen Ausfällen und dem Auftreten maligner Tumore (u. a. Karposi Sarkome und Lymphome) assoziiert (Ho *et al.*, 1995, Falk *et al.*, 1986, Shaw *et al.*, 1985), die 1982 vom Center for Disease Control (CDC) als AIDS zusammengefasst wurden. Aufgrund ähnlicher Krankheitssymptome bei Drogenabhängigen, Empfängern von Blutprodukten, Sexualpartnern von HIV-Infizierten und Kindern HIV-positiver Mütter wurde ein auf sexuellem, intravenösem bzw. perinatalem Wege übertragenes, infektiöses Agens vermutet. Im Jahre 1983 konnte dieses erstmals aus Lymphozyten eines HIV-1-infizierten Patienten isoliert (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983) und als neues, AIDS-verursachendes Retrovirus mit der Bezeichnung „Human Immunodeficiency Virus Type 1“ (HIV-1) identifiziert werden (Coffin *et al.*, 1986). Basierend auf genetischen Analysen des Hüllproteins Env teilt man HIV-1 in die Hauptgruppe M, die ihrerseits in 10 Subtypen (A-J) untergliedert ist, und die Hauptgruppe O ein, die seltenere Subtypen zusammenfasst (Myers *et al.*, 1994). In Europa und USA ist vor allem der Subtyp B prävalent, während der Subtyp E in Afrika und Sybtyp C

in Indien überwiegen. Darüber hinaus konnte ein neuer, aus Kamerun stammender Subtyp N identifiziert werden (Simon *et al.*, 1998).

Neben HIV-1 existiert noch ein weiterer HIV-Typ, der als HIV-2 bezeichnet wird und vorwiegend in West-Afrika in 5 Subtypen (A-E) endemisch ist (Myers *et al.*, 1996, Clavel *et al.*, 1986). Obwohl beide, HIV-1 und HIV-2, zu der Retrovirus-Unterfamilie der Lentiviren gehören, weisen sie in Sequenzvergleichen nur eine etwa 55%ige Homologie zueinander auf (Guyader *et al.*, 1987). HIV-2 steht phylogenetisch betrachtet dem 1985 erstmals aus Rhesusaffen (*Macaca mulata*) isolierten simianen Immundefizienzvirus (Simian Immundeficiency Virus, SIV (SIVmac)) mit einer Sequenzhomologie von etwa 75% weit näher (Hirsch V.M. *et al.*, 1989, Chakrabarti L. *et al.*, 1987). Diese den humanen Immundefizienzviren nahe verwandten simianen Lentiviren verursachen keine Krankheitssymptome in ihren natürlichen Wirten. Allerdings konnte man aus den in Gefangenschaft gehaltenen asiatischen Affenarten (Hirsch and Johnson, 1994) pathogene simiane Immundefizienzviren identifizieren, die AIDS-ähnliche Symptome in ihren Wirten induzieren (Hirsch and Johnson, 1994). Hierzu zählen die Isolate SIVmac (aus Rhesusaffen, *Macaca mulatta*) (Daniel *et al.*, 1985), SIVmne (aus Schweinsaffen, *Macaca nemestrina*) (Benveniste *et al.*, 1986) und SIVstm (*Macaca arctoides*) (Lowenstine *et al.*, 1992). Man vermutet, dass diese pathogenen Immundefizienzviren durch Transmission von SIVsm in die in Gefangenschaft lebenden asiatischen Affenarten entstanden sind (Hirsch and Johnson, 1994).

Aufgrund der Homologien zwischen der HIV-2- und SIV-Genom-Struktur, einschließlich dem Vorhandensein des akzessorischen Gens *vpx*, wird angenommen, dass HIV-2 evolutiv vom SIVsm abstammt. Man vermutet, dass dieses aus Halsbandmangaben (Sooty Mangabey Monkeys, *Cercocebus atys*) isolierte Lentivirus durch Zoonosis auf den Menschen übertragen wurde (Hahn *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 1996, Hirsch *et al.*, 1989). Für HIV-1 wird eine Transmission von SIVcpz, einem aus Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*) isolierten Lentivirus, auf den Menschen angenommen (Hahn *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 1999). Phylogenetische Untersuchungen weisen darauf hin, dass in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts erstmalig HIV-1 (Gruppe M) aufgetreten ist (Korber *et al.*, 2000) und sich bedingt durch die veränderten sozioökonomischen und politischen Verhältnisse in Afrika Ende der 50er Jahre pandemisch ausbreiten konnte (Hillis, 2000; Hahn *et al.*, 2000).

1.1.2 Genomstruktur und Morphologie von HIV-1

Das HI-Virus besitzt wie alle Retroviren zwei identische Einzelstrang-(+) RNA-Moleküle, die eine Länge von etwa 9,2 kb aufweisen (Luciw und Shaclett, 1993) und die viralen Strukturproteine des Virions (Gag) und der Membranhülle (Env) sowie die viralen Enzyme (Pol) kodieren. Sie weisen die Struktur einer eukaryotischen prozessierten mRNA auf, d.h. sie enthalten eine CAP-Struktur am 5'-Ende und ein polyadenyliertes 3'-Ende. Im 5'-Bereich befindet sich darüber hinaus eine Primer-Bindungsstelle, an die eine zelluläre tRNA gebunden ist. Die kodierenden Regionen werden von regulatorischen Sequenzwiederholungen, den sogenannten Long Terminal Repeats (LTR) flankiert, die Signale für die Integration des viralen Genoms in die zelluläre DNA, als auch für die Transkription und Polyadenylierung enthalten. Die LTR wird in die Regionen U3, R und R5, die an den Genomenden in gleicher Orientierung vorliegen, unterteilt.

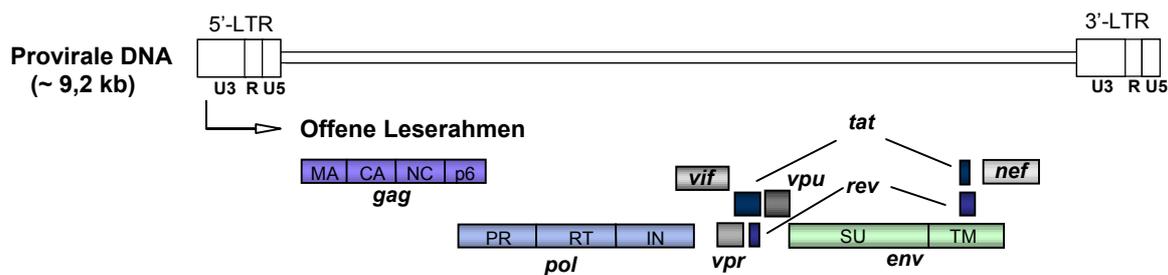


Abb. 1.1:
Genomstruktur des HIV-1 Provirus

Am 5'- und 3'-Ende des Provirus werden die offenen Leserahmen durch die LTR-Sequenzen flankiert, die aus der U3-, R- und U5-Region bestehen. Die provirale DNA kodiert für die Strukturproteine Gag und das Hüllprotein Env, als auch für die viralen Enzyme Pol, die regulatorischen Proteine Tat und Rev und die akzessorischen Proteine Nef, Vif, Vpr und Vpu.

Von den Leserahmen *gag*, *pol* und *env* werden Polyproteine translatiert, welche anschließend durch die virale Protease gespalten werden. Das Gag-Polyprotein wird erst bei der Partikelreifung in die viralen Strukturproteine Matrix (MA), Kapsid (CA), Nukleokapsid (NC) und dem Nukleokapsid-RNA-bindenden Protein p6 gespalten. Das Hüllprotein Env kodiert für das Oberflächen- (gp120-SU, surface) und Transmembran- (gp41-TM, transmembrane) Glykoprotein. Während Gag- und Env-Proteine strukturelle Komponenten des Virions und der Membranhülle sind, kodiert das *pol*-Gen für die drei essentiellen viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) (Frankel und Young, 1998).

Die Genome der humanen und simianen Immundefizienzviren enthalten darüber hinaus offene Leserahmen für die regulatorischen Gene *tat* und *rev*, sowie für die Gene *nef*, *vif*, *vpr*,

vpx oder *vpu* (nur bei HIV-1 und SIVcpz anstelle von *vpx*), die an der Regulation der Infektion und Replikation beteiligt sind.

Das Tat- (Trans-activator of transcription) Protein wirkt als Transaktivator der viralen Genexpression, indem es durch die Bindung an eine gefaltete mRNA-Struktur TAR (Trans-Activation Region) in der Nähe des Transkriptionsstartes die Synthese vollständiger viraler Transkripte ermöglicht. Rev (Regulator of expression of virion proteins) reguliert die virale Genexpression, indem es als Multimer an ein Rev-Responsive Element (RRE), einer RNA-Sequenz im Bereich des *env*-Gens, in allen einfach gespleißten und ungespleißten viralen mRNAs bindet. Rev ermöglicht somit den effizienten Transport dieser RNAs aus dem Kern und deren Translation. Für das Vif-Protein (Viral infectivity factor) wird eine Rolle bei der Produktion infektiöser Viruspartikel angenommen, indem es am Zusammenbau des Virions (*virus assembly*) und dessen Reifung beteiligt ist. Vpr (Viral protein rapid) ist am aktiven Kerntransport des viralen Präintegrationskomplexes in ruhenden Zellen beteiligt. Darüber hinaus ist Vpr durch Inhibition der p43^{cdc2}-Kinase-Aktivität in der Lage, einen Arrest in der G₂-Phase des Zellzyklus zu induzieren, der indirekt zu einer erhöhten Aktivität des viralen Promotors führt. Für Vpu (Viral protein out) sind zwei Funktionen beschrieben; die Stimulation der Freisetzung von Virionen und die Degradation des neusynthetisierten CD4-Rezeptors im ER. Diese verhindert eine Komplexbildung gleichzeitig synthetisierter viraler Hüll- und CD4-Proteine und erleichtert die Freisetzung von Env aus dem ER. Nef (Negative factor) ist das erste virale Protein, das in einer Zelle nach Infektion nachweisbar ist und von dem angenommen wird, dass es in Zusammenhang mit einer hohen Viruslast und der viralen Pathogenität steht. Nef bewirkt zum einen durch die Herunterregulation des CD4-Rezeptors eine erleichterte Freisetzung der Virionen, zum anderen durch die Herabregulation von MHC-I eine Inhibition der Zell-vermittelten Lyse von HIV-infizierten Zellen. Des Weiteren erhöht Nef die Replikationseffizienz und virale Infektiosität, die CD4-unabhängig zu sein scheint (Cullen, 1998).

Reife HIV-Partikel haben einen Durchmesser von etwa 100 nm und sind von einer Phospholipid-Doppelmembran umgeben, in der das in Trimeren vorliegende Transmembranprotein gp41 eingelagert ist. Dieses ist über nicht-kovalente Bindungen mit dem externen Glykoprotein gp120-SU assoziiert. Die Innenseite der Membran ist mit Matrixproteinen ausgekleidet, die mit dem konischen Kapsid verbunden sind. Im Inneren des Nukleokapsids befindet sich das virale Genom, das in Form von zwei identischen RNA-Molekülen vorliegt und mit Nukleokapsid-Proteinen komplexiert ist. Als weitere virale Komponenten befinden sich im Viruskapsid die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.

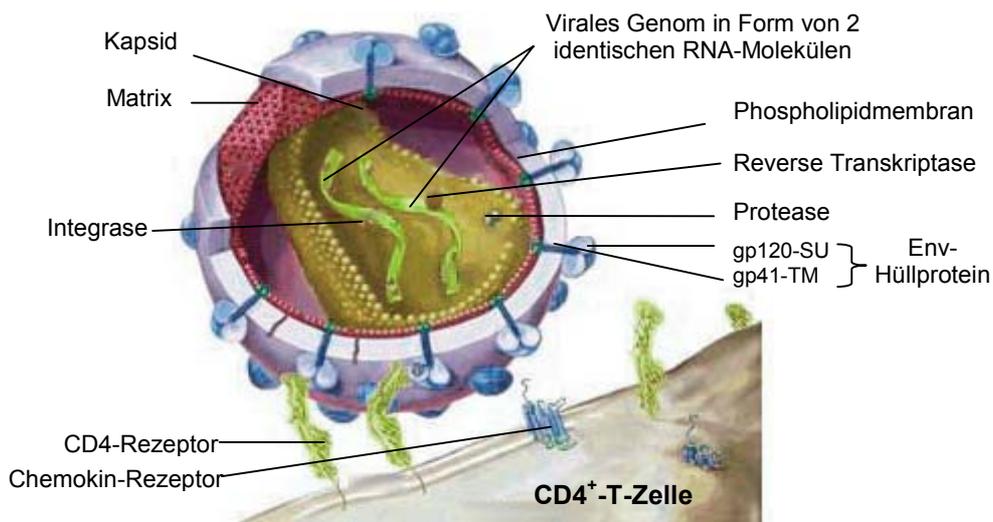


Abb. 1.2:
Schematischer Aufbau eines HIV-Partikels (modifiziert nach Abbas et al., 2000)

1.1.3 Replikationszyklus von HIV-1

Die Bindung des HI-Virus an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle stellt den initialen Schritt der Infektion dar. Der Zelleintritt von HIV wird dabei durch die Interaktion des trimerisierten viralen Glykoproteins gp120-SU mit dem CD4-Rezeptor der Zielzelle vermittelt. Dieser wird vor allem auf T-Lymphozyten, aber auch auf Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und Mikrogliazellen exprimiert (Clapham *et al.*, 1991, Klatzmann *et al.*, 1984). Zusätzlich zu diesem primären Rezeptor sind bestimmte Chemokin-Rezeptoren der Familie der CC- bzw. CXC-Rezeptoren als Korezeptoren an dem Eintritt von HIV in die Wirtszelle beteiligt (Feng *et al.*, 1996, Deng *et al.*, 1996, Alkhatib *et al.*, 1996). Der Wirtszelltropismus, d.h. die Infektion verschiedener Zelltypen durch bestimmte HIV-Isolate, wird durch die Verwendung unterschiedlicher Korezeptoren bestimmt (Cocchi *et al.*, 1996). Während der frühen Phase der Infektion treten CCR5- (R5-) spezifische oder vorwiegend Makrophagen- (M-) trope Varianten auf, die keine Synzytien (Bildung von Riesenzellen „Synzytien“ durch Zell-Zell-Fusionen) induzieren. In der symptomatischen Phase der Infektion dagegen treten die Synzytien induzierenden CXCR4-(X4-) oder T-Zell-tropen Varianten bzw. dualtrope R5X4-Varianten auf (Berger *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnten weitere Chemokinrezeptoren, wie CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, CCR9, V28 bzw. Chemokin-ähnliche Rezeptoren, wie GPR15 (BOB) und STRL33 (BONZO) identifiziert werden, die von HIV zwar benutzt werden, aber weitaus seltener den Zelleintritt für die virale Replikation vermitteln (Kanbe *et al.*, 1999, Berger *et al.*, 1999, Edinger *et al.*, 1999, Unutmaz *et al.*, 1998, Choe *et al.*, 1996, Doranz *et al.*, 1996). Durch die Bindung des viralen gp120-SU an den CD4-Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, die den V3-Loop, ein

Peptid-Loop in der dritten variablen Domäne des gp120-SU, zugänglich für die Bindung des Korezeptors macht. Der V3-Loop fungiert als primäre Korezeptor-Bindungsstelle und bestimmt somit den Virus-Tropismus (Cocchi *et al.*, 1996; Choe *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996). Die Korezeptor-Bindung induziert darüber hinaus eine Konformationsänderung im viralen Hüllprotein, die zu einer Exposition der gp41-Transmembran-Domäne sowie des N-terminalen Fusionspeptids führt. Dabei wird der engere Kontakt zwischen der viralen und zellulären Membran vermittelt und eine Membranfusion induziert (Chan *et al.*, 1997; Weissenhorn *et al.*, 1997). Das Nukleokapsid gelangt auf diese Weise in das Cytoplasma der Zielzelle. Hier kommt es zur Freisetzung der viralen RNA und der Enzyme, die zur Initiation der Replikation und Integration notwendig sind (*uncoating*). Die virale RNA wird unter der Mitwirkung der als Primer dienenden tRNA von der viruseigenen Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in DNA umgeschrieben (Morrow *et al.*, 1994). Da die virale RT keine „proof reading“-Aktivität besitzt, kann es zum fehlerhaften Einbau von Nukleotiden kommen, die zur Variabilität des Virus beitragen (Preston *et al.*, 1988). Aus den Enzymen der Reversen Transkriptase und Integrase, sowie der viralen DNA, den Matrixproteinen und Vpr-Molekülen bildet sich der Präintegrationskomplex, der aktiv in den Zellkern transportiert wird. Im Zellkern vermittelt die virale Integrase die Integration der Virus-DNA in das Zellgenom. Das Provirus wird dann bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. In Abhängigkeit vom Aktivitätszustand der Zelle wird das Provirus entweder transkribiert oder liegt latent vor (Stevenson *et al.*, 1990). Die latent infizierten Zellen stellen ein Reservoir an HI-Viren dar. Im Falle einer T-Zell-Aktivierung kommt es zur Transkription der proviralen DNA durch die zelluläre RNA-Polymerase II. Während der frühen Phase werden zunächst mehrfach gespleißte mRNAs gebildet, die nach dem Export aus dem Zellkern im Cytoplasma translatiert werden. Die im Cytoplasma synthetisierten essentiellen regulatorischen Proteine Tat, Rev und Nef werden in den Zellkern transportiert und führen hier zu einer verstärkten Transkription und zur Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs. Diese dienen nach dem Transport in das Cytoplasma sowohl zur Translation der viralen Strukturproteine und der akzessorischen Polypeptide, als auch als Virusgenome, die an der Cytoplasmamembran mit viralen Proteinkomponenten aggregieren (*assembly*). In der Folge kommt es zur Knospung unreifer Viruspartikel von der Zelloberfläche. Während des Ausknospens (*budding*) der Viruspartikel aus der Wirtszelle erfolgt die Einlagerung des viralen Hüllproteins und die Reifung zu infektiösen Viren durch Spaltung der Vorläuferproteine durch die virale Protease (Freed, 1998).

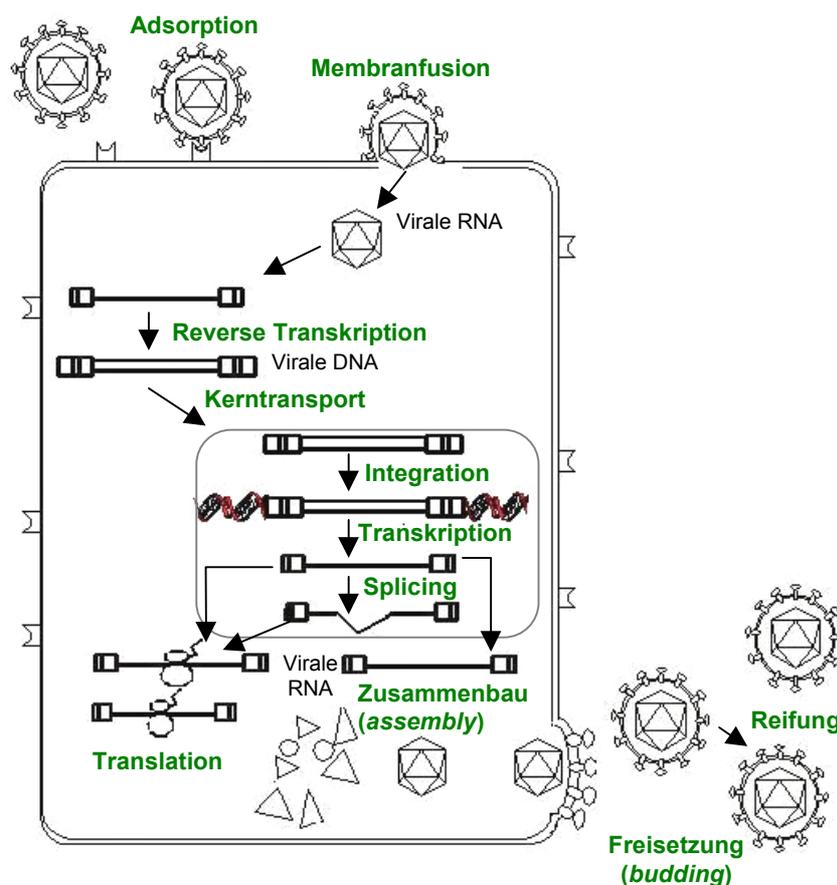


Abb. 1.3:
Schematische Darstellung der einzelnen Prozesse während des viralen Replikationszyklus von HIV-1

1.1.4 HIV-Pathogenese

Humane und simiane Immundefizienzviren werden der Gattung der Lentiviren zugeordnet, die ihrerseits der Familie der *Retroviridae* angehören. Lentiviren verursachen lebenslange Infektionen mit unterschiedlichen Krankheitsbildern, denen ein langsam voranschreitender und degenerativer Krankheitsverlauf gemeinsam ist (Narayan, 1989). Aufgrund ihrer langen Latenzzeit bezeichnet man sie auch als langsame Viren (*slow virus*).

Die HIV-Infektion kann in drei Phasen gegliedert werden: die akute Phase der Primärinfektion, die asymptomatische und die symptomatische Phase, in der es zum Ausbruch von AIDS kommt. Die 8 bis 12 Wochen andauernde akute Phase der Primärinfektion ist gekennzeichnet durch eine starke Virusvermehrung (bis zu 10^7 RNA-Kopien/ml Plasma) mit einem gleichzeitigen vorübergehenden Absinken der $CD4^+$ -Lymphozyten auf 500 Zellen/ml, deren Zahl nach der primären Virämie wieder leicht ansteigt (Reimann *et al.*, 1994, Tindall und Cooper *et al.*, 1991). Die initiale Infektion verläuft häufig klinisch inapparent, es können jedoch auch grippeähnliche Symptome mit Lymphknoten-

schwellungen auftreten (Cooper *et al.*, 1985). Gleichzeitig mit dem Auftreten der antiviralen Immunantwort sinkt die Virusbelastung auf ein konstant niedriges Niveau von etwa $10^3 - 10^6$ Partikel/ml Plasma (Finzi und Siliciano, 1998). Dieses Niveau der HIV-RNA-Konzentration im Plasma, das sich während der asymptomatischen Phase, d.h. 6 bis 12 Monate nach der Infektion individuell einstellt, gilt als wichtiger Progressionsmarker bezüglich der Dauer und Symptomatik der asymptomatischen Phase (Mellors *et al.*, 1996, O'Brian *et al.*, 1996). Im Gegensatz zu der Senkung der Viruslast im Plasma, bleibt diese in den Lymphknoten, die ein Reservoir für das Virus darstellen, unverändert hoch. In dieser Phase ist in den Lymphknoten eine starke Anreicherung infizierter Zellen sowie mit Antikörpern komplexierter Viren nachweisbar, die absorbiert in einem Netzwerk aus follikulär dendritischen Zellen (FDC) am Verlassen der Lymphknoten gehindert werden (Pantaleo *et al.*, 1993a). Obwohl die asymptomatische Phase gekennzeichnet ist durch eine relativ geringe und konstante Virusbelastung, ist der Virus-Umsatz extrem hoch. Untersuchungen der Virusdynamik zeigten eine Freisetzung von etwa 10^{10} infektiösen Viruspartikeln/Tag, die jedoch unter der Kontrolle des Immunsystems rasch eliminiert werden. Die Halbwertszeit von produktiv infizierten $CD4^+$ T-Zellen liegt bei 1,6 Tagen, die freier Viruspartikel bei 6 Stunden (Perelson *et al.*, 1997, Perelson *et al.*, 1996, Ho *et al.*, 1995, Wei *et al.*, 1995). In dieser Phase stellt sich somit ein scheinbar dynamisches Gleichgewicht (*steady state*) zwischen Virus-Produktion und -Elimination ein, dessen enormer Umsatz jedoch mit verantwortlich ist für den graduellen Verlust der $CD4^+$ T-Zellen. Die symptomatische Phase, die nach der 8 bis 10 Jahre dauernden Latenzzeit in einem Zusammenbruch dieses Gleichgewichts in Erscheinung tritt, ist durch einen massiven Anstieg der Viruslast und einem gleichzeitigen Versagen der Immunreaktionen, sowie durch einem dramatischen Abfall der $CD4^+$ T-Zellzahl auf unter 200 Zellen/ μ l Blut gekennzeichnet. In dieser Phase unterliegt das HIV-Genom einer hohen Mutationsrate, sodass unter dem gleichzeitigen Selektionsdruck durch das Immunsystem die viralen Epitope einer kontinuierlichen Veränderung unterliegen und dem humoralen und zellulären Abwehrmechanismus entgehen. Darüber hinaus verändern die Viren ihre Replikationseigenschaften und zeigen einen veränderten Zelltropismus. Während in der frühen Infektionsphase M-trope HIV-1-Stämme nachweisbar sind, die CCR5 als Korezeptor nutzen, treten im späteren Verlauf der Infektion Virusvarianten auf, die ein erweitertes Korezeptorspektrum, darunter auch CXCR4 benutzen. Dieser Wechsel der Korezeptornutzung von CCR5 zu CXCR4 wird mit einer Krankheitsprogression in das AIDS-Stadium korreliert (Xiao *et al.*, 1998, Connor *et al.*, 1997). Im AIDS-Stadium kommt es zu einer Zerstörung der Architektur der Lymphknoten und zu einer Auflösung des Netzwerkes der FDCs sowie der Keimzentren, sodaß in der Folge die von den $CD4^+$ T-Zellen produzierten Viren in das periphere Blut gelangen. Die Abnahme der $CD4^+$ T-Zellzahl ist nicht alleine durch die beschleunigte Zerstörung der reifen T-Zellen und der damit bedingten

Ausschöpfung des Immunsystems erklärbar (Ho *et al.*, 1995, Wei *et al.*, 1995), sondern auch durch die beeinträchtigte Produktion der T-Zellen im Knochenmark, Thymus und Lymphknoten bedingt (McCune, 2000). Die Zerstörung reifer CD4⁺ T-Zellen ist auf die direkte zytolytische Wirkung des Virus sowie auf Apoptose-Mechanismen und die Elimination der infizierten Zellen durch cytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen zurückzuführen. Die beeinträchtigte T-Zellproduktion ist durch Virus-assoziierte Effekte, wie dem Infektionsvermittelten Tod der Vorläuferzellen und der Zerstörung des unterstützenden, für die Hämatopoese nötigen Stromalen Netzwerkes bzw. auf indirekte Viruseffekte erklärbar. So ist das AIDS-Stadium symptomatisch u.a. gekennzeichnet durch generalisierte Lymphadenopathie, neurologischen Symptomen, opportunistischen Infektionen und Zytokin-Dysfunktionen (McCune, 2001). Darüber hinaus kommt es zu einer Verschiebung des Th1-Zytokinprofils zum Th2-Profil und einer dadurch bedingten Schwächung der zellulären Immunabwehr, die schließlich zum Tod führt (Pantaleo *et al.*, 1993, Miedema *et al.*, 1990).

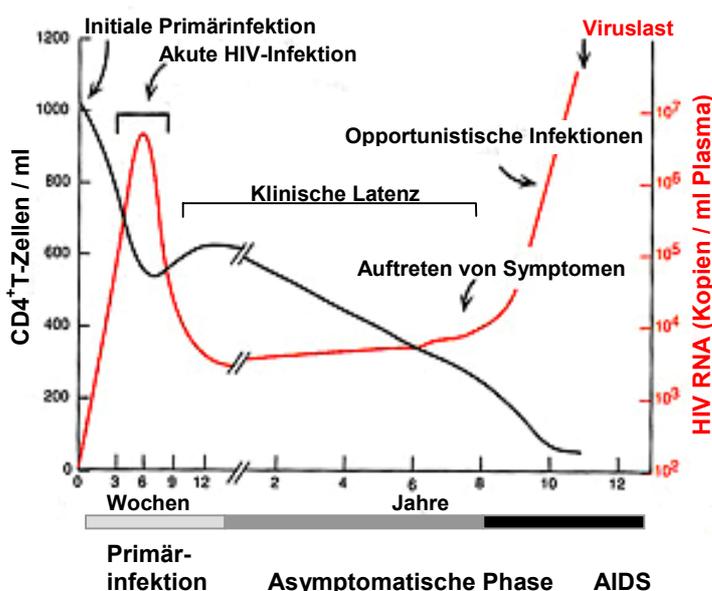


Abb. 1.4:
Klinischer Verlauf der HIV-1-
Infektion (modifiziert nach
Abbas *et al.*)

1.1.5 HIV und Immunität

Obwohl beide Zweige des Immunsystems, die humorale als auch die zelluläre Immunantwort, durch die HIV-Infektion aktiviert werden, ist die Immunabwehr weder in der Lage das Virus vollständig zu eliminieren noch die Infektion dauerhaft zu kontrollieren, sodass die Virus-induzierte Immundefizienz mit einem Anstieg der opportunistischen Infektionen zum Tod von HIV-Infizierten führt (Nowak und McMichael, 1995, Pantaleo, 1997a).

1.1.5.1 Humorale Immunantwort

Bereits innerhalb weniger Wochen nach HIV-Infektion sind Virus-spezifische Antikörper, die hauptsächlich gegen die Strukturproteine Gag und Env gerichtet sind, nachweisbar (Graham 1994, Morre *et al.*, 1994). Darunter befinden sich auch neutralisierende Antikörper, die vor allem gegen das virale gp120-SU gerichtet sind. Diese sind durch Bindung an den V3-Loop, dem primären Neutralisationsepitop von HIV-1, in der Lage, die Infektion oder Internalisierung von freien Viruspartikeln zu verhindern (Golding *et al.*, 1994, Dimmock, 1993). Während der asymptomatischen Phase sind Antikörper gegen fast alle viralen Proteine nachweisbar (Burton und Montefiori, 1997). Die entscheidende Rolle von neutralisierenden Antikörpern bei viralen Infektionen (Fish *et al.*, 1979, Hunsmann *et al.*, 1975) wird bei der HIV-Infektion durch die hohe Variabilität des viralen Genoms, vor allem im V3-Bereich, als auch durch die Existenz verschiedener Subtypen von HIV erschwert. So können zwar während der asymptomatischen Phase hohe Titer neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden, die jedoch eine breite Kreuzreaktivität für eine effiziente Virusneutralisierung aufweisen müssen. Aufgrund der hohen Mutations- und Replikationsrate von HIV können Virusvarianten entstehen, die sich als sogenannte „Fluchtmutanten“ der Antikörperantwort entziehen. Darüber hinaus konnten Env-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, die eine infektionsverstärkende Wirkung (*enhancement*) vermitteln (Fust, 1995). Diese Antikörper fördern möglicherweise die Bindung des Virus-Antikörper-Komplexes an Fc-Rezeptoren (Homsy *et al.*, 1989) oder Komplement-Rezeptoren (Robinson *et al.*, 1991) der Zielzellen (z.B. Makrophagen).

Die Virolyse von infizierten Zellen und von einer Lipidhülle umgebenen Viruspartikeln kann durch das Komplementsystem (Hirsch, 1982) oder unter Vermittlung von Antikörpern erfolgen (Sissons und Oldstone, 1980). Die Epitope dieser Antikörper liegen vor allem im Transmembranbereich gp41 des viralen Hüllproteins (Marschang *et al.*, 1997). So konnten verschiedene HIV-Stämme *in vitro* zwar eine Komplementaktivierung in Patienten-Seren hervorrufen (Stoiber *et al.*, 1997, Sullivan *et al.*, 1996, Spear *et al.*, 1990), *in vivo* scheinen HI-Viren jedoch durch den Einbau bestimmter zellulärer Proteine in das virale Hüllprotein vor dem Komplementsystem geschützt zu sein (Marschang, 1995, Montefiori, 1994). Antikörper gegen gp120-SU und gp41-TM sind in der Lage, eine antikörperabhängige zelluläre Cytotoxizität (ADCC) zu vermitteln. Hierbei werden Zellen, die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Oberfläche aufweisen von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) oder von anderen Monozyten, die Rezeptoren für Immunglobuline (Ig) auf ihrer Oberfläche tragen, durch den Fc-Teil der gebundenen Antikörper erkannt und von diesen durch Perforation der Membran und DNA-Abbau zerstört (Yagita *et al.*, 1992).

1.1.5.2 Zelluläre Immunantwort

Cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind für die Kontrolle und Bekämpfung viraler Infektionen, darunter auch CMV (Cytomegalie-Virus), Influenza, Hepatitis und EBV (Epstein-Barr-Virus), von entscheidender Bedeutung (Oldstone, 1994). CTLs sind CD8-positive (+) T-Lymphozyten, deren lytische Aktivität einer MHC-Klasse-I-Restriktion unterliegt. Generell unterscheidet man MHC-Rezeptoren der Klasse I und II (siehe Abb. 1.6, Seite 22). Die innerhalb einer Zelle synthetisierten (viralen) Antigene werden über den Golgi-Apparat endogen prozessiert und an MHC-I-Moleküle an der Wirtsoberfläche den T-Lymphozyten präsentiert, die das CD8-Antigen exprimieren. Exogene Antigene werden dagegen endocytotisch aufgenommen, in Phagosom prozessiert und durch MHC-II-Rezeptoren CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert. Bei der Bindung des Antigen/MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor der CD8⁺ T-Zellen, kommt es zu einer Aktivierung der CTLs und einer nachfolgenden Zerstörung der infizierten Zelle. Als auslösender Mechanismus für die Abtötung der Zielzellen wird Apoptose oder Perforinlyse angenommen. Kommt es in Gegenwart von IL-2 zu einer Aktivierung von CTLs, führt diese in Folge zur Teilung und Bildung viruspezifischer cytotoxischer Zellklone.

Bei HIV-Infektionen treten Virus-spezifische CTLs bereits wenige Tage nach der Infektion auf (Reimann *et al.*, 1994, Yasutomi *et al.*, 1993). Die aus Blut, Lunge, Milz, Gehirn und Lymphgewebe isolierbaren CTLs übernehmen eine bedeutende Funktion in der Immunkontrolle während der initialen akuten Phase der Infektion. Ihre Präsenz ist zeitlich korreliert mit einem drastischen Abfall der primären Virämie, sowohl im Plasma als auch in den PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) (Borrow *et al.*, 1994, Koup *et al.*, 1994, Safrit *et al.*, 1994). Auch während der chronischen, asymptomatischen Phase ist die Anzahl zirkulierender HIV-spezifischer T-Zellen hoch; so sind oftmals 1-2% der zirkulierenden CD8⁺ T-Zellen spezifisch für ein dominantes HIV-Epitop. Die HIV-spezifische CTL-Aktivität ist vor allem gegen den V3-Bereich und die CD4-Bindungsregion des viralen Hüllproteins (Johnson *et al.*, 1992), gegen konservierte Regionen des Kapsid- (p24) und Matrix- (p17) Proteins (Buseyne *et al.*, 1993) als auch gegen Pol, in bestimmten Domänen der Reversen Transkriptase (Walker und Plata *et al.*, 1990, Hosmalin *et al.*, 1990) gerichtet. Darüber hinaus sind auch gegen Nef und die regulatorischen viralen Proteine wie Vif-, Tat- und Rev gerichtete CTLs nachweisbar (Riviere *et al.*, 1994). Diese, gegen frühe regulatorische Proteine von HIV-1 gerichteten CTLs gehören zu den entscheidenden Abwehrmechanismen in der Kontrolle der retroviralen Infektion, da sie zu einer Elimination Virus-infizierter Zellen bereits vor der Freisetzung neusynthetisierter Viruspartikel führen (Yang *et al.*, 1996, Riviere *et al.*, 1994). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass Personen, die trotz

häufiger Virusexposition und einer nicht nachweisbaren humoralen Virus-spezifischen Immunantwort, jedoch einer nachweisbaren HIV-spezifischen CTL-Aktivität, uninfiziert blieben (Pinto *et al.*, 1995). Dennoch ist nach wie vor unklar, inwiefern CTLs in der Lage sind die Infektion zu kontrollieren (Feinberg und McLean, 1997). Auch die Frage, warum trotz der hohen CTL-Aktivität keine vollständige Elimination des Virus erreicht werden kann und diese beim Eintritt in die symptomatische Phase schwächer wird und schließlich verschwindet, ist nach wie vor offen (Klein *et al.*, 1995).

Aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten weisen neben ihrer zytotoxischen Aktivität weitere antivirale, nicht-lytische Mechanismen auf, die nicht MHC restringiert sind. CD8⁺ T-Zellen sind in der Lage, lösliche immunregulatorische Faktoren zu sezernieren, die eine inhibitorische Wirkung auf die HIV-Replikation in infizierten CD4⁺ T-Zellen vermitteln (Mackewicz und Levy, 1992). Dieser hemmende Effekt auf die Virusreplikation konnte in verschiedenen Primaten, vor allem in apathogenen Tiermodellen nachgewiesen werden (Ennen *et al.*, 1994, Powell *et al.*, 1993). So sind bis zu 50% der frei lebenden AGMs (African Green Monkey) zwar mit dem HIV-verwandten SIV_{agm} infiziert, sie weisen jedoch eine der asymptomatischen Phase der HIV-Infektion vergleichbare geringe Anzahl Virus-infizierter Zellen in der Peripherie auf und entwickeln keine AIDS-ähnlichen Symptome (Cichutek *et al.*, 1993, Norley *et al.*, 1990). Als Ursache dieser geringen Virusbelastung wird die Sekretion löslicher, inhibitorisch-wirkender Faktoren angenommen, die von CD8⁺ T-Zellen sezerniert werden (Levy, 1993). Darüber hinaus gibt es klinische Hinweise, dass die Progression in das AIDS-Stadium mit der Abwesenheit der supprimierenden CD8-Aktivität korreliert (Gomez *et al.*, 1994). So konnte bei Langzeit-Infizierten, die zwischen 11 bis 15 Jahren HIV-seropositiv waren, jedoch keine Progression in das AIDS-Stadium aufwiesen, eine erhöhte antivirale Aktivität der CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Cao *et al.*, 1995), die zunächst als CAF (Cell Antiviral Factor)-Aktivität bezeichnet wurde.

Als Vermittler der Virus-Suppression wurden 1995 die CC-(β)-Chemokine MIP (Macrophage Inflammatory Protein)-1α, MIP-1β und RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted) identifiziert, die von CD8⁺ T-Lymphozyten sezerniert, die HIV-Replikation in PBMC supprimierten (Cocchi *et al.*, 1995). Der Nachweis, dass diese pro-inflammatorischen Cytokine, die über die Aktivierung spezifischer Leukozyten chemotaktisch in inflammatorische und immunregulatorische Prozesse eingreifen, vor allem von aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten sezerniert werden, gelang durch die Inhibition der antiviralen Aktivität durch neutralisierende Antikörper gegen die Chemokine in Zellkulturüberständen CD8⁺ T-Zellen. Gleichzeitig konnte der HIV-Korezeptor CCR5, der von M-tropen Varianten des HIV-1 benutzt wird, als Rezeptor für die β-Chemokine MIP-1α, MIP-1β und RANTES identifiziert

werden (Deng *et al.*, 1996). Aus diesem Zusammenhang wurde der Mechanismus abgeleitet, dass durch die Konkurrenz zwischen den β -Chemokinen und den HI-Virionen um die Bindung an den CCR5-Rezeptor eine Inhibition der HIV-Replikation erfolgt. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass die Bindungsstellen am CCR5-Rezeptor für die CC-(β)-Chemokine und das virale Hüllprotein gp120, abhängig vom Virusstamm, nur zum Teil überlappen (Lu *et al.*, 1997, Doranz *et al.*, 1996). Als ein weiterer Mechanismus wird die durch die natürlichen Liganden, in diesem Falle der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES, induzierte Herunterregulation des CCR5-Korezeptors angenommen, die ebenfalls eine supprimierende Wirkung auf die HIV-Infektion *in vivo* haben könnte (Goulder *et al.*, 1997). Unterstützt wird diese These durch die Beobachtung, dass eine 32 bp große Deletion in der zweiten extrazellulären Schleife des CCR5-Rezeptors, der als Folge der Verkürzung nicht auf der Zelloberfläche präsentiert wird, einen Schutz gegenüber einer HIV-Infektion vermittelt. So blieben Personen, die homozygote Träger dieser Deletion waren trotz häufiger Virusexposition uninfiziert und auch bei heterozygoten Trägern ist eine schwache Protektion und eine langsamere Progression in das symptomatische AIDS-Stadium nachweisbar (Dean *et al.*, 1996, Huang *et al.*, 1996).

Als ein weiterer HIV-supprimierender Faktor wurde das Interleukin (IL-)16 identifiziert, welches zunächst als „Lymphocyte Chemoattractant Factor“ (LCF) bezeichnet wurde (Baier *et al.*, 1995, Cruikshank *et al.*, 1994, Cruikshank *et al.*, 1987). Dieses ebenfalls vorwiegend von aktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten sezernierte Interleukin, wird zunächst als Vorläufer-Protein Pro-IL-16 gebildet und nach Translation proteolytisch durch die Caspase 3 in das biologisch aktive IL-16 (sIL-16) gespalten (Zhang *et al.*, 1998, Baier und Kurth, 1997). Neben den immunmodulatorischen und proinflammatorischen Eigenschaften weist IL-16 einen antiviralen Effekt *in vitro* auf. Dieser war nach Zugabe von rekombinanten IL-16 in HIV- bzw. SIV infizierten und CD8-depletierten PBMC durch eine supprimierte virale Replikation nachweisbar (Baier *et al.*, 1995). Obwohl IL-16 als natürlicher Ligand des CD4-Rezeptors identifiziert wurde (Cruikshank *et al.*, 1987), scheint sein antiviraler Effekt nicht in der Blockierung des Zelleintritts durch Konkurrenz mit den HIV-1 gp120-Hüllprotein um die CD4-Bindungsregion begründet zu sein. Man vermutet, dass IL-16 die LTR-Promotor-Aktivität von HIV-1 reprimiert (Baier und Kurth, 1997).

Ausgehend von den antiviralen Eigenschaften der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES als auch des IL-16 die HIV-Replikation zu kontrollieren bzw. zu beeinflussen, werden diese zunehmend als prognostische Marker bzw. Surrogatmarker der Krankheitsprogression eingesetzt. Bei einem Vergleich der β -Chemokin-Konzentrationen im Serum von Uninfizierten und HIV-positiven Personen, wiesen letztere deutlich erhöhte

Konzentrationen von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES auf (McKenzie *et al.*, 1996). Eine erhöhte RANTES- Konzentration bei HIV-Infizierten im Vergleich zu seronegativen Kontrollen konnte auch auf mRNA-Ebene bestätigt werden (Müller *et al.*, 1997). Da die Cytokin-Sekretion Teil eines immunregulatorischen Prozesses ist und in Antwort auf einen bestimmten Antigen-Stimulus, in diesem Fall durch HIV-Antigene erfolgt, wird eine Korrelation zwischen dem Cytokin-Profil in seropositiven Patienten und dem klinischen Status der HIV-Infektion diskutiert. Anhand statistischer Analysen wurden die Serumkonzentrationen der β -Chemokine von HIV-Infizierten in zahlreichen Studien quantifiziert und mit den klinischen Parametern der Patienten korreliert. So konnte bei Langzeit-Überlebenden (Long-Term Survivors, LTS), die trotz einer bereits lange bestehenden HIV-Infektion keine Anzeichen einer Erkrankungsprogression aufwiesen, niedrigere RANTES-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden als bei HIV-Infizierten mit fortschreitender Erkrankung (*progressors*) (Zanussi *et al.*, 1996). Für IL-16 dagegen wurden erhöhte Serum-Konzentrationen in der asymptomatischen Phase nachgewiesen, die mit dem Eintritt in das symptomatische AIDS-Stadium signifikant abfallen (Amiel *et al.*, 1999). Auch bei der Quantifizierung der MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von aktivierten PBMC und CD8⁺ T-Zellen konnte die Korrelation zwischen der Chemokin-Konzentration und der HIV-Progression bestätigt werden (Scala *et al.*, 1997).

1.2 Strategien zur Bekämpfung des humanen Immundefizienzvirus

1.2.1 Antiretrovirale Therapie

Die Entwicklung potenter Therapeutika gegen das humane Immundefizienzvirus hat die Anzahl der opportunistischen Infektionen und AIDS-bedingten Todesfälle dramatisch gesenkt und die Virus-bedingte Immundefizienz entscheidend verbessert. Obwohl nach wie vor keine völlige Elimination des HI-Virus durch antiretrovirale Therapeutika möglich ist, konnte die Lebensqualität der Patienten insbesondere durch die Einführung der Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART), eine Kombination aus zwei Reverse Transkriptase-Inhibitoren und einem Protease-Inhibitor (PI), entscheidend verbessert werden. Bei den Reverse Transkriptase-Inhibitoren unterscheidet man zwischen zwei Wirkstoffgruppen, den Nukleosidanaloga (NRTI) und den nicht-nukleosidischen Inhibitoren (NNRTI). Während Nukleosidanaloga (AZT, ddI, ddC, 3TC) an das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase binden und durch ihren Einbau in die DNA-Stränge einen Kettenabbruch auslösen, binden nicht-nukleosidische Inhibitoren (BHAP-, TIBO-, Nevirapin) in einer hydrophoben Tasche in

der Nähe des aktiven Zentrums und führen so zu dessen Blockierung. Protease-Inhibitoren (Saquinavir, Ritonavir) binden in das aktive Zentrum der viralen Protease und verhindern durch kompetitive Hemmung die proteolytische Spaltung der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine und somit die Reifung zu infektiösen Viren.

Die Wirkung von HAART auf die Virus-Dynamik ist zunächst gekennzeichnet durch die Eliminierung der infizierten, aktivierten $CD4^+$ T-Lymphozyten und der Prävention neuer Infektionen (Perelson *et al.*, 1996). Daran schließt sich eine langsamere, individuell sehr unterschiedlich verlaufende Phase der Zerstörung von infizierten Makrohagen oder Virion-gebundenen dendritischen Zellen bzw. latent-infizierten $CD4^+$ T-Zellen mit einer niedrigen Replikationsrate an (Richman, 2001). Neben der effektiven Senkung der Viruslast im Plasma und infizierten Zellen in lymphoiden Geweben unter die Nachweisgrenze (50 Kopien/ml Plasma) und der Supprimierung der viralen Replikation, ist die Wiederherstellung der Immunfunktion ein wesentliches Ziel der antiretroviralen Therapie. Unter HAART kommt es zu einem relativ raschen und konstanten Anstieg der $CD4^+$ T-Zellzahl, die sich vor allem in der $CD4$ -Memory-Subpopulation widerspiegelt, während die Anzahl naiver T-Lymphozyten unwesentlich bzw. langsamer ansteigt. Darüber hinaus konnte auch die Wirkung auf die zelluläre Immunantwort, u.a. auf das Cytokin-Profil, durch den Einsatz der antiretroviralen Therapie gezeigt werden (Goulder und Walker, 1999). Während der ersten 2 bis 3 Monate unter HAART ist eine erhöhte Anzahl aktivierter T-Zellen nachweisbar, die als Aktivierungsmarker das CD38-Antigen tragen. Dieses Oberflächen-Antigen konnte auch bei aktivierten $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden, die eine erhöhte Zellproliferation aufwiesen. Der Zusammenhang zwischen diesem Aktivierungsmuster und einer vermehrten Cytokin-Sezernierung konnte 1997 in einer Studie von Müller *et al.* bestätigt werden, die neben einer erhöhten Anzahl $CD8^+CD38^+$ T-Zellen in HIV-Patienten gegenüber seronegativen Personen auch eine erhöhte RANTES-Serumkonzentration mit einer erhöhten $CD8^+CD38^+$ T-Anzahl korrelieren konnte (Müller *et al.*, 1997). Darüber hinaus konnte bei Patienten, die auf HAART ansprechen, sogenannten HAART-Respondern, eine reduzierte $CD8^+$ T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden (Li *et al.*, 1998, Autran *et al.*, 1997).

Trotz der Vielzahl an positiven Effekten unterliegt der Erfolg der therapeutischen Behandlung unter HAART nach wie vor gewissen Grenzen. Die Notwendigkeit einer lebenslangen Einnahme von antiviralen Therapeutika ist eng assoziiert mit der Frage der frühen Initiation der Behandlung und der Abwägung des Nutzen-Risiko-Verhältnisses. Insbesondere die Langzeitfolgen, wie metabolische und Leber-Dysfunktionen sind im Zuge der Therapie angestiegen (Powderly and Carr, 2001). Auch die strenge Einhaltung der Medikation und mögliche Unverträglichkeiten der Therapeutika sind für HIV-Patienten oftmals sehr

belastend. Darüber hinaus stellen vor allem die Entstehung resistenter HIV-Stämme und die Transmission therapieresistenter Viren eine Barriere für eine erfolgreiche Behandlung des HI-Virus dar. Gerade durch den Einsatz hochpotenter Therapeutika wird der Selektionsdruck auf das Virus verstärkt und damit die Entstehung von einem durch zufällige Mutationen evolvierten therapieresistenten HI-Virus erhöht. Aufgrund des Risikos von Resistenzbildungen ist ein intensives „Monitoring“ der Patienten unter HAART unter zur Hilfenahme einer Vielzahl klinischer Parameter von Bedeutung. Neben der Viruslast können auch körpereigene, die Immunkonstitution reflektierende Parameter, wie die CD4⁺ T-Zellzahl und das Cytokin-Profil, als Surrogatmarker das frühzeitige Erkennen eines Therapieversagens und in Folge die rechtzeitige therapeutische Intervention durch eine Umstellung der antiretroviralen Therapeutika ermöglichen.

1.2.2 Strategien zur Impfstoffentwicklung gegen HIV

Die intensive Entwicklung neuer antiretroviraler Medikamente und der Einsatz der Kombinationstherapie hat HIV-Infizierten zwar eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und eine Verlängerung der Lebensdauer ermöglicht, die völlige Elimination des Virus ist jedoch nach wie vor nicht möglich. Neben den extremen Kosten der antiretroviralen Therapie ist vor allem die damit einhergehende Problematik der Zugänglichkeit dieser Therapeutika als wesentliche Barriere in der Bekämpfung der weltweiten HIV/AIDS-Epidemie anzusehen. Während HIV-Infizierte in den westlichen Industrienationen deutlich von den verbesserten antiviralen Therapiemaßnahmen der letzten Jahre profitierten, bleiben über 90% der weltweiten Bevölkerung von diesen Therapiefortschritten weiterhin unerreicht. So ist neben der Verbesserung der Chemotherapie vor allem die Entwicklung eines sicheren und präventiven Impfstoffes gegen das humane Immundefizienzvirus als wesentliches Ziel in der Kontrolle der globalen HIV/AIDS-Epidemie anzusehen.

Während der letzten Jahre konnten wesentliche Fortschritte im Verständnis der AIDS-Pathogenese und HIV-induzierten Immunreaktionen erzielt werden. Hier haben neben zahlreichen *in vitro* Experimenten vor allem *in vivo* Immunisierungsstudien in vergleichbaren Primaten-Modellen mit nachfolgenden Infektionsversuchen wichtige Einblicke in die Immunogenität verschiedener Impfstoffstrategien vermitteln können (Daniel *et al.*, 1990, Kurth *et al.*, 1988) und wesentlich zur Erforschung der Pathogenese und Ursachen des Infektionsverlaufes von HIV beigetragen (Levy, 1996). Dabei stellt das Rhesusaffen-Tiermodell eines der am häufigsten eingesetzten Tiermodelle zur Untersuchung der

pathogenen Mechanismen der lentiviralen Infektion dar. Zur Untersuchung der Immunogenität von HIV-1-Antigenen, wie u.a. dem viralen Hüllprotein, ist insbesondere das chimäre pathogene simiane-humane Immundefizienzvirus (Simian-Human Immunodeficiency Virus, SHIV) SHIV89.6P geeignet. Es enthält die aus einem dualtropen, d.h. die Korezeptoren CCR5 bzw. CXCR4-nutzenden, Patientenisolat 89.6 stammenden HIV-1-Gene *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* und *env* und die von SIV_{mac}239 abgeleiteten *gag/pol*-Gene (Reiman *et al.*, 1996). Durch Infektionsexperimente mit dem pathogenen SHIV89.6P ist es möglich, das Potential von Immunisierungsstrategien in Hinsicht auf einen Schutz vor einer Infektion oder einer langsameren Krankheitsprogression zu untersuchen (Nathanson *et al.*, 1999).

Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand wird die Induktion der humoralen wie auch der zellulären Immunantwort als essentielle Eigenschaft eines Impfstoffes angesehen, um einen effizienten Schutz gegenüber einer HIV-Infektion zu vermitteln (Mooij und Heeney, 2001). Im Rahmen der humoralen Immunantwort ist hier vor allem die Induktion neutralisierender Antikörper von Bedeutung, die das Potential besitzen, das Virus bereits vor der Infektion der Wirtszellen zu inaktivieren. Die von Plasma-Zellen gebildeten neutralisierenden Antikörper, die nach Antigen-Erkennung aus differenzierten Gedächtnis-B-Zellen hervorgegangen sind, vermitteln darüber hinaus einen Langzeit-Schutz und führen zu einer Mobilisierung des inflammatorischen Systems, einschließlich dem Komplementsystem, den Neutrophilen und Monozyten (Nabel, 2001). Durch den Nachweis der Koinzidenz einer starken CTL-Antwort und einer daraus resultierenden verminderten Virämie, ist die entscheidende Rolle der zellulären Immunantwort in der Kontrolle der HIV-Infektion gezeigt worden (Pantaleo und Fauci, 1994). Ein Immunogen, das eine CTL-Antwort auslöst, ermöglicht die Erkennung und Eliminierung von infizierten und virusproduzierenden Zellen und ist somit essentiell für die Immunkontrolle der viralen Replikation. Das Ziel einen Impfstoff zu entwickeln, der sowohl den humoralen Zweig über neutralisierende Antikörper, als auch den zellulären Zweig des Immunsystems über CTLs ausreichend aktiviert, um einen vollständigen Schutz vor einer HIV-Infektion zu vermitteln, ist nach wie vor unerreicht. Dennoch existieren zahlreiche Ansätze, die dieses Ziel mit unterschiedlichen Strategien verfolgen. Einen kurzen Überblick über die derzeit in (vor-) klinischen Studien befindlichen Impfstoffe ist in Tab.1.1 gegeben.

Bestandteile des Impfstoffes	Status	Vorteil	Nachteil
Impfstoffe, die eine humorale Immunantwort auslösen			
Virale Oberflächenproteine (u.a. gp120)	Phase I und II	Sichere u. einfache Herstellung	HIV-Primärisolate aus Patienten wurden von den Impfstoff-induzierten Antikörpern nicht erkannt
inaktiviertes Virus	bislang nur im Tiermodell getestet	enthält alle Strukturproteine; einfach herzustellen	Risiko der unvollständigen Inaktivierung, im Tiermodell nicht erfolgreich
Pseudovirionen	Phase I	HIV-Oberflächeproteine werden in ihrer nahezu natürlichen Konformation präsentiert	schwierig in der Herstellung und Erhaltung der Langzeit-Stabilität
Impfstoffe, die eine zelluläre Immunantwort auslösen			
Lebende Vektorviren (nicht-pathogene bzw. nicht in menschlichen Zellen replizierende Viren, die HIV-Gene enthalten, u.a. Canary Pox Virus, MVA)	Phase I und II	Mit Hilfe von Markern kann die Menge und Art der produzierten viralen Proteine kontrolliert werden	kompliziert in der Herstellung; induzieren nur eine schwache Immunantwort
Nackte DNA , die ein oder mehrere HIV-Gene kodieren	Phase I	einfach herzustellen	gewisse Bedenken, daß durch die Integration von HIV-Genen Mutationen entstehen
HIV Peptide (Proteinfragmente)	Phase I	einfach herzustellen	induzieren keine starke Immunantwort
Impfstoffe, die eine humorale und zelluläre Immunantwort auslösen			
Lebendes, attenuiertes HIV	Nur im Tiermodell erprobt	entspricht am ehesten dem natürlichen Erreger; könnte mit dessen Fähigkeit zur Replikation in Zellen interferieren	das Virus kann potentiell pathogene Wirkung haben
Kombination verschiedener Elemente im „Prime boost regime“ , z.B. Canary Pox Virus als Lebend-Vektor und gp120	Phase II	Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort	kompliziert herzustellen

Tab. 1.1:
Tabellarischer Überblick über die derzeit in (vor-)klinischen Studien befindlichen Impfstoffstrategien gegen HIV-1 (Quelle: Robinson, 2002; Baltimore und Heilman, 1998).

1.3 Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind infektiöse, vermehrungsunfähige Retroviren, die in der Lage sind, Fremdgene in permissive Zielzellen zu übertragen (Transduktion). Die verpackbaren Transfervektoren beinhalten in der Regel keine viralen Strukturgene. An Stelle der viralen Gene können therapeutische Gene oder Reportergene inseriert werden, deren Expression in den Wirtszellen durch die viralen Promotor-/Enhancer-Elemente in der 5'-LTR oder durch heterologe Promotoren gewährleistet wird. Das Verpackungssignal (ψ) erlaubt die Verpackung von RNA-Transkripten des Transfervektors in die retroviralen Vektorpartikel. Die Strukturproteine Gag, Pol und Env werden *in trans* von sogenannten Verpackungszelllinien für die Herstellung der Vektorpartikel zur Verfügung gestellt. Durch die Bereitstellung der Strukturproteine auf unterschiedlichen (ψ -negativen, ψ^-) Genkonstrukten soll die Entstehung replikationskompetenter Retroviren in den Verpackungszellen verhindert werden. Bei der Expression verpackbarer (ψ -positiven, ψ^+) Transferkonstrukte in Verpackungszellen kommt es zur Bildung retroviraler Vektorpartikel, die den Transfervektor enthalten und in den Zellkulturüberstand der Verpackungszellen abgegeben werden.

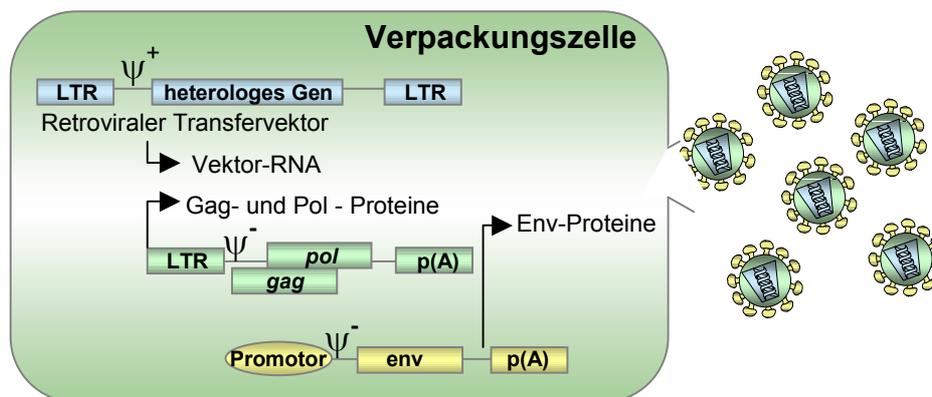


Abb. 1.5:

Aufbau einer Verpackungszelllinie für den retroviralen Gentransfer

Durch die Bereitstellung der Strukturproteine auf unterschiedlichen (ψ^-) Genkonstrukten soll die Entstehung replikationskompetenter Retroviren in den Verpackungszellen verhindert werden. Nur der ψ^+ Transfervektor wird verpackt und in die Zielzelle übertragen.

Retrovirale Vektoren erlauben die stabile Integration des Transfergens in das Genom der Wirtszelle und ermöglichen aufgrund der chromosomalen Integration eine lang anhaltende Expression des Transfergens. Die bisher am häufigsten verwendeten retroviralen Vektoren sind von dem bereits sehr gut charakterisierten amphotropen Murinen Leukämievirus (MLV) abgeleitet, die in der Lage sind, alle teilungsaktiven murinen und humanen Zellen zu transduzieren. Ihr Tropismus wird durch die Interaktion des externen viralen Oberflächenproteins gp70-SU des MLV mit dem zellulären Rezeptor RAM-1 bestimmt (Eiden

et al., 1996, Kozak *et al.*, 1995, Kavanaugh *et al.*, 1994). Da der Phosphatransporter RAM-1 als Rezeptor ubiquitär auf nahezu allen humanen Zelltypen exprimiert wird, ist die *in vivo* Anwendung dieser MLV-abgeleiteten Vektoren aufgrund der geringen Transduktions-spezifität und -effizienz als problematisch anzusehen. Zwar könnte man durch eine höhere Vektordosis der geringen Effizienz entgegenwirken, gleichzeitig würde jedoch durch eine stärkere Aktivierung des Immunsystems das Risiko der Neutralisierung der Vektorpartikel durch Antikörper erhöht werden. Darüber hinaus würde auch das Risiko der malignen Transformation als Folge unspezifischer Integration des Vektorgenoms in das Wirtzellgenom erheblich ansteigen. Um diese Nachteile zu umgehen, wurden MLV-abgeleitete Vektoren mit einem eingeschränkten Wirtszell-Tropismus entwickelt. Eine Möglichkeit, den Tropismus viraler Vektoren durch die Verwendung heterologer Hüllproteine zu modifizieren, fasst man unter dem Begriff *Pseudotypisierung* zusammen.

1.3.1 Pseudotypisierung retroviraler Vektoren

Der Tropismus umhüllter Virionen oder viraler Vektorpartikel wird auf der Ebene des Zelleintritts durch die spezifische Interaktion des viralen Oberflächen-Hüllproteins (SU) mit den zellulären Oberflächenproteinen bestimmt. Durch den Austausch homologer Hüllproteine gegen andere (heterologe) Fremd-Hüllproteine (*Pseudotypisierung*) konnte eine Änderung des Zelltropismus und ein vermindertes Risiko in der Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCRs) in den Verpackungszellen erreicht werden. Darüber hinaus ist durch die Pseudotypisierung auch eine Steigerung der Transduktionseffizienz und eine erhöhte Vektorstabilität erzielt worden. So konnte durch die Pseudotypisierung mit dem G-Protein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) die Vektorstabilität wesentlich erhöht werden (Gallardo *et al.*, 1997, Sharma *et al.*, 1996, Burns *et al.*, 1993). Das Hüllprotein gp120 des HIV-1 bestimmt den CD4-abhängigen Tropismus der Zellinfektion und schränkt so die Anwendung von HIV-1-abgeleiteten Vektoren auf die Transduktion humaner CD4⁺ T-Zellen ein (Corbeau *et al.*, 1996, Poeschla *et al.*, 1996). Mit der Pseudotypisierung von Kapsidpartikeln des MLV mit dem lentiviralen HIV-1 Hüllprotein konnte erstmals die Generierung von Pseudotyp-vektoren mit eingeschränktem Wirtszell-Tropismus beschrieben werden. Die Inkorporation des HIV-1-Hüllproteins ist allerdings aus sterischen Gründen nur möglich, wenn dieses aus einem vollständigen Oberflächen-Hüllprotein gp120-SU und einer trunkierten Variante des Transmembranhüllproteins gp41-TM besteht (Tr712) (Lodge *et al.*, 1998, Schnierle *et al.*, 1997, Mammano *et al.*, 1997, Wilk *et al.*, 1992).

Mit der Möglichkeit der Generierung retroviraler pseudotypisierter [MLV(HIV-1)]-Vektorpartikel, die die selektive Transduktion CD4⁺ T-Zellen erlauben, stehen wertvolle Werkzeuge für gentherapeutische als auch für experimentelle Ansätze zur Erweiterung des Verständnisses der Virus-Zell-Interaktionen zur Verfügung. So sind diese zellspezifischen Vektoren nicht nur für den klinischen Einsatz in der Gentherapie bei CD4-bedingten Erkrankungen wie ADA-SCID (Adenosine-Desaminase-Severe Combined Immunodeficiency) oder HIV/AIDS denkbar, sondern auch für Studien virologischer Grundlagen wie der Korezeptornutzung oder zur Untersuchung von Mechanismen der antiviralen Immunantwort von Interesse.

1.3.2 Gentransfer in primäre periphere mononukleäre Blutzellen

Die Entwicklung viraler Gentransfersysteme zur Transduktion oder Infektion spezifischer Zellpopulationen stellt neben der antiretroviralen Kombinationsstherapie einen viel versprechenden Ansatz in der Behandlung von HIV/AIDS dar. Neben der Immuntherapie und der Immun-Restauration ist vor allem der gentherapeutische Einsatz HIV-inhibitorischer Proteine oder RNA-Moleküle von Interesse. Dabei soll die Expression therapeutischer Gene in den natürlichen Wirtszellen des HIV die Replikation oder Integration des Virus inhibieren. Als therapeutische Genprodukte für die intrazelluläre Immunisierung sind dabei Ribozyme, Köder-RNA, transdominant-negative Mutanten von HIV-Proteinen oder Antikörperfragmente geeignet (Marasco *et al.*, 1999, Ho *et al.*, 1998, Duan *et al.*, 1997, Bohyhadi *et al.*, 1997, Smith *et al.*, 1996, Leavitt *et al.*, 1996, Levy-Mintz *et al.*, 1996). Einige dieser gentherapeutischen Ansätze befinden sich bereits in der klinischen Anwendung (Bauer *et al.*, 2000, , Amado *et al.*, 1999, Wong-Staal *et al.*, 1998, Blaese *et al.*, 1995).

Der Gentransfer in humane pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC), aus denen durch Differenzierung lymphoide, myeloide und erythroide Zellen hervorgehen, stellt einen weiteren viel versprechenden Ansatz dar, therapeutische Gene über einen langen Zeitraum in den Zellen des peripheren Blutes zu exprimieren (Kearns *et al.*, 1997, Ogata *et al.*, 1995). Eine der Hauptschwierigkeit in der klinischen Anwendung ist dabei die Isolierung und Aufreinigung der Stammzellen, als auch die Erhaltung der Repopulierungseigenschaften nach Transduktion und Expansion der Zellen (Peters *et al.*, 1996, Han *et al.*, 1995).

Bei dem Einsatz viraler Gentransfersysteme unterscheidet man zwischen der *in vivo* und *ex vivo* Anwendung. Im Gegensatz zu der *in vivo*-Anwendung, die auf einer direkten Gabe des Vektors in den Patienten beruht, werden bei dem *ex vivo* Gentransfer zunächst Zellen des

peripheren Blutes isoliert und anschließend durch entsprechend gewählte Kultivierungsbedingungen die gewünschte Zielzell-Subpopulation expandiert und gegebenenfalls aktiviert. Nach *ex vivo* Transduktion der Zielzellen mit den entsprechenden Vektorpartikeln können die autologen Transfergen-exprimierenden Zellen dem Patienten transplantiert werden.

Neben dem Einsatz retroviraler Vektoren im Bereich der Gentherapie, finden diese zunehmend auch Anwendung in Immunisierungsstudien gegen HIV. Replikationsdefekte Vektoren stellen eine sichere Methode zur Immunisierung dar, die durch stabile Integration des Vektorgenoms in die Wirtszelle eine lang andauernde Expression des Transfergens erlauben. Da die neusynthetisierten Fremdproteine in die endogene Prozessierung gelangen und über den MHC-I-Komplex auf der Oberfläche der Wirtszellen präsentiert werden, ist die Induktion der zellulären Immunantwort gewährleistet (Abb. 1.6.A) (Jolly und Warner, 1990, McMichael and Hanke, 2002). Durch den Einsatz eines Transfervektors, der virale Antigene, darunter auch das virale Hüllprotein Env, kodiert, ist infolge der Expression des viralen Hüllproteins auf der Oberfläche der transduzierten Zellen eine Fusion mit den CD4-Molekülen benachbarter Zellen zu erwarten. Die dadurch hervorgerufene Synzytieninduktion kann zur Lyse der Zellen und infolge dieser zu Protein-Fragmenten führen, die ihrerseits endocytotisch aufgenommen und durch MHC II-Rezeptoren CD4⁺ T-Helfer Lymphozyten präsentiert werden und eine humorale Immunantwort induzieren (Abb. 1.6.B) (Watts und Powis, 1999, Callahan *et al.*, 1993)

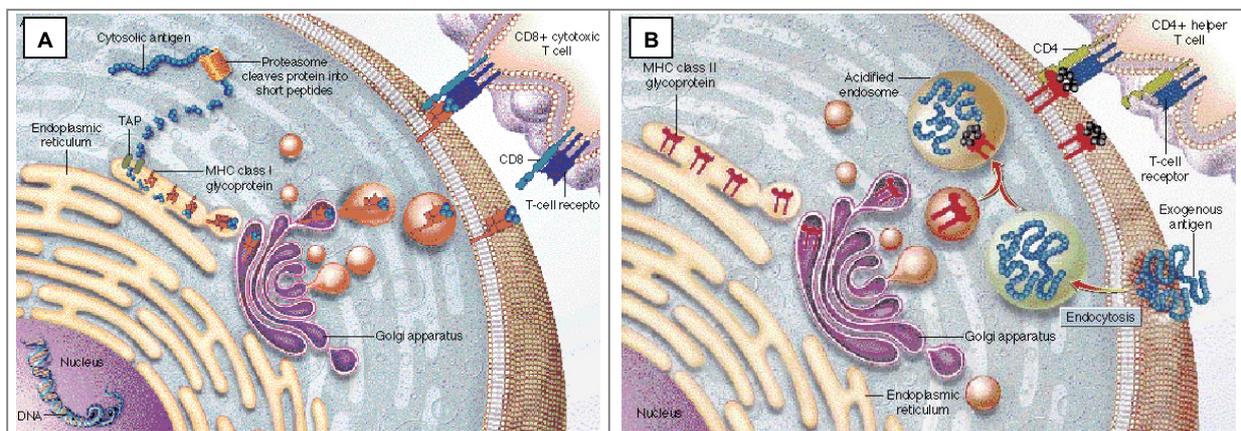


Abb. 1.6:

Darstellung der MHC-I- (A) und MHC-II-(B) restringierten Antigen-Präsentation

A: MHC I-Moleküle können Peptid-Fragmente von viralen Proteinen präsentieren, die nach Infektion in der Zelle endogen prozessiert wurden. Durch Präsentation dieser viralen Antigene durch MHC I-Moleküle können CD8⁺ zytotoxische T-Zellen stimuliert und somit eine zelluläre Immunantwort induziert werden, die als eine der effektivsten Immunantworten gegen HIV angesehen wird.

B: In dieser Darstellung ist der Prozess der Antigen-Präsentation gegenüber CD4⁺ T-Helfer-Zellen durch MHC II-Moleküle dargestellt. Hierbei werden exogene Antigene durch Phagozytose bzw. Endozytose in die Zelle aufgenommen, prozessiert und über MHC II an der Zelloberfläche präsentiert. Durch Interaktion mit T-Helfer-Zellen sind sie in der Lage eine humorale, d.h. eine durch Antikörper-vermittelte Immunantwort zu induzieren.

1.4 Zielsetzung

Zur Kontrolle der globalen HIV/AIDS-Epidemie werden derzeit vor allem zwei Strategien verfolgt: die Verbesserung der antiviralen Kombinationstherapie und die Entwicklung eines präventiven Impfstoffes gegen das humane Immundefizienzvirus. Zur Verbesserung und Erweiterung bestehender Diagnosemethoden bei einer HIV-1-Infektion ist der Einsatz neuer Surrogatmarker notwendig. Insbesondere die von CD8⁺ T-Zellen sezernierten β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES als auch das Interleukin-16 erscheinen als Surrogatmarker zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Therapie als vielversprechend. Da die antiretrovirale Kombinationstherapie zu einer Supprimierung der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung führt (Li *et al.*, 1998, Autran *et al.*, 1997), ist ein Zusammenhang zwischen der bei einem Therapieversagen ansteigenden Viruslast und einer erhöhten Aktivität CD8⁺ T-Zellen in Assoziation mit einem veränderten Cytokin-Expressionsmuster denkbar. Dieser Zusammenhang sollte durch den Vergleich von zwei Patientenkollektiven, die ihrer Viruslast entsprechend in HAART-Responder (≤ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) und -Non-Responder (≥ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) differenziert wurden, untersucht werden. Hierzu wurden die Konzentrationen der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie IL-16 sowohl im Serum, als auch *in vitro*, im Zellkulturüberstand von stimulierten CD8⁺ T-Zellen unter Einbeziehung des Zell-Aktivierungsstatus analysiert und zwischen den beiden Patientenkollektiven verglichen.

Desweiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit eine neue HIV-1-Immunisierungsstrategie untersucht werden. Eine protektive Immunantwort gegen HIV-1 wird vor allem gegen frühe regulatorische Proteine wie Tat und Rev (Boyer, *et al.*, 2000, Ugen *et al.*, 1998), als auch gegen Strukturproteine wie das virale Hüllprotein Env (Johnson *et al.*, 1992, Graham, 1994, Morre *et al.*, 1994) induziert. Auf diesen Beobachtungen basierend sollte ein bicistronischer Transfervektor entwickelt werden, der sowohl die von dem pathogenen chimären SHIV89.6P abgeleiteten HIV-1-Gene *tat*, *rev* und *env* als auch den Rezeptor für den C-terminal trunkierten humanen Nervenwachstumsfaktor (Δ LNGFR, „Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor“) als Oberflächenmarker kodiert. Dabei sollte zunächst *in vitro* gezeigt werden, dass [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren einen effizienten Gentransfer in immunkompetente, HIV-permissive Zellen erlauben und die viralen Transferegene auf der Oberfläche der CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. Nachfolgend sollte im Rhesusaffen-Tiermodell untersucht werden, ob *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierte autologe PBMC nach Transplantation in den Rezipienten eine humorale und zelluläre Immunantwort gegen die viralen Transferegene induzieren können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Methoden der Molekularbiologie

2.1.1 Plasmide und Vektoren

2.1.1.1 Verwendete Plasmide zur Herstellung des Transfervektors *pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr*

Für die Herstellung eines verpackbaren retroviralen Expressionskonstruktes für die SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* wurde der von Dr. M. Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellte Transfervektor *pMgSLDeIS* als Ausgangsplasmid verwendet. Dieser bicistronische retrovirale Transfervektor mit der 5'-LTR des Mouse Stem Cell Virus (MSCV) und der 3'-LTR des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) ist für die Genexpression in lymphohämatopoetischen Zellen optimiert. Der im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Transfervektor *pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr* enthält einen offenen Leserahmen für die SHIV-Gene *tat*, *rev* und dem viralen Hüllprotein-Gen *env* sowie den 3'-gelegenen offenen Leserahmen für den C-terminal truncierten, schwach-affinen Rezeptor des humanen Nervenwachstumsfaktors (Δ LNGFR, „Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor“) als Oberflächenmarker. Er enthält ferner das Ampicillinresistenzgen (*amp^r*) und ein Replikationssignal zur Amplifikation in *E. coli*. Zur Klonierung des Transfervektors *pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr* wurde das ursprünglich enthaltene und für die β -Untereinheit der NADPH-Oxidase kodierende gp91^{Phox}-Gen durch die SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* ausgetauscht (Kap. 2.1.4).

Die Sequenzen, der in den Transfervektor inserierten SHIV-Gene, stammen aus dem Molekularklon KB9, der die 3'-Hälfte des proviralen chimären SHIV 89.6P mit den aus dem dualtropen Patientenisolat 89.6 stammenden HIV-1-Genen *vif*, *vpx*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* und *env* (Reiman *et al.*, 1996) in einem pSL1180-Vektor (Pharmacia, NJ, USA) enthält. Die im folgenden genannten Nukleotidpositionen beziehen sich auf die in der EMBL/Genbank dargestellte Sequenz des SHIV-89.6/KB9 (U89134), beginnend mit der R-Region der 5-LTR als Nukleotidposition 1. Die in den Transfervektor inserierten HIV-Gene wurden 5' des *tat*-Gens an Position 5920 bis Position 8940 am 3' Ende des *env*-Gens mittels PCR amplifiziert und über EcoRI-Schnittstellen in den Vektor *pMgSLDeIS* kloniert.

2.1.1.2 Verwendete Plasmide für transiente Transfektionen

Zur Überprüfung der Expression und Funktionalität der im Vektor *pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr* kodierten Transfgene wurden zunächst mittels transienter Transfektionen [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel generiert. Als Kontrolle wurden [MLV(HIV)]- bzw. [MLV(VSV-G/S HIV)]-Pseudotypvektoren transient hergestellt. Hierzu wurden folgende Plasmide verwendet:

pL128 kodiert für das C-terminal trunkierte Hüllprotein (HIV-Tr712) und das Rev-Protein des HIV-1. Die Transkription des *env*-Gens wird von einem β -Aktin-Promotor gesteuert und enthält ein Polyadenylierungssignal der Herpes Simplex Virus Thymidin-Kinase (HSV-TK poly(A)). Für die Selektion in eukaryotischen Zellen besitzt das Plasmid eine G418 Resistenzvermittelnde Selektionskassette. Das Plasmid wurde von Valerie Bosch (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt (Wilk *et al.*, 1992)

pMD.G kodiert das Protein G von VSV (Vesikuläres Stomatitis-Virus), welches ein ubiquitär auf der Zellmembran exprimiertes Phospholipid als Rezeptor zum Zelleintritt benutzt. Die Transkription wird von einem CMV-Promotor gesteuert und enthält ein Polyadenylierungssignal des humanen β -Globulin-Gens (Ory *et al.*, 1996).

pHIT60 kodiert für die Proteine Gag und Pol des ecotropen murinen Leukämievirus (Typ Moloney - MoMuLV; Soneoka *et al.*, 1995). Die Transkription der *gag/pol*-Gene wird von einem CMV-Promotor getrieben. Zusätzlich besitzt das Konstrukt einen SV40ori zur zytoplasmatischen Amplifikation des Plasmids in "Large T" -transformierten Zellen. Es besitzt keine Verpackungssequenz zur Verpackung in MLV-Virionen. Das Konstrukt beinhaltet das *gpt* (XGPRT - Xanthin-guanin-Phosphoribosyl-Transferase)-Gen zur Selektion mit Mycophenolsäure in Säugerzellen.

pMgegfp- Δ Ingfr ist, wie der bereits beschriebene Transfervektor *pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr*, von *pMgSLdelS* abgeleitet. Als Reporter wurde das "Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP; CLONTECH, Heidelberg) anstelle der ursprünglich im offenen Leserahmen kodierten β -Untereinheit der NADPH-Oxidase (gp91^{Phox}) inseriert (Stefanie Steidel, PEI).

Zum Nachweis von RCRs in den Überständen der mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten Ghost-Zellen wurde ein sogenannter Rescue-Test durchgeführt (Kap. 2.3.7 und Kap. 3.2.3.4), in dem als Positiv-Kontrolle das replikationskompetente amphotrope MLV eingesetzt wurde. **pM91**, das für die Vollängen-Sequenz des amphotropen MLV kodiert,

wurde transient in 293T-Zellen transfiziert. Der viruspartikelhaltige Überstand wurde nachfolgend in einen Rescue-Test zur Infektion von CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen eingesetzt.

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, spezifische Nukleotidsequenzen ausgehend von genomischer DNA, cDNA oder Plasmid-DNA zu amplifizieren (Mullis und Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1985). Das amplifizierte Fragment kann nachfolgend in weitere molekularbiologische Techniken eingesetzt werden. Mit Hilfe der aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermophilus aquaticus* stammenden DNA-abhängigen Taq-Polymerase kann ein ausgewählter Nukleotidsequenzbereich synthetisiert werden, sofern entsprechende Pufferbedingungen vorliegen und zwei Start-Oligonukleotide (Primer) sowie Desoxynukleotide vorhanden sind. Die Zyklusbedingungen sind abhängig von der Länge der gewählten Oligonukleotidprimer bzw. deren Schmelztemperaturen, sowie von der Länge der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz.

Eine Standard-PCR (100 µl) enthält: 10 x PCR-Puffer (10mM Tris/HCl, pH 8,8; 50mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % Gelantine), je 10 µM (+)-Primer und (-)-Primer, je 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz. Pro PCR-Reaktion wurden ausgehend von Plasmid-DNA 100 ng und von genomischer DNA 200 bzw. 500 ng als Template eingesetzt. Ein typischer PCR-Zyklus besteht aus einem ersten Schritt, in dem die DNA bei 94°C zu Einzelsträngen denaturiert, gefolgt von einer Hybridisierungsphase, in der strangspezifische Primer bei 50° C - 60° C (je nach Schmelztemperatur der Oligonukleotide) hybridisieren können. Daraufhin folgt die Extension bei 72° C bzw. 68° C, dem Temperaturoptimum der jeweiligen Polymerase entsprechend. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte (Denaturierung, Hybridisierung der Primer, Extension) kommt es zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung des gewählten DNA-Bereiches. Bei jeder PCR-Reaktion wurde vor dem ersten Reaktionszyklus eine 3-minütige (bzw. 15 min bei Verwendung der Taq-Gold-Polymerase) Denaturierungsphase bei 94° C vorgeschaltet, um eine vollständige Denaturierung der DNA-Stränge zu erreichen. Darüber hinaus wurde nach den Zyklen eine 10-minütige Phase bei 72° C bzw. 68° C angeschlossen, in der die Extension noch nicht fertig synthetisierter Stränge vervollständigt werden konnte.

Zur Klonierung des Transfervektors wurde das ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer, Mannheim) verwendet. Es enthält eine Kombination aus Taq und Pwo

Polymerase mit „proofreading Aktivität“, die den fehlerhaften Einbau von Nukleotiden in den wachsenden PCR-Strang verhindert. Das Temperaturoptimum für die Extension liegt bei diesem PCR-System bei 68° C.

Zum Nachweis replikationskompetenter Retroviren (Replication Competent Retrovirus, RCR) wurde das Expand™ Long Template PCR System (Boehringer, Mannheim) verwendet, das ebenfalls die Kombination aus Taq und Pwo Polymerase enthält und für die Amplifizierung von Fragmenten einer Größe von 3 kb bis 12 kb optimiert ist.

Zum Nachweis proviraler SHIV-Sequenzen aus genomischer DNA transduzierter und nachfolgend transplantierte Zellen wurde eine Nested-PCR mit der AmpliTaq-Gold™-DNA-Polymerase (Perkin Elmer, Vaterstetten) durchgeführt. Ihr Temperaturoptimum befindet sich bei 72° C. Die AmpliTaq-Gold™-DNA-Polymerase muß zunächst durch eine 15 minütige Hitzebehandlung bei 94° C vor den eigentlichen PCR-Zyklen aktiviert werden, um unspezifische Primeranlagerungen und damit verbundene unspezifische Extensionen zu vermeiden und die spezifische Amplifikation zu maximieren.

2.1.3 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific (Darmstadt) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 10µM eingestellt. Die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonucleasen ist durch Unterstreichung hervorgehoben.

Oligonukleotide zur Herstellung des Transfervektors pMgΔenv/tat/rev/ΔIngfr mittels Fusions-PCR:

SHIV-1 (+)E	5'- CCG <u>GAA TTC</u> CCC TCT AGA AGC ATG CTG TAG AGC - 3'
SHIV-2 (-)E	5'- CCG <u>GAA TTC</u> GAG TAT TCA TAT ACT GTC CCT GAT TG - 3'
SHIV-FU (+)	5'- AGG GAT ATT GAC CAT TAT CGT TTC AGA CCC TCC TCC CAG C - 3'
SHIV-FU (-)	5'- GCT GGG AGG AGG GTC TGA AAC GAT AAT GGT CAA TA CCC T - 3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 1 min, 62° C / 2 min, 68° C / 3 min; 35 Zyklen
Fusions-PCR: 94° C / 1 min, 55° C / 2 min, 68° C / 2 min; 10 Zyklen;
94° C / 1 min, 60° C / 2 min, 68° C / 2 min; 20 Zyklen

Oligonukleotide zur Sequenzierung der inserierten SHIV-Gene im pMg-Vektor:

MG SEQ(+) 5'- GCC TCG ATC CTC CCT TTA TCC AGC - 3'
MG SEQ(-) 5'- TCA GGT CCA CAG AGG AAA ACT CCT - 3'

Oligonukleotide zur Amplifikation der SHIV-Gene tat, rev und env:

MgSHIV Extern (+) 5'- CTC TAG AAG CAT GCT GTA GAG C - 3'
MgSHIV Extern (-) 5'- CAG ATC ATC AAC ATC CCA AGG AGC - 3'
MgSHIV Intern (+) 5'- GAA ATG GAG CCA GTA GAT CCT AG - 3'
Mg SHIV Intern (-) 5'- GCC CCA TCT CCA CCC CCA TC - 3'

PCR-Bedingungen: Extern: 94° C / 1 min, 62° C / 45 sec, 72° C / 45 sec; 60 Zyklen
 Nested: 94° C / 1 min, 62° C / 45 sec, 72° C / 45 sec; 30 Zyklen

Oligonukleotide zur Amplifikation der humanen GAPDH:

huGAPDH (+) 5'- GTG AGT GCA GGA GGG CCC G -3'
huGAPDH (-) 5'- CAA AAG GAG TGA AGG CCC TGC - 3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 1 min, 62° C / 45 sec, 72° C / 45 sec; 35 Zyklen

Oligonukleotide zum Nachweis von rekombinanten RCRs

MgSHIV Extern (-) 5'- CAG ATC ATC AAC ATC CCA AGG AGC - 3'
MLV gp (-) 5' - CCA TCG ATT TAG GGG - 3'
MLV gp(+) 5' - ATA AGA ATG CGG CGG - 3'

PCR-Bedingungen: 94° C / 1 min, 62° C / 1 min, 68° C / 3 min; 35 Zyklen

2.1.4 Fusions-PCR

Zur Klonierung des Transfervektors pMg Δ env/tat/rev/ Δ ingfr wurde die rekombinante oder Fusions-PCR durchgeführt. Diese nach Horton *et al.* (Horton *et al.*, 1989) modifizierte Methode ermöglicht die Rekombination zweier oder mehrerer DNA-Fragmente an einer beliebigen Stelle ohne den Einsatz von Restriktionsendonukleasen. Mittels rekombinanter PCR wurden flankierende EcoRI Schnittstellen für die spätere Klonierung in den pMgSLDeIS eingefügt. Darüber hinaus wurde mittels Fusions-PCR in Anlehnung an die Publikationen von Lodge *et al.* (1998), Schnierle *et al.* (1997) und Mammano *et al.* (1997) das env-Gen an

Position 712 durch Einführung eines Stop-Kodons trunziert (Tr712), sodass ein vollständiges Oberflächenhüllprotein und eine trunzierte Variante des Transmembranproteins exprimiert wird. Dieses trunzierte Transmembranprotein ermöglicht die Inkorporation des SHIV-Hüllproteins in das MLV-Kapsid. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Reinigung der beiden erhaltenen Amplifikate (A und B) wurden diese in äquimolaren Mengen (50-100 ng) in die Fusions-PCR eingesetzt. Das rekombinierte PCR-Fragment wurden anschließend mit EcoRI restringiert und in den ebenfalls mit EcoRI restringierten pMgSLDeIS-Vektor ligiert. Durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung des 5'- und 3'-Endes der Insertionsschnittstelle wurde die korrekte Orientierung des Inserts in dem resultierenden pMg Δ env/tat/rev Δ ngf überprüft.

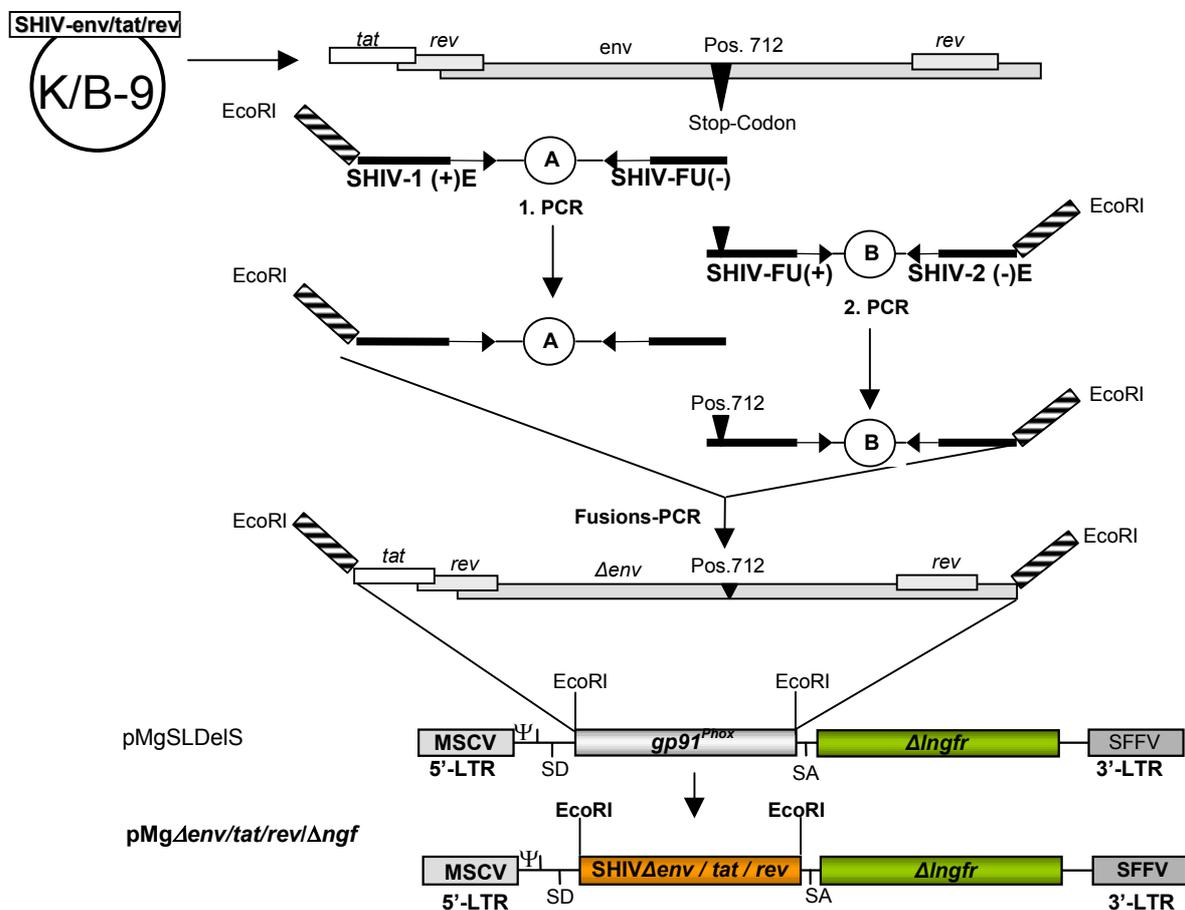


Abb. 2.1:

Schematische Darstellung der Fusion-PCR

(SHIV-1 (+)E, SHIV-2 (-)E, SHIV-FU(+) und SHIV-FU(-) repräsentieren die in der Fusion-PCR eingesetzten Oligonukleotidprimer);

A: erhaltenes Amplifikat aus der 1. PCR mit den Primern SHIV-1 (+)E / SHIV-FU (-)

B: erhaltenes Amplifikat aus der 2. PCR mit den Primern SHIV-FU (+) / SHIV-1 (-)E; hier wurde an Position 712 ein Stop-Kodon eingefügt,

A und B wurden nachfolgend in die Fusions-PCR eingesetzt

2.1.5 Nukleotidsequenzbestimmung

Zur Überprüfung der korrekten Nukleotidsequenz der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente und deren korrekte Inserierung wurde eine Nukleotid-Sequenzanalyse nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (jeweils 1 Farbstoff für jedes Didesoxynukleotid) als Terminatoren eingebaut werden, wobei ihnen das zur Verlängerung der DNA-Kette nötige 3'-Hydroxylende zur Knüpfung der Phosphodiesterbindung fehlt. Mittels eines Argonlasers werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und ihre Emission detektiert. Die Sequenzierungen erfolgten mit dem Dye-Desoxy-Terminator-Cycle-Sequencing-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt). Pro Sequenzierreaktion (8 µl Ansatz) wurden 2 µl des vom Hersteller gelieferten Premixes, 0,5 µg DNA und 10 pmol eines Primers eingesetzt. Nach der Sequenzierreaktion (PCR-Reaktion: 96° C, 15 sec; 50° C 15 sec; 60° C, 4 min; 39 Zyklen) wurden die Proben aufgereinigt und getrocknet und in 2 µl Auftragspuffer (0,5 µl Formamid, 0,5 µl Agarose-Ladepuffer, 25 mM EDTA [pH 8,0]) aufgenommen, 2 min bei 90° C denaturiert und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auswertung wurde mit dem automatischen DNA-Sequenzer Modell 373 A (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die automatischen Sequenzierungen und Auswertungen wurden von Herrn Dipl.Ing. Martin Selbert (Paul-Ehrlich-Institut, Langen) durchgeführt.

2.1.6 Restriktion, Ligation und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Restriktionen, Dephosphorylierungen und Ligationen von Plasmid-DNA oder mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmenten erfolgten mit Enzymen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers.

Die Ligation der aufgereinigten Restriktionsfragmente mit der restringierten und dephosphorylierten Vektor-DNA erfolgte im molaren Verhältnis 2:1 mit der T4-Ligase (100 U/Ansatz), 1,5 µl Ligasepuffer (NEB, Schwalbach) in einem Volumen von 20 µl bei 4° C über Nacht.

Um Religationen zu vermeiden wurden linearisierte Plasmide mittels alkalischer Phosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase, CIP, NEB, Schwalbach) dephosphoryliert. Das Enzym entfernt die für eine effiziente Ligation nötigen 5'-Phosphatgruppen der DNA. Für die Dephosphorylierung wurden 10 U CIP eingesetzt und 1 h bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 10 min bei 75° C inaktiviert.

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Je nach Länge der zu trennenden Fragmente wurden 1-3%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1-3 g Agarose (Gibco/BRL, Eggenstein) in 100 ml $1 \times$ TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) gekocht, auf ca. 60° C abgekühlt und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach Erstarren des Gels wurde es mit $1 \times$ TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit $6 \times$ Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol FF, 30 % Glycerol in Aqua bidest) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und 1-2 Stunden bei 80-120 Volt aufgetrennt. Die verwendete Spannung richtete sich nach der Gelkonzentration. Als DNA-Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein), die Hae III restringierte ϕ X174 DNA (Pharmacia, Freiburg) und die 100 bp DNA-Leiter (NEB, Schwalbach) verwendet. Die aufgetrennten DNA-Fragmente konnten anschließend auf einem UV-Transilluminator (302 nm) detektiert werden.

Die Fragmentlängen der Größenstandards in bp:

<i>1 kb DNA-Leiter:</i>	134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506/517, 1018, 1636, 2036, 3054, 4072, 5090, 6108, 7126, 8144, 9162, 10180, 11198, 12216
<i>ϕX174 DNA-Hae III:</i>	72, 118, 194, 234, 271, 281, 310, 603, 8723, 1078, 1353
<i>100 bp DNA-Leiter:</i>	100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1517

2.1.8 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Zur weiteren Klonierung wurden die PCR-Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mittels des QIAEX-II™-Gelextraktions-Kits nach Angaben des Herstellers aus der Gelmatrix extrahiert. Das Prinzip dieser Reinigungsmethode beruht auf der Adsorption von DNA an die QIAEX-Glaskügelchen-Emulsion.

2.1.9 Herstellung kompetenter Bakterien

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die *E.coli*-Stämme DH5 α und Top10F'(GIBCO BRL, Eggenstein) mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Hierzu wurden pro Bakterienstamm 100 ml LB-Medium (LB-

Medium: 10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; ad 1 Liter A. dest., autoklaviert, supplementiert mit 50 µg/ml Ampicillin) mit 1 ml Übernachtskultur (37° C) angeimpft und die Bakterienkultur bei 37° C im Schüttler bis zu einer Dichte (OD_{550}) von 0,55 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 min auf Eis gekühlt, mit 6.000 rpm bei 4° C (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) pelletiert und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis und einer weiteren Zentrifugation bei 4° C mit 6.000 rpm wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15% Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt und sterilfiltriert) aufgenommen, zu 100 µl-Aliquots auf Trockeneis schockgefroren und bei -70° C gelagert.

2.1.10 Transformation

Für die Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42° C für 45 s und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis, wurden die Bakterien mit 0,5 ml SOC-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37° C für eine Stunde im Bakterien-schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, in der im Gefäß verbleibenden Lösung resuspendiert und auf Ampicillin-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37° C oder bei Raumtemperatur 2-3 Tage inkubiert.

2.1.11 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mittels der Plasmid-Aufreinigungs-Kits der Firma QIAGEN (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 200 ml Übernachtskultur (LB-Medium) zunächst für 15 Minuten bei 5.000 rpm (JA14-Rotor, Beckmann, München) pelletiert. Nach der Lyse der Bakterien mit den vom Hersteller beigelegten Puffern erfolgte die Aufreinigung der Plasmide über eine Anionenaustausch-Säule (tip-500-Säulen, QIAGEN, Hilden). Die Präparation kleinerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte aus 15 ml Übernachtskulturen mit Hilfe des QIAprep-8-Kit (QIAGEN, Hilden). Die erhaltene DNA-Menge wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Pharmacia-UV-Spektrometer (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.1.12 Isolierung genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Präparation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp-Blood-Kits der Firma QIAGEN (Hilden). Hierzu wurden 5×10^5 Zellen verwendet, die in 200 ml PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4 , 1,4 mM KH_2PO_4) resuspendiert worden waren. Die Isolierung der DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Anschließend wurde die DNA in 50 μl Aqua bidest gelöst und die Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Pharmacia-UV-Spektrometer (Gene Quant II, RNA/DNA-Calculator, Pharmacia Biotech).

2.2 Materialien und Methoden der Zellkultur

2.2.1 Zellen und Medien

2.2.1.1 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Adhärennte Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium („low glucose“ DMEM von GIBCO BRL, Eggenstein) mit 10% Komplement-inaktivierten fötalem Kälberserum (FKS; Biochrom, Berlin), 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) bei 37 °C, 5 % CO_2 und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus) kultiviert. Zur Zellpassage wurden die Zellen zweimal wöchentlich mit 5mM EDTA in PBS aus den Kulturgefäßen gelöst und 1:10 mit frischem Medium versetzt. Das Medium der CD4- und Korezeptor-exprimierenden GHOST-Zellen wurde mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hygromycin (GIBCO BRL, Eggenstein), 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 (Serva, Heidelberg) und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin (ICN, Eschwege) supplementiert.

Verwendete adhärennte Zelllinien

293T humane embryonale Nierenepithelzelllinie, SV40 LargeT transformiert (DuBridge *et al.*, 1987). Die Zellen wurden von Dr. M. Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Phoenix™ 293T-abgeleitete Zelllinie, stabil transfiziert mit einem Expressionskonstrukt für MLV-*gag/pol* und einer CD8-IRES (Pear *et al.*, 1993)

Ghost humane Osteosarkomzelllinie (HOS-abgeleitet) (Cecilia *et al.*, 1998), stabil transduziert mit einem retroviralen Vektor für die Expression von humanem CD4 (MV7neo-T4). Zusätzlich tragen die Zellen ein HIV-2 LTR-getriebenes hGFP-Konstrukt, welches durch Kotransfektion mit einem CMV getriebenen Hygromycin-Resistenz-vermittelnden Konstrukt und anschließender Selektion stabil transfiziert wurde. Darüber hinaus wurden die Zellen Ghost/CXCR4 und Ghost/CCR5 mit einem retroviralen Expressionskonstrukt für die angegebenen HIV-Korezeptoren stabil transduziert. Die Zellen wurden von M. Dittmar (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) zur Verfügung gestellt. NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm GHOST CXCR4: # 3685:, Hi-5 (CCR5): # 3944

2.2.1.2 Kultivierung von Suspensionszelllinien

Suspensionszelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (nach GIBCO BRL, Eggenstein), supplementiert mit 10% FKS (Biochrom KG, Berlin), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) kultiviert und zweimal pro Woche 1:10 mit frischem Medium versetzt.

Verwendete Suspensionszelllinien

Molt 4/8 humane T-Zellen (akut lymphoblastische Leukämie), NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: #175 (Kikukawa *et al.*, 1986)

U937 humane myeloide Zelllinie, die von Dr. E. Flory, Paul-Ehrlich-Institut, Langen zur Verfügung gestellt wurde.

2.2.2. Präparation primärer peripherer mononukleärer Blutzellen (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC)

Die Präparation von PBMC aus Vollblut (Citrat- oder EDTA-Blut) erfolgte durch Auftrennung über eine Ficoll-Kissen-Dichtezentrifugation (Ficoll Histopaque 1077, Sigma, Deisenhofen). 15 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque wurden in einem 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) vorsichtig mit 15-30 ml Blut überschichtet und anschließend für 30 min

zentrifugiert (2.300 rpm, RT, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Nach der Trennung der Blutzellen durch Zentrifugation bildeten die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen zwischen der oberen Plasmaphase und der unteren Ficollphase eine milchig trübe Interphase („Lymphozytenring“), während die roten Blutkörperchen und Granulozyten, aufgrund ihrer höheren Dichte sedimentierten. Der Lymphozytenring wurde vorsichtig abpipettiert und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die PBMC wurden zweimal mit je 35 ml PBS gewaschen, um restliches Ficoll Histopaque zu entfernen. Durch die anschließende Aufnahme in hypotone 0,86%ige Ammoniumchlorid-Lösung (PBS 0,86% NH₄Cl) für 15 min bei 37° C erfolgte die Lyse restlicher Erythrozyten. In zwei Waschschrritten wurde das Ammoniumchlorid entfernt und die Zellen in einer Dichte von 1 x 10⁶/ml Zellen in Medium aufgenommen.

2.2.3 Kultivierung von PBMC

Die PBMC wurden nach der Aufreinigung in X-Vivo 10-Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien) bzw. RPMI 1640 Medium, das mit 20% FKS bzw. 10% FKS und 10% autologem Plasma, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg/ml Nystatin, 100 Einheiten/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) supplementiert war, kultiviert. Zur Stimulierung der Zellproliferation wurde dem Medium der humanen PBMC nach der Isolation 5 µg/ml Phytohaemagglutinin (PHA, Wellcome, Dartford, Großbritannien) und dem Medium der Rhesus-PBMC 10 µg/ml PHA, sowie 200 Units IL-2/ml (IL-2, Chiron, Marburg) für 72 h zugesetzt. Die Proliferation der Zellen wurde durch Bestimmung der Zellzahl und die Aktivierung der Zellen anhand der T-Zellaktivierungsmarker CD25 oder CD69 im FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) überprüft.

2.2.4 Plasmagewinnung nach PBMC-Isolation

Das aus der PBMC-Isolierung gewonnene Plasma wurde für verschiedene Nachweisverfahren bzw. für die spätere Kultivierung der PBMC weiter aufbereitet. Nach der Ficoll-Kissen-Dichtezentrifugation des Vollblutes befindet sich das Plasma oberhalb des Lymphozytenringes und kann mit einer Pipette abgenommen werden. Um noch eventuell vorhandene Zellen abzutrennen, wurde das Plasma für 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend für 30 min bei 56 °C inaktiviert. Danach wurde das Plasma erneut 10 min bei 3.000 rpm und 4°C zentrifugiert und dann bei 4°C bzw. bei längerer Lagerung bei -70° C aufbewahrt.

2.2.5 Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie

Zur Generierung von verpackbaren pseudotypisierten [MLV(SHIV)]-Vektoren wurde die stabile Verpackungszelllinie ϕ NX MLV *gag-pol*/SHIV Δ *env/tat/rev*/ Δ *Ingfr* etabliert. Hierzu wurde die 293T-abgeleitete PhoenixTM-Zelllinie (Pear *et al.*, 1993) verwendet, die ein stabiles MLV *gag-pol*-Konstrukt enthält. Als Oberflächenmarker-Kassette enthält die PhoenixTM-Zelllinie eine CD8-IRES (Internal Ribosome Entry Site) 3' des offenen Leserahmens von MLV *gag-pol*, deren Expression einen direkten Rückschluß auf die stabile Expression von MLV *gag/pol* zulässt und im FACS mittels eines murinen α CD8-Antikörpers (Lyt-2) nachweisbar ist. Als zusätzlichen Ko-Selektionsmarker enthält das Konstrukt ein Hygromycin-Resistenzgen. Um das Rekombinationspotential zu minimieren, wird der MLV *gag-pol*-Vektor von einem RSV-Promotor getrieben. In diese *env*-negative Verpackungszelllinie wurde der Transfervektor pMg Δ *env/tat/rev*/ Δ *Ingfr* stabil transfiziert. Durch die anschließende magnetische Zellseparierung (MACS, Kap. 2.2.15) erhielt man eine 91 bzw. 99%-Transfervektor-positive Verpackungszelllinie.

2.2.6 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Adhärente Zellen wurden mit 5mM EDTA in PBS vom Kulturgefäßboden abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1.300 rpm, 4 °C, 10 min, Heraeus-Minifuge, Hanau) und $1,5 \times 10^6$ Zellen in 800 μ l 4°C-gekühltem Medium 1 (DMEM bzw. RPMI, 20% FKS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und mit 800 μ l des bei 4°C gekühlten Medium 2 (DMEM bzw. RPMI, 20% FKS, 20% DMSO, Merck, Darmstadt) überschichtet. Anschließend wurden die Zellen auf -80 °C und nach 24 h in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.7 Auftauen von Zellen

Die in den Einfrierröhrchen befindlichen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37° C zügig aufgetaut und sofort in 20 ml Medium überführt. Zur Entfernung des zytotoxischen DMSO wurden die Zellen für 10 Minuten bei 1.300 rpm (Minifuge T, Heraeus Hanau) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in Kultur genommen. Am nächsten Tag folgte ein Mediumwechsel und die Zugabe notwendiger Selektionsmarker.

2.2.8 Transfektion mittels Lipofektamin™

Das Einschleusen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zur stabilen und transienten Transfektion wurde die DNA mit Lipidvesikeln komplexiert, welche anschließend in das Zytoplasma aufgenommen werden (Lipofektion). Hierzu wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin™ in Kombination mit Lipofektamin PLUS™ (GIBCO BRL, Eggenstein) verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 5×10^5 pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 2-4 µg Plasmid-DNA mit 6 µl Lipofektamin PLUS™ in 100 µl OptiMEM (GIBCO BRL, Eggenstein) für 15 min bei RT vorinkubiert. In einem parallelen Ansatz wurden 5 µl Lipofektamin™ in 100 µl OptiMEM ebenfalls für 15 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze zusammengegeben und nochmals für 15 min inkubiert, sodaß die kationischen Lipide des Lipofektamins mit der DNA komplexierten. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 2 ml serumfreien Medium überschichtet und gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde danach in 800 µl OptiMEM aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Das DNA-Liposomengemisch wurde 4 h bei 37° C im Zellinkubator inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde frisches Medium zugegeben. Die Expression der übertragenen Gene wurde 48 h nach Transfektion mittels FACS oder IPA (*In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay) überprüft, bzw. die generierten Pseudotypvektoren nach Filtration (0,45 µm-Spritzenfilter, Sartorius, Göttingen) zur Entfernung kontaminierender Zellen zur weiteren Transduktion eingesetzt.

Für die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie für den Transfervektor pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr wurden 1×10^7 Zellen am Vortag in einer mittleren Zellkulturflasche (250 ml, 75 cm², Cellstar, Greiner, Frickenhausen) ausgesät. Zur Transfektion des Transfervektors pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr wurden insgesamt 20 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Den größeren Volumina entsprechend wurde jeweils die 6fache Menge der oben genannten Reagenzien eingesetzt.

2.2.9 Generierung von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

Zur Generierung von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren wurden auf 80% konfluenten Kulturen der Verpackungszelllinie in 550 ml Zellkulturflaschen (182 cm², Cellstar, Greiner, Frickenhausen) je 15 ml frisches Medium ohne Selektionsmarker gegeben. Um höhere Vektortiter zu erzielen, wurde das Medium mit 10 mM Natriumbutyrat (Sigma, Deisenhofen) supplementiert (Olsen *et al.*, 1995). Nach 14 Stunden wurde das Medium abgenommen und durch einen 45 µm Filter (45 µm Mikrofilter, Sartorius, Göttingen) von verbleibenden Zellen

getrennt bzw. für 10 min bei 3000 rpm, 4°C (Minifuge T, Heraeus, Hanau) zentrifugiert, sodass restliche Zellen bzw. Zelltrümmer pelletiert wurden. Nativer Überstand wurde, sofern er nicht direkt zur Transduktion eingesetzt wurde, aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die zur Transduktion von Rhesus-PBMC eingesetzten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren wurden durch Ultrazentrifugation pelletiert, sodass eine 175fache Anreicherung der vektorpartikelhaltigen Überstände erreicht wurde. Hierzu wurde der vektorpartikelhaltige Überstand der Verpackungszellen bei 25.000 rpm und 4 °C für 1,5 h in einem SW28-Rotor (Beckmann, München) zentrifugiert. Im Anschluß an die Ultrazentrifugation wurde das Medium vorsichtig abgenommen und das Pellet in 200 µl PBS (BioWhittaker, Verviers, Belgien) aufgenommen. Nach vorsichtigem Resuspendieren wurde das Pellet dann für 30 min bei 4° C auf dem Schüttler gelöst. Danach wurde der Vektorstock aliquotiert und bei -80° C gelagert.

2.2.10 Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten zur Transduktion von Rhesus-PBMC

Retronektin, ein rekombinantes Fragment aus humanem Fibronektin, enthält spezifische Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren, als auch für hämatopoetische Zellen (Hanenberg *et al.* 1996). Die Kolo-kalisierung von Vektoren und Zellen auf Retronektin-beschichteten Platten führt zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz. Zur Transduktion primärer Zellen wurden 12- bzw. 24-Lochplatten (BD Falcon, Heidelberg), die nicht zellkulturbehandelt waren, mit Retronektin beschichtet. Hierzu wurden je 500 bzw. 250 µl Retronektinlösung (0,1 µg/ml) pro Vertiefung pipettiert und für eine Stunde offen unter UV-Licht inkubiert. Nach einer weiteren halben Stunde unter UV-Licht, bei der die Platten mit einem Deckel verschlossen waren, wurde die Retronektinlösung abgenommen und 500 bzw. 250 µl einer 2%-igen BSA-Lösung (in PBS) zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in die Vertiefungen gegeben. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten zweimal mit HBSS-Puffer (Sigma, Deisenhofen) gewaschen und zur Lagerung bei 4°C mit 0,5 bzw. 1 ml PBS überschichtet.

2.2.11 Transduktion primärer Lymphozyten

Die zur Transduktion primärer Lymphozyten eingesetzten Retronektin-beschichteten Platten wurden zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit vektorhaltigem Überstand für eine halbe Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und

1 x 10⁶ Zellen (12-Loch Platte) bzw. 5 x 10⁵ Zellen (24-Loch Platte) wurden in 500 bzw. 250 µl vektorhaltigen Überstand (verdünnt in X-Vivo Medium mit 20 % FKS bzw. 10% FKS/ 10% Plasma, 200 Units/ml IL-2, 4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, Deisenhofen), 10 µg PHA, 2 mM Glutamin und Antibiotika) auf die Platten gegeben. Diese wurden anschließend für 90 min bei 32° C und 1.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert und für weitere 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach folgte ein Halbmediumwechsel gegen entsprechendes Medium ohne Protaminsulfat und PHA. Die durchflußzytometrische Analyse der transduzierten Zellen erfolgte zwei Tage nach der Transduktion.

2.2.12 Transduktion von Zelllinien

Für die Transduktion von adhärennten Zelllinien wurden am Vortag 1 x 10⁵ Zellen in einer 6-Loch Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Das Kulturmedium der zu transduzierenden Zellen wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit vektorhaltigem Überstand inkubiert. Zur Transduktion von Suspensionszellen wurden 1 x 10⁵ Zellen abzentrifugiert, im vektorpartikelhaltigen Überstand bzw. in der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 500 µl resuspendiert und in 12-Loch Platten (NUNC, Wiesbaden) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Stunden bei 37° C erfolgte ein Mediumwechsel. Die durchflußzytometrische Analyse der Transduktionseffizienz erfolgte 2 Tage nach Transduktion.

2.2.13 Vektortitration

Zur Bestimmung des Vektortiters der mittels transienter Transfektion bzw. durch Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie generierten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren wurden zellfreie vektorpartikelhaltige Überstände in verschiedenen Verdünnungen zur Transduktion permissiver Zellen (2,5 x 10⁵) eingesetzt. Für die Titrations wurden Verdünnungsreihen von 500 µl, 250 µl und 25 µl bei nativen Überständen bzw. 100 µl, 10 µl, 1 µl bei UZ-pelletierten Überständen in einem Gesamtvolumen von 500 µl eingesetzt. 48 h nach Transduktion wurde die Anzahl Transfergen-positiver Zellen anhand des Oberflächenmarkers Δ LNGFR im FACS bestimmt. Der Titer, angegeben in infektiösen Einheiten pro ml (i.E./ml), wurde aus dem Mittelwert der drei durchgeführten Titrationsstufen errechnet. Die Titration der im Tierversuch eingesetzten vektorpartikelhaltigen Überstände erfolgte im autologen System d.h. auf primären Rhesus-PBMC, um eine Vergleichbarkeit der Gentransfer-Effizienz zu gewährleisten.

2.2.14 Synzytieninduktionsassay

Bei der Expression lentiviraler Hüllproteine auf der Oberfläche transduzierter Zellen kommt es in Gegenwart von CD4 auf der Nachbarzelle zur Bindung der beiden membranständigen Proteine, die zu einer Verschmelzung der beiden Zellen, der sogenannten Synzytieninduktion, führt. Die Synzytieninduktion wurde für den Nachweis der Funktionalität des auf der Oberfläche transfizierter Zellen exprimierten SHIV-Hüllproteins verwendet, nachdem diese mit dem Transfervektor pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr transfiziert worden waren. Die Synzytieninduktion ist nur möglich, wenn das Hüllprotein auf der Oberfläche exprimiert wird, an CD4 der Nachbarzelle bindet und die für die Fusion notwendige Konformationsänderung eingehen kann. Hierzu wurden 5×10^5 Zellen der Verpackungszelllinie bzw. transient mit pMg Δ env/tat/rev/ Δ Ingfr transfizierte 293T-Zellen in einer 6-Loch-Platte (NUNC, Wiesbaden) ausgesät. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen mit 5×10^5 Zellen der CD4-positiven humanen T-Zelllinie Molt 4/8 überschichtet und für 24 bis 48 h kokultiviert. Danach konnte die Synzytieninduktion lichtmikroskopisch untersucht und die Expressionen des viralen Hüllproteins mittels *In-situ*-Immun-Peroxidase-Assay (Kap. 2.3.3) nachgewiesen werden.

2.2.15 Magnetische Zellsortierung (Magnetic Cell Sorting, MACS)

Die Sortierung von Zellen aufgrund der Expression von Oberflächenantigenen wird durch die Bindung spezifischer Antikörper, die entweder direkt oder durch einen Zweitantikörper mit Metallkügelchen (*Beads*) gekoppelt sind, ermöglicht. Die auf diese Art und Weise markierten Zellen werden beim Durchfließen einer Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten. Die magnetische Zellsortierung wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Anreicherung Transfervektor-positiver Verpackungszellen und zur Separierung von T-Zell-Subpopulationen angewandt. Zur magnetischen Zellseparierung wurde das Mini- und Midi-MACS-System der Firma Miltenyi-Biotec (Bergisch-Gladbach) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Anreicherung CD8⁺ T-Zellen aus humanen PBMC zur Quantifizierung der Cytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen erfolgte durch die Anbindung CD8⁺ T-Zellen an CD8-spezifische monoklonale Antikörper, die direkt mit magnetischen Metallkügelchen, sogenannten „Microbeads“, gekoppelt waren.

Verpackungszellen, die zu 5-50% Transfervektor-positiv waren, konnten durch eine oder zwei magnetische Zellsortierungen auf eine Reinheit von bis zu 99% angereichert werden. Da bislang kein direkt mit magnetischen Beads gekoppelter monoklonaler Antikörper für das

im Transfervektor enthaltene Oberflächenmarkergen $\Delta Ingfr$ erhältlich ist, war die Inkubation eines mit magnetischen Beads gekoppelten Sekundärantikörpers erforderlich.

Die zu sortierenden Zellen (5×10^6 für die MSTM-Säulen und 1×10^8 Zellen für die LS-Säulen) wurden abzentrifugiert und einmal in Waschpuffer (PBS, 2 % BSA, Serva, Heidelberg, 2 mM EDTA, pH 7,2, sterilfiltriert) gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 50-100 μ l Waschpuffer resuspendiert und mit 20 μ l $\alpha\Delta$ LNGFR (50 μ g/ml, Chemicon, Hofheim) je 5×10^6 Zellen für 30 min bei 4° C inkubiert. Nach zwei Waschschritten bei 4° C wurde das Pellet wiederum in 50-100 μ l Waschpuffer resuspendiert und mit Rat-anti-mouse-IgG1-Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach) für 30 min bei 4° C inkubiert (10 μ l pro 5×10^6 Zellen). Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Beads, halten Antigen-positive Zellen an den Säulen im Magnetfeld zurück. Für die Selektion CD8⁺ T-Zellen war nur ein Inkubationsschritt mit einem CD8-Antikörper nötig, da dieser bereits direkt mit magnetischen Beads gekoppelt war. Nach einem Waschschrift bei RT wurden die Zellen auf die jeweiligen vorequilibrierte Säulen (MS bzw. LS-Säulen, Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach) gegeben und viermal mit 0,5 bzw. 1 ml Waschpuffer gewaschen. Für die Elution wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen mit 2 bzw. 5 ml Waschpuffer eluiert. Nach dem Abzentrifugieren (1.300 rpm, 10 min, RT, Minifuge T, Heraeus, Hanau) wurden die Zellen in Kultur genommen und nach zwei bis drei Tagen im FACS auf ihre Reinheit untersucht. Gegebenenfalls wurde eine zweite MACS-Anreicherung angeschlossen.

2.2.16 Analytische Durchflußzytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellpopulationen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von Zellen. Mit Hilfe eines Argon-Lasers werden die Zellen bei 488 nm angeregt, worauf die in Abhängigkeit des jeweils verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs emittierten Signale bei unterschiedlichen Wellenlängen eine qualitative wie auch quantitative Aussage auf die Expression des jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proteins erlauben. Gleichzeitig kann im Streulicht die Größe und Granularität der Zellen dargestellt werden.

Anhand der analytischen Durchflußzytometrie wurden transfizierte und transduzierte Zellen auf die Expression des Markergens $\Delta Ingfr$ sowie primäre Lymphozyten und T-Zelllinien auf die Expression von CD-Markern und Cytokinrezeptoren untersucht. Die Expression des viralen Hüllproteins auf der Oberfläche der Verpackungszelllinie erfolgte mittels eines α HIV⁺

Serums eines Patienten (60 min, 37° C) und der nachfolgenden Inkubation mit einem PE-(R-Phycoerythrin) konjugierten Sekundärantikörper *α* hu IgG (Sigma, Deisenhofen) für 30 min bei 4° C. Desweiteren wurde die Viabilität der *ex vivo* transduzierten PBMC nach Isolation, nach Stimulation und nach Transduktion mittels der PI-(Propidium-Iodid, Sigma, Deisenhofen)-Anfärbung bestimmt. Das DNA-interkalierende Propidium-Iodid, kann nur dann in Zellen eindringen, wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist und die Zellen sich im Übergang zur Apoptose befinden bzw. schon apoptotisch sind. Der Nachweis Env-spezifischer Antikörper im Serum des mit *ex vivo* transduzierten PBMC immunisierten Rhesusaffen erfolgte durch Inkubation des Serums in einer 1:5 Verdünnung und einer nachfolgenden Inkubation des Sekundärantikörper *α* hu IgG (Sigma, Deisenhofen).

Die Anfärbung der Zellen wurde in Polystyren-Röhrchen (Falcon, BD, Heidelberg) durchgeführt. Je 2×10^5 Zellen wurden in 100 μ l FACS-Puffer (FACS-Puffer mit 1% FCS, 0,1% NaN₃, Merck Darmstadt) resuspendiert und mit 0,5-5 μ l eines Fluoreszenzfarbstoff-markierten monoklonalen Antikörpers inkubiert. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 4° C im Dunkeln, wurden die Proben einmal mit 500 μ l Wasch-Puffer gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4° C, Minifuge T, Heraeus, Hanau) und anschließend durch Zugabe von 200 μ l 1%iger Paraformaldehydlösung (Sigma, Deisenhofen) in PBS fixiert. Bei einer Anfärbung mit nicht-fluoreszenzstoffmarkierten Antikörpern wurden die Zellen nach Inkubation mit dem spezifischen Antikörper zweimal mit Waschpuffer gewaschen und danach mit einem Fluoreszenzstoff-markierten Sekundärantikörper 20 min bei 4° C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Die Analyse der Zellen erfolgte an einem FACS Scan (FACStar plus, Becton Dickinson, Heidelberg), wobei das Einmessen von mindestens 5000 Zellen erforderlich war. Die Auswertung der Messreihen erfolgte mit der Lysis II Software (Becton Dickinson, Heidelberg).

Folgende Antikörper wurden verwendet:

Antikörper	Klon	Firma
α -hu CD4 (IgG1, FITC)	SK3	Pharmingen, Heidelberg
α -hu CD8 (IgG1, PE)	SK1,	Becton Dickinson, Heidelberg
α -mouse CD8 (IgG1, PE)	Ly-2	Becton Dickinson, Heidelberg
α -CXCR4 (IgG2a, PE)	12G5	Pharmingen, Heidelberg
α -CCR5 (IgG2b, FITC)	FAB183F	R&D Systems, Wiesbaden
α -CD69 (IgG1, PE)	FN50	Becton Dickinson, Heidelberg
α -CD25 (IgG1, PE)	ACT-1	DAKO Diagnostika, Hamburg
α -hu <i>LNGFR</i> (PE)	37145X	Pharmingen, Heidelberg
α -hu <i>LNGFR</i> (unkonjugiert)	MAB5264	Chemicon, Hofheim

α -mouse IgG1 γ (PE, Sekundärantikörper)	MO55172	Sigma, Deisenhofen
α -human IgG1 (PE, Sekundärantikörper)	38H9151	Sigma, Deisenhofen
Isotyp: Mouse IgG1 κ (PE)	X40	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp: Mouse IgG1 κ (FITC)	MO-26463	Becton Dickinson, Heidelberg
Isotyp: Rat IgG2a (PE)	G-155178	Pharmingen, Heidelberg
Isotyp: Mouse IgG2b (FITC)	20116	R&D Systems, Wiesbaden

2.2.17 Test auf virale Reverse Transkriptase-Aktivität (RT-Test)

Als Marker für die Präsenz von Viruspartikeln dient der Nachweis von Reverser Transkriptase-Aktivität im Kulturmedium von Zellen. Das Testsystem, das hier zum Nachweis von RCRs eingesetzt wurde, beruht auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip und detektiert die auf dem *pol*-Gen kodierte Reverse Transkriptase, die die auf den Testplatten immobilisierte Oligonukleotide transkribiert. Diese enthalten einen gewissen Anteil des markierten BrdUTP- (Bromo-deoxyuridin-triphosphat)-Nukleotids, das in den transkribierten Strang eingebaut wird. Die markierten Nukleotide werden von einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper erkannt, welcher die farbliche Umsetzung des nachfolgend hinzugegebenen Substrates katalysiert. Die umgesetzte Substratmenge, die mit der Anzahl eingebauter markierter Nukleotide und somit mit der vorhandenen RT-Aktivität im Zellkulturüberstand korreliert, wurde photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Photometers (Spektra-SLT Labinstruments, Crailsheim) bei 405nm bestimmt. Anhand einer Standardreihe kann eine bestimmte Absorption der entsprechenden RT-Aktivität zugeordnet werden. Zum Nachweis von RCRs in den Überständen der mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten Ghost-Zellen wurden jeweils 10 μ l Zellkulturüberstand in den C-type-RTTM Activity Assay (Cavidi Tech, Uppsala, Schweden) eingesetzt und die RT-Aktivität nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die Proben wurden in einem Zeitraum von 14 Tagen im Abstand von 2-4 Tagen entnommen, wobei am 5. Tag die Überstände auf eine zweite Zielzell-Generation überführt wurden. Als Positiv-Kontrolle wurden transient hergestellte Überstände des replizierenden amphotropen MLV pM91 (Kap. 2.1.1.2) und als Negativkontrolle Medium ohne Vektor- bzw. Viruspartikel eingesetzt. Die abgenommenen Überstände wurden zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4° C) um restliche Zellen abzutrennen und in Sarstedtreaktionsgefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) bei -80° C gelagert. Die Nachweise mit dem C-Type-RTTM Activity Assay wurden von S. Raupp durchgeführt.

2.3 Methoden der Serologie und Immunologie

2.3.1 Verwendete Seren für die klinische Studie

Die im Rahmen der klinischen Studie zur Bestimmung der Cytokin- bzw. IL-16-Konzentrationen eingesetzten Seren stammen von HIV-1-infizierten Patienten der HIV-Ambulanz der Johann-Wolfgang-Goethe Universität in Frankfurt/Main. Das untersuchte Patientenkollektiv wurde differenziert in sogenannte HAART-Responder, d.h. Patienten, die unter HAART eine Viruslast von ≤ 50 Kopien/ml Plasma aufweisen, und sogenannte HAART-Non-Responder, deren Viruslast trotz HAART bei >50 Kopien/ml Plasma liegt. Ferner wurden die Serumkonzentrationen von seronegativen Kontrollpersonen gemessen.

Das Serum wurde aus 2 ml nicht-heparinisiertem Vollblut nach Abschluss der Blutgerinnung durch Zentrifugation bei 3.000 rpm für 10 min gewonnen. Zur Virusinaktivierung wurde das Serum für 30 min bei 56° C inaktiviert und anschließend bei 3.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Danach wurde der Serum-Überstand entnommen, aliquotiert und bei -70° C gelagert.

2.3.2 Verwendete Seren zur Messung der humoralen Immunantwort nach Immunisierung

Die zur Messung der Immunantwort eingesetzten Seren stammen von dem Rhesusaffen B57, dem im Rahmen der Immunisierungsstudie die *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten autologen PBMC transplantiert worden waren. Als Negativkontrolle wurde ein vor der Immunisierung abgenommenes Prä-Immun-Serum verwendet. Mittels der nach Immunisierung abgenommenen Seren, den sogenannten Post-Immun-Seren, sollte die humorale Immunantwort im ELISA untersucht werden. Die Seren wurden wie bereits in Kap. 2.3.1 beschrieben aufgearbeitet.

2.3.3 In-situ-Immun-Peroxidase-Assay (IPA)

Die Expression viraler Proteine in transfizierten oder transduzierten Zellen wurde immunhistochemisch mittels IPA nachgewiesen. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Methanol 30 min bei -20° C fixiert und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zellen 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Blockierungspuffer (PBS, 2% BSA) inkubiert. Anschließend wurden die

Zellen mit dem spezifischen Antiserum in einer zuvor getesteten Verdünnung in Blockierungspuffer für 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Zum Nachweis der Expression des lentiviralen Hüllproteins in transfizierten und transduzierten Zellen wurde ein α HIV⁺-Serum eines Patienten in einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungspuffer eingesetzt. Nach einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Meerrettich-Peroxidase-konjugiertem Protein G (BIO-RAD, München, 1:1000 in Blockierungspuffer, 1h, 37° C) als Sekundärantikörper erfolgte die Detektion der Fc-Teile der spezifischen Immunglobuline des zuvor verwendeten Antiserums. Nach zwei Waschschritten folgte die Zugabe der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer, pH 5 und 30 μ l H₂O₂, 45 μ m filtriert). Während der 5-10 minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur kommt es zur enzymatischen Umsetzung des Chromogens, die lichtmikroskopisch in einer deutlichen Rotfärbung Antigen-positiver Zellen sichtbar wird.

2.3.4 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbant-Assay (ELISA)

Dieser enzymgekoppelte Immunadsorptionstest wird als qualitative und quantitative Methode zum Nachweis spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Methode beruht auf einer Antigen-Antikörper-Bindung, die mittels eines enzymgekoppelten Sekundär-Antikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet ist, nachgewiesen wird. Die Intensität der Farbreaktion, die sich proportional zu der Anzahl der gebundenen Antikörper verhält, wurde photometrisch bei 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im ELISA Reader (Spektra, SLT) bestimmt, wobei die Messungen jeweils im Doppelansatz erfolgten. Für den linearen Teil der Verdünnungskurven wurde mit Hilfe der linearen Regression eine Gerade ermittelt. Der Titer der entsprechenden Probe errechnet sich aus dem Schnittpunkt dieser Gerade mit dem für jeden Test festzulegenden Grenzwert (Cut off).

2.3.4.1 Nachweis der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES und des Interleukins IL-16

Der Nachweis der Cytokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie des IL-16 im Serum und im Zellkulturüberstand stimulierter CD8-positiver (+) T-Zellen erfolgte mittels der ELISA-Testkits der Firma R&D System (Wiesbaden) und Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Basierend auf dem Sandwich-Enzym-Immunoassay-Verfahren sind die Mikrotiterplatten mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper vorbeschichtet, gegen den das entsprechende

Cytokin bzw. Interleukin der zu untersuchenden Probe binden kann. Mit einem Enzymgekoppelten Sekundärantikörper, der spezifisch gegen das jeweilige Cytokin bzw. Interleukin gerichtet ist, und der nachfolgenden Inkubation der Substratlösung lassen sich gebundene Antikörper durch die enzymatische Farbreaktion nachweisen.

Zur Bestimmung der MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden jeweils 5×10^5 CD8⁺ T-Zellen in 12 Loch-Platten (NUNC, Wiesbaden) ausgesät und für 3 Tage mit 5 μ g/ml PHA stimuliert. Danach wurde der Zellkulturüberstand von den Zellen abgenommen, filtriert (45 μ m Mikrofilter, Sartorius, Göttingen) und in Aliquots bei -80° C gelagert.

2.3.4.2 Nachweis Transfergen-spezifischer Antikörper

Für den Nachweis von Antikörpern gegen die Transfergene SHIV $\Delta env/tat/rev$ und $\Delta lngfr$ wurde ein qualitativer ELISA durchgeführt, bei dem als Antigen Vektorpartikel der Transfervektor-positiven Verpackungszelllinie sowie als Negativ-Kontrolle Überstände der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie auf 96-Loch-Platten (Falcon, Microtest III Probind Plate, Becton Dickinson, Heidelberg) immobilisiert wurden. Hierzu wurden die 1:5 in Aqua bidest verdünnten UZ-pelletierten Vektorpartikel-haltigen Überstände in einem Gesamtvolumen von 50 μ l auf die Platten gegeben und diese durch Trocknung über Nacht bei Raumtemperatur an eine Trägermatrix am Boden der Platte adsorbiert. Nach Waschen der beschichteten Platten mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 in PBS) erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch die Zugabe von Blockierungspuffer (3% BSA, 10% FCS in PBS; 50 μ l/Loch) für eine Stunde bei 37° C. Nach Waschen der Platten mit Waschpuffer, erfolgte die Serum-Inkubation in einer Verdünnung von 1:5 und 1:10 in Probenpuffer (3% BSA, 10% FCS, 0,05% Tween 20) jeweils im Doppelansatz. Die optimale Verdünnung der zuvor hitzeinaktivierten Testseren war vorab in einer „Schachbrett-Titration“, d.h. durch Titration des Antigens versus dem Antikörper-enthaltenen Testserum (α HIV⁺-Serum) ermittelt worden. Während der einstündigen Inkubation bei 37° C können nun die im Testserum vorhandenen spezifischen Antikörper mit dem auf der Platte immobilisierten Antigen reagieren. Durch nachfolgende Waschschrte (3 mal je 250 μ l Waschpuffer) wurden ungebundene Antikörper entfernt. Als Sekundärantikörper wurde das anti-human-IgG-Peroxidase-Konjugat (Sigma, Deisenhofen) in der Verdünnung 1:1000 (50 μ l/Loch) eingesetzt und für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Substratlösung (5 ml PBS, pH 6,0; 5 mg OPD, Sigma, 7,5 μ l H₂O₂) in einem Volumen von 50 μ l pro Loch zugegeben. Die Farbreaktion wurde mit 25 μ l 2.5M H₂SO₄

abgestoppt. Die Intensität der Farbreaktion, die sich proportional zur Anzahl der gebundenen Antikörper verhält, wurde photometrisch bei 490 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im ELISA Reader (Spektra, SLT) bestimmt. Für den Nachweis Transferrgen-spezifischer Antikörper wurde die Differenz der OD-Werte der mit Vektorpartikeln der Transfervektor-positiven Verpackungszelllinie-beschichteten ELISA-Platte und der mit Überständen der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie beschichteten ELISA-Platte errechnet und als spezifisches Signal gewertet.

2.3.4.3 Nachweis HIV- 1-gp120-spezifischer Antikörper

Da mit dem in Kap. 2.3.4.2 beschriebenen Testsystem keine Differenzierung zwischen der HIV- und Δ LN GFR -spezifischen Antikörperantwort möglich ist, wurde in einem weiteren ELISA das rekombinante HIV-1-IIIB-Glykoprotein gp120 (ImmunoDiagnostics, Inc., MA, USA) als Antigen verwendet. 25 ng dieses im CHO-Expressionssystem hergestellten Proteins, dessen Sequenzhomologie zuvor durch Sequenzvergleiche mit dem zur Immunisierung verwendeten SHIV 89.6P *env* überprüft worden war, wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l in Aqua bidest/Loch auf 96-Loch-Platten (ImmunoTMPlatten Maxi SorpTMSurface, BD, Heidelberg) immobilisiert. Die weiteren Reaktionsschritte wurden nach dem in Kap. 2.3.4.2 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung des Rhesusaffen abgenommenen Seren wurden 1:5 in Probenpuffer verdünnt und als Duplikate auf die Antigen-beschichtete Platte aufgetragen. Als Positivkontrolle wurde ein α HIV⁺-Serum eingesetzt.

2.3.5 Nachweis neutralisierender Antikörper

Für den Nachweis neutralisierender Antikörper im Serum des immunisierten Rhesusaffen wurden [MLV(SHIV)] vektorpartikelhaltige Überstände (multiplicity of infection (MOI) 0,1) zusammen mit den 1:5 verdünnten Seren für eine Stunde bei 37° C in einem Gesamtvolumen von 500 μ l präinkubiert und anschließend zur Transduktion auf permissive CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen und Rhesus-PBMC (5×10^5) eingesetzt. Als Kontrolle wurde ein Prä-Immunsrum und ein α HIV⁺-Serum verwendet, sowie ein Ansatz, der Vektorpartikel ohne Serum enthielt. Zwei Stunden nach Transduktionsbeginn wurden die Zellen gewaschen und in frischem Kulturmedium für zwei Tage expandiert. Die Anzahl transduzierter Zellen wurde 2 Tage nach Transduktion im FACS anhand des Oberflächenmarkers Δ LN GFR untersucht. Die nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum bzw. ohne Serum erzielte

Transduktionseffizienz wurde als 100% gewertet. Der Anteil transduzierter Zellen wurde nach Inkubation der Post-Immun-Seren bzw. des α HIV⁺-Serums relativ zur Transduktionseffizienz, die nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum bzw. ohne Serum erzielt worden ist, angegeben.

2.3.6 Nachweis von cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) im ELISpot

Mit Hilfe des ELISpot-Assays können einzelne Cytokin-produzierende Zellen nachgewiesen werden, darunter auch cytotoxische T-Lymphozyten. Diese können anhand ihrer Fähigkeit auf Antigen-Stimuli INF γ zu sezernieren, d.h. bei Kontakt mit dem Peptidantigen im Kontext des passenden MHC I, im ELISpot nachgewiesen werden. Bei dieser Abwandlung des Sandwich-ELISA wird ein hochaffiner monoklonaler INF γ -Antikörper an die Matrix einer Mikrotiterplatte absorbiert. Anschließend werden PBMC zusammen mit dem zu testenden Peptidpool als Antigen-Stimulus auf die vorbeschichteten Platten gegeben. Während der Inkubationszeit heftet sich das sezernierte Cytokin (INF γ) an den monoklonalen Antikörper. Zunächst wurden die 96-Loch-PVDF Platten (MAIPS4510, Millipore) mit je 100 μ l/Loch des Antikörpers GZ-4 (Mabtech AB, Gamla, Schweden) in einer Konzentration von 15 μ g/ml gelöst in 0,1 M NaHCO₃/Na₂CO₃-Puffer (pH 9,6, steril filtriert) beschichtet und über Nacht bei 4° C gelagert. Danach wurde die Antikörper-Lösung entfernt und die Platten 6mal mit je 200 μ l/Loch PBS gewaschen. Danach folgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit je 100 μ l/Loch R10 (RPMI 1640, 10% FCS, 2mM L-Glutamin, Antibiotika, 0.2 μ m-filtriert) für 2 Stunden bei 37° C im Brutschrank. Nach Entfernung des Blockierungspuffers wurden die PBMC (2 x 10⁵ Zellen/Loch) zusammen mit den Antigen-Stimuli auf die Platten transferiert und für 16 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Als Antigen-Stimuli wurden hierbei Peptidpools von HIV-1-Env und Rev in einer Konzentration von 25 μ g/ml sowie rekombinantes (r) HIV-1 gp120 und rTat in einer Konzentration von 2 μ g/ml eingesetzt. Nach Entfernung der Zellen wurden die Platten 6mal mit je 200 μ l/Loch PBS gewaschen. Der Nachweis des gebundenen INF γ erfolgte mit einem monoklonalen biotinylierten INF γ -Antikörper (100 μ l/Loch, 1:1000 verdünnt in PBS mit 0,5% filtriertem FCS, Mabtech AB, Gamla, Schweden). Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 37° C wurden die Platten 6mal mit 0,1% Tween 20 in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit einem Streptavidin-Alkalin-Phosphatase Konjugat (Mabtech AB, Gamla, Schweden), das 1:1000 in in PBS mit 0,5% filtrierten FCS verdünnt worden war (je 100 μ l/Loch), für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor Zugabe der Substratlösung BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Inolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) substrate, B-1911, Sigma, Deisenhofen) wurden die Platten 6mal mit je 200 μ l/Loch 0,1% Tween 20 in PBS gewaschen. Die Platten

wurden 45 min mit der Substratlösung inkubiert, wobei die in der Substratlösung enthaltenen Chromogene auf der Membran präzipitierten und als einzelne „Spots“ sichtbar wurden. Die Substratlösung wurde danach entfernt und die Farbreaktion durch Waschen mit Aqua bidest. gestoppt. Die Platten wurden getrocknet und danach lichtmikroskopisch ausgewertet. Der Nachweis der INF γ -Sekretion im ELISpot wurde am Robert-Koch-Institut in Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Steve Norley in Zusammenarbeit mit Erik Seibold durchgeführt.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit diesem Verfahren (modifiziert nach Laemmli, 1970) werden Proteingemische nach ihrem apparenten Molekulargewicht durch die Molekularsiebeigenschaften des Polyacrylamid-Gelsystems aufgetrennt. Hierbei umgibt das negativ geladene Detergenz SDS die Proteine mit überschüssigen negativen Ladungen, sodaß das Laufverhalten unbeeinflusst von ihrer Nettoladung bleibt.

2.4.1.1 Aufbereitung der Proben

Mittels Western-Blot-Analyse sollte in Zellextrakten der Verpackungszelle das Vorhandensein SHIV-spezifischer Antikörper im Serum des immunisierten Rhesusaffen nachgewiesen werden. Hierzu wurden konfluente Zellen einer großen Zellkulturflasche (182 cm², 550 ml, NUNC, Wiesbaden) zunächst mit PBS gewaschen und mit 1ml 5mM EDTA in PBS vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und 2 mal mit PBS gewaschen (1200 rpm, 10 min, 4° C). Anschließend wurden 5 x 10⁷ Zellen in 150 μ l PBS resuspendiert, mit 50 μ l Probenpuffer (Roti Load, Roth, Karlsruhe) versetzt und für 5 min bei 95° C erhitzt. Anschließend wurden die Zellen auf einen QIAShredder (QIAGEN, Hilden) gegeben, nach Angaben des Herstellers extrahiert und die erhaltenen Zellextrakte auf ein 12%iges Gel aufgetragen.

Verwendete Protein-Molekulargewichts-Marker:

RPN 800 Full range Rainbow (Amersham, Buckinghamshire, England) [kDa]

250 / 160 / 107 / 77 / 52 / 35 / 30 / 25 / 15 / 10

Pro Spur wurde 10 µl Marker eingesetzt.

Die Durchführung des diskontinuierlichen SDS-PAGE erfolgte mittels der Mini-Gel-Apparatur der Firma BioRad (BioRad Trans-Blot-System, München) nach Angaben des Herstellers. Als Spannungsquelle diente ein Standard Power Pack P25 (Biometra, Göttingen)

Zusammensetzung des 12%igen SDS-Polyacrylamid-Gels**Sammelgel:**

0,65 ml 30 % Acrylamid, 4,5 ml Stacking Buffer (0,14 M Tris pH 6,8, 0,11 % TEMED, 0,11 % SDS), 0,05 ml 10 % APS

Trenngel:

3,4 ml Aqua bidest., 4 ml 30 % Acrylamid, 2,5 Resolving Buffer (1,5 M Tris pH 9, 0,4 % TEMED, 0,4 % SDS), 0,1 ml 10 % APS

SDS-Laufpuffer (5x):

25 mM Tris, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS in Aqua bidest.

2.4.2 Western-Blot

Den Transfer von Proteinen auf Protein-bindende Oberflächen (Towbin *et al.*, 1979) bezeichnet man als Western-Blotting. Die mittels SDS-Page aufgetrennten Proteine wurden in einer Apparatur nach Angaben des Herstellers auf eine Polivinyliden-Fluorid-(PVDF)-Membran (Immobilon-P™, Millipore, Bredford) transferiert (400 mA, 35 min). Als Transferpuffer wurde 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,037 % SDS und 20 % Methanol in Aqua bidest. verwendet. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen nach dem Blotting für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C mit 5% Milchpulver (AppliChem, Darmstadt) in TBST (10 mM Tris/pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit den Post-Immun-Seren bzw. mit dem als Positiv-Kontrolle verwendetenne αHIV⁺-Serum in einer 1:50 Verdünnung in Blockierungspuffer über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach dreimaligen Waschen für 10 min erfolgte die Zugabe des

Sekundärantikörpers, dem 1:1000 in TBST verdünnten Meerrettich-Peroxydase-konjugierten Protein-G (BioRad, München). Nach 35-45 minütiger Inkubation wurde die Membran dreimal für 10 min in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte der Nachweis der spezifisch markierten Proteine durch das „Enhanced“ Chemolumineszenz-Verfahren (ECL) nach Angaben des Herstellers (Amersham, Braunschweig). Durch die Exposition spezieller Röntgenfilme (Hyperfilm ECL, Amersham, Braunschweig) wurden die Signale detektiert. Die Expositionszeiten lagen zwischen 1-15 min. Die Western-Blot-Analysen wurden von S. Raupp durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse von Surrogatmarkern zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART)

Die hochwirksame antiretrovirale Kombinationstherapie (HAART) hat zu einer drastischen Senkung der Plasmavirämie in HIV-infizierten Patienten geführt, sodaß neben den klassischen Verlaufsmarkern wie der Viruslast und der Anzahl CD4⁺ T-Zellen neue Surrogatmarker zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Therapie notwendig sind. Da die antiretrovirale Kombinationstherapie zu einer Supprimierung der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung führt (Li *et al.*, 1998, Autran *et al.*, 1997), wurde in dieser Arbeit die Assoziation zwischen der verminderten T-Zell-Aktivierung und der reduzierten Viruslast unter HAART untersucht. Darüber hinaus wurde der Zusammenhang zwischen der Plasmavirämie unter HAART und der Sekretion der endogenen HIV-supprimierenden β -Chemokine sowie IL-16 und deren Potential als Therapie-begleitende Surrogatmarker im Rahmen einer klinischen Studie untersucht.

3.1.1 Aufbau der klinischen Studie

In Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Virologie und der Infektionsambulanz der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main wurde eine klinische Studie ausgearbeitet, an der insgesamt 24 HIV-positive Patienten teilnahmen. Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der Studie mit der Kombinationstherapie behandelt. Die Studienteilnehmer wurden ihrer Viruslast entsprechend in zwei Patientenkollektive unterteilt. Das erste Kollektiv umfasste Patienten, die unter HAART eine niedrige bis unterhalb der Detektionsgrenze liegende Viruslast (≤ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) aufwiesen und als HAART-Responder bezeichnet wurden. In dem zweiten Kollektiv wurden Patienten zusammengefasst, bei denen trotz der antiretroviralen Kombinationstherapie eine hohe Viruslast nachweisbar war und die infolgedessen als Therapie-Versager bzw. als sogenannte HAART-Non-Responder (≥ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) bezeichnet wurden. Durch den Vergleich dieser beiden Patientengruppen sollte der Zusammenhang zwischen der Cytokin- bzw. Lymphokin-Konzentration im Serum bzw. im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen und der Viruslast untersucht werden. Die klinischen Daten der einzelnen Studienteilnehmer sind in Tab. 3.1 zusammengefasst.

Patienten	n	Viruslast
HIV-seronegative Kontrollen	5	∅
HAART-Responder	11 3	< 50 Kopien / ml Plasma 50 Kopien / ml Plasma
HAART-Non-Responder	4 2 2 2	500 - 1×10^4 Kopien / ml Plasma 1×10^4 - 1×10^5 Kopien / ml Plasma 1×10^5 - 1×10^6 Kopien / ml Plasma > 1×10^6 Kopien / ml Plasma

Tab. 3.1:

Patientenkollektiv der klinischen Studie, die ihrer Viruslast entsprechend in HAART-Responder und HAART-Non-Responder differenziert wurden. Darüber hinaus wurden HIV-seronegative Kontrollpersonen in die Cytokin-Messungen miteinbezogen; n = Anzahl der Patienten bzw. Kontrollpersonen

3.1.2 Vergleich des Aktivierungsstatus CD8⁺ T-Zellen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Neben ihrer zytotoxischen Aktivität vermitteln CD8⁺ T-Zellen durch die Sekretion löslicher immunregulatorischer Faktoren, wie den β -Chemokinen und IL-16, einen supprimierenden Effekt auf die HIV-Replikation. Um den Zusammenhang zwischen dem Aktivierungsstatus der CD8⁺ T-Zellen und dem durch eine Erhöhung der Viruslast definierten Therapieversagen zu untersuchen, wurde die Anzahl der aktivierten CD8⁺ T-Zellen aus HAART-Respondern und -Non-Respondern analysiert. Hierzu wurden aus den primären Lymphozyten beider Patientenkollektive CD8⁺ T-Zellen mittels magnetischer Separierung isoliert. Die erhaltene CD8⁺-Population wurde unmittelbar nach der magnetischen Zellseparierung mit einem FITC markierten α CD8- und einen PE-konjugierten α CD4-Antikörper angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Wie in Abb. 3.1. repräsentativ dargestellt, konnte nach der magnetischen Separierung eine nahezu 100% CD8⁺ T-Zell-Population für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

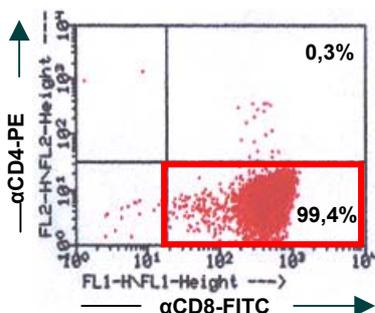


Abb. 3.1:

FACS-Analyse der aus Patienten isolierten Zellen nach magnetischer Separierung mit einem FITC-konjugierten α CD8-Antikörper und einem PE-konjugierten α CD4-Antikörper. Die Dot-Plot-Darstellung zeigt den prozentualen Anteil der positiven Zellen im jeweiligen Quadranten.

Um den Aktivierungsstatus CD8⁺ T-Zellen zwischen HAART-Respondern und -Non-Respondern zu vergleichen, wurde anhand des frühen Aktivierungsmarkers CD69 der Anteil der aktivierten CD8⁺ T-Zellen sowohl in unstimulierten Zellen als auch ihre Aktivierbarkeit nach *in vitro* Stimulierung mit PHA/IL-2 untersucht. Hierzu wurden die CD8⁺ T-Zellen beider Patientengruppen in einer Doppelfärbung mit einem αCD8-Antikörper (FITC) und einem gegen CD69 gerichteten Antikörper (PE) durchflußzytometrisch analysiert. In Abb. 3.2 ist der Vergleich der Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen zwischen HAART-Respondern und -Non-Respondern dargestellt.

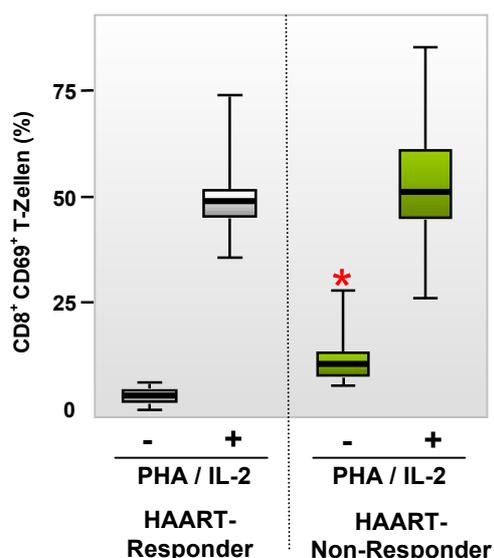


Abb. 3.2: Anzahl der CD8⁺CD69⁺T-Zellen von HAART-Respondern (n=14; links, in grau dargestellt) und HAART-Non-Respondern (n=10; rechts, in grün dargestellt) vor (- PHA/IL-2) und nach *in vitro*-Stimulation (+ PHA/IL-2). Die Zellen wurden in einer Doppelfärbung mit αCD8/αCD69-Antikörpern im FACS analysiert. * = p < 0,05 = signifikant nach t-Test; p = 0,0049.

Die in der Box-Plot-Darstellung gezeigte horizontale schwarze Linie in jeder Box gibt den Median an, während das sie umgebene farbige Rechteck die Spanne der Messergebnisse von 50% der Patienten angibt. Die T-förmigen Linien geben die Schwankungsbreite der erzielten Messwerte (Minimal- und Maximalwerte) an.

Wie in Abb. 3.2 und in Tab. 3.2 dargestellt, war in unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der Anteil CD8⁺CD69⁺T-Zellen bei HAART-Non-Respondern (Mean = 13,9 ± 3,5%) im Vergleich zu HAART-Respondern (Mean = 4,4 ± 0,7%) signifikant (p = 0,0049) erhöht. Beide Patientengruppen zeigten in ihrer Aktivierbarkeit *in vitro* keine signifikanten Unterschiede. So betrug der Mittelwert von HAART-Respondern 51,4 ± 2,7%, während HAART-Non-Responder einen Mittelwert von 55,0 ± 5,1% CD8⁺CD69⁺ T-Zellen aufwiesen.

Anteil aktivierter CD8 ⁺ CD69 ⁺ T-Zellen (%)	- PHA / IL-2	+ PHA / IL-2
HAART-Responder		
Mean	4,4 ± 0,7	51,4 ± 2,7
Median (Range)	5,1 (1,0 - 7,5)	50,6 (36,9 - 75,4)
HAART-Non-Responder		
Mean	13,9 ± 3,5	55,0 ± 5,1
Median (Range)	10,8 (6,3 - 30) p = 0,0049	52,2 (27,2 - 86,7)

Tab. 3.2: Anteil der CD8⁺CD69⁺T-Zellen von HAART-Respondern (n=14) und -Non-Respondern (n=10) vor (- PHA/IL-2) und nach *in vitro*-Stimulation (+ PHA/IL-2) in %. p < 0,05 = signifikant nach t-Test

3.1.3 Vergleich der β -Chemokin- und IL-16-Serumkonzentrationen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Nachdem die vorangegangene Untersuchung eine signifikant erhöhte Anzahl aktivierter $CD8^+CD69^+$ T-Zellen in unstimulierten Zellen bei HAART-Non-Respondern nachweisen konnte, wurden weiterführend die Cytokin-Serumkonzentrationen zwischen HAART-Respondern und -Non-Respondern verglichen. Hierzu wurden die Serumkonzentrationen der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie des Interleukins IL-16 im ELISA bestimmt. Darüber hinaus wurden die Cytokin-Serumkonzentrationen HIV-seronegativer Kontrollpersonen quantifiziert.

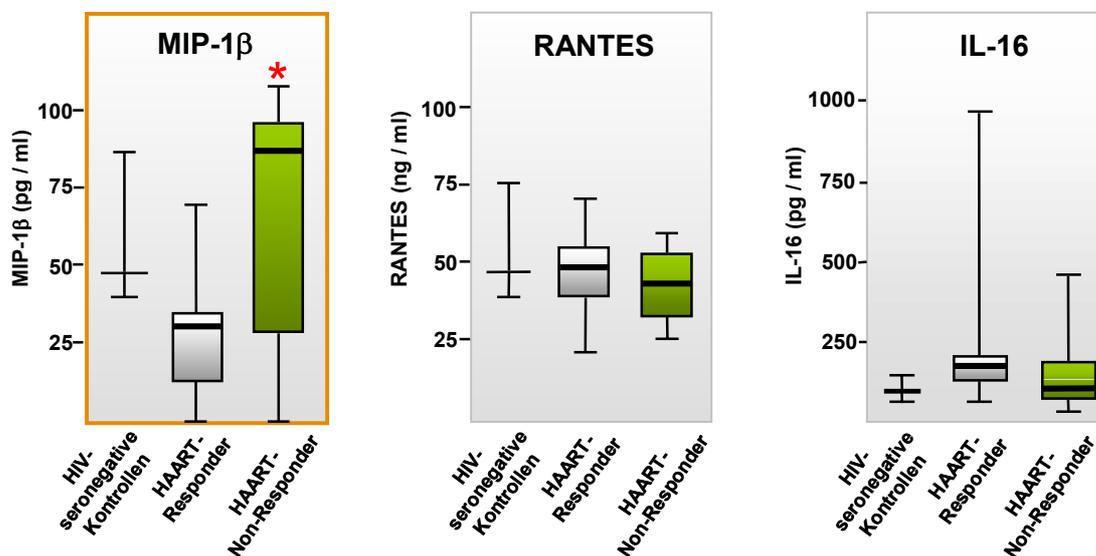


Abb. 3.3:

MIP-1 β -, RANTES- und IL-16-Serumkonzentrationen bei HAART-Respondern (n=14), -Non-Respondern (n=10) und HIV-seronegativen Kontrollpersonen (n=5)

* = $p < 0,05$ = signifikant nach t-Test; $p = 0,0175$. (Erläuterungen zur Boxplot-Darstellung siehe Abb. 3.2).

Wie in Abb. 3.3 und Tab. 3.3 dargestellt, konnte eine signifikant erhöhte MIP-1 β -Serumkonzentration bei HAART-Non-Respondern (Mean = $66,4 \pm 14,4$ pg/ml) im Vergleich zu HAART-Respondern (Mean = $28,4 \pm 7,1$ pg/ml) nachgewiesen werden ($p = 0,0175$). Die gemessenen Serumkonzentrationen für RANTES und IL-16 unterschieden sich nur unwesentlich innerhalb der untersuchten Patientenkollektive. Die MIP-1 α -Serumkonzentrationen lagen unterhalb der Detektionsgrenze von 1 pg/ml und wurden aus diesem Grund graphisch nicht berücksichtigt.

Serumkonzentration	Mip-1 β (pg / ml)	RANTES (ng / ml)	IL-16 (pg / ml)
HAART-Responder Mean Median (Range)	28,4 \pm 7,1 28,5 (0- 69) p = 0,0175	47,39 \pm 4,02 49,7 (18,9 - 70,9)	262,0 \pm 68,89 172,0 (59-971)
HAART-Non-Responder Mean Median (Range)	66,4 \pm 14,4 86,5 (0 - 108)	43,29 \pm 4,4 44,8 (26,5 - 58,10)	159,4 \pm 50,5 90,0 (43 - 473)

Tab. 3.3:

MIP-1 β -, RANTES- und IL-16-Serumkonzentrationen bei HAART-Respondern (n=14) und -Non-Respondern (n=10). p < 0,05 = signifikant nach t-Test

Um den Zusammenhang zwischen der signifikant erhöhten MIP-1 β -Serumkonzentration bei HAART-Non-Respondern und der Anzahl aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen zu untersuchen, wurden die im ELISA gemessenen Serumkonzentrationen mit dem im FACS gemessenen Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen korreliert. Hierzu wurden die gemessenen MIP-1 β -Serumkonzentrationen in 4 Konzentrationseinheiten unterteilt (<30, <60, <90 und >90 pg) und gegen den Anteil der CD8⁺CD69⁺ T-Zellen aufgetragen (Abb. 3.4).

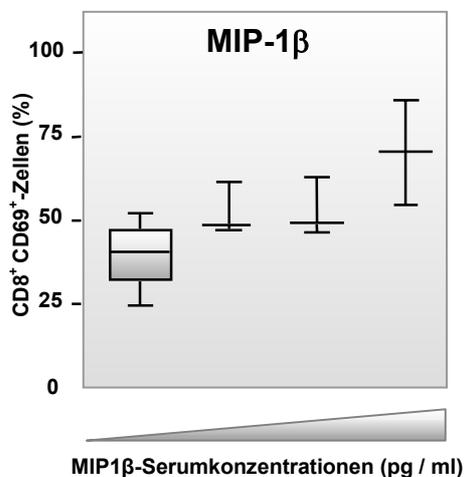


Abb. 3.4:

MIP-1 β -Serumkonzentrationen in Abhängigkeit zu dem im FACS gemessenen Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen
(Erläuterungen zur Boxplot-Darstellung siehe Abb. 3.2)

Die Boxplot-Darstellung in Abb. 3.4 zeigt, dass eine zunehmende MIP-1 β -Serumkonzentration mit einem erhöhten Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen korreliert, sodaß auf einen direkten Zusammenhang zwischen der MIP-1 β -Serumkonzentration und der Anzahl aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen zu schließen ist.

3.1.4 Vergleich der β -Chemokin- und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Nach der Bestimmung der Serumkonzentrationen sollten in einem weiteren Ansatz die β -Chemokin- und IL-16-Konzentrationen *in vitro* im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen zwischen HAART-Respondern und -Non-Respondern untersucht werden. Da Vorversuche zeigten, dass die Cytokin-Konzentrationen in unstimulierten Zellen an der Detektionsgrenze der ELISA-Tests lagen, wurden die Zellen der beiden Patientengruppen nach Isolation und magnetischer Zellseparierung 72 h mit PHA/IL-2 stimuliert und die Cytokin-Konzentration der zellfreien Überstände im ELISA quantifiziert. Zusätzlich zu den beiden Patientenkollektiven wurden auch HIV-seronegative Kontrollen in diese Untersuchung miteinbezogen.

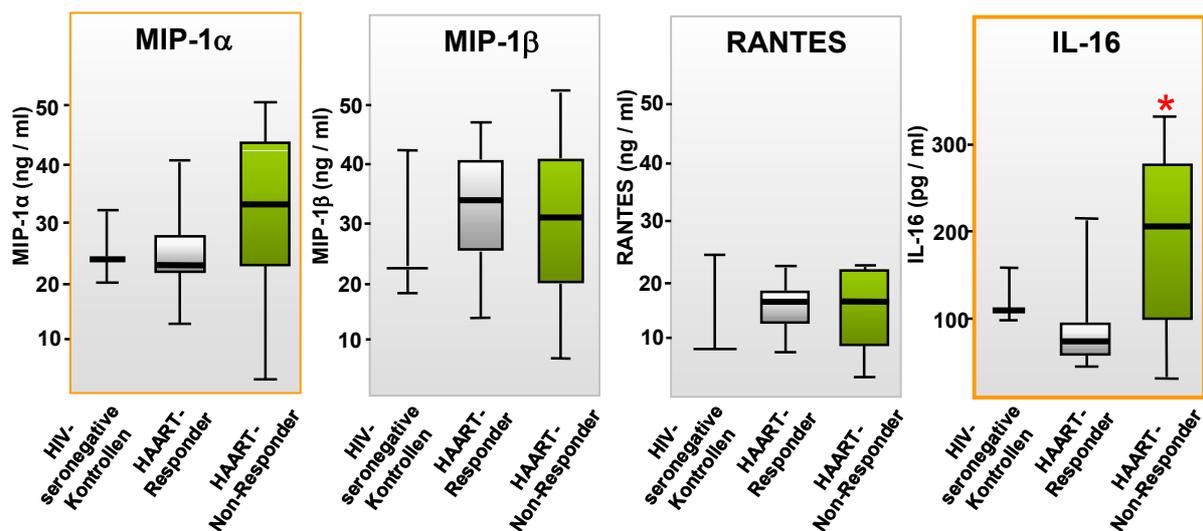


Abb. 3.5:

MIP-1 α -, MIP-1 β -, RANTES- und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen bei HAART-Respondern (n=14), -Non-Respondern (n=10) und HIV-seronegativen Kontrollpersonen (n=5)

* = $p < 0,05$ = signifikant nach t-Test; $p = 0,0077$. (Erläuterungen zur Boxplot-Darstellung siehe Abb. 3.2).

Wie in Abb. 3.5 und Tab. 3.4 gezeigt, ist ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Viruslast, repräsentiert durch das Patientenkollektiv der HAART-Non-Responder, und einer erhöhten MIP-1 α - und IL-16-Konzentration im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen nachweisbar. Das Patientenkollektiv der HAART-Non-Responder wies eine erhöhte MIP-1 α -Konzentration (Mean $29,7 \pm 5,9$ ng/ml) im Vergleich zu HAART-Respondern (Mean $24,1 \pm 2,3$ ng/ml) auf. Für IL-16 konnte eine signifikante Konzentrationserhöhung des Lymphokins im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen bei HAART-Non-Respondern (Mean $188,6 \pm$

35,7 pg/ml) im Vergleich zu HAART-Respondern ($90,2 \pm 12,77$ pg/ml) nachgewiesen werden ($p=0,0077$). Für MIP-1 β und RANTES wurden in beiden Patientenkollektiven vergleichbare β -Chemokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand gemessen, die nur gegenüber den gemessenen Konzentrationen der HIV-seronegativen Kontrollen geringfügig erhöht waren.

Cytokin-Konzentration CD8 ⁺ T-Zellen	Mip-1 α (ng / ml)	Mip-1 β (ng / ml)	RANTES (ng / ml)	IL-16 (pg / ml)
HAART-Responder				
Mean	24,1 \pm 2,3	34,3 \pm 4,4	15,6 \pm 0,8	90,2 \pm 12,77
Median (Range)	23,0 (12,6 - 41,5)	34 (14,3 - 45,9)	16,3 (9,3 - 25,1)	81 (48 - 212)
HAART-Non-Responder				
Mean	29,7 \pm 5,9	27,9 \pm 5,0	14,8 \pm 2,1	188,6 \pm 35,7
Median (Range)	34 (3,5 - 51,2)	30,5 (5,1 - 51,20)	16,3 (4,4 - 21,5)	206 (24 - 332)
				$p = 0,0077$

Tab. 3.4:

MIP-1 α -, MIP-1 β -, RANTES- und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen bei HAART-Respondern (n=14) und -Non-Respondern (n=10). $p < 0,05$ = signifikant nach t-Test.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen den gemessenen Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen und dem Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen wurden, wie bereits für die Serumkonzentrationen gezeigt, die gemessenen MIP-1 α - und IL-16-Konzentrationen mit dem Anteil aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen verglichen.

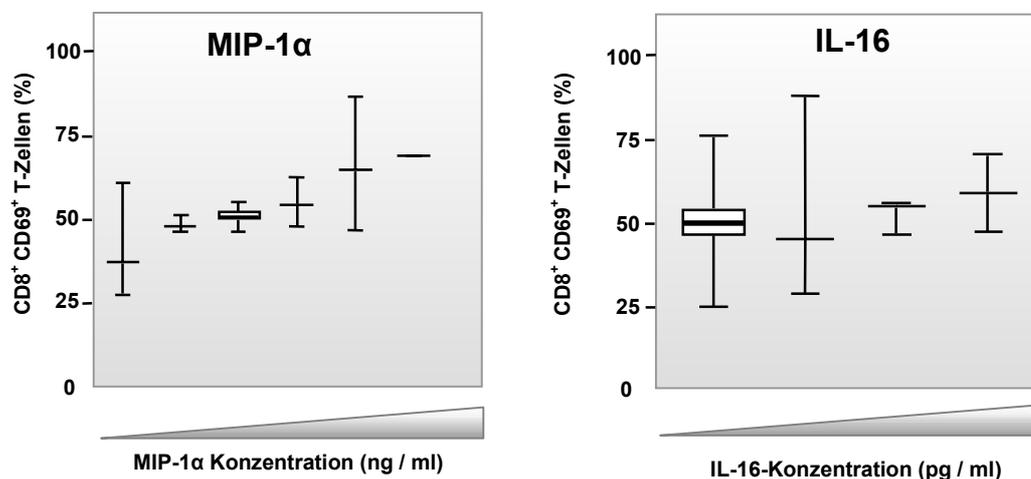


Abb. 3.6:

MIP-1 α und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit zu dem im FACS gemessenen Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen (Boxplot-Darstellung siehe Abb. 3.2)

Die in Abb. 3.6 gezeigten Boxplot-Darstellungen zeigen eine Korrelation zwischen einer erhöhten MIP-1 α -Konzentration und dem Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen. Für die gemessenen IL-16-Konzentrationen ist der Zusammenhang zwischen der Anzahl CD8⁺CD69⁺ T-Zellen und der Lymphokin-Sezernierung nur schwach erkennbar.

3.1.5 Der Einfluß der Viruslast auf die Cytokin-Sezernierung von CD8⁺ T-Zellen *in vitro*

Die in dieser Patienten-Studie untersuchten Cytokin-Profile umfassen lediglich einzelne Messpunkte, die zu einem zufälligen Zeitpunkt innerhalb der einjährig angewandten antiviralen Kombinationstherapie aufgezeichnet wurden. Die gezeigten Zusammenhänge zwischen den gemessenen Cytokin-Konzentrationen und der Viruslast innerhalb der Patientenkollektive der HAART-Responder und -Non-Responder können somit nur direkt auf den Zeitpunkt der Messung bezogen werden. Um den therapeutischen Wert der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES als auch des IL-16 als Therapie-begleitende Surrogatmarker zu zeigen, ist die Untersuchung des Verlaufs dieser körpereigenen HIV-supprimierenden Faktoren auf eine veränderte Plasmavirämie während der Therapie notwendig. Innerhalb der Studienkohorte konnte die Untersuchung des longitudinalen Profils der Cytokine allerdings nur bei einem einzelnen Patienten gezeigt werden, da alle anderen Teilnehmer während des Untersuchungszeitraumes keine veränderte Plasmavirämie aufwiesen. So kann der in Abb. 3.7 dargestellte Verlauf der Cytokin-Konzentrationen lediglich als ein Fallbeispiel angesehen werden. Zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme wies der Patient eine Virusbelastung von 500 Kopien/ml Plasma und zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme, 6 Monate später, eine Viruslast von weniger als 20 Kopien/ml Plasma auf. Während dieses Zeitraumes war gleichzeitig zu der Senkung der Plasmavirämie auch ein verändertes Cytokin-Profil erkennbar, das in einer supprimierten IL-16-Sezernierung und einer reduzierten MIP-1 α - und MIP-1 β -Konzentration im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen nachweisbar war (Abb. 3.7).

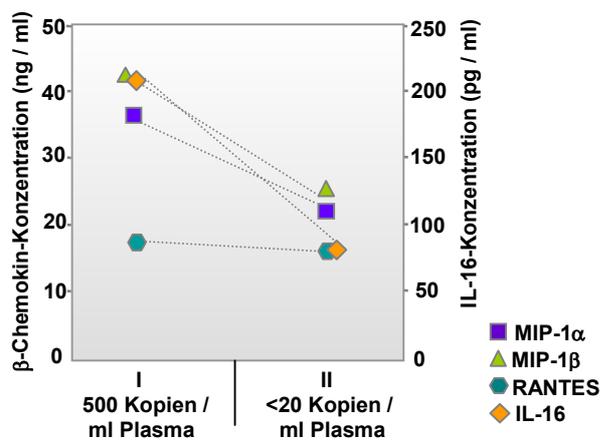


Abb. 3.7:
Einfluß einer veränderten Viruslast auf das Cytokin-Profil dargestellt an einem Fallbeispiel.

In dieser Abbildung sind die Cytokin-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen gezeigt, die von einem Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen wurden. Der Patient wies zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (I) eine Viruslast von 500 Kopien/ml und in der 6 Monate darauf folgenden Blutentnahme (II) eine Viruslast von < 20 Kopien/ml auf.

3.2 Entwicklung einer HIV-1-Immunisierungsstrategie mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

Retrovirale Vektoren, die durch stabile Integration des gewünschten Gens in das Genom der Zielzelle eine lang anhaltende Expression des Transgens ermöglichen, werden nicht nur im Bereich der Gentherapie, sondern auch zunehmend für Immunisierungsstudien gegen HIV-1 eingesetzt. Von [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren, konnte bereits ein effizienter und selektiver Gentransfer in CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden (Schnierle *et al.*, 1997). Mit einem MLV-abgeleiteten Transfervektor für die viralen Transferegene *tat*, *rev* und *env* sollte neben einem spezifischen und effizienten Gentransfer in immunkompetente HIV-permissive CD4⁺ T-Zellen die Induktion einer humoralen wie auch zellulären Immunantwort nach Transplantation der *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten PBMC untersucht werden.

3.2.1 Entwicklung eines MLV-abgeleiteten Transfervektors für die viralen Antigene Tat, Rev und Env

Da eine protektive Immunantwort vor allem gegen Struktur-, sowie frühe, regulatorische Proteine gerichtet ist, wurde ein Transfervektor für die HIV-1 verwandten SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* entwickelt. Die inserierten Gene stammen von dem mittels rekombinanter DNA-Technik hergestellten chimären SHIV89.6P, das nach Infektion des nicht-pathogenen SHIV89.6 in Rhesusaffen und mehreren *in vivo* Passagen als pathogenes Virus (SHIV89.6P) isoliert werden konnte. Im SHIV89.6P stammen die Strukturgene *gag* und *pol* von SIV_{mac239} während *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu* und *env* aus dem dualtropen HIV-1-Patientenisolat 89.6 stammen (Reiman *et al.*, 1996). Das SHIV89.6P eignet sich aufgrund seiner HIV-1-Homologie und seiner pathogenen Eigenschaften im Rhesusaffen zur Untersuchung der Immunogenität von HIV-1-Antigenen. Darüber hinaus kann durch nachfolgende Infektionsversuche im Tiermodell das Potential von Immunisierungsstrategien in Hinsicht auf einen Schutz vor einer Infektion oder einer langsameren Krankheitsprogression untersucht werden (Nathanson *et al.*, 1999).

Für die Herstellung eines verpackbaren retroviralen Transfervektors für die SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* wurde der bicistronische Transfervektor pMgSLDeIS (Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) als Ausgangskonstrukt verwendet. Mittels einer Fusions-PCR wurde zunächst im *env*-Gen an Position 712 ein Stop-Kodon eingeführt (Δenv), um durch die trunkierte Variante des Transmembranproteins die Inkorporation des viralen Hüllproteins in

das MLV-Kapsid zu gewährleisten (Lodge *et al.*, 1998, Schnierle *et al.*, 1997, Mammano *et al.*, 1997, Wilk *et al.*, 1992). Desweiteren wurden mittels rekombinanter PCR flankierende EcoRI-Schnittstellen an das 5'- und 3'-Ende der SHIV-Gene eingeführt, sodaß das ursprüngliche im Transfervektor enthaltene *gp91-Phox*-Gen durch restriktiven Verdau und anschließende Ligation gegen die viralen Gene *tat*, *rev* und *env* ausgetauscht werden konnte (Kap. 2.1.4). Die richtige Orientierung der inserierten SHIV-Gene in dem Transfervektor pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ wurde durch analytischen Verdau und durch Sequenzierung des 5' und 3'-Endes der Insertionsschnittstelle überprüft.

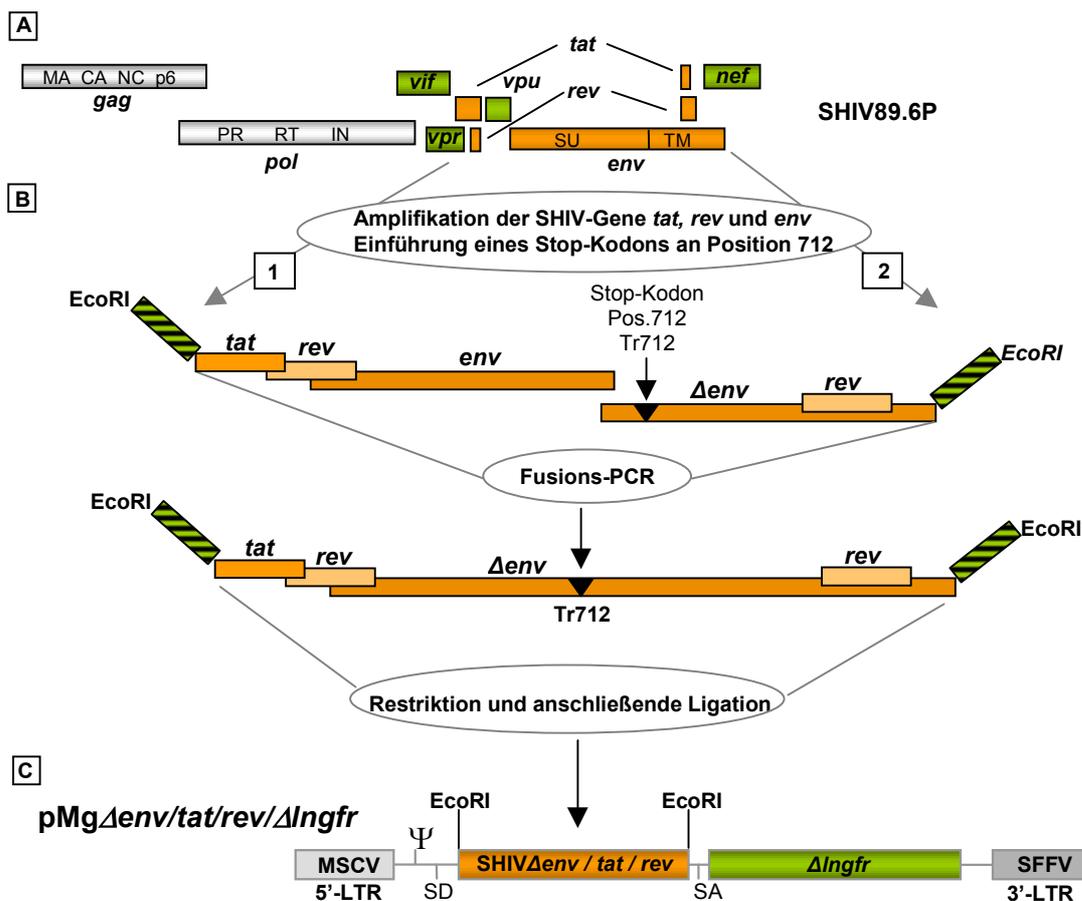


Abb. 3.8:

A. Genomstruktur des SHIV89.6P. Die in grau dargestellten Gene *gag* und *pol* stammen von SIV_{mac239}, während die grün dargestellten *vif*, *vpu* und *nef* sowie die in den Transfervektor inserierten orange dargestellten Gene *tat*, *rev* und *env* aus dem dualtropen HIV-1-Patientenisolat 89.6 stammen.

B: Herstellung des Transfervektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ mittels Fusions-PCR (nach Kap. 2.1.4)

C: Schematische Darstellung des Transfervektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ mit den inserierten SHIV-Genen Δenv , *tat* und *rev*

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit hergestellten MLV-abgeleiteten Transfervektor für die SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* sollte nachfolgend durch Bereitstellung der MLV-Strukturgene *gag* und *pol* in *trans* sowohl die Pseudotypisierung des SHIV-Hüllproteins mit dem MLV-

Kapsid als auch die Verpackbarkeit der Transfgene in [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel untersucht werden.

3.2.2 Generierung von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

3.2.2.1 Nachweis der Expression der viralen Transfgene nach transienter Transfektion des MLV-abgeleiteten Transfervektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$

Die Expression der SHIV-Transfgene wurde nach transienter Transfektion des Transfervektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$ und dem für MLV *gag/pol* kodierenden Plasmid pHIT60 immunhistochemisch untersucht. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen zur Detektion der lentiviralen Proteine mit einem αHIV^+ -Serum immunhistochemisch (Kap. 2.3.3) angefärbt.

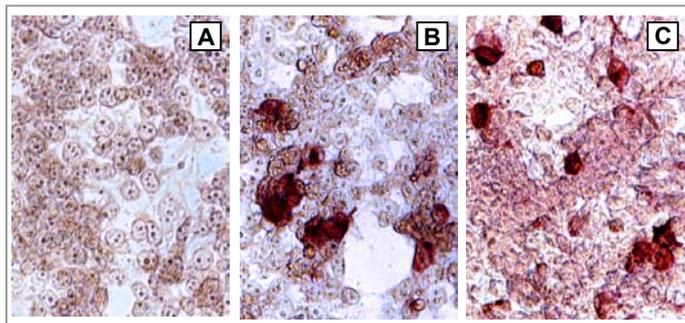


Abb. 3.9:
Expression der viralen Transfgene in 293T-Zellen nach transienter Transfektion.

Zur Detektion der lentiviralen Proteine auf der Zelloberfläche wurden die transient transfizierten 293T-Zellen immunhistochemisch mit einem αHIV^+ -Serum angefärbt.

A: untransfizierte 293T-Zellen (Negativ-Kontrolle)

B: mit pL128 (HIV-1 Δenv , Tr712) und pHIT60 (MLV *gag/pol*) transfizierte 293T-Zellen (Positiv-Kontrolle)

C: mit pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$ und pHIT60 (MLV *gag/pol*) transfizierte 293T-Zellen

Wie in Abb. 3.9 erkennbar, konnte nach transienter Transfektion des Transfervektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$ in 293T-Zellen und immunhistochemischer Anfärbung der Zellen anhand der Rotfärbung der Transfgen-positiven Zellen die Expression der SHIV-Transfgene lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 3.9.C). Das als Positiv-Kontrolle transfizierte trunkierte HIV-1-Hüllprotein (pL128) zeigte ebenfalls eine deutliche Rotfärbung in den transfizierten Zellen (Abb. 3.9.B). Im Gegensatz dazu war bei den als Negativ-Kontrolle eingesetzten untransfizierten 293T-Zellen lediglich eine schwache Hintergrundfärbung sichtbar (Abb. 3.9.A).

3.2.2.2 Funktionalität des im Transfervektor kodierten SHIV-Hüllproteins im Synzytieninduktionsassay

Der Nachweis der funktionellen Expression des im Transfervektor *pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$* kodierten SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche transfizierter Zellen erfolgte durch Kokultivierung mit der humanen CD4⁺ T-Zelllinie Molt 4/8 (Kap. 2.2.14). Sofern die transfizierten lentiviralen Hüllproteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden, können diese mit dem membranständigen CD4-Protein der Nachbarzelle eine Fusion eingehen und sogenannte Synzytien induzieren. Zum Nachweis der Synzytieninduktion wurden 5×10^5 293T-Zellen mit den Plasmiden *pHIT60* (MLV *gag/pol*) und *pL128* (HIV-1 Δenv , Positiv-Kontrolle) bzw. *pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$* transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Transfektanten mit 5×10^5 Molt 4/8-Zellen überschichtet. Nach weiteren 24-48 h konnte in der Kokultur der mit den lentiviralen Hüllproteinen transfizierten und mit Molt 4/8-Zellen überschichteten 293T-Zellen eine Synzytieninduktion beobachtet werden. Nach immunhistochemischer Anfärbung der Zellen mit einem αHIV^+ -Serum waren die Synzytien in einer deutlichen Rotfärbung lichtmikroskopisch nachweisbar.

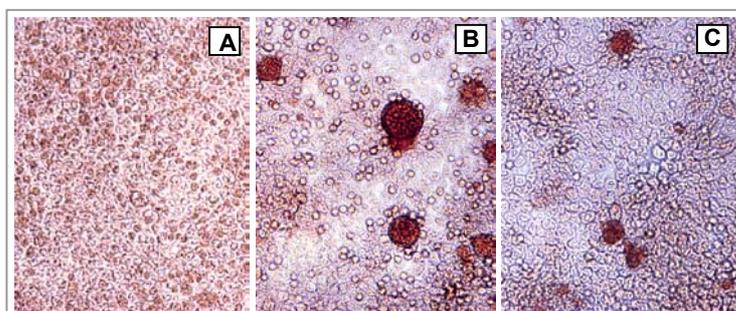


Abb. 3.10:

Funktionalität des im Transfervektor kodierten SHIV-Hüllproteins: Synzytieninduktion durch Expression der lentiviralen Hüllproteine und Kokultivierung mit CD4⁺ Molt4/8-Zellen

Die Zellen wurden mit einem αHIV^+ -Serum immunhistochemisch angefärbt.

A: untransfizierte 293T-Zellen (Negativ-Kontrolle)

B: mit *pL128* (HIV-1 Δenv , Tr712) und *pHIT60* transfizierte 293T-Zellen (Positiv-Kontrolle)

C: mit *pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$* und *pHIT60* transfizierte 293T-Zellen

Wie in Abb. 3.10 dargestellt, konnte in den mit dem Transfervektor *pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$* transfizierten und nachfolgend mit Molt 4/8-Zellen kokultivierten 293T-Zellen die funktionelle Expression des SHIV-Hüllproteins anhand der Synzytieninduktion nachgewiesen werden (Abb. 3.10.C). Die durch Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche transfizierter Zellen induzierten Synzytien waren in ihrer Größe und Anzahl etwas geringer als die der mit dem HIV-1 Hüllprotein transfizierten 293T-Zellen als Positiv-Kontrolle (Abb. 3.10.B). Die untransfizierten 293T-Zellen zeigten wie erwartet keine Synzytieninduktion (Negativ-Kontrolle, Abb. 3.10.A).

3.2.2.3 Verpackbarkeit des Transfervektors in [MLV(VSV-G/SHIV)]-Vektorpartikel

Die Verpackbarkeit des Transfervektors in das MLV-Kapsid und die Transduktion dieser pseudotypisierten [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel in $CD4^+$ Zellen wurde zunächst immunhistochemisch nachgewiesen. Da die Sensitivität dieses Testsystems nicht sehr hoch ist und bislang die Effizienz der Inkorporation des SHIV-Hüllproteins in das MLV-Kapsid unbekannt war, wurden in einem transienten Ansatz [MLV(SHIV/VSV-G)]-Vektorpartikel generiert. Da das Protein G von VSV ein ubiquitär auf der Zellmembran exprimiertes Phospholipid als Rezeptor zum Zelleintritt benutzt, sollte durch die Generierung von [MLV(SHIV/VSV-G)]-Vektorpartikeln, die sowohl das SHIV-Env als auch das VSV-G-Protein auf der Oberfläche tragen, die Effizienz des Gentransfers in die $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen erhöht werden. Als Positivkontrolle wurden transient hergestellte [MLV(HIV-1)]-Vektorpartikel zur Transduktion eingesetzt. Zwei Tage nach Transduktion waren die transduzierten Zellen nach spezifischer Immunfärbung mit einem αHIV^+ -Serum lichtmikroskopisch detektierbar.

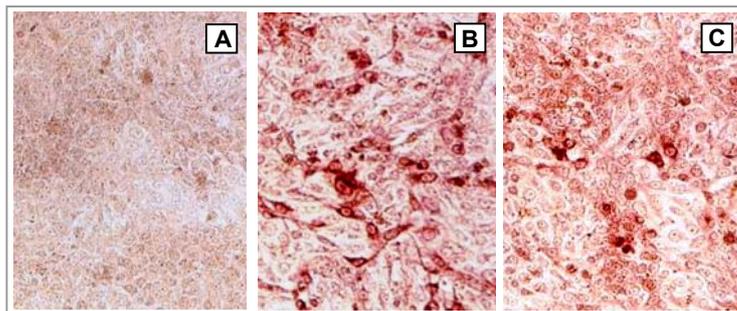


Abb. 3.11:

Verpackbarkeit des Transfervektors in [MLV(VSV-G/SHIV)]-Vektorpartikel.

Die transient hergestellten Vektorpartikel wurden auf $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen transduziert und nach 2 Tagen immunhistochemisch mit einem αHIV^+ -Serum angefärbt.

A: Mit Zellkulturüberständen von untransfizierten 293T-Zellen transduzierte $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen (Negativ-Kontrolle)

B: Mit [MLV(HIV-1)]-Vektorpartikeln transduzierte $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen (Positiv-Kontrolle)

C: Mit [MLV(SHIV/VSV-G)]-Vektorpartikeln transduzierte $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen

Die Verpackbarkeit des Transfervektors in das MLV-Kapsid konnte mittels der transient hergestellten [MLV(VSV-G/SHIV)]-Pseudotypvektoren und der nachfolgenden Transduktion auf $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen immunhistochemisch anhand der HIV-spezifischen Immunfärbung Transfergen-positiver Zellen lichtmikroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 3.11.C). Die Zellen der Negativ-Kontrolle, die mit dem Überstand von untransfizierten Zellen transduziert worden waren, zeigten nur ein geringes Hintergrundsignal (Abb. 3.11.A), während die mit [MLV(HIV-1)]-Vektorpartikeln transduzierten $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen als Positivkontrolle eine deutliche Rotfärbung aufwiesen (Abb.3.11.B).

Da die bisherigen Ergebnisse lediglich eine qualitative Aussage über die funktionelle Expression und die Verpackbarkeit des Transfervektors in [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel zulassen, wurde in der nachfolgenden Untersuchung die Effizienz des Gentransfers quantitativ analysiert.

3.2.2.4 Gentransfer-Effizienz der transient hergestellten [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel in CD4⁺ T-Zellen

Zur Bestimmung der Gentransfer-Effizienz von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in CD4⁺ Zellen wurden transient hergestellte Vektorpartikel zur Transduktion auf CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen eingesetzt und die Anzahl transduzierter Zellen anhand des Oberflächenmarkers ΔLNGFR im FACS bestimmt. Hierzu wurden zunächst wie in Kap. 2.2.8 beschrieben auf 5 x 10⁵ 293T-Zellen je 1,5 µg Plasmid zur Transfektion eingesetzt. Als Positiv-Kontrolle wurde der HIV-1 *env*-kodierende Vektor pL128 zusammen mit dem MLV *gag/pol* kodierenden pHIT60 und dem Transfervektor pMg*egfp/ΔIngfr* als Reporterplasmid transfiziert. Der Transfervektor pMg*Δenv/tat/rev/ΔIngfr* wurde mit pHIT60 kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die zellfreien Überstände unverdünnt zur Transduktion von auf 2,5 x 10⁵ CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen eingesetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen mit einem gegen ΔLNGFR-gerichteten monoklonalen Antikörper angefärbt und im FACS analysiert.

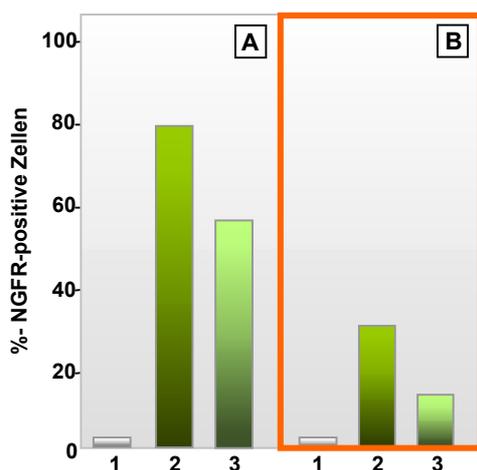


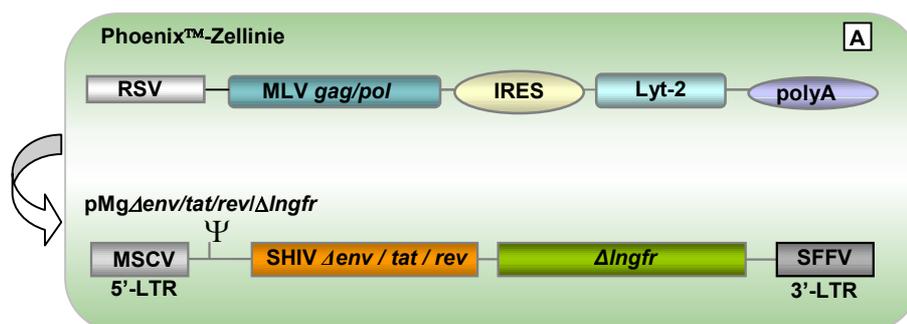
Abb. 3.12:
Transiente Transfektion (A) und nachfolgende Transduktion der transient hergestellten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren auf CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen (B) quantifiziert mittels FACS-Analyse

1: Mit Zellkulturüberberständen von untransfizierten 293T-Zellen transduzierte CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen (Negativ-Kontrolle)
 2: Mit transient hergestellten [MLV(HIV-1)]-Vektorpartikeln transduzierte CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen (Positiv-Kontrolle)
 3: Mit transient hergestellten [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierte CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen

Wie in Abb. 3.12 erkennbar, lag die Anzahl der mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten und ΔLNGFR-positiven Ghost-Zellen bei 17% (Abb. 3.12.B3). Die als Positiv-Kontrolle eingesetzten [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren wiesen 30% (Abb. 3.12.B2) Transfergen-positiven Zellen auf. Die Negativ-Kontrolle, welche mit Überständen von untransfizierten 293T-Zellen transduziert wurde, zeigten kein Signal (0,4%, Abb. 3.12.B1).

3.2.2.5 Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie für den Transfektor $pMg\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$

Stabile Verpackungszellen (Vector Packaging Cell Line, VPCL) ermöglichen eine Transfektions-unabhängige Vektorernte. Darüber hinaus erlauben sie die Generierung größerer Mengen an Vektorpartikeln, die häufig höhere Titer als transient hergestellte Vektoren erreichen. Da für die Immunisierungsstudie die Generierung großer Mengen von [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln notwendig war, wurde eine stabile Verpackungszelllinie für den Transfektor $pMg\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ etabliert. Hierzu wurde, wie in Kap. 2.2.5 beschrieben, die *env*-negative und 293T-abgeleitete PhoenixTM-Zelllinie (Pear *et al.*, 1993) verwendet, die ein stabiles MLV *gag/pol*-Konstrukt mit einer IRES-CD8-Kassette (Lyt-2) enthält, deren Expression einen direkten Rückschluss auf die stabile Expression von MLV *gag/pol* zulässt (Abb. 3.13.A). Durch Anfärbung der PhoenixTM-Zellen mit einem gegen murines CD8 gerichteten Antikörper, konnte die stabile Expression von murinem CD8 gezeigt werden (Abb. 3.13.B). Nach Transfektion des Transfektors $pMg\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ in die PhoenixTM-Zellen und einer zweimaligen MAC-Separierung (Kap. 2.2.15) war nach Anfärbung der Zellen mit einem gegen den Oberflächenmarker $\Delta LNGFR$ gerichteten monoklonalen Antikörper eine 99% Transfektor-positive Verpackungszelllinie nachweisbar (Abb.3.13.C). Für den Nachweis, dass die im Transfektor kodierten SHIV-Gene *tat/rev* und Δenv im gleichen Maße wie der Oberflächenmarker $\Delta lngfr$ in der VPCL exprimiert werden, wurden die Zellen mit einem αHIV^+ -Serum und nachfolgend mit einem PE-konjugierten αhu IgG-Antikörper angefärbt. Wie anhand der FACS-Analysen erkennbar, zeigten 91% der Zellen eine stabile Expression der SHIV-Transferegene (Abb.3.13.D). Zur Quantifizierung der Zellpopulation, die sowohl für das murine CD8 als auch für den Oberflächenmarker $\Delta LNGFR$ positiv ist, wurde eine FACS-Doppel-Anfärbung durchgeführt. Hierbei konnte für 84% der Zellen eine stabile Expression sowohl für das im MLV *gag/pol*-Konstrukt enthaltene murine CD8 als auch für den im Transfektor kodierten Oberflächenmarker $\Delta LNGFR$ nachgewiesen werden (Abb. 3.13.E).



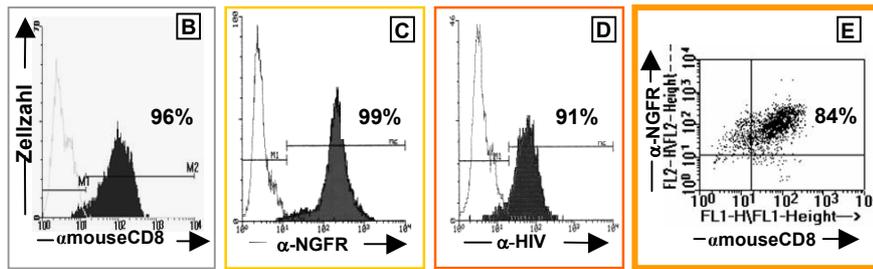


Abb. 3.13:

FACS-Analyse der etablierten VPCL für den Transfektor pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr

A: Schematische Darstellung der VPCL für den Transfektor pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr

B: Anfarbung der PhoenixTM-Zellen mit einem monoklonalen gegen murines CD8-gerichteten Antikörper

C: Anfarbung der VPCL mit einem monoklonalen, gegen den Oberflächenmarker Δ LNFR gerichteten Antikörper

D: Anfarbung der VPCL mit einem α HIV⁺-Serum zur Detektion der SHIV-Transferegene Δ env/tat/rev

E: Doppelanfarbung der VPCL mittels eines FITC-konjugierten murinen CD8-Antikörper und einem PE-konjugierten Δ LNFR-Antikörper in einer Dot-Plot-Darstellung

3.2.2.6 Expression der SHIV-Transferegene in der Verpackungszelllinie

Der Nachweis der Expression der SHIV-Transferegene in der stabil mit dem pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr transfizierten VPCL erfolgte darüber hinaus durch immunhistochemische Anfarbung der Zellen mit einem α HIV⁺-Serum. Die Expression der viralen Transferegene war in der mit pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr transfizierten VPCL durch eine deutliche Rotfärbung der Zellen lichtmikroskopisch nachweisbar (Abb. 3.14.B), während die Transfektor-negative PhoenixTM-Zellen als Negativkontrolle keine Rotfärbung aufwiesen (Abb. 3.14.A).

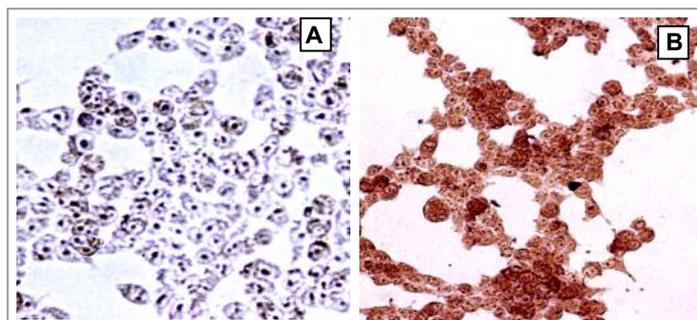


Abb. 3.14:

Expression der viralen Transferegene in der VPCL nach stabiler Transfektion des pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr-Transfektors in PhoenixTM-Zellen

Zur Detektion der lentiviralen Proteine auf der Zelloberfläche wurden die Zellen immunhistochemisch mit einem α HIV⁺-Serum angefärbt.

A: PhoenixTM-Zellen ohne Transfektor (Negativkontrolle)

B: Transfektor-positive VPCL

3.2.2.7 Funktionalität des im Transfektor kodierten und auf der Oberfläche der VPCL exprimierten SHIV-Hüllproteins im Synzytieninduktionsassay

Die funktionelle Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche der stabil mit dem Transfektor *pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr* transfizierten VPCL wurde, wie bereits für den transienten Ansatz (Kap. 3.2.2.2) gezeigt, in einem Synzytieninduktionsassay nachgewiesen. Hierzu wurden, wie in Kap. 2.2.14 beschrieben, 5×10^5 Zellen der VPCL in einer 6-Loch-Platte ausgesät und am folgenden Tag mit 5×10^5 Molt 4/8-Zellen überschichtet. Zwei Tage nach Kokultivierung konnte die funktionelle Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche der Verpackungszellen durch die Synzytieninduktion gezeigt werden, die nach immunhistochemischer Anfärbung der Zellen mit einem α HIV⁺-Serum farblich sichtbar wurde (Abb. 3.15.B)

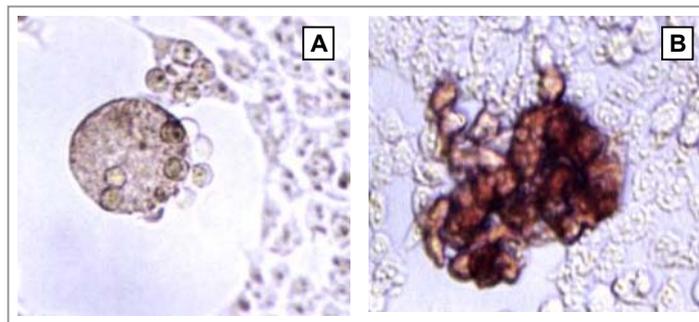


Abb. 3.15:

Funktionalität des im Transfektor kodierten SHIV-Hüllproteins .

A: Synzytieninduktion durch Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Zelloberfläche der VPCL nach Kokultivierung mit Molt4/8-Zellen

B: Synzytieninduktion durch Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Zelloberfläche der VPCL nach Kokultivierung mit Molt4/8-Zellen und nachfolgender immunhistochemischer Anfärbung der Zellen mit einem α HIV⁺-Serum.

3.2.2.8 Transduktion von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in CD4⁺ CXCR4⁺ bzw. CD4⁺CCR5⁺ Ghost-Zellen und CD4⁺CCR5⁺ myeloiden U937-Zellen

Nach dem Nachweis der funktionellen Expression der Transferegene in der stabil mit *pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr* transfizierten VPCL wurde nachfolgend der Gentransfer der mittels der VPCL generierten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in CD4⁺-Zellen quantitativ untersucht. Hierzu wurden je $2,5 \times 10^5$ Zellen der CD4⁺CXCR4⁺ bzw. CD4⁺CCR5⁺ Ghost- und der CD4⁺CCR5⁺ U937-Zelllinie mit nativen zellfreien Überständen der VPCL transduziert. Zwei Tage nach Transduktion wurde die Anzahl transduzierter Zellen anhand des Oberflächenmarkers Δ LNGFR im FACS analysiert. Der Titer, angegeben in infektiösen Einheiten pro ml (i.E./ml), wurde aus dem Mittelwert der drei durchgeführten Titrationsstufen errechnet.

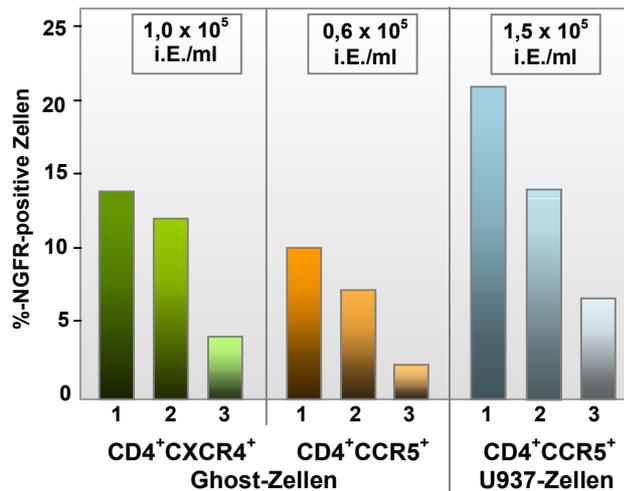


Abb. 3.16:
[MLV(SHIV)]-Vektortiter auf humanen CD4⁺ T-Zelllinien
 1: Vektor-Verdünnung (1:1)
 2: Vektor-Verdünnung (1:2)
 3: Vektor-Verdünnung (1:20)

Wie die in Abb. 3.16 dargestellten Transduktionsergebnisse zeigen, konnten die stabil generierten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren einen effizienten Gentransfer in CD4⁺ Zelllinien vermitteln. Die [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren erreichten auf CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen einen Titer von 1×10^5 i.E./ml und auf CD4⁺CCR5⁺ Ghost-Zellen einen Titer von $0,6 \times 10^5$ i.E./ml. Auf der myeloiden CD4⁺CCR5⁺ Zelllinie U937 wurde mit den [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln ein Titer von $1,5 \times 10^5$ i.E./ml erreicht.

Die in Kap. 3.2.2 dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass mit dem hergestellten MLV-abgeleiteten Transfervektor pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta Ingfr$ bei Bereitstellung der Strukturgene *gag* und *pol* in trans sowohl die Pseudotypisierung des SHIV-Hüllproteins mit dem MLV-Kapsid als auch die funktionelle Expression der Transferegene gewährleistet ist. Die Generierung von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren sowohl im transienten Ansatz wie auch durch Etablierung einer stabilen VPCL ermöglicht darüber hinaus einen effizienten Gentransfer in CD4⁺ T-Zelllinien.

3.2.3 Gentransfer von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) aus Rhesusaffen

3.2.3.1 Optimierung der Transduktionsbedingungen für einen effizienten Gentransfer in Rhesus-PBMC

Bei der Verwendung von onko-retroviralen Vektoren konnte durch die Auswahl geeigneter proliferationsaktivierender Stimulationsbedingungen und durch die Kozenrifugation von vektorhaltigen Überständen und Zielzellen die Effizienz des Gentransfers entscheidend verbessert werden. Da MLV-abgeleitete Vektoren ausschließlich proliferierende Zellen

transduzieren können, ist eine optimale T-Zellstimulation eine wesentliche Voraussetzung für einen effizienten Gentransfer. Bei einem Vergleich unterschiedlicher Stimulationsbedingungen ließ sich für humane PBMC nachweisen, dass eine Kostimulation der T-Lymphozyten mit α CD3/ α CD28 die höchsten Transduktionraten vermittelt (Isabell Schmitt, Dissertation 2002). Im Gegensatz zu humanen PBMC war bei Rhesus-PBMC zwar sowohl bei α CD3/ α CD28-Kostimulation als auch bei PHA/IL-2-Stimulation die gleiche Anzahl aktivierter CD4⁺CD25⁺ Zellen nach *in vitro*-Stimulation nachweisbar, jedoch konnte bei den mit PHA/IL-2 stimulierten PBMC eine 10-fach höhere Transduktionseffizienz mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren erreicht werden als bei den mit α CD3/ α CD28-kostimulierten PBMC (Daten nicht gezeigt). Vorversuche hatten darüber hinaus zeigen können, dass für Rhesus-PBMC eine höhere PHA-Konzentration (10 μ g/ml) als für humane PBMC (5 μ g/ml) für eine optimale Aktivierung der Zellen erforderlich ist.

Neben der Optimierung der Aktivierungsbedingungen konnte auch durch die Aufkonzentrierung der Vektorüberstände die Transduktionseffizienz in primäre T-Lymphozyten erhöht werden. Da in Vorversuchen die Vektortiter mit nativen [MLV(SHIV)]-Vektorüberständen auf primären CD4⁺-Lymphozyten zwischen $1-2 \times 10^5$ lagen, war eine Aufkonzentrierung der Vektorpartikel erforderlich. Die Aufkonzentrierung der vektorhaltigen Überstände erfolgte zunächst durch Zentrifugation sowie durch eine anschließende Filtration mit CentriprepTM-Säulen. Mit den CentriprepTM-Säulen, die sich in Porengrößen der Filtereinheit unterscheiden, wurde eine Volumenminderung um den Faktor 15 erreicht, die infolge der gleichzeitigen Anreicherung transduktionsinhibierender Substanzen die Transduktionseffizienz jedoch nur unwesentlich erhöhen konnte. Die Aufkonzentrierung durch Ultrazentrifugation hingegen, mit der eine Volumenminderung um den Faktor 175 erreicht wurde, konnte die Effizienz des Gentransfers mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln wesentlich erhöhen. Wie in Kap. 2.2.9 beschrieben, wurde von 35 ml nativen vektorpartikelhaltigen Überstand durch Ultrazentrifugation (1,5 h, 25.000 rpm, 4° C) eine Einengung des Volumens auf 200 μ l erreicht. Der Zellkulturüberstand wurde dabei nach der Zentrifugation verworfen und das Vektorpartikelpellet in 200 μ l PBS aufgenommen. Desweiteren konnte durch einen Mediumwechsel einen Tag vor der Ernte der von der VPCL generierten [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel mit frischem X-Vivo 10-Medium (ohne FKS, supplementiert mit Glutamin und Antibiotika) und der Zugabe von 10 mM Natriumbutyrat, einem Transkriptionsaktivator, die Transduktionseffizienz erhöht werden.

3.2.3.2 Transduktion von Rhesus-PBMC mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

Der Einsatz des extrazellulären Matrixmoleküls Fibronectin, bzw. des rekombinanten Retronektin, welche auf Zellkulturplatten immobilisiert, die Kolokalisierung von retroviralen Vektorpartikeln und Zellen ermöglichen, konnte die Gentransfereffizienz in hämatopoetische Stammzellen steigern (Pollok *et al.*, 1998, Hanenberg *et al.*, 1996, Moritz und Williams, 1994). Dieses optimierte Transduktionsprotokoll wurde auch für den Gentransfer von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in primäre CD4⁺ T-Zellen angewandt. Hierzu wurden vor Beginn der Transduktion die Zellkulturplatten mit Retronektin beschichtet (Kap. 2.2.10) und die Zellen nach dem in Kap. 2.2.11 beschriebenen Protokoll transduziert. Die zu transduzierenden primären Rhesus-PBMC waren nach der Isolation in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 12-Lochplatten ausgesät und mit $10 \mu\text{g}$ PHA/IL-2 für 3 Tage stimuliert worden (Kap. 2.2.3). Nach Überprüfung des Aktivierungsstatus anhand des Aktivierungsmarkers CD25, sowie lichtmikroskopisch durch die Bildung von Zellkonglomeraten infolge der Stimulierung, wurden je $2,5 \times 10^5$ PBMC pro Vertiefung zur Transduktion eingesetzt.

Die Zellkulturplatten wurden zunächst mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln für 30 min präinkubiert. Anschließend wurden diese abgenommen und die zu transduzierenden Zellen zusammen mit frischen [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln auf die Platten gegeben. Durch eine 90minütige Zentrifugation bei 1000 rpm erfolgte die Kolokalisierung der Vektorpartikel und der Zellen. Nach einer Inkubationszeit der PBMC von 3 h bei 37° C wurde ein Halbmediumwechsel durchgeführt. Zwei Tage nach Transduktion wurde die Anzahl transduzierter und Transfergen-positiver Zellen anhand des Oberflächenmarkers ΔLNGFR im FACS analysiert. Die Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche transduzierter Zellen war anhand der Synzytieninduktion lichtmikroskopisch nachweisbar (Abb. 3.17).

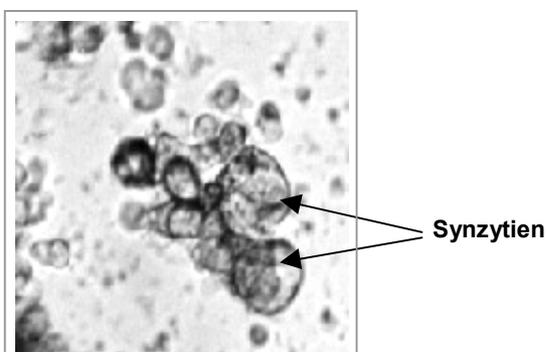


Abb. 3.17:
Synzytieninduktion infolge der Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche transduzierter Rhesus-PBMC

Zur Berechnung des Vektortiters wurde der Anteil Δ NGFR-positiver Zellen nach Transduktion auf die Anzahl potentieller $CD4^+$ -Zielzellen zum Zeitpunkt der Transduktion bezogen (Abb. 3.18.A). Da infolge der Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln die Expression des SHIV-Hüllproteins auf der Oberfläche der transduzierten Zellen eine Herunterregulation des CD4-Moleküls auf der Zelloberfläche induziert (Maradon, 2001, Bour *et al.*, 1995), war keine Doppelanfärbung der PBMC mit einem monoklonalen $\alpha CD4$ - und $\alpha \Delta$ NGFR-Antikörper möglich. Durch Titration der vektorpartikelhaltigen Überstände in 3 Titrationsstufen (100 μ l, 10 μ l, 1 μ l in einem Gesamtvolumen von 500 μ l) wurde der Vektortiter anhand des Mittelwertes der 3 durchgeführten Titrationsstufen errechnet.

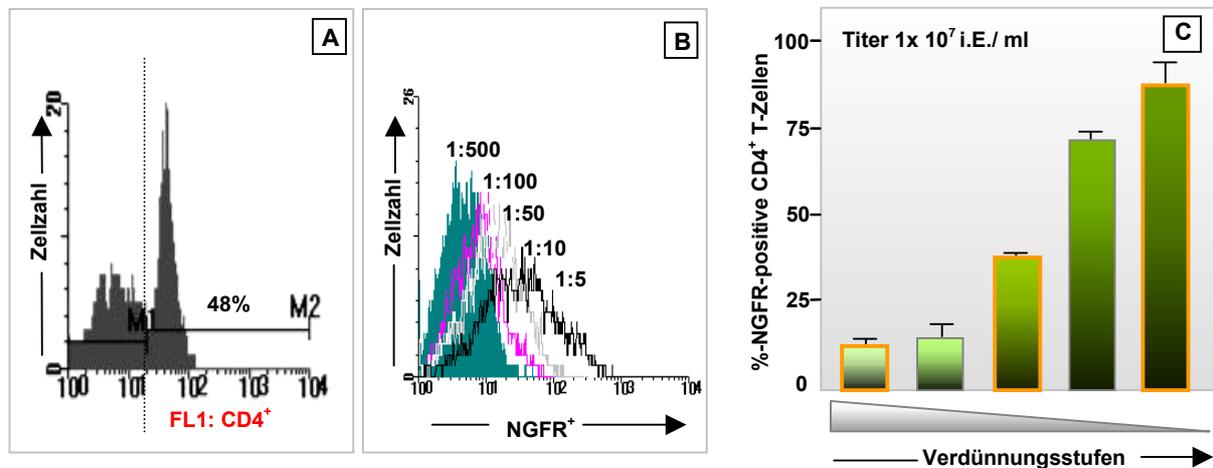


Abb. 3.18:

Transduktion von Rhesus-PBMC mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

A: Anteil der $CD4^+$ T-Zellen (48%) als potentielle Zielzellen der [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren innerhalb der Gesamtpopulation der PBMC

B: Δ NGFR-positiv Zellen nach Transduktion innerhalb der Gesamtpopulation der PBMC (Histogramm-Darstellung der einzelnen Titrationsstufen)

C: [MLV(SHIV)]-Vektortiter in primären Rhesus-Lymphozyten

Die vektorpartikelhaltigen und UZ-aufkonzentrierten Überstände wurden in den Titrationsstufen 1:5, 1:10, 1:50, 1:100 und 1:500 auf jeweils $2,5 \times 10^5$ PBMC transduziert. Zwei Tage nach Transduktion wurde die Anzahl Δ NGFR-positiver Zellen im FACS bestimmt und auf die Anzahl der potentiellen $CD4^+$ -Zielzellen zum Zeitpunkt der Transduktion bezogen. Die orange umrandeten Balken stellen die Verdünnungsstufen dar, aus denen der Mittelwert zur Bestimmung des Vektortiters berechnet wurde.

Die aus den Vektor-Titrations ermittelten Transduktionstiter lagen für die UZ-aufkonzentrierten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren zwischen $1 - 2 \times 10^7$ i.E./ml (Abb. 3.18.C). Wurden die Vektorpartikel nach der Aufkonzentrierung sofort bei -80°C weggefroren, wurde ein Aliquot der Vektorpräparation zur Bestimmung des Transduktionstiters eingesetzt. Der Titer dieser bei -80°C gelagerten Vektorpräparationen lag etwa eine Log-Stufe unter denen der direkt nach Ultrazentrifugation eingesetzten Vektorpartikel. Um eine Vergleichbarkeit der Vektorpräparationen zu erreichen, wurden die in den Tierversuch eingesetzten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren nicht auf Zelllinien, sondern auf Rhesus-PBMC titriert. Die Titer der für die Immunisierungsstudie eingesetzten Vektorpartikel lag bei $1-2 \times 10^6$ i.E./ml.

3.2.3.3 *In vitro* Kinetik der mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten Rhesus-PBMC

Vor Immunsierung des Rhesusaffen durch Transplantation autologer, *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierter PBMC wurde zunächst die *in vitro* Kinetik der transduzierten Rhesus-PBMC untersucht. Hierzu wurde die Expression des Transfergens Δ NGFR in transduzierten Zellen in einem Zeitraum von einer Woche *in vitro* durchflußzytometrisch untersucht.

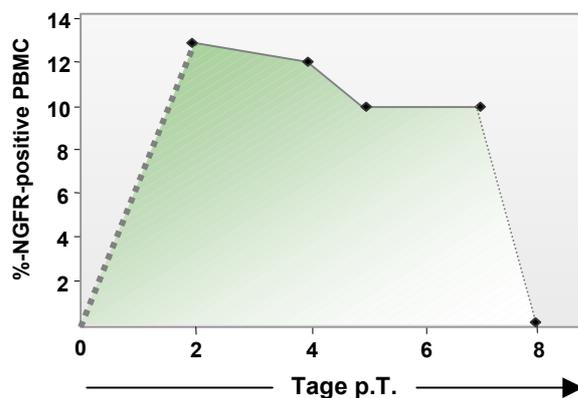


Abb. 3.19:
In vitro Kinetik der transduzierten Rhesus-PBMC, analysiert anhand des Oberflächenmarkers Δ NGFR im FACS; p.T = Tage nach (post) Transduktion

Wie in Abb. 3.19 dargestellt, war die Expression des Oberflächenmarkers Δ NGFR auf der Oberfläche transduzierter Zellen bis zu vier Tage nach Transduktion relativ konstant und dann leicht abnehmend. 8 Tage nach Transduktion war die Expression des Oberflächenmarkers Δ NGFR mittels FACS nicht mehr detektierbar.

Die mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten Rhesus-PBMC wurden darüber hinaus durch eine sensitive Nested-PCR über einen Zeitraum von einer Woche *in vitro* detektiert. Hierzu wurde die genomische DNA aus transduzierten Zellen 2, 4 und 6 Tage nach Transduktion isoliert. Die Detektion der in das Wirtzellgenom inserierten SHIV-Gene erfolgte mittels SHIV-*env* spezifischer Primer (Kap. 2.1.2 und 2.1.3). Als Kontrolle wurden Primer, die das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase) amplifizieren, verwendet.

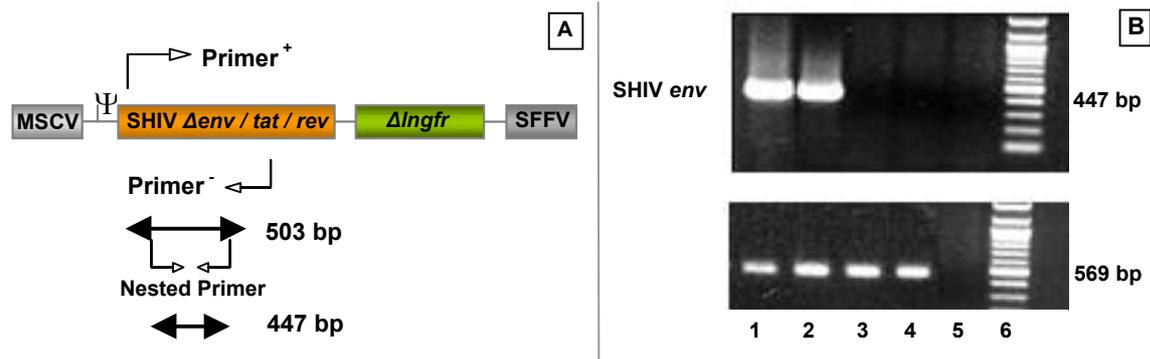


Abb. 3.20:

A: Schematische Darstellung der Nested-PCR zum *in vitro* Nachweis der SHIV-Gene

B: PCR-Nachweis der SHIV-Gene in genomischer DNA transduzierter PBMC

- 1: aus PBMC isolierte genomische DNA 2 Tage nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren
- 2: aus PBMC isolierte genomische DNA 6 Tage nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren
- 3: aus PBMC isolierte genomische DNA 8 Tage nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren
- 4: aus untransduzierten PBMC isolierte genomische DNA (Negativ-Kontrolle)
- 5: H₂O (Negativ-Kontrolle)
- 6: 100 bp DNA-Leiter

Wie in Abb. 3.20.B gezeigt, waren die in das Wirtzellgenom von transduzierten Zellen inserierten SHIV-Sequenzen bis zu 6 Tage nach Transduktion *in vitro* mittels einer Nested-PCR detektierbar (Abb. 3.20.B2). Am Tag 8 nach Transduktion war kein Signal erkennbar (Abb. 3.20.B3), ebenso wie in der als Negativ-Kontrolle eingesetzten genomischen DNA, die aus untransduzierten PBMC isoliert worden war (Abb. 3.20.B4). Die zur Kontrolle der PCR-Bedingungen und Reinheit der genomischen DNA verwendete GAPDH ließ sich als Positiv-Kontrolle in der genomischen DNA von transduzierten und untransduzierten Zellen nachweisen. Als Ursache dieses kurzen Detektionszeitraumes ist möglicherweise die Synzytieninduktion nach Transduktion von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in Rhesus-PBMC denkbar. Diese wird durch die Verschmelzung des auf der Oberfläche transduzierter Zellen exprimierten viralen SHIV-Hüllprotein mit membranständigen CD4-Molekülen der Nachbarzellen induziert. Die Synzytieninduktion war während des gesamten Beobachtungszeitraumes lichtmikroskopisch nachweisbar und trat ab Tag 3 nach Transduktion verstärkt in Erscheinung (Abb. 3.2.21.B).

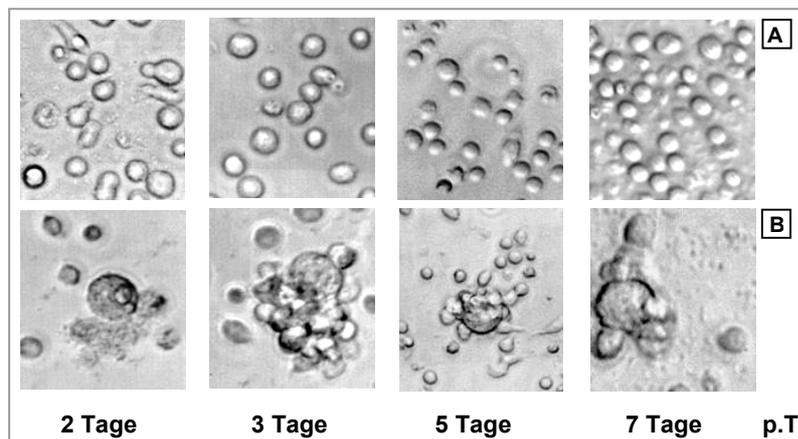


Abb. 3.21:

Lichtmikroskopische Aufnahmen der Rhesus-PBMC

A: Negativ-Kontrolle (untransduzierte PBMC)

B: PBMC nach Transduktion (p.T.) mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

3.2.3.4 Ausschluss von replikationskompetenten Retroviren (RCRs)

Da infolge von Rekombinationsereignissen replikationskompetente Retroviren (RCR) entstehen können, die ein Risiko für den *in vivo* Einsatz darstellen, wurde vor Beginn der Immunisierungsstudie mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren das Vorhandensein von RCRs *in vitro* untersucht. Der Ausschluss von RCRs erfolgte zunächst in der aus der Verpackungszelllinie und aus transduzierten Zellen isolierten DNA mittels PCR-Analyse. Für den RCR-PCR-Nachweis wurden ein Sense- und ein Antisense-Primer, die im MLV *gag/pol*-Bereich binden, sowie ein im SHIV-*env*-Bereich amplifizierender Antisense-Primer (Abb. 3.22.A) eingesetzt. Für den Fall einer Rekombination wäre der Erhalt von zwei unterschiedlichen Fragmenten zu erwarten, das rekombinierte MLV/SHIV-Konstrukt mit 4067 bp als auch das MLV-Konstrukt von 1000 bp. Sofern keine Rekombination stattgefunden hat, ist durch die fehlende Bindestelle im SHIV-*env* keine Amplifikation des *env*-Gens möglich und somit lediglich das MLV-Amplifikat von 1000 bp zu erwarten. Durch Verwendung des Long Template PCR-Kits (Boehringer, Mannheim) sowie einer ausreichenden PCR-Zyklenzahl sollte die Amplifikation des 4067 bp großen RCR-Fragmentes sichergestellt werden. Als Kontrolle wurde in einer Nested-PCR das SHIV-*env* amplifiziert, sowie zur Kontrolle der PCR-Bedingungen und Reinheit der genomischen DNA das Haushaltsgen GAPDH.

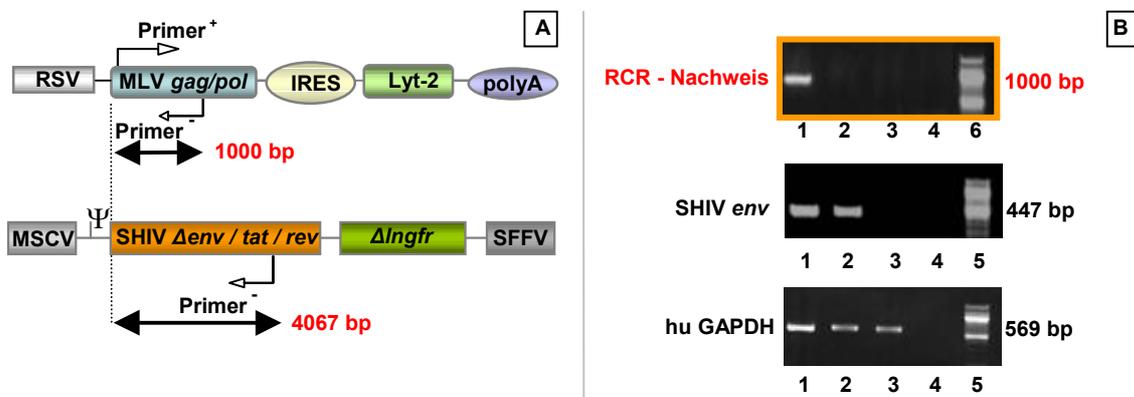


Abb. 3.22:

Ausschluß eines rekombinierten MLV/SHIV-Konstruktes in der aus der Verpackungszelllinie und transduzierten Zellen isolierten DNA mittels RCR-PCR

A: Schematische Darstellung der RCR-PCR

B: Ergebnisse der RCR-PCR

- 1: aus der VPCL isolierte DNA
- 2: aus PBMC isolierte genomische DNA nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren
- 3: aus untransduzierten PBMC isolierte genomische DNA (Negativ-Kontrolle)
- 4: H₂O
- 5: 100 bp Leiter
- 6: 1kb Leiter

Wie anhand der in Abb. 3.22.B gezeigten RCR-PCR erkennbar ist, konnte das Vorhandensein eines rekombinierten MLV/SHIV-Konstruktes ausgeschlossen werden. In der

aus der Verpackungszelle isolierten DNA war ausschließlich das amplifizierte MLV gag/pol Fragment (1000 bp) detektierbar (Abb. 3.22.B1), während in der genomischen DNA transduzierter Zellen kein Amplifikat nachweisbar war (Abb. 3.22.B2). Nach Amplifikation des SHIV-*env*-Gens war in der sensitiven Nested-PCR ein *env*-spezifisches Amplifikat in der DNA der Verpackungszelle sowie in der genomischen DNA transduzierter Zellen nachweisbar. Die zur Kontrolle eingesetzte GAPDH ließ sich in allen DNA-Präparationen nachweisen.

Als ein weiterer Nachweis zum Ausschluß replikationskompetenter Retroviren wurde ein sogenannter Rescue-Test durchgeführt (Kap. 2.3.7). Hierzu wurden [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren auf CD4⁺CXCR4⁺ Ghost-Zellen transduziert. Nach fünf Tagen wurde der Zellkulturüberstand der transduzierten Zellen auf eine zweite Zielzell-Generation transduziert. Sofern es infolge von Rekombinationsereignissen zur Entstehung replikationskompetenter Retroviren kommen sollte, wären diese durch RT-Aktivität im Zellkulturüberstand der 2. Zielzellgeneration nachweisbar. Als Positiv-Kontrolle wurde in diesem Testsystem das replikationskompetente amphotrope MLV (pM91) eingesetzt, als Negativ-Kontrolle der Zellkulturüberstand von nicht transduzierten Zellen.

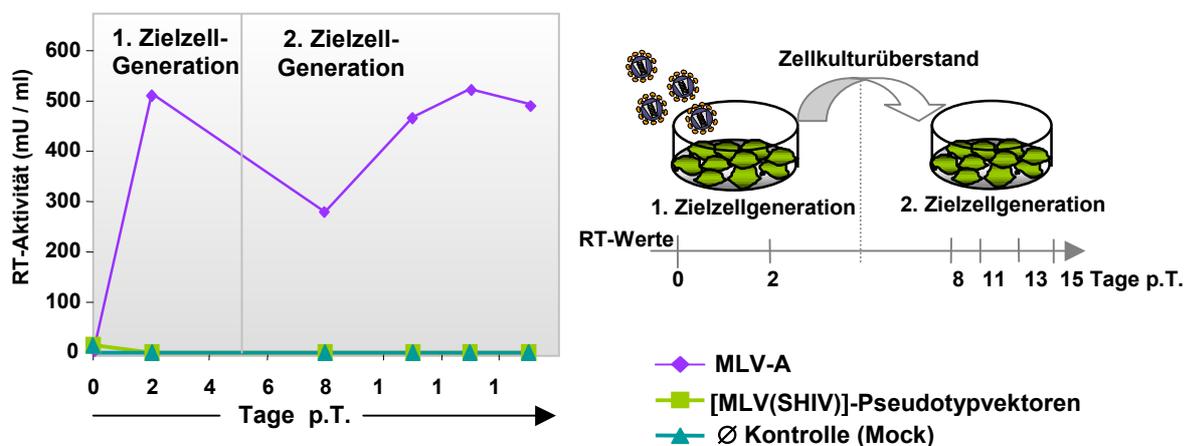


Abb. 3.23:

RT-Test zum Ausschluß von RCRs

Verlauf der RT-Werte nach Transduktion (p.T.) der [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren in CD4⁺ CXCR4⁺ Ghost-Zellen und nachfolgender Sekundärinfektion einer zweiten Zielzell-Generation

Der in Abb. 3.23 dargestellte Verlauf der RT-Werte zeigte keinen Hinweis auf die Existenz replikationskompetenter Retroviren. Zwar konnte kurz nach der ersten Transduktion der [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren zum Zeitpunkt 0 eine kurzzeitige, minimale RT-Aktivität der im Medium verbliebenen Vektorpartikel nachgewiesen werden, die jedoch bereits 2 Tage nach Transduktion und auch nach Infektion der zweiten Zielzell-Generation nicht mehr detektierbar war. Es ist somit auszuschließen, dass durch Rekombinationen des

Transfervektors pMg Δ env/tat/rev/ Δ ingfr und dem MLV gag/pol infektiöse (replikationskompetente) Vektorpartikel generiert wurden. Im Gegensatz dazu zeigte das als Positiv-Kontrolle eingesetzte amphotrope MLV den für ein replikatives Retrovirus typischen RT-Verlauf. Bereits 2 Tage nach der ersten Transduktion war eine deutliche RT-Aktivität im Überstand der infizierten Ghost-Zellen detektierbar. Nach Übertragung des Zellkulturüberstandes der ersten auf eine zweite Zielzellgeneration war ebenfalls am Tag 2 der Neuinfektion eine im Vergleich zum Anfangswert geringere RT-Aktivität messbar, die nach 13 Tagen ihr Maximum erreichte und auch in den nachfolgenden Tagen nahezu konstant blieb.

Wie die Ergebnisse von Kap. 3.2.3 zeigen, ist mit den mittels einer stabilen VPCL generierten [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren ein effizienter Gentransfer in primäre CD4⁺ Rhesus-PBMC möglich, die eine stabile Expression der Transfergene über einen Zeitraum von 6 Tagen *in vitro* aufweisen. Im Hinblick auf die nachfolgende Immunisierungsstudie konnte das Risiko der Entstehung von RCRs sowohl mittels PCR als auch in einem Rescue-Test *in vitro* ausgeschlossen werden.

3.2.4 Immunisierungsstudie im Rhesusaffen-Tiermodell

3.2.4.1 Experimentelles Design der Immunisierungsstudie

Nachdem ein effizienter Gentransfer von viralen Antigenen mittels eines MLV-abgeleiteten Vektors *in vitro* gezeigt werden konnte, sollte die Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort nach Transplantation der autologen, *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC im Rhesusaffen-Tiermodell untersucht werden. Die Reinfusion von autologen, viralen Antigen-exprimierenden Zellen anstelle einer direkten Immunisierung mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln sollte das Risiko einer sofortigen Elimination durch das Komplementsystem minimieren. Im Mittelpunkt dieser Immunisierungsstudie stand neben der Untersuchung des immunogenen Potentials der reinfundierten autologen PBMC auch der Nachweis des Detektionszeitraumes dieser Transfergen-exprimierenden Zellen *in vivo* (Abb. 3.24). Die Detektion der transplantierten Zellen *in vivo* sollte mit Hilfe der sensitiven Nested-PCR erfolgen, die bereits zur *in vitro*-Detektion von transduzierten Zellen eingesetzt worden war (Kap. 3.2.3.3). Der Nachweis der Induktion einer Transfergen-spezifischen Immunantwort sollte durch regelmäßige Serumentnahmen mit verschiedenen serologischen Nachweisverfahren gezeigt werden. Wie in Abb. 3.24 dargestellt, sollte die Transplantation der transduzierten PBMC in drei aufeinander folgenden Applikationen erfolgen, in einem zeitlichen Abstand von 18 bzw. 12 Tagen.

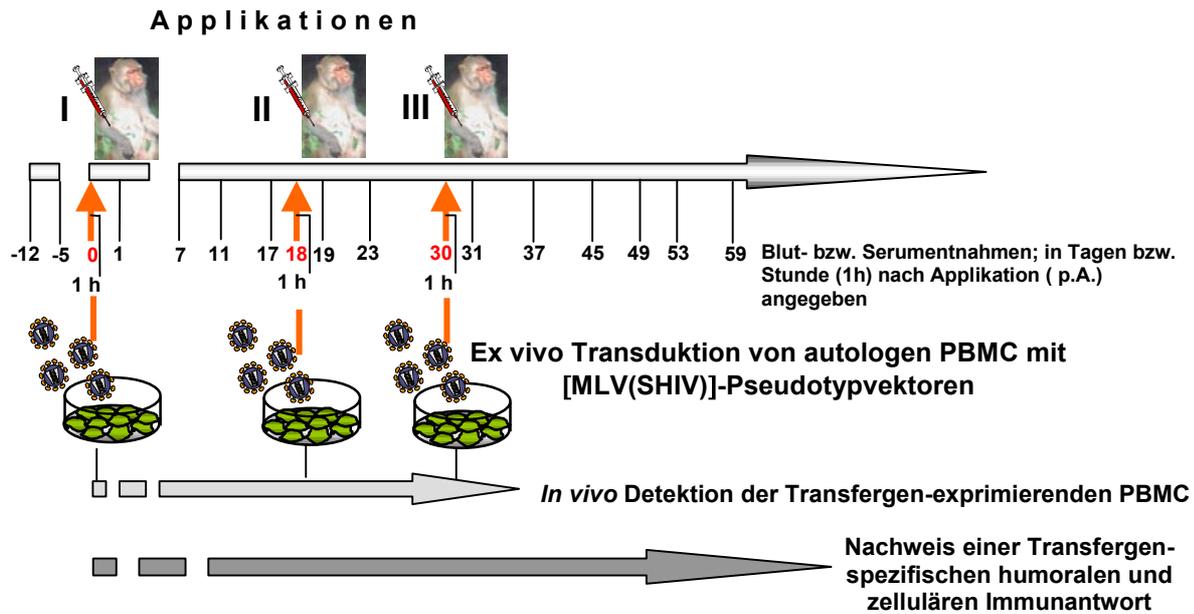


Abb. 3.24:
Experimentelles Design der Immunisierungsstudie

Die Immunisierung des Rhesusaffen erfolgte durch die Transplantation von *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC. Bei den in rot dargestellten Zeitpunkten handelt es sich um die Tage der Applikation der Transfergen-exprimierenden Zellen, die in schwarz dargestellten Zeitpunkte zeigen die Blut- bzw. Serumentnahmen. I = 1. Applikation, II = 2. Applikation, III = 3. Applikation

3.2.4.2 Parameter zur Analyse der zur Transplantation eingesetzten autologen PBMC

Die autologen PBMC, die nach der *ex vivo* Transduktion in einen Rhesusaffen appliziert werden sollten, wurden nach Isolation, Stimulation und Transduktion in bezug auf die Proliferation, Aktivierbarkeit und Viabilität *in vitro* untersucht. Darüber hinaus wurde vor Transplantation die Anzahl Transfergen-positiver Zellen nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln bestimmt.

3.2.4.2.1 Aktivierung und Proliferation der Rhesus-PBMC

Die Aktivierung und Proliferation der PBMC wurde nach Isolierung, nach PHA/IL-2-Stimulation, sowie nach Transduktion zum Zeitpunkt der Transplantation analysiert. Die Proliferation der Zellen wurde durch Bromphenolblau-Anfärbung und lichtmikroskopische Auszählung der lebenden Zellen bestimmt. Neben der Proliferation, wurde auch der Aktivierungsstatus der PBMC mittels des Aktivierungsmarkers CD25 im FACS bestimmt. Die Expression dieses Markermoleküls wird infolge der Stimulation durch PHA/IL-2 bereits innerhalb von drei Tagen in aktivierten Zellen hochreguliert. Eine Aktivierung der PBMC kann

darüber hinaus auch lichtmikroskopisch durch die Bildung von Zellkonglomeraten beobachtet werden.

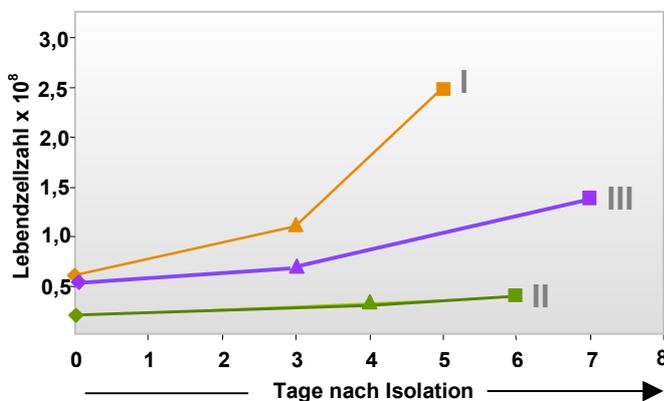


Abb. 3.25:
Anzahl der proliferierenden Zellen nach Isolation, nach PHA/IL-2-Stimulation und nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektoren
I = 1. Applikation, II = 2. Applikation, III = 3. Applikation;
◆ = Zellzahl nach Isolation, ▲ = Zellzahl nach PHA/IL-2-Stimulation, ■ = Zellzahl 2 Tage nach Transduktion

Wie in Abb. 3.25 erkennbar, wiesen die zur ersten Transplantation eingesetzten PBMC nach PHA/IL-2-Stimulation und Transduktion eine hohe Proliferationsrate auf; von $6,0 \times 10^7$ Zellen nach Isolierung hatte sich ihre Anzahl nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln auf $2,5 \times 10^8$ erhöht (Abb. 3.25, I). Die FACS-Analysen in Abb. 3.26 zeigen, dass der Anteil aktivierter $CD4^+/CD25^+$ T-Zellen nach PHA/IL-2 Stimulation um den Faktor 5 anstieg (Abb. 3.26, I). Nach der ersten Transplantation entwickelte der Rhesusaffe eine Leukopenie infolge der zahlreichen vorangegangenen Blutentnahmen. Diese erschwerte in den nachfolgenden Experimenten die Isolierung der PBMC, da in der erhaltenen Lymphozytenpopulation nach der Ficoll-Dichtezentrifugation ein hoher Anteil von Erythrozyten auftrat. So konnten nach der zweiten Blutentnahme nur $2,0 \times 10^7$ PBMC isoliert werden. Die pathologische Veränderung des Blutbildes spiegelte sich auch in der Proliferationsrate der Zellen nach PHA/IL-2-Stimulation ($2,0 \times 10^7$) und Transduktion ($4,0 \times 10^7$) wider, die deutlich niedriger lag als in dem vorangegangenen Experiment (Abb. 3.25, II). Erst durch die Gabe eines Eisen-Präparates zur Stabilisierung und Bindung freier Erythrozyten konnte man mit der dritten und letzten Blutentnahme fortfahren. Zwar lag auch hier die Proliferationsrate der PBMC unterhalb der des ersten Experimentes, dennoch war die Anzahl der Zellen von $6,0 \times 10^7$ nach Isolation auf $7,0 \times 10^7$ nach PHA/IL-2-Stimulation und $1,4 \times 10^8$ nach Transduktion angestiegen (Abb. 3.25, III), wenn gleich sich die Zahl der stimulierten $CD4^+/CD25^+$ -T-Zellen nach PHA-Zugabe lediglich um den Faktor 3 erhöhte (Abb. 3.26, III).

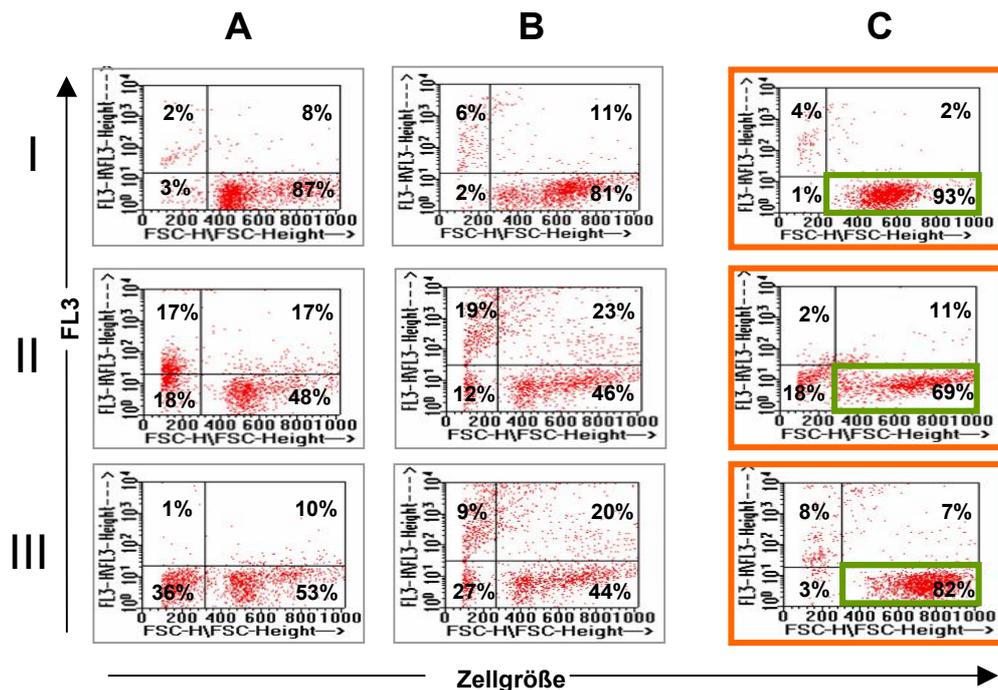


Abb. 3.27:

Viabilität der Zellen nach Isolation, nach PHA/IL-2-Stimulation und nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln zum Zeitpunkt der Transduktion mittels Propidium-Iodid (PI)-Anfärbung und nachfolgender FACS-Analyse. Der Anteil der viablen Zellen ist in der Dot-Plot-Darstellung im rechten unteren Quadranten angegeben. I = 1. Applikation, II = 2. Applikation, III = 3. Applikation

A: PBMC nach der Isolation

B: PBMC nach PHA/IL-2-Stimulation

C: PBMC 2 nach der Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren, zum Zeitpunkt der Transplantation

Wie anhand der in Abb. 3.27 dargestellten FACS-Analysen erkennbar, zeigte die Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen (Abb. 3.27.C). So waren bei der ersten Applikation 93% der transplantierten PBMC viabel (Abb. 3.27.CI). Da, wie bereits in Kap. 3.2.4.2.1 beschrieben, der Rhesusaffe infolge der häufigen Blutentnahmen eine Leukopenie entwickelt hatte, war in den nachfolgenden Applikationen, insbesondere bei der zweiten, der Anteil der lebenden Zellen reduziert. Zwar konnte durch die längere Kulturnahme der Zellen bis zum Zeitpunkt der Transplantation der Anteil an viablen Zellen nahezu verdoppelt werden, jedoch war der Anteil an apoptotischen Zellen im Vergleich zu denen zur ersten Transplantation reinfundierten Zellen erhöht. So lag der Anteil der lebenden Zellen bei der zweiten Transplantation bei 69% (Abb. 3.27.CII) und bei der dritten Applikation bei 82% (Abb. 3.27.CIII).

3.2.4.2.3 Anzahl der zur Transplantation eingesetzten Transfergen-positiven Rhesus-PBMC

Nach Isolation und PHA/IL-2 Stimulation wurden die Rhesus-PBMC mit einer MOI (*Multiplicity Of Infection*) von 0,1 mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduziert. Zwei Tage nach Transduktion, zum Zeitpunkt der Transplantation, wurden die Zellen auf die Expression des Oberflächenmarkers Δ NGFR im FACS analysiert, um die genaue Anzahl der zur Transplantation eingesetzten Transfergen-positiven PBMC zu bestimmen. Als Nachweis des viralen Gentransfers wurde darüber hinaus die Synzytieninduktion in den transduzierten PBMC lichtmikroskopisch untersucht.

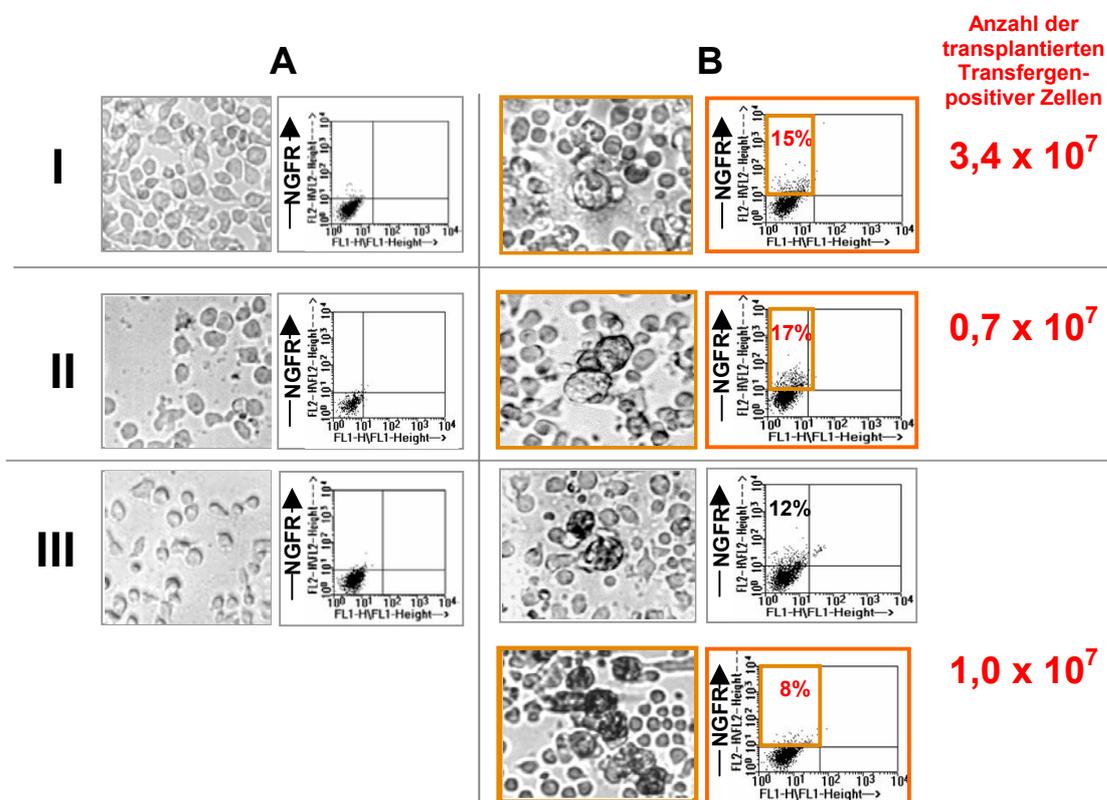


Abb. 3.28:

Anzahl der Transfergen-(Δ NGFR) positiven Zellen nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren und anschließender FACS-Analyse. In der rechten Spalte ist die Anzahl der zur Transplantation eingesetzten Transfergen-positiven Rhesus-PBMC dargestellt. Darüber hinaus wurde die Synzytieninduktion in den transduzierten Zellen lichtmikroskopisch untersucht.

A: Negativ-Kontrolle (untransduzierte PBMC)

B: Mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierte und nachfolgend in den Rhesusaffen transplantierte PBMC

Nach Transduktion der Rhesus-PBMC mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren waren 12-17% Δ NGFR-positive Zellen in der Gesamtpopulation der PBMC detektierbar (Abb. 3.28.B). Zur Berechnung der Anzahl der transplantierten Transfergen-positiven Zellen wurde der im

FACS gemessene Anteil Δ LNNGFR-positiver Zellen auf die Lebendzellzahl (Abb. 3.25) bezogen. Bei der ersten Transplantation wurden $3,4 \times 10^7$, bei der zweiten $0,7 \times 10^7$ und bei der dritten Transplantation $1,1 \times 10^7$ Transfergen-exprimierende Zellen appliziert (Abb. 3.28.B, rechte Spalte).

Nach allen drei *ex vivo* Transduktionen war lichtmikroskopisch eine deutliche Synzytieninduktion in der Kultur der transduzierten Zellen nachweisbar. Da Untersuchungen zur *in vitro* Kinetik von transduzierten Rhesus-PBMC zeigen konnten, dass 3 Tage nach Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren eine verstärkte Synzytieninduktion nachweisbar ist (Kap. 3.2.3.3), wurden bei der dritten Transplantation die Zellen erst 4 Tage nach der Transduktion in den Rhesusaffen appliziert, um die immunogene Wirkung der auf den autologen PBMC exprimierten viralen Antigene *in vivo* zu verstärken.

3.2.5 Nachweis der transplantierten Transfergen-positiven Zellen *in vivo*

Die *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC wurden in einem Volumen von 10 ml PBS in drei aufeinander folgenden Applikationen am linken Bein des Rhesusaffen in die *Vena saphena* reinfundiert. Eine Stunde nach der Applikation erfolgte die erste Blutentnahme an der *Vena illiaca*. Desweiteren wurden 24 h bzw. 7 Tage nach Applikation weitere Blutentnahmen ebenfalls an der *Vena illiaca* durchgeführt. Aus den erhaltenen Blutproben wurde sofort nach der Entnahme genomische DNA isoliert. Diese wurde in die sensitive Transfergen-spezifische Nested-PCR (Kap. 3.2.3.3) für den *in vivo* Nachweis der Transfergen-positiven Zellen eingesetzt, die bereits für den Nachweis der proviralen SHIV-Sequenzen in genomischer DNA transduzierter Zellen verwendet worden war (Kap. 3.2.3.3). Zur Bestimmung der Nachweisgrenze dieser bereits zur *in vitro* Detektion der viralen Transfergene angewandten PCR-Methode, war in einem vorangegangenen Experiment eine Transfergen-positiv Probe genomischer DNA, die aus transduzierten PBMC isoliert worden war, im Hintergrund von Transfergen-negativer DNA aus untransduzierten PBMC in bestimmten Titrationsstufen (1:20, 1:200, 1:400) eingesetzt worden. Mit Hilfe dieses Standards, d.h. durch Titration vektorpositiver gegen vektornegativer DNA, wurde das Detektionslimit bestimmt. Mit der Nested-PCR konnten SHIV-*env* spezifische Sequenzen mit einer Sensitivität von einer „positiven“ Zelle in einer Gesamtpopulation von 400 Zellen detektiert werden.

Obwohl in der ersten Applikation die höchste Anzahl Transfergen-positiver Lymphozyten transplantiert worden war, erhielt man aus keiner der zu verschiedenen Zeitpunkten

entnommenen Blutproben ein positives Signal für die SHIV-Sequenzen (Daten nicht gezeigt). Nach der zweiten Transplantation (II) war in der genomischen DNA, die aus den direkt nach der Applikation und nach 24 h entnommenen Blutentnahmen isoliert worden war, ein positives Signal für die SHIV-Sequenzen detektierbar, das 7 Tage nach Applikation nicht mehr nachweisbar war (Abb. 3.29.A und B). Bei der dritten und letzten Applikation war ein positives Signal zu allen Zeitpunkten, einschließlich 7 Tage nach Transplantation detektierbar, wenn gleich das Signal der aus 24 h Stunden nach Applikation entnommenen Probe möglicherweise aufgrund einer zu gering eingesetzten DNA-Menge etwas schwächer war (Abb. 3.29.B). Dieses Ergebnis entspricht dem in Kap. 3.2.3.3 untersuchten Detektionszeitraum transduzierter Zellen *in vitro*, in dem die proviralen SHIV-Sequenzen ebenfalls bis zu 6 Tagen nach Transduktion in der genomischen DNA transduzierter Zellen detektierbar waren.

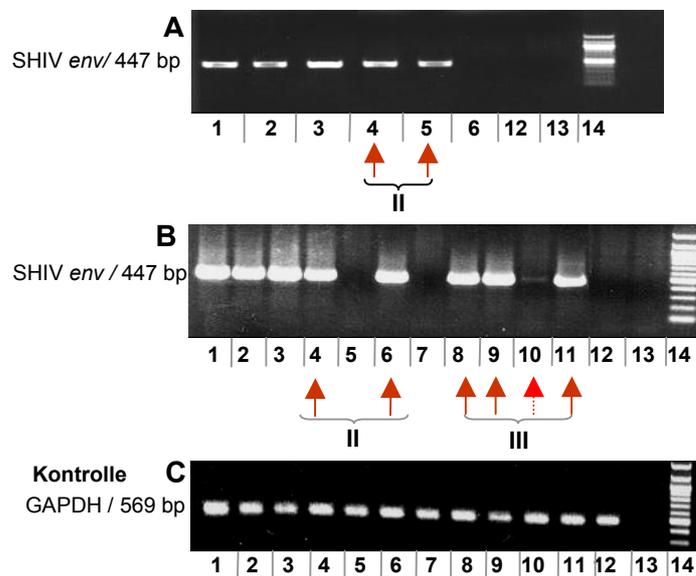


Abb.3.29:

Nachweis der transplantierten Transfergen-positiven Zellen *in vivo*

Aus den zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation (p.A.) entnommenen Blutproben wurde zunächst genomische DNA isoliert, die anschließend in einer Konzentration von 400 ng in die Nested-PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Nach Amplifikation mittels Env-spezifischer Primer wurden die Amplifikate auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Als Kontrolle zum Nachweis genomischer DNA wurde das Haushaltsgen GAPDH amplifiziert. A und B sind zwei unabhängig voneinander durchgeführte Nested-PCR-Reaktionen.

A: 2. Applikation (II)

B: 2. und 3. Applikation (III)

C: GAPDH-Kontrolle

- 1: interner Standard (1:20)
- 2: interner Standard (1:200)
- 3: interner Standard (1:400)
- 4: genom. DNA, die aus den zur Transplantation II eingesetzten *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten PBMC isoliert worden war (Positiv-Kontrolle)
- 5-7: genom. DNA, isoliert aus Blutentnahmen nach 1 h (5), 24h (6) und 7 Tagen (7) nach der 2. Applikation
- 8: genom. DNA, die aus den zur Transplantation III eingesetzten *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten PBMC isoliert worden war (Positiv-Kontrolle)
- 9-11: genom. DNA, isoliert aus Blutentnahmen nach 1 h (9), 24h (10) und 7 Tagen (11) nach der 3. Applikation
- 12: genom. DNA, isoliert aus untransduzierten Zellen (Negativ-Kontrolle)
- 13: H₂O
- 14: 100 bp Leiter

3.2.6 Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort nach Transplantation der Transfergen-exprimierenden autologen PBMC in einen Rhesusaffen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die transplantierten Zellen bis zu 7 Tage nach Applikation *in vivo* detektierbar sind, wurde nachfolgend das immunogene Potential dieser Antigen-exprimierenden Zellen *in vivo* untersucht.

3.2.6.1 Induktion einer humoralen Immunantwort

Der Nachweis der Induktion einer humoralen Immunantwort nach Transplantation der *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC erfolgte durch verschiedene serologische und proteinbiochemische Untersuchungen. Hierzu wurden die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation der Transfergen-exprimierenden Zellen entnommenen und hitzeinaktivierten Serumproben (Post-Immun-Seren) eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurden Prä-Immun-Seren verwendet, welche vor Beginn der Immunisierungsstudie von dem Versuchstier entnommen worden waren.

3.2.6.1.1 Nachweis von Transfergen-spezifischen Antikörpern

Die Induktion einer humoralen Transfergen-spezifischen Immunantwort konnte in einem Vorversuch bereits qualitativ mittels FACS nachgewiesen werden. Hierzu waren Zellen der Verpackungszelllinie mit einem nach 5 Wochen nach der ersten Transplantation entnommenen Post-Immun-Serum und nachfolgend mit einem IgG-PE-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert worden. Es konnten dabei eindeutig Antikörper gegen die Verpackungszelllinie detektiert werden, während das als Negativ-Kontrolle eingesetzte Prä-Immun-Serum nur ein schwaches Hintergrundsignal aufwies (Daten nicht gezeigt). Als Positiv-Kontrolle war ein α HIV⁺-Serum verwendet worden.

Im Folgenden wurde zum Nachweis der Induktion einer Transfergen-spezifischen humoralen Immunantwort ein ELISA etabliert, der die Kinetik der Antikörper-vermittelten Immunantwort aufzeigt (Kap. 2.3.4.2). Hierzu wurden aufkonzentrierte Überstände der VPCL als Antigene auf ELISA-Platten immobilisiert, an denen die in den Post-Immun-Seren enthaltenen Transfergen-spezifischen Antikörper binden können. Durch Kopplung eines α hu-IgG-Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers und der nachfolgenden Zugabe der Substrat-

lösung ist durch die farblich sichtbare Substratumsetzung der Nachweis einer Transfergen-spezifischen Antikörper-Antwort möglich. Um eine unspezifische humorale Immunreaktion, die u.a. gegen MLV Gag/Pol oder gegen die bei der Applikation mitgeführten Medienrückstände gerichtet sein kann, auszuschließen, wurde in einem parallelen Ansatz eine zweite ELISA-Platte mit aufkonzentrierten Überständen der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie beschichtet. Das photometrisch gemessene Signal der „positiven“, d.h. mit aufkonzentrierten Überständen der VPCL beschichteten Platte, wurde nach Subtraktion der „negativen“, mit Überständen der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie beschichteten Platte als qualitativer Nachweis einer Transfergen-spezifischen humoralen Immunantwort gewertet (ΔOD_{490} -Werte = Signaldifferenz_{pos-neg}).

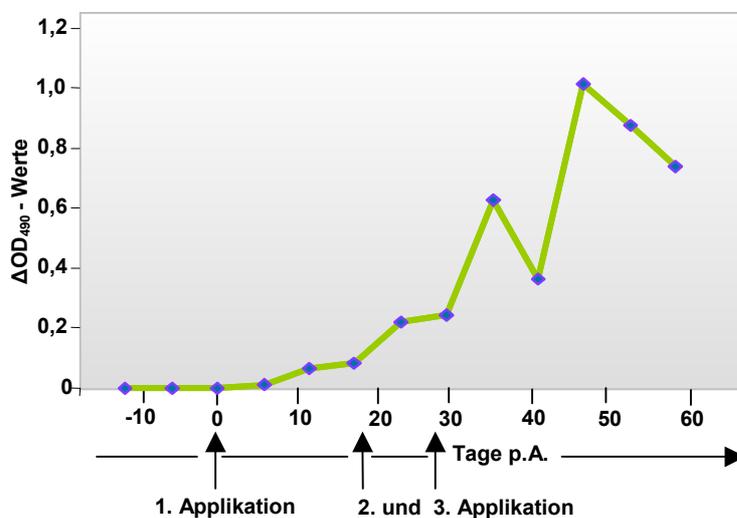


Abb. 3.30:
Nachweis einer Transfergen-spezifischen humoralen Immunantwort mittels ELISA;
p.A. = post Applikation;
 ΔOD_{490} -Werte = Signaldifferenz_{pos-neg} = Transfergen-spezifisches Signal

Die in Abb. 3.30 dargestellten ELISA-Daten zeigen, dass drei Wochen nach der ersten Transplantation der autologen, *ex vivo* mit [MLV(SHIV-1)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC, Transfergen-spezifische Antikörper im Serum des immunisierten Rhesusaffen nachweisbar waren. Ein zweiter eindeutiger Anstieg der Antikörperkonzentration war in der fünften Woche nach der ersten Applikation bzw. eine Woche nach der dritten und letzten Transplantation der Transfergen-exprimierenden Zellen zu beobachten. Nach einem kurzzeitigen Abfall stieg die Antikörperkonzentration nach 7 Wochen, d.h. zweieinhalb Wochen nach der letzten Inokulation, auf einen Maximalwert an, der in den folgenden Wochen wieder leicht absank. Da die als Negativ-Kontrolle eingesetzten Prä-Immun-Seren keinerlei Hintergrund-Signale aufwiesen, ist die in den Post-Immun-Seren detektierbare Antikörper-Reaktion eindeutig als spezifische Immunantwort auf die Transplantation der Transfergen-exprimierenden Zellen zu bewerten.

3.2.6.1.2 Nachweis von HIV-1-gp120-spezifischen Antikörpern

Da der Nachweis der Induktion einer humoralen Immunantwort in den vorangegangenen Untersuchungen keine Diskriminierung zwischen den Transfargenen, d.h. zwischen den viralen Antigenen Tat, Rev und Env und dem Oberflächenmarkerprotein Δ LNDR erlaubte, wurde ein weiterer, HIV-1-spezifischer ELISA entwickelt. Als Antigen wurde das rekombinante HIV-1-IIIB-gp120-Glykoprotein verwendet, nachdem zuvor durch Sequenzvergleiche eine 82%ige Sequenzhomologie zu dem Env-Hüllprotein von SHIV89.6P gezeigt werden konnte.

Für den HIV-1-gp120-spezifischen Antikörper-Nachweis wurden je 25 ng des im CHO-Expressionssystem hergestellten Proteins eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde ein Prä-Immun-Serum verwendet, welches am Tag 0, d.h. direkt vor Applikation der *ex vivo* transduzierten Zellen entnommen worden war. Nach Inkubation der Test-Seren erfolgte die Detektion der HIV-1-gp120-spezifischen Antikörper-Antwort nach dem in Kap. 2.3.4.2 und 2.3.4.3 beschriebenen Protokoll. Das als Negativ-Kontrolle eingesetzte Prä-Immun-Serum zeigte ein starkes Hintergrundsignal, sodass die Differenz der photometrisch ermittelten OD-Werte zu den nach erfolgter Immunisierung entnommenen Post-Immun-Seren nicht sehr signifikant war (Abb. 3.31).

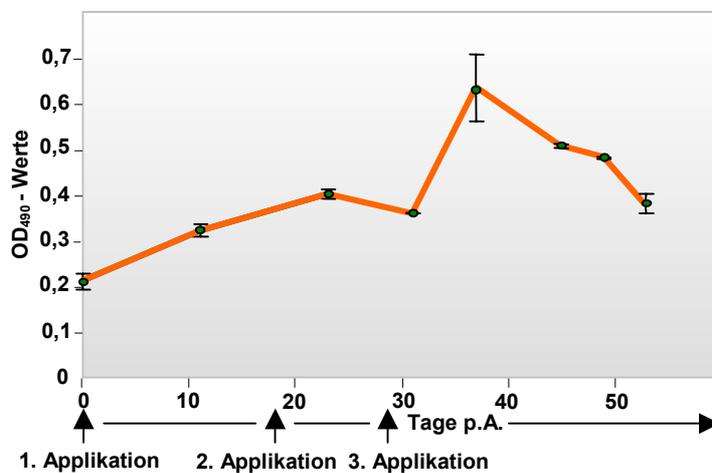


Abb. 3.31: Nachweis einer HIV-1-gp120-spezifischen humoralen Immunantwort mittels ELISA; p.A. = post Applikation

Da man bei der angewandten Immunisierungsstrategie jedoch nicht davon ausgehen konnte, eine vergleichbar starke humorale Immunantwort wie bei einer Virus-Infektion zu induzieren, ist die relativ schwache Env-spezifische Antikörper-Antwort nicht überraschend. Für die getesteten Post-Immun-Seren war, wie bereits in dem im vorangegangenen Kap. 3.2.6.1.1 beschriebenen Transfargen-spezifischen ELISA, ein Maximalwert der Antikörperkonzentration 5 Wochen nach der ersten bzw. zwei Wochen nach der dritten Transplantation detektierbar, die in den folgenden Wochen wieder abnehmend war (Abb. 3.31). Das zur Kontrolle der Antikörperspezifität eingesetzte α HIV⁺-Serum als Positiv-Kontrolle zeigte bei

allen durchgeführten ELISA-Nachweisen ein eindeutiges Signal ($> 0,8$ OD₄₉₀-Wert; Daten nicht gezeigt), sodass bei den in den Post-Immunsereen detektierbaren OD₄₉₀-Werten von einer HIV-1-gp120-spezifischen Antikörper-Antwort auszugehen ist.

3.2.6.1.3 Nachweis HIV-1-spezifischer Antikörper mittels Western-Blot-Analyse

Die Induktion einer HIV-1-Env-spezifischen humoralen Immunantwort konnte auch proteinbiochemisch mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden. In dieser wurde ein nach Transplantation der *ex vivo* transduzierten PBMC entnommenes Post-Immun-Serum (Abb. 3.32, 3) zur Detektion des SHIV-Hüllproteins in Zellysaten der stabil mit dem Transfervektor *pMgΔenv/tat/rev/ΔIngfr* transfizierten VPCL verwendet. Als Positiv-Kontrolle wurde ein α HIV⁺-Serum (Abb. 3.32, 2) zur Detektion des viralen Hüllproteins eingesetzt, als Negativ-Kontrolle ein Prä-Immun-Serum (Abb. 3.32, 1). Um die Spezifität der detektierbaren Signale zu zeigen, wurden die Seren darüber hinaus mit Zellysaten der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie inkubiert (Negativ-Kontrolle).

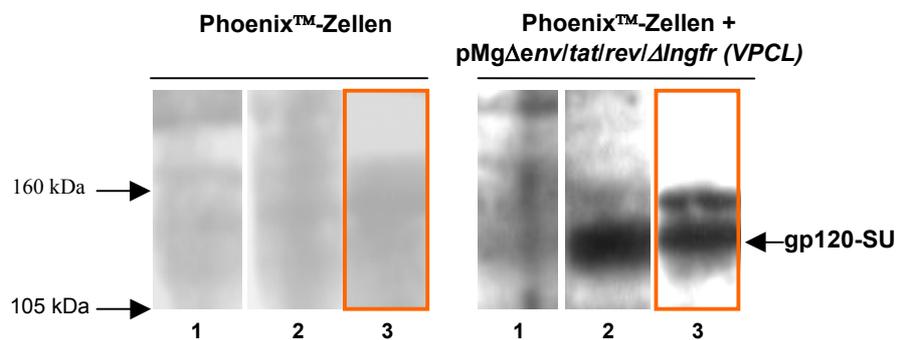


Abb. 3.32:

Western-Blot-Analyse zum Nachweis SHIV-Env-spezifischer Antikörper in dem nach Transplantation der *ex vivo* transduzierten PBMC entnommenen Post-Immun-Serum in den Zellysaten der Transfervektor-positiven VPCL. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellysate der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie mit den Seren inkubiert.

1 : Prä-Immun-Serum (Negativ-Kontrolle)

2: α HIV⁺-1-Serum (Positiv-Kontrolle)

3: Post-Immun-Serum

In der in Abb. 3.32 gezeigten Western-Blot-Analyse konnte mittels des Post-Immun-Serums (Abb. 3.32, 3) das virale Hüllprotein (gp120-SU) in den Zellysaten der VPCL detektiert werden, während mit dem als Negativ-Kontrolle eingesetzten Prä-Immun-Serum (Abb. 3.32, 1) kein Signal detektierbar war. Mit dem als Positiv-Kontrolle eingesetzten α HIV⁺-Serum konnte ebenfalls das virale Hüllprotein in den Zellysaten der VPCL nachgewiesen werden (Abb. 3.32, 2). Da in den Zellysaten der Transfervektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie weder mit dem Post-Immun-Serum noch mit dem α HIV⁺-Serum ein Signal detektierbar war, ist von

einem spezifischen gp120-SU Nachweis in den Zellysaten der VPCL auszugehen, der den Nachweis einer gp120-spezifischen Antikörper-Antwort des in Kap. 3.2.6.1.2 gezeigten ELISA bestätigt.

3.2.6.1.4 Nachweis neutralisierender Antikörper

Die Induktion neutralisierender Antikörper wird als essentielle Eigenschaft eines protektiven HIV-Impfstoffes angesehen, da diese in der Lage sind, die Infektion oder Internalisierung von freien Viruspartikeln zu verhindern. Um die Induktion von neutralisierenden Antikörpern nach Immunisierung des Rhesusaffen zu untersuchen, wurde ein Neutralisationstest durchgeführt (Kap. 2.3.5). In diesem werden Virus-spezifische Antikörper nachgewiesen, die in der Lage sind, virale Infektionen bzw. Transduktionen mit Viruspartikeln auf Indikatorzellen zu verhindern.

Für den Nachweis neutralisierender Antikörper im Serum des immunisierten Rhesusaffen wurden zwei Post-Immun-Seren, sowie ein Prä-Immun-Serum als Negativ-Kontrolle und ein αHIV^+ -Serum als Positiv-Kontrolle mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln (MOI 0,1) präinkubiert und nachfolgend zur Transduktion auf permissive $\text{CD4}^+ \text{CXCR4}^+$ Ghost-Zellen eingesetzt. Sofern infolge der Immunisierung neutralisierende Antikörper induziert worden sind, würden diese durch Komplexierung mit den [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln die Transduktionseffizienz reduzieren. Die nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum erzielte Transduktionseffizienz wurde als 100% gewertet. Der Anteil transduzierter Zellen nach Inkubation mit den Post-Immun-Seren bzw. mit dem αHIV^+ -Serum ist relativ zur Transduktionseffizienz, die nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum erzielt worden ist, angegeben.

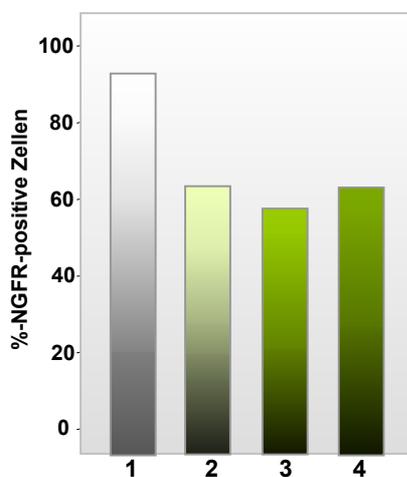


Abb. 3.33:

Nachweis neutralisierender Antikörper in Post-Immun-Seren des immunisierten Rhesusaffen im Neutralisationstest auf einer T-Zelllinie.

Transduktionseffizienz in $\text{CD4}^+ \text{CXCR4}^+$ Ghost-Zellen nach Inkubation der Vektorpartikel mit Post-Immun-Seren, einem Prä-Immun-Serum (Negativ-Kontrolle) bzw. einem αHIV^+ -Serum (Positiv-Kontrolle). Die Transduktionseffizienz nach Inkubation der Vektorpartikel mit dem Prä-Immun-Serum wurde als 100% gewertet. Der Anteil transduzierter Zellen nach Inkubation der Post-Immun-Seren bzw. αHIV^+ -Serum ist relativ zur Effizienz nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum angegeben.

1: Prä-Immun-Serum (Negativ-Kontrolle)

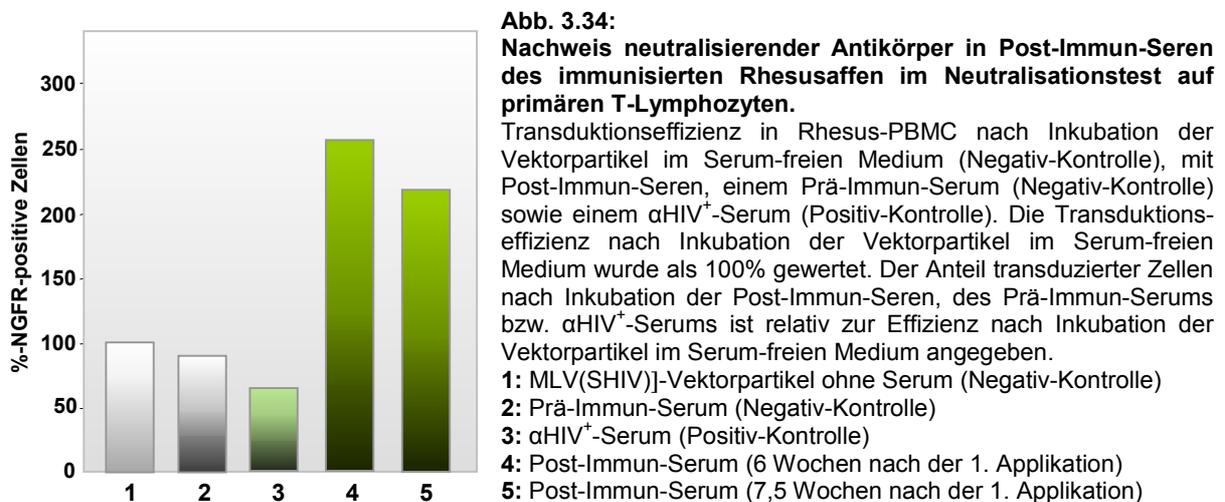
2: αHIV^+ -Serum (Positiv-Kontrolle)

3: Post-Immun-Serum (6 Wochen nach der 1. Applikation)

4: Post-Immun-Serum (7,5 Wochen nach der 1. Applikation)

Wie in Abb. 3.33 dargestellt, konnte nach Präinkubation der Post-Immun-Seren eine vergleichbare Reduktion des Transduktionstiters wie nach Inkubation mit dem αHIV^+ -Serum (Positiv-Kontrolle) nachgewiesen werden. Sofern man den Inkubationsansatz mit dem Prä-Immun-Serum als Negativ-Kontrolle als 100% wertet, ist eine Reduktion der Transduktionseffizienz nach Inkubation mit dem αHIV^+ -Serum um 30% und mit den nach der Immunisierung entnommenen Seren um 36 bzw. 30% nachweisbar. Diese Reduktion der Transduktionseffizienz könnte darauf hindeuten, dass neutralisierende Antikörper durch die Immunisierung induziert wurden.

Das Vorhandensein neutralisierender Antikörper wurde darüber hinaus in einem weiteren Testsystem untersucht, in dem primäre Rhesus-PBMC als Indikatorzellen verwendet wurden (Abb. 3.34). Als Negativ-Kontrolle wurde ein zusätzlicher Ansatz miteinbezogen, in dem die Vektorpartikel in Abwesenheit von Serum präinkubiert wurden und dessen erzielte Transduktionseffizienz als 100% gewertet wurde. Der Anteil transduzierter Zellen ist in diesem Testsystem nach Inkubation des Prä-Immun-Serums, Post-Immun-Seren bzw. mit dem αHIV^+ -Serum relativ zu der Transduktionseffizienz, die nach Inkubation der Vektorpartikel in Abwesenheit von Serum erzielt wurde, angegeben.



Interessanterweise war in diesem Testsystem, in dem primäre Zellen als Indikatorzellen verwendet wurden, ein gegenteiliger Effekt auf die Transduktionseffizienz nach Inkubation der [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel mit den Post-Immun-Seren nachweisbar. Sofern die Transduktionseffizienz, die in Abwesenheit von Serum erzielt wurde, als 100% gewertet wurde, zeigte sich bei dem als Negativ-Kontrolle eingesetzten Prä-Immun-Serum eine Reduktion des Transduktionstiters von 9%, während die Inkubation mit dem αHIV^+ -Serum die Transduktionseffizienz mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln um 37% reduzierte. Im Gegensatz dazu war nach Inkubation der Vektorpartikel mit den Post-Immun-Seren eine bis

zu 2,5 fache Steigerung der Transduktionsrate nachweisbar. Diese Beobachtung ließ sich auch in einem nachfolgenden Experiment auf Rhesus-PBMC reproduzieren (Daten nicht gezeigt) und könnte auf das bereits beschriebene Phänomen des „*enhancement*“ durch Env-spezifische Antikörper (Fust *et al.*, 1995) zurückzuführen sein.

Die in diesem Kapitel gezeigten serologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen konnten nachweisen, dass nach dem zellspezifischen *ex vivo* Gentransfer von [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln in CD4⁺ T-Zellen und Transplantation dieser Transfergen-exprimierenden Zellen in den Rhesusaffen eine HIV-spezifische humorale Immunantwort induziert werden konnte.

3.2.6.2 Induktion einer HIV-spezifischen zellulären Immunantwort nach Transplantation autologer *ex vivo* transduzierter PBMC

Bei der Immunkontrolle und Elimination viraler Infektionen ist neben der humoralen Immunreaktion vor allem die Induktion der zellulären Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Eine zentrale Rolle übernehmen hierbei insbesondere die CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs). Bei der HIV-1-Infektion gehören insbesondere CTLs, die gegen das virale Hüllprotein, aber auch gegen die frühen regulatorischen Proteine Tat und Rev gerichtet sind, zu den entscheidenden Abwehrmechanismen in der Kontrolle der HIV-1-Infektion. Für den Nachweis der Induktion einer CTL-vermittelten Immunreaktion nach Immunisierung mit den viralen Transfergen-exprimierenden PBMC wurde ein ELIspot-Assay am Robert-Koch-Institut in Berlin in der Arbeitsgruppe von Dr. Steve Norley in Zusammenarbeit mit Erik Seibold durchgeführt. In diesem Testsystem können CTLs anhand ihrer Fähigkeit auf Antigen-Stimuli INF γ zu sezernieren, nachgewiesen werden. Als Antigen-Stimuli wurden verschiedene Peptid-Pools von HIV-1-Env und Rev in einer Konzentration von 25 μ g/ml sowie rekombinantes (r) HIV-1 gp120 und rHIV-1-IIIB Tat in einer Konzentration von 2 μ g/ml bzw. 0,4 μ g/ml eingesetzt. Nachdem die aus den immunisierten Rhesusaffen isolierten PBMC (2×10^5 Zellen) mit den entsprechenden Peptid-Pools bzw. rekombinanten Proteinen inkubiert worden waren, erfolgte der Nachweis des gebundenen INF γ mit einem monoklonalen biotinylierten α INF γ -Antikörper. Nach Zugabe eines Streptavidin-Alkalin-Phosphatase Konjugates konnten einzelne INF γ -produzierende Zellen anhand der in der nachfolgend hinzugegebenen Substratlösung enthaltenen Chromogene, die auf der Membran präzipitierten, als einzelne Spots detektiert werden. Als Negativ-Kontrolle wurden PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen eingesetzt. In Abb.3.35 sind repräsentativ die

lichtmikroskopischen Aufnahmen der $\text{INF}\gamma$ -sekretierenden CTLs nach spezifischer Env-Peptid-Stimulation dargestellt.

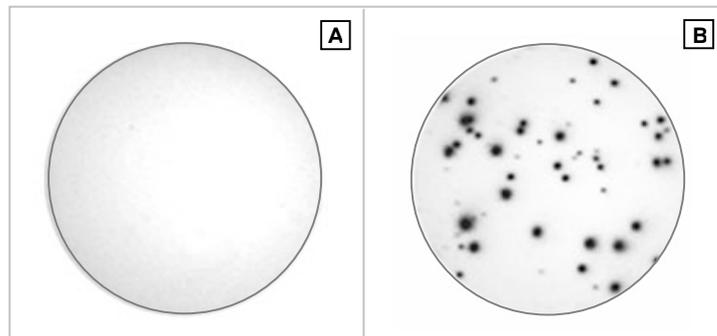


Abb. 3.35:

Lichtmikroskopische Aufnahmen der $\text{INF}\gamma$ -sekretierenden CTLs nach spezifischer Env-Peptid-Pool-Stimulation. Im ELISPOT entsprechen die Spots einzelnen $\text{INF}\gamma$ -produzierenden Zellen.

A: PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen

B: PBMC des immunisierten Rhesusaffen (7,5 Wochen nach der letzten Transplantation entnommen)

In den nachfolgenden Abbildungen und Tabellen sind die Ergebnisse des ELISPOT-Assays quantitativ zusammengefasst. Für das im ELISPOT-Assay als Antigen-Stimulus eingesetzte rHIV-1-IIIB Tat konnte trotz hoher Sequenzhomologie zu dem SHIV89.6P-Tat keine CTL-Aktivität in den nach Immunisierung entnommenen PBMC nachgewiesen werden.

3.2.6.2.1 Nachweis einer Rev-spezifischen CTL-Aktivität

Für den Nachweis einer Rev-spezifischen CTL-Aktivität wurden insgesamt zwei Peptid-Pools des HIV-1-Isolates BRU als Antigen-Stimulus eingesetzt (Tab. 3.5).

Rev-Peptid-Pool	Isolat	Sequenz
Rev-Peptid-Pool 1	HIV-1 BRU rev	aa 1-70
Rev-Peptid-Pool 2	HIV-1 BRU rev	aa 71-115

Tab. 3.5:

Auflistung der in den ELISPOT-Assay eingesetzten Rev-Peptid-Pools zum Nachweis einer HIV-spezifischen CTL-Aktivität in den nach Immunisierung entnommenen Rhesus-PBMC.

aa = amino acids; Aminosäure-Sequenz

Der als Antigen-Stimulus eingesetzte Rev-Peptid-Pool 1, der die Aminosäuresequenz 1-70 von HIV-1 BRU umfasst, zeigte eine signifikante Rev-spezifische CTL-Aktivität in den nach 7,5 Wochen nach Inokulation entnommenen PBMCs ($p = 0,0323$). 10 Wochen nach Immunisierung war die CTL-Aktivität nicht mehr detektierbar. Der die Aminosäuresequenz 71-115 von HIV-1 BRU umfassende Rev-Peptid-Pool 2 dagegen konnte in den 10 Wochen nach Inokulation entnommenen PBMCs eine signifikante CTL-Aktivität induzieren ($p =$

0,0337), die jedoch deutlich schwächer als die im Kontext des Rev-Peptid-Pool 1 induzierten CTL-Aktivität war (Abb. 3.36, Tab. 3.6).

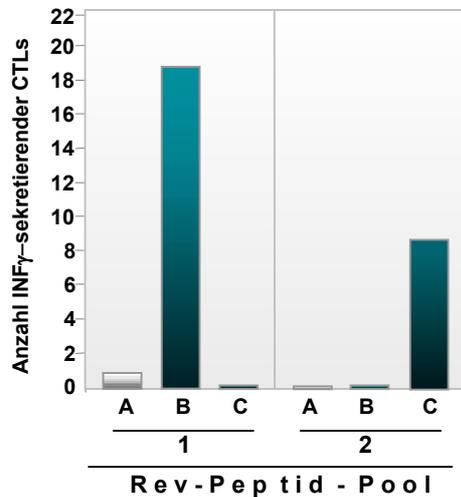


Abb. 3.36:

Anzahl IFN γ -sekretierender CTLs nach spezifischer Antigen-Stimulation mittels verschiedener Rev-Peptid-Pools (1 und 2) im ELIspot. Es handelt sich hier um die errechneten Mittelwerte der lichtmikroskopisch ausgezählten Spots, abzüglich der Spot-Anzahl der Medium- (Negativ-) Kontrolle.

A: PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen (Negativ-Kontrolle)

B: PBMC des immunisierten Rhesusaffen (7,5 Wochen nach der letzten Transplantation entnommen)

C: PBMC des immunisierten Rhesusaffen (10 Wochen nach der letzten Transplantation entnommen)

Rev-Peptid-Pool	Negativ-Kontrolle	PBMC 7,5 Wo nach Immunisierung	PBMC 7,5 Wo nach Immunisierung
Rev-Peptid-Pool 1			
Mean	1,2 \pm 0,7	19,1 \pm 5,8	0,0 \pm 0,0
Median (Range)	1,0 (0 - 2,5)	20,4 (8,4 - 28,4) $p = 0,0323$	0,0
Rev-Peptid-Pool 2			
Mean	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	8,4 \pm 2,6
Median (Range)	0,0	0,0	9,4 (3,4 - 12,4) $p = 0,0337$

Tab. 3.6:

Statistische Auswertung der Anzahl IFN γ -sekretierender CTLs nach spezifischer Antigen-Stimulation mittels verschiedener Rev-Peptid-Pools (1 und 2) im ELIspot. Als Negativ-Kontrolle wurden PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen eingesetzt. $p < 0,05$ = signifikant nach t-Test

3.2.6.2.2 Nachweis einer Env-spezifischen CTL-Aktivität

Für den Nachweis einer Env-spezifischen CTL-Aktivität wurden insgesamt 5 Env-Peptid-Pools sowie das rekombinante HIV-1 SF2 gp120 als Antigen-Stimulus eingesetzt. Eine Env-spezifische CTL-Aktivität konnte dabei für die aus den Isolaten HIV-1 W61D und HIV-1IIIB, HXB2-1A stammenden Env-Peptid-Pools 1 und 3 sowie für das rekombinante HIV-1 SF2 gp120 nachgewiesen werden (Tab. 3.7).

Env-Peptid-Pool	Isolat	Sequenz
Env-Peptid-Pool 1	HIV-1 W61D gp120 HIV-1IIIB, HXB2-1A gp120	(A) DDVNTTNTSTTTTNSGWGTGE (B) TTSNGWWTGEIRKGEIKNCSF (C) RKGEIKNCSFNITTSIRDKV (D) DVVPIDDDNATTKNKTTRNF (E) TTKNKTTRNFRLIHCNSSVM (F) RLIHCNSSVMTQACPKVSFE (G) PIPHYCAPAGFAILKCNK
Env-Peptid-Pool 2	HIV-1(HXB2)env gp120 HIV-1 IIIB, HXB2-1A env gp120	GFAILKCNKTFDGGKGLCTN TFDGGKGLCTNVSTVQCTHGI RPVVSTQLLNGSLAEEEVV NGSLAEEEVVIRSVNFTDNA NGSLAEEEVVIRSDNFMDNT IRSDNFMDNTKTIIVQLNES KTIIVQLNESVAINCTRPNN VAINCTRPNNNTRKGIHIGP NTRKGIHIGPGRAFYAARKI GRAFYAARKIIGDIRQAHCN
Env-Peptid-Pool 3	HIV-1IIIB, HXB2-1A gp120 W61Dgp120	(H) IGDIRQAHCNLSRAQWNNTL (I) LSRAQWNNTLKQIVIKLREH (J) KQIVIKLREHFGNKTIFNQ (K) FGNKTIKFNQSSGGDPEIVR (L) SSGGDPEIVRHSFNCGGEFF (M) TWNGTEGNNTTEGNSTITLPCR (N) EGNSTITLPCRKQIINMWQ (O) RIKQIINMWQEVGKAMYAPP
Env-Peptid-Pool 4	W61Dgp120	EVGKAMYAPPIGGQIRCSSN IGGQIRCSSNITGLLLTRDG ITGLLLTRDGGTEGNGTENE GTEGNGTENETEIFRPGGGD TEIFRPGGGDMRDNRSELY MRDNWRSELYKYKVVKVEPL KYKVVKVEPLGVAPTRAKRR GVAPTRAKRRVVQREKR
Env-Peptid-Pool 5	W61Dgp120 HIV-1 IIIB, HXB2-1A env gp120 HIV-1(HXB2)env gp120 HIV-1 IIIB, HXB2-1A env gp120 HIV-1 W61D gp120	AAEQLWVTVYYGVPVWKEAT VPVWKEATTLFCASDAKAY LFCAASAKAYDTEVHNWVWAT DTEVHNWVWATHACVPTDPN HACVPTDPNPQEVVLGNVTE PQEVVLGNVTEYFNMMWKNMNV DQMHEDIISLWDQSLKPCVK WDQSLKPCVKLTPLCVTLDCD LTPLCVTLDCDDVNTTNTST
rHIV-1 SF2 gp120	HIV-1 SF2 gp120 (CHO)	

Tab. 3.7:

Auflistung der in den ELISpot-Assay eingesetzten Env-Peptid-Pools zum Nachweis einer HIV-spezifischen CTL-Aktivität in den nach Immunisierung entnommenen Rhesus-PBMC. Für die mit A, B, C, usw. markierten Sequenzen war eine CTL-Aktivität nachweisbar, sodass diese nachfolgend zur Bestimmung der CTL-Determinanten zu Sequenzvergleichsanalysen eingesetzt wurden (Abb. 3.40).

Wie in Abb. 3.37 und Tab. 3.8 gezeigt, war für den als Antigen-Stimulus eingesetzten Env-Peptid-Pool 1 die höchste CTL-Aktivität nachweisbar, die sowohl in den nach 7,5 als auch in den nach 10 Wochen nach der ersten Immunisierung entnommenen Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl INF γ -sekretierender CTLs im Vergleich zu den als Negativ-Kontrolle eingesetzten Zellen eines nicht-immunisierten Rhesusaffen aufwies ($p = 0,001$ bzw. $p = 0,0101$). Mit dem Env-Peptid-Pool 3 war eine schwächere, jedoch zu beiden Zeitpunkten

gleichbleibende CTL-Aktivität nachweisbar ($p = 0,0153$), während das rekombinante HIV-1 SF2 gp120, eingesetzt in einer Konzentration von $2\mu\text{g/ml}$, nur in den 10 Wochen nach Immunisierung entnommenen PBMC eine CTL-Aktivität induzieren konnte ($2,9 \pm 2,2$). Für die als Antigen-Stimuli eingesetzten Env-Pools 2, 4 und 5 konnte keine CTL-Aktivität in den nach der Immunisierung entnommenen Zellen nachgewiesen werden.

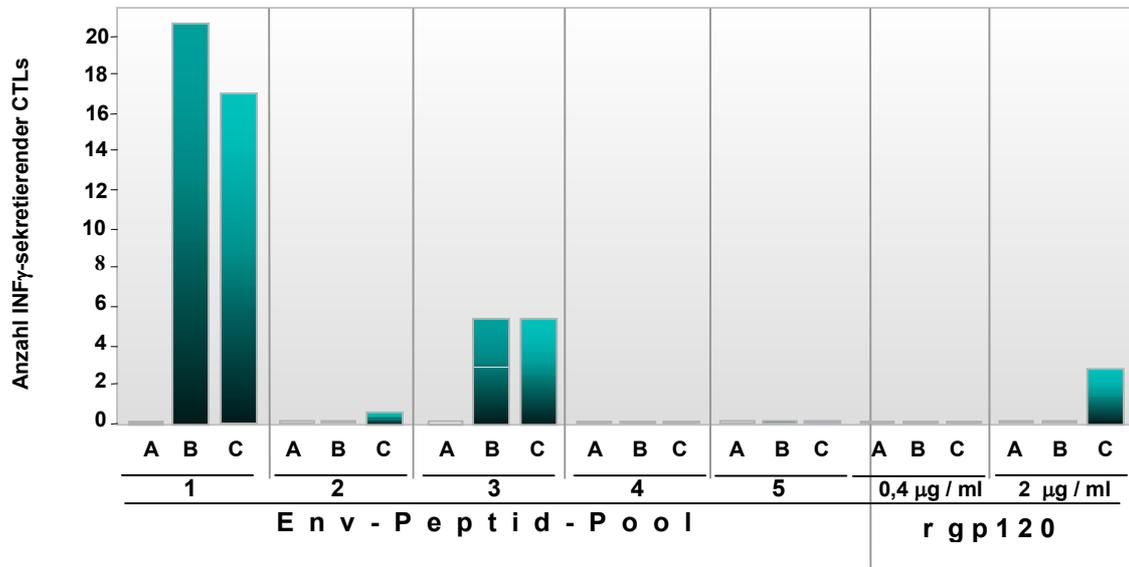


Abb. 3.37:

Anzahl IFN γ -sekretierender CTLs nach spezifischer Antigen-Stimulation mittels verschiedener Env-Peptid-Pools (1 – 5) sowie mit rgp120 im ELIspot. Es handelt sich hier um die errechneten Mittelwerte der lichtmikroskopisch ausgezählten Spots, abzüglich der Spot-Anzahl der Medium- (Negativ-) Kontrolle.

A: PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen (Negativ-Kontrolle)

B: PBMC des immunisierten Rhesusaffen (7,5 Wochen nach der letzten Transplantation entnommen)

C: PBMC des Immunisierten Rhesusaffen (10 Wochen nach der letzten Transplantation entnommen)

Env-Peptid-Pool	Negativ-Kontrolle	PBMC 7,5 Wo nach Immunisierung	PBMC 10 Wo nach Immunisierung
Env-Pool 1			
Mean	0,0 \pm 0,0	20,9 \pm 1,3	17,1 \pm 3,7
Median (Range)	0,0	20,4 (18,9 - 23,4)	14,4 (12,4 - 24,4)
		$p = 0,0001$	$p = 0,0101$
Env-Pool 3			
Mean	0,0 \pm 0,0	5,9 \pm 1,5	5,9 \pm 3,9
Median (Range)	0,0	5,9 (3,4 - 8,4)	4,4 (0 - 13,4)
		$p = 0,0153$	
rgp120 (2$\mu\text{g/ml}$)			
Mean	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	2,9 \pm 2,2
Median (Range)	0,0	0,0	1,4 (0 - 7,4)

Tab. 3.8:

Statistische Auswertung der Anzahl IFN γ -sekretierender CTLs nach spezifischer Antigen-Stimulation mittels verschiedener Env-Peptid-Pools (1 und 3) bzw. mit rgp120 im ELIspot. Als Negativ-Kontrolle wurden PBMC eines nicht-immunisierten Rhesusaffen eingesetzt. $p < 0,05$ = signifikant nach t-Test

3.2.6.2.3 Bestimmung der CTL-Determinanten in den zur Immunisierung eingesetzten SHIV-Transfergen

Zur Bestimmung der CTL-Determinanten wurden Aminosäure-Sequenzvergleiche zwischen den im ELIspot-Assay als Antigen-Stimulus eingesetzten Peptid-Pools und den zur Immunisierung eingesetzten viralen Antigenen Rev und Env von SHIV89.6P durchgeführt. Der Sequenzvergleich zwischen dem SHIV 89.6P Rev und dem aus dem Isolat von HIV-1 BRU stammenden Rev ergab eine Sequenzhomologie von 92%. Die Sequenzvergleiche in Abb. 3.38 im Kontext zu den in Abb. 3.36 gezeigten Ergebnissen und statistischen Auswertungen in Tab. 3.6 zeigen, dass die höchste Rev-spezifische CTL-Aktivität in dem Bereich des Rev-Peptid-Pools 1 umfassenden Aminosäuren-Sequenzbereich von 1-71 nachweisbar war.

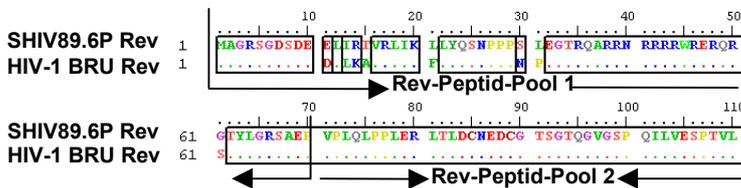


Abb. 3.38: Sequenzvergleich des zur Immunisierung eingesetzten SHIV89.6P-Rev und den als Antigen-Stimuli eingesetzten Rev-Peptid-Pools von HIV-1 BRU-REV.

Die in Abb. 3.40 dargestellten Sequenzvergleiche konnten eine hohe Sequenzhomologie zwischen SHIV89.6P-Env und dem als Antigen-Stimulus im ELIspot-Assay eingesetzten Peptid-Pool 1 mit den Sequenzen A, B, F und G (Tab. 3.7) nachweisen, während für die Sequenzen C-E keine Sequenzhomologien zu dem SHIV89.6P-Hüllprotein nachweisbar waren.

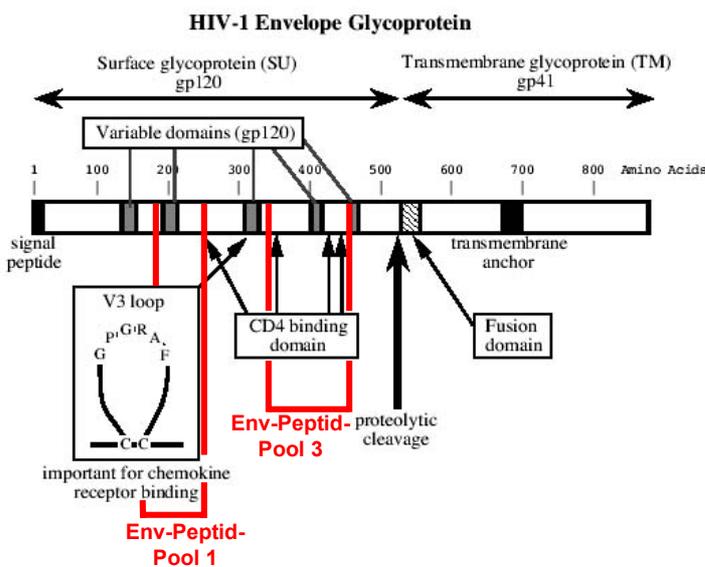


Abb. 3.39: Schematische Darstellung der einzelnen Domänen im HIV-1 Hüllprotein und den im ELIspot-Assay nachgewiesenen CTL-Determinanten

Die Bereiche, in denen die eingesetzten Peptid-Pools eine nachweisbare signifikante CTL-Aktivität in den PBMC des immunisierten Rhesusaffen induzieren, liegen in dem Aminosäuresequenzbereichen 152-170 (Peptidpool 1 A und B) bzw. 195-230 (Peptidpool 1 F und G) innerhalb der variablen Domäne des gp120 (Abb. 3.39). Für den Peptid-Pool 3, der

im ELISpot ebenfalls eine signifikant erhöhte CTL-Aktivität in den PBMC des immunisierten Rhesusaffen induzieren konnte, war eine hohe Sequenzhomologie der Peptide H-L sowie N und O nachweisbar, die in den Aminosäuresequenzbereichen 324-384 im V3-Loop des viralen HIV-1-Hüllproteins als auch in den Bereichen 405-436 in der CD4-Bindungsregion lagen (Abb. 3.39).

Die Ergebnisse dieses ELISpot-Assays konnten somit erfolgreich die Induktion einer zellulären zytotoxischen Immunantwort nach Immunisierung mit den HIV-1 Antigen exprimierenden autologen PBMC zeigen, die spezifisch gegen die für einen effizienten Schutz bedeutenden Determinanten des HIV-1-Hüllproteins, dem V3-Loop und der CD4-Bindungsregion sowie gegen das regulatorische HIV-1-Rev gerichtet war.

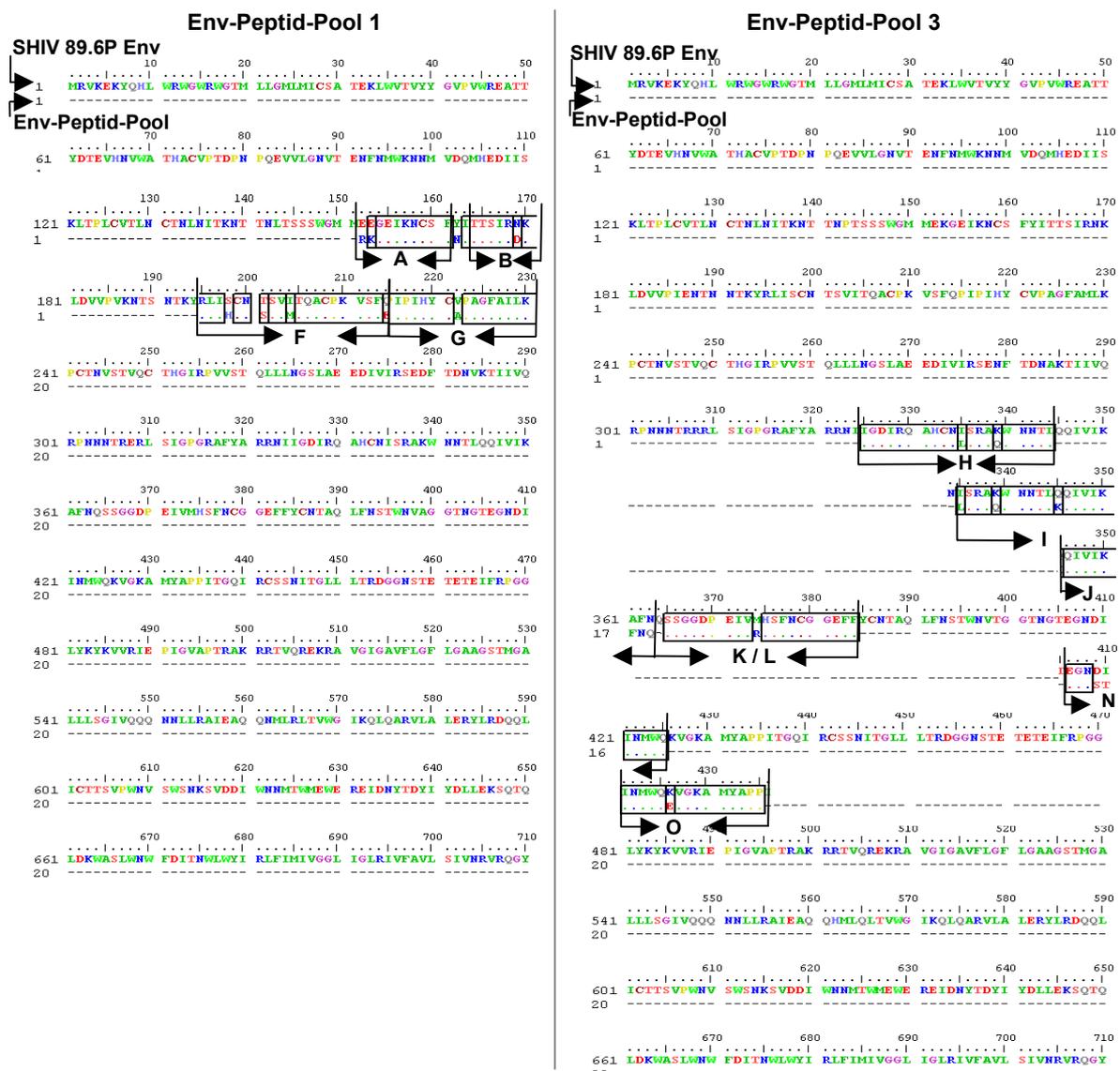


Abb. 3.40: Sequenzvergleich des zur Immunisierung eingesetzten SHIV89.6P-Env und den als Antigen-Stimuli eingesetzten Env-Peptid-Pools 1 und 3, mit denen im ELISpot eine HIV-1 Env-spezifische CTL-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

4 Diskussion

4.1 Analyse von Surrogatmarkern zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART)

Zur Erweiterung bestehender Diagnosemethoden als auch zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Therapie werden neue wirtspezifische Parameter, sogenannte Surrogatmarker benötigt, durch deren Quantifizierung eine direkte Einschätzung des Erfolgs oder Versagens der Therapie möglich ist. Da die individuellen Unterschiede im Therapie-Erfolg ausschließlich in der klinischen Krankheitsprogression sichtbar sind (Kaufmann *et al.*, 1998), werden neben den bereits in der Klinik etablierten Verlaufsmarkern, wie der Viruslast und der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen neue, die Immunkonstitution des Patienten reflektierende Parameter für ein intensives Therapie-begleitendes „Monitoring“ benötigt. Darüber hinaus kann die Plasmavirämie als diagnostischer Marker die Krankheitsprogression nur unzureichend reflektieren, da diese bei den Patienten infolge der hochwirksamen antiretroviralen Kombinationstherapie über einen langen Zeitraum unterhalb des Detektionslimits von 50 Kopien/ml Plasma verbleiben kann.

4.1.1 Vergleich des Aktivierungsstatus CD8⁺ T-Zellen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Der Einfluss der antiretroviralen Kombinationstherapie auf den Aktivierungsstatus von T-Zellen zeigt sich in einer erhöhten Anzahl aktivierter CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut von HIV-Infizierten in den ersten Wochen nach Initiation von HAART, die anschließend zu den Anfangswerten vor Beginn der antiretroviralen Kombinationstherapie abfällt (Roederer, 1998). Eine neuere Studie konnte den Zusammenhang bestätigen und nachweisen, dass der Anteil aktivierter CD8⁺CD38⁺ Lymphozyten parallel mit der Viruslast 28 Wochen nach Initiation der antiretroviralen Kombinationstherapie auf einen „Normalwert“ abfällt, sodass die Anzahl CD8⁺CD38⁺ T-Zellen als Marker der verbleibenden Viruslast unter HAART angesehen werden kann (Tilling *et al.*, 2002). Um den Aktivierungsstatus CD8⁺ T-Zellen als potentiellen Surrogatmarker der antiretroviralen Therapie zu untersuchen, wurde der Anteil aktivierter CD8⁺ T-Zellen zwischen den Patientenkollektiven der HAART-Responder (Viruslast ≤ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) und -Non-Responder (Viruslast ≥ 50 RNA-Kopien/ml Plasma) verglichen.

Da die CD8⁺ T-Zellen sowohl direkt nach Isolation als auch nach 72h *in vitro* Stimulation mit PHA/IL-2 auf ihren Aktivierungsstatus mittels FACS untersucht werden sollten, wurde der frühe T-Zellaktivierungsmarker CD69 für die Analyse verwendet. Der Vergleich der beiden Patientenkollektive konnte zeigen, dass die durch eine erhöhte Viruslast unter HAART als Therapie-Versager repräsentierten HAART-Non-Responder eine signifikant erhöhte Anzahl CD8⁺CD69⁺ Zellen gegenüber HAART-Respondern aufwiesen ($p = 0,0049$). Nach *in vitro* Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit PHA/IL-2 war dieser Effekt lediglich in einem leicht erhöhten Anteil CD8⁺CD69⁺ T-Zellen bei HAART-Non-Respondern gegenüber HAART-Respondern sichtbar. Die signifikante Erhöhung des Anteils der basal, d.h. ohne vorangegangene *in vitro* Stimulation, aktivierten CD8⁺CD69⁺ T-Zellen bei HAART-Non-Respondern ist möglicherweise auf die in diesem Patientenkollektiv nachweisbare erhöhte Viruslast zurückzuführen. Dieser Zusammenhang würde die Rolle des Aktivierungsstatus CD8⁺ T-Zellen als Marker der verbleibenden Viruslast unter HAART (Tilling *et al.*, 2002) zeigen.

4.1.2 Vergleich der β -Chemokin- und IL-16-Serumkonzentrationen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Die β -Chemokine, die als natürliche Liganden des CCR5-Rezeptors die Infektion M-troper HI-Viren durch Blockierung bzw. Herunterregulation des CCR5-Rezeptors supprimieren (Cocchi *et al.*, 1995) und das Lymphokin IL-16, das durch eine Regulation der HIV-LTR-Promotor-Aktivität seine HIV-supprimierende Eigenschaft vermittelt (Baier *et al.*, 1995, Cruikshank *et al.*, 1994, Cruikshank *et al.*, 1987) sind bereits in zahlreichen Studien mit viralen und klinischen Parametern assoziiert worden. In den meisten der bislang publizierten Studien wurden die Serumkonzentrationen der β -Chemokine und IL-16 mit dem klinischen Status der Patienten korreliert (Polo *et al.*, 1999, Amiel *et al.*, 1998). Da die Cytokin-Sekretion als Teil eines immunregulatorischen Prozesses in Antwort auf einen bestimmten Antigen-Stimulus, in diesem Fall durch virale HIV-Antigene erfolgt, ist ein Zusammenhang zwischen dem Cytokin-Profil und der Viruslast, die als direkter Marker den Erfolg bzw. Misserfolg von HAART anzeigt, denkbar.

Nachdem die Assoziation einer verminderten CD8⁺ T-Zell-Aktivierung infolge der reduzierten Viruslast unter HAART gezeigt werden konnte, wurde nachfolgend der Zusammenhang zwischen den von CD8⁺ T-Zellen sezernierten HIV-supprimierenden β -Chemokinen und IL-16 und der Viruslast untersucht. Aufgrund des fehlenden bzw. schwachen Antigen-Stimulus bei HAART-Respondern wurde eine Supprimierung der Cytokin-Sezernierung vermutet. Die

Sensitivität dieses Cytokin-Profiles in Antwort auf eine veränderte, d.h. erhöhte Viruslast infolge eines Therapie-Versagens unter HAART, wurde zunächst durch den Vergleich der Serumkonzentrationen der β -Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie des Lymphokins IL-16 von HAART-Respondern und -Non-Respondern untersucht. Dabei konnte für das β -Chemokin MIP-1 β eine signifikant erhöhte Serumkonzentration bei HAART-Non-Respondern im Vergleich zu -Respondern nachgewiesen werden ($p = 0,0175$). Die Serumkonzentrationen von RANTES und IL-16 dagegen waren in beiden Patientenkollektiven vergleichbar und liegen in den Konzentrationsbereichen von gesunden Kontrollpersonen bzw. für MIP-1 α unterhalb des Detektionslimits. Bei der Gegenüberstellung der im ELISA quantifizierten MIP-1 β -Serumkonzentrationen und dem Anteil aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen, konnte der Zusammenhang zwischen einer erhöhten MIP-1 β -Serumkonzentration und einem erhöhten Anteil aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen gezeigt werden. Der Nachweis, dass lediglich für MIP-1 β , nicht aber für die β -Chemokine MIP-1 α und RANTES eine Assoziation zu der Viruslast während der antiretroviralen Therapie nachweisbar ist, war bereits von Hittinger et al (1998) und Weiss *et al.* (1997) gezeigt worden. Eine mögliche Erklärung könnte hierbei der Nachweis sein, dass MIP-1 α - bzw. RANTES außer an CCR5 noch an weitere Rezeptoren binden (u.a. CKR-1 bzw. CCR1), während MIP-1 β ausschließlich an den CCR5-Rezeptor bindet und somit einen stärkeren HIV-supprimierenden Effekt durch die Blockierung des CCR5-Rezeptors bzw. dessen Herunterregulation bewirkt (Garzino-Demo *et al.*, 1999, Murphy, 1994). Der Nachweis einer Viruslast-unabhängigen IL-16-Serumkonzentration war bereits für symptomatische HIV-Patienten gezeigt worden, bei denen trotz einer nicht detektierbaren Viruslast eine durchschnittlich zweifach höhere IL-16-Serumkonzentration als bei Patienten mit detektierbarer Viruslast nachweisbar war (Bader *et al.*, 2001). Hier wurde ein Zusammenhang der IL-16-Serumkonzentrationen mit dem CDC-Status der Patienten angenommen. Die Ergebnisse der Serumanalysen, die keine signifikante Korrelation zwischen der Virusbelastung und den Cytokinen MIP-1 α , RANTES und IL-16 im Serum von HAART-Patienten nachweisen konnten, deuten darauf hin, dass die peripher in der Blutbahn zirkulierenden Cytokine nicht alleine für die Inhibition der HIV-Replikation verantwortlich sind. Es ist denkbar, dass intrazellulär sezernierte Cytokine die Plasmavirusbelastung regulieren. Diese Rolle wurde bereits von Zhou *et al.* (1999 und 1997) für IL-16 angenommen, in dem IL-16 intrazellulär die HIV-Transkription supprimiert.

4.1.3 Vergleich der β -Chemokin- und IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen von HAART-Respondern und -Non-Respondern

Da $CD8^+$ T-Lymphozyten sowohl durch zytolytische Aktivität als auch durch die Sekretion der HIV-supprimierenden β -Chemokine und IL-16 in der Kontrolle der HIV-Infektion beteiligt sind, wurde weiterführend die induzierbare Expression dieser Cytokine in $CD8^+$ T-Zellen durch *in vitro*-Stimulation mit PHA/IL-2 untersucht und innerhalb der Patientenkollektive der HAART-Responder und -Non-Responder verglichen. Dabei konnte bei HAART-Non-Respondern eine signifikante Erhöhung der IL-16-Konzentration ($p=0,0077$) als auch eine erhöhte MIP-1 α -Konzentration im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Für die β -Chemokine MIP-1 β und RANTES wurden in beiden Patientenkollektiven vergleichbare Konzentrationen gemessen, die lediglich gegenüber den gemessenen Konzentrationen der seronegativen Kontrollen leicht erhöht waren. Wie schon bei den Serumkonzentrationen gezeigt, war auch hier für MIP-1 α und wesentlich schwächer auch für die im ELISA quantifizierten IL-16-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter $CD8^+$ T-Zellen mit ansteigenden Cytokinkonzentrationen ein erhöhter Anteil aktivierter $CD8^+CD69^+$ T-Zellen nachweisbar. Die Beobachtung müsste jedoch in einer größeren Studienkohorte statistisch geprüft werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung deuten darauf hin, dass die erhöhte Viruslast infolge eines Therapieversagens möglicherweise zu einer im Vergleich zu HAART-Respondern erhöhten Immunaktivierung und damit zu einer erhöhten induzierbaren Expression des Lymphokins IL-16 und des β -Chemokins MIP-1 α in $CD8^+$ T-Zellen geführt hat. Für MIP-1 α war durch den Nachweis einer „Normalisierung“ der MIP-1 α -Konzentration in PBMC von HAART-Patienten, die mit denen von sogenannten „slow progressors“ und gesunden Kontrollpersonen vergleichbar waren, bereits die Rolle dieses Chemokins im klinischen Monitoring der HIV-Therapie postuliert worden (Carter *et al.*, 2000). Für IL-16 ist bislang nur ein Zusammenhang mit der Erkrankungsprogression nachgewiesen worden. Dieser zeigte sich in einer erhöhten IL-16-Serumkonzentrationen bei asymptomatischen Patienten, während im klinischen AIDS-Stadium ein Abfall der IL-16-Konzentration im Serum zu beobachten ist (Amiel *et al.*, 1998, Darissac *et al.*, 1997). Desweiteren konnte von T-Zell-Klonen, die aus sogenannten „Long-Term-Non-Progressors“ isoliert worden waren, eine erhöhte Sekretion von IL-16 gezeigt werden (Scala *et al.*, 1997). Um zu prüfen, inwiefern der beobachtete Effekt der signifikanten Erhöhung der IL-16-Konzentration im Zellkulturüberstand $CD8^+$ T-Zellen von HAART-Non-Respondern direkt auf die erhöhte Viruslast zurückzuführen ist oder aber den individuellen Immun-Status der Patienten reflektiert, könnte anstelle des unspezifischen PHA-Stimulus ein HIV-Antigen-Stimulus zur Induktion der *in vitro*

IL-16-Expression eingesetzt werden, wie es bereits schon Garzino-Demo *et al.* in ihrer Studie 1999 gezeigt haben.

Eine mögliche Ursache, dass MIP-1 β lediglich im Serum, nicht aber im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen bei HAART-Non-Respondern erhöht ist, könnte auf einen inversen Effekt zwischen der intrazellulären und der sezernierten Form von MIP-1 β zurückzuführen sein. Eine inverse Assoziation zwischen der intrazellulären Konzentration und der „extrazellulären“ Serumkonzentration von MIP-1 β war bereits im Zusammenhang mit der CD4⁺ T-Zell-Anzahl bei HIV-Infizierten gezeigt worden (Tartakovsky *et al.*, 1999). Hierbei wurde eine hohe intrazelluläre MIP-1 β -Konzentration mit einem geschwächten Immun-Status (z.B. niedrige CD4⁺ T-Zellzahl) und einer hohen Viruslast assoziiert. Diese Beobachtung würde zwar den Ergebnissen unserer Studie widersprechen, allerdings handelte es sich bei der untersuchten Studienkohorte um untherapierte HIV-positive Patienten, sodass möglicherweise der Einsatz antiretroviraler Therapeutika das Cytokin-Expressionsmuster zusätzlich beeinflusst (Pierdominici *et al.*, 2002, Aukrust *et al.*, 1998, Bisset *et al.*, 1997).

4.1.4 Ausblick

Die Beobachtung, dass eine Erhöhung der Viruslast infolge eines Therapieversagens keinen signifikanten Effekt auf die MIP-1 α und RANTES-Expression im Serum bzw. im Zellkulturüberstand von *in vitro* stimulierten CD8⁺ T-Zellen gezeigt hat, deutet darauf hin, dass diese β -Chemokine nicht allein für die Inhibition der HIV-1-Replikation verantwortlich sind. So ist die Regulation der HIV-Replikation als ein komplexes Netzwerk endogener Cytokine anzusehen, in dem die Cytokine sowohl synergistisch wie auch antagonistisch wirken können (Kinter *et al.*, 1996, Poli *et al.*, 1995, Weissman *et al.*, 1994, Poli *et al.*, 1994, Poli *et al.*, 1991). So konnte neben den β -Chemokinen auch für INF α , IL1 β , IL6 und IL-10 eine HIV-supprimierende Wirkung gezeigt werden (Kinter *et al.*, 1996, Ho *et al.*, 1995, Weisman *et al.*, 1994). Desweiteren sind neben CD8⁺ T-Zellen auch CD4⁺ T-Zellen und Makrophagen in der Lage β -Chemokine zu sezernieren (Nelson *et al.*, 1993). Dies könnte ein Grund der oft sehr kontrovers geführten Diskussionen über die Rolle der β -Chemokine sein. Darüber hinaus hat die mangelnde Standardisierung der Testsysteme innerhalb der verschiedenen klinischen Studien zum Teil zu sehr widersprüchlichen Ergebnissen und zu großen Varianzen der Messwerte geführt. Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse wird neben der jeweils verwandten Methodologie auch durch die unterschiedlichen Studienkohorten und ihren verschiedenen Therapiemaßnahmen erschwert. Dennoch erscheint die im Rahmen dieser klinischen Studie gezeigte Beobachtung einer signifikanten Erhöhung der

induzierbaren Expression von IL-16 in CD8⁺ T-Zellen und die signifikant erhöhte Serumkonzentration von MIP-1β bei HAART-Versagern ein vielversprechender Ansatz in der Verbesserung der Diagnosemethoden innerhalb der antiretroviralen Therapie zu sein, um eine rechtzeitige therapeutische Intervention vor einem signifikanten Anstieg der Viruslast zu gewährleisten. Um das Potential von MIP-1β und IL-16 hinsichtlich einer Eignung als Surrogatmarker für die Effizienz der antiretroviralen Kombinationstherapie weiterhin zu prüfen, ist die Analyse der Cytokin-Konzentrationen im Verlauf der Therapie notwendig. Dies konnte bereits an einem Patienten exemplarisch gezeigt werden, der als einziger Patient der Studienkohorte eine veränderte Viruslast während des Untersuchungszeitraumes aufwies. Zwar ist die Senkung der Viruslast von 500 Kopien/ml Plasma auf 20 Kopien/ml Plasma nicht prägnant, dennoch könnte die zeitgleiche Senkung der IL-16-Konzentration und die etwas geringere Reduktion der MIP-1α- und MIP-1β-Konzentrationen im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen die Sensitivität dieser körpereigenen HIV-supprimierenden Faktoren auf die Viruslast zeigen. Diese Beobachtung macht die Notwendigkeit einer longitudinalen Analyse der IL-16-Konzentration von *in vitro* stimulierten CD8⁺ T-Zellen, aber auch von MIP-1β-Serumkonzentrationen deutlich. Um den therapeutischen Wert dieser Cytokine und ihre Fähigkeit die Effizienz der antiretroviralen Therapie zu reflektieren statistisch zu festigen, müsste weiterführend die Untersuchung des longitudinalen MIP-1 β- und IL-16-Profiles im Serum bzw. im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen innerhalb einer größeren Studienkohorte erfolgen.

4.2 Entwicklung einer HIV-1-Immunisierungsstrategie mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren

Neben der intensiven Entwicklung und Verbesserung antiretroviral wirkender Therapeutika konzentrierten sich die Bemühungen in den letzten Jahren vermehrt auf die Entwicklung von Impfstoffstrategien gegen das humane Immundefizienzvirus. Mit dem wachsenden Verständnis der HIV/AIDS-Pathogenese und HIV-induzierten Immunreaktionen wurde auch das Wissen um essentielle Eigenschaften eines Langzeitschutz-vermittelnden Impfstoffes wesentlich erweitert. Insbesondere *in vivo* Immunisierungsstudien in Primaten-Modellen mit nachfolgenden Infektionsversuchen konnten maßgeblich zum Verständnis der Immunogenität verschiedener Impfstoffstrategien beitragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue Immunisierungsstrategie mit einem MLV-abgeleiteten Transfervektor evaluiert, in dem zunächst ein effizienter Gentransfer der viralen HIV-Antigene Tat, Rev und Env in CD4⁺ T-Zellen gezeigt und nachfolgend durch Transplantation dieser Transfergen-exprimierenden Zellen die Induktion einer humoralen wie auch zellulären Immunantwort im Rhesusaffen-Tiermodell untersucht werden sollte.

4.2.1 Effizienter Gentransfer der viralen Transfergene *tat*, *rev* und *env* mittels eines MLV-abgeleiteten Transfervektors

Mit dem Wissen über die Pathogenese und HIV-induzierten Immunreaktionen wird angenommen, dass eine durch einen potentiellen Impfstoff induzierte effiziente und protektive Immunantwort vor allem gegen Struktur-, sowie regulatorische Proteine wie Tat und Rev gerichtet sein muss (McGregor, *et al.*, 2000, Boyer, *et al.*, 2000). Um diese Voraussetzung zu erfüllen, wurde ein bicistronischer Transfervektor pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ entwickelt, der die aus dem chimären SHIV89.6P stammenden HIV-Gene *tat*, *rev* und das virale Hüllprotein-Gen *env* sowie den Oberflächenmarker $\Delta lngfr$ kodiert. Durch die Verwendung der aus dem chimären SHIV stammenden Gene *tat*, *rev* und *env* stand somit ein System zur Verfügung, mit dem, aufgrund der Homologien zu HIV-1, das immunogene Potential von HIV-1-Antigenen untersucht werden kann. Darüber hinaus kann durch Infektionsversuche mit SHIV89.6P im Tiermodell das Potential von Immunisierungsstrategien in Hinsicht auf einen Schutz vor einer Infektion oder einer langsameren Krankheitsprogression nachgewiesen werden (Nathanson *et al.*, 1999).

Durch die Verwendung des MLV-abgeleiteten Transfervektors pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr und der Bereitstellung der MLV-Strukturgene *gag* und *pol* in trans, konnte erfolgreich die Pseudotypisierung des SHIV-Hüllproteins mit dem MLV-Kapsid sowohl immunhistochemisch als auch durchflußzytometrisch nachgewiesen werden. So konnte neben dem Nachweis der funktionellen Expression des viralen HIV-Hüllproteins Env auf der Oberfläche transfizierter Zellen auch die Verpackbarkeit des Transfervektors in [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel gezeigt werden. Zur Herstellung größerer Vektormengen für die Transduktion primärer T-Zellen und deren spätere Transplantation in den Rhesusaffen wurde eine stabile Verpackungszelllinie für den Transfektor pMg Δ env/tat/rev/ Δ lngfr etabliert. Durchflußzytometrische Analysen konnten zeigen, dass nach zweimaliger MAC-Separierung beide Transferegene, d.h. sowohl die viralen Antigene Tat, Rev und Env als auch der Oberflächenmarker Δ LNGFR im gleichen Maße effizient, d.h. zu 91 bzw. 99% exprimiert werden. Neben der Etablierung der stabilen Verpackungszelllinie zur Steigerung der Vektorpartikelproduktion wurde auch die Gentransfer-Effizienz in primäre CD4⁺ T-Zellen durch Optimierung des Transduktionsprotokolls gesteigert. Dies konnte durch die Aufkonzentrierung der stabil durch die Verpackungszelllinie generierten Vektorpartikelüberstände mittels Ultrazentrifugation durch eine 175fache Volumenreduktion erreicht werden. Die erfolgreiche Konzentrierung viraler Vektoren ohne Verlust der Infektiosität durch physikalische Schädigung der Partikel (Yee *et al.*, 1994) war bereits von Pham *et al.* (2001) beschrieben worden. Desweiteren konnte durch die Zugabe von Natriumbutyrat, einem Transkriptionsaktivator (Boosalis *et al.*, 1997), der zu einer Stabilisierung der Vollängen-Vektor-RNA beiträgt (Olsen und Sechelski, 1995), 24 Stunden vor Vektorernte, eine Erhöhung der Vektortiter erreicht werden. Ferner war in Vorversuchen gezeigt worden, dass auch das zur Generierung von Vektorpartikeln eingesetzte Zellkulturmedium Einfluss auf die Gentransfer-Effizienz nimmt. Durch die Verwendung des X-Vivo 10-Mediums, sowohl zur Kultivierung primärer Lymphozyten als auch zur Generierung der [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren, konnte die höchste Gentransfer-Effizienz erreicht werden. Um das Risiko einer Immunreaktion *in vivo* gegen das zur Kultivierung von Zellen eingesetzte fötale Kälberserum (FCS) zu minimieren, wurde bei den Verpackungszellen ein Tag vor der Vektorernte ein Mediumwechsel ohne die Zugabe von FCS durchgeführt. Darüber hinaus erfolgte die Kultivierung der primären Lymphozyten mit autologem Plasma. Da jedoch nur begrenzte Plasma-Mengen für die Versuchsansätze zur Verfügung standen, erfolgte die Kultivierung und Transduktion der Zellen mit 10% FCS und 10% autologem Plasma. Bei dem Einsatz von autologem Plasma wird darüber hinaus auch ein positiver Einfluss auf die Vektorpartikel-Interaktion und Vektorstabilität vermutet (Asch *et al.*, 1998, I. Schmitt, Dissertation 2002).

Da MLV-abgeleitete Vektoren ausschließlich proliferierende Zellen transduzieren, stellte die optimale Proliferation der T-Lymphozyten zum Zeitpunkt der Transduktion eine wesentliche Voraussetzung für einen effizienten Gentransfer dar. Die Proliferation von T-Lymphozyten kann durch PHA, α CD3 (OKT-1), α CD28 (kostimulatorisches Molekül), sowie Ionomycin stimuliert werden (Quinn *et al.*, 1998, Blaese *et al.*, 1995, Bunnell *et al.*, 1995). Für primäre Rhesus-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass im Unterschied zu humanen PBMC die Suszeptibilität für einen Gentransfer mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren durch Aktivierung der Zellen für 72 h mit PHA/IL-2 im Vergleich zur Aktivierung mit α CD3/ α CD28-Kostimulation erhöht ist. Durch die Verwendung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten zur Transduktion primärer Lymphozyten konnte die bereits für hämatopoetische Stammzellen beschriebene Erhöhung der Gentransfereffizienz durch Kolo-kalisierung der Vektorpartikel und Zellen erreicht werden (Pollok *et al.*, 1998, Hanenberg *et al.* 1996, Moritz *et al.*, 1994). Durch die Optimierung des beschriebenen Transduktionsprotokolls konnte ein Transduktionstiter von bis zu 2×10^7 i.E./ml in primäre CD4⁺ T-Zellen mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren erzielt werden. Ein spezifischer und effizienter Gentransfer in CD4⁺ T-Zellen durch [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren war bereits von Schnierle *et al.* (1997) gezeigt worden. Durch Optimierung des Transduktionsprotokolls konnte mittels [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren ein Vektortiter von 2×10^7 i.E./ml auf humanen CD4⁺-Lymphozyten erreicht werden, die in Abhängigkeit des Spenders bis zu 80% der CD4⁺-Zielzellen transduzieren konnten (Isabel Schmitt, Dissertation 2002). Die erreichte Gentransfereffizienz mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren ist somit direkt mit den CXCR4-tropen [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren vergleichbar. Durch Mehrfachtransduktionen könnte zwar die Gentransfereffizienz und damit die Zahl Transfergen-positiver Zellen erhöht werden, jedoch würde infolge der dafür notwendigen längeren *ex vivo* Kultivierung und genetischen Modifizierung das Risiko von Kontaminationen und unerwünschten Immunreaktionen *in vivo* ansteigen (Bunnell *et al.*, 1997). Eine andere Möglichkeit zur Produktion großer Mengen hochtitriger Vektorstocks, insbesondere bei Immunisierungsstudien an mehreren Rhesusaffen, stellt der Einsatz spezieller Bioreaktoren dar, die die Generierung von Vektorpartikeln in einem „Large scale“-Maßstab ermöglichen. Hierbei wird die Verpackungszelllinie auf geeigneten Trägermaterialien immobilisiert und durch ein künstliches Kapillarsystem (Artificial Capillary System, ACS) die Generierung hochkonzentrierter Vektorüberstände ermöglicht (Pizzato *et al.*, 2001, Pan und Whitley, 1999).

4.2.2 *In vitro* Kinetik der mit [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren transduzierten Rhesus-PBMC

Die Immunisierung des Rhesusaffen sollte durch einen *ex vivo* Gentransfer erfolgen, um durch die Transplantation autologer Zellen einer *in vivo* Neutralisierung der Fremdartigene durch das Komplementsystem entgegen zu wirken und somit eine möglichst lang anhaltende Expression der viralen Antigene *in vivo* zu gewährleisten. Vor Beginn der Immunisierungsstudie wurde die *in vitro* Kinetik der transduzierten Rhesus-PBMC untersucht. Mittels durchflußzytometrischer Analysen und einer sensitiven PCR-Methode konnte nachgewiesen werden, dass die Transfergen-exprimierenden Zellen bis zu 6 Tage nach Transduktion *in vitro* detektierbar sind, während am Tag 8 nach erfolgtem Gentransfer kein Signal nachweisbar ist.

Marx *et al.* (1999) konnten zeigen, dass das in einem MSCV-basierenden bicistronischen Vektor kodierte Transfergen GFP über einen Zeitraum von bis zu 6 Monaten nach Transduktion in humanen Knochenmarkszellen detektierbar ist. Eine Erklärung für den relativ kurzen Detektionszeitraum der Transfergen-exprimierenden Zellen ist möglicherweise die Expression des viralen Hüllproteins Env auf der Oberfläche transduzierter Zellen, das durch die Verschmelzung mit membranständigen CD4-Molekülen der Nachbarzellen eine Synzytieninduktion hervorruft. Diese war während des gesamten Beobachtungszeitraumes, und verstärkt ab Tag 3 nach Transduktion *in vitro* lichtmikroskopisch nachweisbar. Die durch die Synzytieninduktion hervorgerufene Lyse der Zellen und der nachfolgende Zelltod sind aus diesem Grund als eine mögliche Ursache für den kurzen Detektionszeitraum der transduzierten Zellen anzusehen. Auf der anderen Seite könnte auch das mit der PCR erreichte Detektionslimit von 1 positiven Zelle in einer Gesamtpopulation von 400 Zellen nicht ausreichend für den Nachweis Transfergen-exprimierender Zellen *in vitro* sein.

4.2.3 Ausschluss von replikationskompetenten Retroviren (RCRs)

Vor Beginn der *in vivo* Immunisierungsstudie sollte zunächst das Risiko der Entstehung von replikationskompetenten Retroviren (RCRs) in der Verpackungszelllinie und mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten Zellen ausgeschlossen werden. Zwar sind retrovirale Pseudotypvektoren durch die Bereitstellung der Strukturproteine auf unterschiedlichen Genkonstrukten und der nur geringen Sequenzhomologien als relativ sicher anzusehen, dennoch ist die Entstehung replikationskompetenter Retroviren infolge von Rekombinationsereignissen nicht völlig auszuschließen. Zwar sind bisher keine natürlich

aufgetretenen Rekombinationen zwischen C-Typ Viren, wie MLV, und Lentiviren nachgewiesen worden, dennoch besteht das Risiko einer Rekombination zwischen den kodierenden Regionen der verschiedenen Virustypen und damit der Entstehung eines replikationsfähigen Hybridvirus.

Die Entstehung von RCRs wurde mit zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen ausgeschlossen. Zunächst wurde mittels PCR genomische DNA, die aus der Verpackungszelllinie und aus transduzierten Zellen isoliert worden war, auf das Vorhandensein von Rekombinationsereignissen geprüft. Durch Verwendung eines im MLV *gag/pol*-Bereich bindenden Sense- und Antisense-Primers sowie eines weiteren im SHIV-*env*-Bereich amplifizierenden Antisense-Primers konnte anhand des erhaltenen Amplifikates das Vorhandensein eines rekombinierten Hybridvirus ausgeschlossen werden. Da mittels PCR und den gewählten Primerkombinationen nicht alle möglichen Rekombinationen zwischen den viralen Genen erfasst werden können, ist die Überprüfung der Vektorpartikel auf einer Indikatorzelllinie in einem sogenannten Rescuetest sinnvoll (Chen *et al.*, 2001). Es wurde daher als weiterer Nachweis zum Ausschluss replikationskompetenter Retroviren eine RT-PCR durchgeführt. Hierbei wurden [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren auf Ghost-Zellen transduziert und nach 5 Tagen der Zellkulturüberstand auf eine zweite Generation von Ghost-Zellen übertragen. In keiner der beiden Zielzellgenerationen, war mit Ausnahme einer kurzzeitigen minimalen Rest-RT-Aktivität der im Medium verbliebenen [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel zum Zeitpunkt 0 der ersten Transduktion, eine RT-Aktivität detektierbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass keine Rekombinationsereignisse stattgefunden haben und das Risiko der Entstehung von RCRs bei der Anwendung von [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren *in vivo* auszuschließen ist.

4.2.4 Immunisierungsstudie im Rhesusaffen-Tiermodell

Nachdem *in vitro* der effiziente Gentransfer mittels des MLV-abgeleiteten Vektors pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta ngfr$ in primäre CD4⁺ T-Zellen gezeigt werden konnte, sollte das Potential der *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC zur Induktion einer humoralen wie auch zellulären Immunantwort im Rhesusaffen-Tiermodell untersucht werden. Um das Risiko einer sofortigen Elimination der [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren durch das Komplementsystem zu minimieren, wurden zur Immunisierung autologe, *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierte PBMC eingesetzt. Da bislang keine Studien über diese Form der Immunisierungsstrategie in der Literatur beschrieben worden waren, ist das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Immunisierungsexperiment als ein „proof of

principle“ anzusehen. Die einen Zeitraum von zwei Monaten umfassende *in vivo* Studie, sollte dabei im wesentlichen zwei Fragestellungen behandeln. Zum einen sollte der Detektionszeitraum der reinfundierten, Transfergen-exprimierenden Zellen *in vivo* mittels PCR gezeigt werden, als auch das immunogene Potential dieser Zellen evaluiert werden. Die Immunisierung des Rhesusaffen erfolgte durch drei aufeinander folgende Transplantationen der Antigen-exprimierenden Zellen, die in einem zeitlichen Abstand von 18 bzw. 12 Tagen stattfanden. Durch die mehrmalige Applikation der *ex vivo* transduzierten Zellen sollte in Anlehnung an ein „prime and boost“ Verfahren die immunogene Wirkung der SHIV-Proteine Env, Tat und Rev verstärkt werden. Da *in vitro* bereits gezeigt werden konnte, dass ab dem dritten Tag nach erfolgter Transduktion mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln eine verstärkte Synzytieninduktion zu beobachten ist, erfolgte die dritte Transplantation der mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten Zellen vier Tage nach der Transduktion, um die immunogene Wirkung der viralen Antigen-exprimierenden CD4⁺ T-Zellen zu verstärken. Um vor der Transplantation der autologen *ex vivo* transduzierten Zellen einen erfolgreichen Gentransfer sicherzustellen, wurden vor jedem Applikationsexperiment die Proliferation, Aktivierung und Viabilität der Zellen untersucht als auch die Transduktionseffizienz analysiert. Es zeigte sich, dass infolge der häufigen Blutentnahmen, die für Vorversuche und auch für die Isolierung der zur ersten Immunisierung eingesetzten Zellen notwendig waren, der Rhesusaffe eine Leukopenie entwickelte. Diese pathologische Veränderung des Blutbildes hatte einen Einfluss auf die Isolierbarkeit der PBMC aus Vollblut, sowie auf das Proliferations- und Aktivierungsverhalten der Lymphozyten *in vitro*. Durch die Gabe eines Eisen-Präparates zur Stabilisierung und Bindung freier Erythrozyten war ein positiver Effekt auf die Anzahl der isolierbaren Zellen und das Proliferationsverhalten der PBMC sichtbar. Dennoch wäre bei weiteren Immunisierungsstudien eine Verlängerung des Zeitraumes zwischen den einzelnen Transplantationen von Vorteil, um das Risiko einer pathologischen Veränderung des Blutbildes infolge der umfangreichen Blutentnahmen zu minimieren.

4.2.5 Nachweis der transplantierten Transfergen-positiven Zellen *in vivo*

Die zur Immunisierung eingesetzten Transfergen-exprimierenden Zellen ($0,7 \times 10^7$ bis $3,4 \times 10^7$) sollten nach der Transplantation in den Rhesusaffen *in vivo* in der zu den Zeitpunkten 1h, 24 h und 7 Tage nach Transplantation isolierten genomischen DNA detektiert werden. Die zur ersten Transplantation reinfundierten genetisch modifizierten Zellen konnten zu keinem Zeitpunkt in der nach Transplantation aus Vollblut isolierten genomischen DNA detektiert werden. Dies ist insofern überraschend, da die zur zweiten und dritten Immunisierung transplantierten Transfergen-positiven Zellzahlen deutlich niedriger lagen und

mittels PCR *in vivo* detektiert werden konnten. Da das Detektionsproblem zum Nachweis der zur ersten Transplantation eingesetzten Zellen somit nicht im Zusammenhang mit der PCR-Nachweissensitivität steht, ist als mögliche Ursache die Applikationstechnik bzw. das recht große Inokulationsvolumen denkbar. Bei der zweiten Transplantation waren die Transfergen-exprimierenden Zellen bis 24 Stunden nach Applikation und bei der dritten Transplantation bis 7 Tage nach Applikation detektierbar. In einer ähnlichen Untersuchung waren *ex vivo* transduzierte und nachfolgend in Rhesusaffen transplantierte CD4⁺ T-Zellen bis zu 21 Tage nach Reinfusion detektierbar, wenn gleich die Zellzahl von 0,8 - 6,2 x 10⁸ transplantierte Zellen wesentlich höher war (Bunnell *et al.*, 1997). Eine mögliche Erklärung für den kurzen Detektionszeitraum der transplantierten Zellen *in vivo* könnte die durch Expression des viralen Hüllproteins auf der Oberfläche transduzierter Zellen induzierte Synzytieninduktion darstellen. Der Detektionszeitraum der Transfergen-exprimierenden Zellen von 7 Tagen entspricht den erhaltenen *in vitro* Daten, im Rahmen derer Transfergen-exprimierende Zellen ebenfalls bis zu 6 Tage nach Transduktion detektierbar waren. Möglicherweise ist jedoch auch die Nachweissensitivität der etablierten PCR nicht ausreichend für die *in vivo* Detektion.

4.2.6 Induktion einer HIV-1 spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort nach Transplantation der Transfergen-exprimierenden autologen PBMC

Die Induktion der humoralen Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern als auch die Induktion der zellulären Immunreaktion, und hier insbesondere die CTL-Antwort werden heute als essentielle Eigenschaften eines protektiven Impfstoffes angesehen (Mooij und Heeney, 2001). Eine Reihe der konventionellen Immunisierungsstrategien, darunter rekombinante Proteine (u.a. rgp160) und inaktiviertes Virus, konnten durch die Bereitstellung exogener Antigene primär den MHC-II-Antigen-Präsentationsweg und damit eine humorale Immunantwort induzieren. Eine virus-spezifische CD8⁺ T-Zell-Stimulation, die eine intrazelluläre Prozessierung der Antigene voraussetzt, konnte dagegen nur unzureichend vermittelt werden (Brander und Walker, 1999, Irwin *et al.*, 1994). Die Impfstoffentwicklung konzentrierte sich in den letzten Jahren daher vermehrt auf eine Immunisierungsstrategie, die in der Lage ist, sowohl durch exogene Antigene über MHC-II als auch über eine intrazelluläre Prozessierung von HIV-Proteinen die MHC-I Antigen-Präsentation zu vermitteln und somit eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren. Eine Induktion des humoralen wie auch des zellulären Zweiges des Immunsystems konnte bislang vor allem durch die Kombination aus zwei Impfstoffstrategien im „prime boost“-Verfahren erreicht werden, u.a. durch Vaccinia Virus-gp160 und einem anschließenden „boost“ mit

rekombinantem gp120-SU (Brander and Walker, 1999). Von den bislang zur Immunisierung gegen HIV eingesetzten retroviralen Vektoren konnte durch die Einführung von HIV-Genen in das Genom der Wirtszelle die intrazelluläre Prozessierung der HIV-Antigene und somit eine MHC-I-vermittelte CTL-Antwort gezeigt werden. Durch die stabile Integration der Transfergene in das Wirtzellgenom wird darüber hinaus eine anhaltende Expression der viralen Transfergene und somit eine kontinuierliche T-Zell-Aktivierung ermöglicht (Nabel, 2001). Ferner zeigten neuere Studien, dass retrovirale Vektoren auch in der Lage sind, eine humorale Immunantwort zu induzieren (Xin *et al.*, 2001, Mooij und Heeney, 2001).

4.2.6.1 Nachweis einer HIV-1-gp120-spezifischen humoralen Immunantwort

Der initiale Schritt, der zu einer HIV-Infektion führt, ist die Interaktion des viralen Oberflächenhüllproteins gp120 mit dem CD4-Rezeptor und dem Korezeptor der Wirtszelle. Das gp120 stellt daher das primäre Ziel für eine Neutralisierung des HIV durch Antikörper dar (McMichael and Hanke, 2002). Antikörper haben das Potential bereits vor der Infektion das Virus zu inaktivieren und führen darüber hinaus zu einer Mobilisierung des inflammatorischen Systems, einschließlich dem Komplementsystem, den Neutrophilen und Monozyten.

Für den Nachweis einer spezifischen humoralen Immunantwort nach Transplantation der viralen Antigen-exprimierenden Zellen wurden die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung entnommenen Serumproben in verschiedene serologische und proteinbiochemische Nachweisverfahren eingesetzt. Dabei konnte sowohl mittels durchflußzytometrischer Analysen als auch durch einen Transfergen-spezifischen ELISA eine spezifische Antikörperantwort gegen die Transfergen-exprimierenden autologen Zellen gezeigt werden. In dem mit Zellkulturüberständen der stabilen Verpackungszelllinie als Antigen immobilisierten ELISA konnte ein erster Transfergen-spezifischer Anstieg der Antikörperkonzentration in dem nach 3 Wochen nach Transplantation entnommenen Post-Immun-Serum detektiert werden. Ein zweiter eindeutiger Anstieg der Antikörperkonzentration war in der fünften Woche nach der ersten Inokulation bzw. eine Woche nach der dritten und letzten Applikation der Transfergen-exprimierenden Zellen zu beobachten. Nach einem kurzzeitigen Abfall stieg die Antikörperkonzentration in Woche 7, d.h. zweieinhalb Wochen nach der letzten Inokulation zu einem Maximalwert an, der in den folgenden Wochen wieder leicht absank. Da die vor Transplantation entnommenen Prä-Immun-Seren keinerlei Hintergrundsignal aufwiesen, ist von einer Transfergen-spezifischen humoralen Immunantwort auszugehen. Da die erhaltenen ELISA-Werte von denen in einem

Parallelansatz durchgeführten ELISA, der als Antigen aufkonzentrierte Überstände der Transfektor-negativen PhoenixTM-Zelllinie enthielt, subtrahiert wurden, ist bei den in Abb. 3.30 dargestellten ELISA-Werten (ΔOD_{490} -Werte = Signaldifferenz_{pos-neg}) eine unspezifische humorale Immunantwort, die u.a. gegen MLV Gag/Pol oder gegen die bei der Applikation mitgeführten Medienrückstände gerichtet sein könnte, auszuschließen. Da mit diesem ELISA-Testsystem keine Differenzierung zwischen den Transfektoren möglich war, wurde ein weiterer, HIV-1-spezifischer ELISA etabliert. In diesem mit gp120 als Antigen-immobilisierten ELISA konnte erfolgreich die Induktion einer HIV-1-gp120-spezifischen Antikörperantwort nachgewiesen werden. Das Maximum der Antikörperkonzentration wurde dabei, wie schon für den Transfektor-spezifischen ELISA gezeigt, 5 Wochen nach der ersten bzw. 2 Wochen nach der letzten Immunisierung detektiert und war in den nachfolgenden Wochen wieder abnehmend (Abb. 3.31). Da man bei der angewandten Immunisierungsstrategie nicht davon ausgehen konnte, eine vergleichbar starke humorale Immunantwort wie bei einer Virus-Infektion zu induzieren, war eine relativ schwache Antikörperkonzentration zu erwarten. Aufgrund der geringen Antikörperkonzentration war es daher nicht möglich, durch Titrationen den genauen Antikörper-Titer zu bestimmen, da bei einer höheren Verdünnung der Seren ($> 1:5$) keine spezifischen Signale detektierbar waren. Aus diesem Grund stellen die gezeigten ELISA-Daten lediglich einen qualitativen Nachweis für die Induktion einer HIV-1-gp120-spezifischen, humoralen Immunantwort nach Immunisierung dar. Möglicherweise könnte man hier durch Optimierungen des ELISA-Protokolls, u.a. durch die als Antigen-immobilisierte Protein-Konzentration bzw. durch den Einsatz eines rekombinanten SHIV89.6P-gp120 als Antigen die Sensitivität des Antikörpernachweises erhöhen.

Die Induktion einer humoralen Immunantwort in Form von neutralisierenden Antikörpern wird als essentielle Eigenschaft eines Impfstoffes angesehen, da diese in der Lage sind, die Infektion oder Internalisierung von freien Viruspartikeln zu verhindern. Für den Nachweis neutralisierender Antikörper wurden Neutralisationstests auf zwei unterschiedlichen Indikatorzellen durchgeführt. Der auf $CD4^+CXCR4^+$ Ghost-Zellen durchgeführte Neutralisationstest konnte nach Inkubation der [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel mit den Post-Immun-Seren eine Reduktion des Transduktionstiters nachweisen. Diese war mit der Transduktionsrate, die nach Inkubation der Vektorpartikel mit einem αHIV^+ -Serum (Positiv-Kontrolle) erzielt wurde, vergleichbar. Diese Beobachtung könnte auf das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern zurückzuführen sein, die durch Komplexbildung mit Vektorpartikeln zu einer Reduktion der Transduktionseffizienz geführt haben. Bei dem auf primären Rhesus-PBMC als Indikatorzellen durchgeführten Neutralisationstest war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. Hier führte die Inkubation der Post-Immun-Seren mit den

[MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln zu einer 2,5 fachen Steigerung der Gentransfer-Effizienz im Vergleich zu der nach Inkubation mit dem Prä-Immun-Serum erzielten Transduktionsrate. Diese Beobachtung könnte auf das bereits beschriebene Phänomen des „*enhancement*“ (Fust *et al.*, 1995) zurückzuführen sein. Diese infektionsverstärkende Wirkung, die von Env-spezifischen Antikörpern beschrieben wurde, lässt sich möglicherweise auf die verbesserte Bindung des Komplexes zwischen Vektorpartikeln und Antikörpern an die CD4-Rezeptoren von primären Zellen erklären.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der humoralen Immunantwort in Kap. 3.2.6.1 konnten erfolgreich nachweisen, dass nach der Transplantation der *ex vivo* mit [MLV(SHIV)]-Vektorpartikeln transduzierten PBMC eine MHC-II-restringierte Antigen-Präsentation und in Folge die Induktion einer HIV-1-gp120-spezifischen Antikörperantwort stattgefunden hat. Die Induktion von neutralisierenden Antikörpern bzw. die Induktion von Antikörpern, die einen infektionsverstärkenden Effekt vermitteln, müsste in weiteren Experimenten geprüft werden.

Eines der Hauptprobleme bei der Induktion neutralisierender Antikörper durch Impfstoffe stellt die limitierte Neutralisierungseffizienz dar, da neutralisierende Antikörper oftmals nur ungenügend mit dem HIV-Hüllprotein verschiedener HIV-Stämme und insbesondere mit dem hoch variablen V3-Loop kreuzreagieren können (McMichael and Hanke, 2002, Nabel, 2001). Aus diesem Grund ist neben der humoralen, vor allem die Induktion der zellulären Immunantwort in Form von CTLs eine wichtige Anforderung an einen präventiven Impfstoff gegen das humane Immundefizienzvirus.

4.2.6.2 Nachweis einer HIV-1-Env- und Rev-spezifischen zellulären Immunantwort

Mit dem wachsenden Verständnis der HIV/AIDS-Pathogenese und HIV-induzierten Immunreaktionen wurde deutlich, dass die frühe Induktion einer CTL-vermittelten Immunantwort mit einer Abnahme der primären Virämie während der HIV-1-Infektion assoziiert ist (Borrow *et al.*, 1994, Pantaleo *et al.*, 1994). Ferner scheinen Virus-spezifische CTLs eine kritische Rolle in der Kontrolle der chronischen HIV-Infektion zu übernehmen (Musey *et al.*, 1997). Hierbei konnte eine signifikante inverse Korrelation zwischen HIV-spezifischen CTLs und der Viruslast nachgewiesen werden, die die signifikante Bedeutung der CTLs in der Kontrolle der HIV-Infektion unterstreicht (Ogg *et al.*, 1998). Aus diesen Daten wird die Anforderung und Notwendigkeit an einen Impfstoff zur Induktion einer potenten zellulären Immunantwort deutlich. Antigene, die intrazellulär prozessiert und über MHC-I auf der Zelloberfläche präsentiert werden, induzieren eine spezifische CTL-Antwort. In den

letzten Jahren konnte vor allem durch den Einsatz von lebenden attenuierten Viren eine MHC-I-vermittelte Antigen-Präsentation induziert werden, allerdings stellt das vorhandene Infektionsrisiko eines der Hauptprobleme dieser Immunisierungsstrategie in der klinischen Anwendung dar.

Wie die Ergebnisse des in Kap. 3.2.6.2 gezeigten ELIspot-Assays zeigen, hat durch den retroviralen Gentransfer mittels eines MLV-abgeleiteten Transfervektors und der nachfolgenden Integration der viralen Transferegene in das Wirtszellgenom eine intrazelluläre Prozessierung und MHC-I-restringierte Antigenpräsentation der viralen Proteine in CD4⁺ T-Zellen stattgefunden. Obwohl CD4⁺ T-Zellen nicht zu den „klassischen“ Antigen-präsentierenden Zellen gehören, konnte in den PBMC, die 7,5 bzw. 10 Wochen nach der letzten Transplantation aus dem Blut des immunisierten Rhesusaffen isoliert worden waren, erfolgreich die Induktion einer Rev- und Env-spezifischen CTL-Antwort gezeigt werden. Die eingesetzten Rev-Peptid-Pools des HIV-1 BRU als Antigen-Stimuli konnten eine signifikante, vor allem gegen den Sequenzbereich 1-71 des Rev-Proteins gerichtete CTL-Aktivität nachweisen. Mittels der verschiedenen als Antigen-Stimuli eingesetzten Env-Peptid-Pools konnte eine signifikante CTL-Aktivität nachgewiesen werden, die spezifisch gegen die für einen effizienten Schutz bedeutenden Determinanten des HIV-1-Hüllproteins, den variablen Bereich des gp120-Hüllproteins (u.a. dem V3-Loop) sowie gegen die CD4-Bindungsregion gerichtet war (Johnson *et al.*, 1992).

4.2.7 Ausblick

Die Immunisierungsstudie mit *ex vivo* transduzierten und nachfolgend in den Rhesusaffen transplantierten PBMC konnte erfolgreich die Induktion einer HIV-spezifischen humoralen und zellulären Immunantwort nachweisen. Eine wesentliche Voraussetzung für einen effektiven und präventiven Impfstoff ist die von einer wiederholten Antigen-Stimulation abhängige Persistenz der Gedächtnisfunktion des Immunsystems (McMichael and Hanke, 2002), die den Schutz vor einer Infektion vermittelt (Zinkernagel *et al.*, 1994). Im Rahmen der Immunisierungsstudie wurde ebenfalls nach der ersten Transplantation der viralen Antigen-exprimierenden Zellen (Priming) ein „boost“ zur Verstärkung der Immunantwort durch zwei weitere Transplantationen angeschlossen. Es ist jedoch unklar, ob die induzierte SHIV-spezifische Immunantwort einen ausreichenden Schutz vor einem Infektionsversuch mit dem pathogenen SHIV89.6P vermitteln würde. Daher wäre eine wiederholte Immunisierung sowohl für weiterführende Untersuchungen der induzierten Immunantworten als auch zur weiteren Verstärkung und Persistenz der Immunreaktionen sinnvoll.

Von einem MLV-abgeleiteten retroviralen Vektor, der die viralen Gene HIV-1 IIIB *env* und *rev* kodiert, konnte bereits die Induktion einer Immunantwort nach Transplantation von *ex vivo* transduzierten Fibroblasten im Rhesusaffen-Tiermodell gezeigt werden (Laube *et al.*, 1994). In einer weiteren Studie, in der dieser retrovirale Vektor durch intramuskuläre Applikation zur Immunisierung in Mäusen und Rhesusaffen eingesetzt wurde, konnte aus den aus der Milz der immunisierten Tiere isolierten dendritischen Zellen erfolgreich die Induktion einer Antigen-spezifischen CTL-Antwort *in vitro* gezeigt werden (Song *et al.*, 1997). In einer von Barouch *et al.* (2002) publizierten Untersuchung, in der ein bicistronisches für gp120 und GM-CSF kodierendes Plasmid intramuskulär zur Immunisierung von Mäusen eingesetzt wurde, konnte ebenfalls die Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort gezeigt werden. Es wäre daher für weiterführende Untersuchungen denkbar, den MLV-abgeleiteten Transfektor pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta ngfr$ bzw. [MLV(SHIV)]-Vektorpartikel ebenfalls durch direkte intramuskuläre Applikation zur Immunisierung einzusetzen. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass bei Immunisierung mit viralen Vektoren die Induktion von Immunreaktionen durch Cytokine moduliert wird. Die HIV-1-Env spezifische zelluläre Immunantwort, die durch ein HIV-1-*env* exprimierendes Vaccinia Virus induziert worden war, konnte durch Zugabe von IL-2 in Mäusen dosisabhängig verstärkt werden (Mooji and Heeney, 2002, Gherandi *et al.*, 1999). Es wäre daher denkbar, den im Transfektor enthaltenen Oberflächenmarker $\Delta LNGFR$ gegen IL-2 auszutauschen oder aber bei der Immunisierung IL-2 als Protein zu applizieren, um die immunogene Wirkung zu verstärken.

5 Zusammenfassung

Der weltweiten Ausbreitung des humanen Immundefizienzvirus versucht man neben der Entwicklung eines präventiven HIV-Impfstoffes auch durch die Verbesserung der chemotherapeutischen Behandlung HIV-Infizierter entgegen zu wirken. Die hochwirksame antiretrovirale Kombinationsstherapie (HAART) hat neben der Anzahl der opportunistischen Infektionen und AIDS-bedingten Todesfälle auch die Viruslast in vielen HIV-Infizierten über einen langen Zeitraum unterhalb der Detektionsgrenze senken können. Es sind daher neben den klassischen Verlaufsmarkern wie der Viruslast und der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen neue Surrogatmarker zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Therapie notwendig. Der Einfluss der Viruslast auf den CD8⁺ T-Zellaktivierungsstatus während der antiretroviralen Therapie zeigte sich durch den Vergleich von HAART-Respondern und den durch eine hohe Viruslast infolge eines Therapie-Versagens gekennzeichneten HAART-Non-Respondern. Die Beobachtung einer signifikant erhöhten Anzahl an basal, d.h. ohne vorangegangene *in vitro* Stimulation, aktivierten CD8⁺CD69⁺ T-Zellen bei HAART-Non-Respondern ($p = 0,0049$) konnte die Rolle des T-Zell-Aktivierungsstatus als Marker der verbleibenden Viruslast unter HAART nachweisen. Um das Potential der von CD8⁺ T-Zellen sezernierten HIV-supprimierenden β -Chemokinen und IL-16 als HAART-begleitende Surrogatmarker zu untersuchen, wurde die Expression von MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES sowie des Lymphokins IL-16 im Serum und im Zellkulturüberstand aktivierter CD8⁺ T-Zellen untersucht. Für HAART-Non-Responder konnte im Zellkulturüberstand von *in vitro* stimulierten CD8⁺ T-Zellen eine signifikante Erhöhung der IL-16-Expression ($p = 0,0077$) und eine erhöhte Expression von MIP-1 α im Vergleich zu HAART-Respondern gezeigt werden. Darüber hinaus wurde eine signifikant erhöhte MIP-1 β -Serumkonzentration bei HAART-Non-Respondern ($p = 0,0175$) nachgewiesen, die mit einer erhöhten Anzahl aktivierter CD8⁺CD69⁺ T-Zellen assoziiert war. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass neben MIP-1 α , vor allem das β -Chemokin MIP-1 β und das Lymphokin IL-16 vielversprechende Surrogatmarker zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Therapie darstellen, die als sensitive therapiebegleitende Marker die rechtzeitige therapeutische Intervention vor einem signifikanten Anstieg der Viruslast ermöglichen könnten.

Da trotz der intensiven Entwicklung und Verbesserung antiretroviral wirkender Therapeutika die vollständige Elimination des HI-Virus bislang nicht möglich ist, wurde in den vergangenen Jahren konzentriert an der Entwicklung neuer Impfstoffstrategien gearbeitet. Eine durch einen Impfstoff induzierte protektive Immunantwort gegen HIV sollte vor allem gegen Strukturproteine, sowie gegen die regulatorischen Proteine Tat und Rev gerichtet sein. Mit

einem MLV-abgeleiteten Transfektor für die SHIV-Gene *tat*, *rev* und *env* wurde in dieser Arbeit das immunogene Potential zur Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort im Rhesusaffen-Tiermodell untersucht. Durch die Etablierung einer stabilen Verpackungszelllinie für den Transfektor pMg $\Delta env/tat/rev/\Delta lngfr$ konnte der effiziente Gentransfer in CD4⁺ T-Zellen mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren gezeigt werden. Durch Optimierung der Transduktionsbedingungen konnte ein Transduktionstiter von 1-2 x 10⁷ i.E./ml in primäre Rhesus-Lymphozyten erreicht werden. Um das immunogene Potential dieser HIV-Antigen-exprimierenden Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurden in einer Immunisierungsstudie 0,7 - 3,4 x 10⁷ Transfektor-positive PBMC in 3 aufeinander folgenden Transplantationen in einen Rhesusaffen reinfundiert. Die transplantierten Zellen waren nach der 3. Applikation bis zu 7 Tage nach Transplantation *in vivo* mittels PCR detektierbar. Eine HIV-gp120-spezifische Antikörperantwort konnte fünf Wochen nach der ersten bzw. zwei Wochen nach der letzten Immunisierung nachgewiesen werden. In einem ELISpot-Assay konnte erfolgreich die Induktion einer HIV-1-Env- und Rev-spezifischen CTL-Antwort in den nach 7,5 bzw. 10 Wochen nach der letzten Immunisierung entnommenen PBMCs nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten Sequenzanalysen, dass die induzierte CTL-Aktivität gegen die für einen effizienten Schutz bedeutenden Determinanten des HIV-1-Hüllproteins, gegen die variable Domäne des gp120 als auch gegen die CD4-Bindungsregion gerichtet war. In dieser Immunisierungsstudie war es somit erstmals möglich, durch die Transplantation autologer HIV-Antigen-exprimierender CD4⁺ T-Zellen eine spezifische humorale wie auch zelluläre Immunantwort *in vivo* zu induzieren.

6 Literaturverzeichnis

ALKHATIB, G., COMBADIÈRE, C., BRODER, C.C., FENG, Y., KENNEDY, P.E., MURPHY, P.M. AND BERGER, E.A. (1996): CC CKR5: A RANTES, MIP-1 alpha, MIP-1 beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* **272**, 1955-1958.

AMADO, R. G., MITSUYASU, R. T., SYMONDS, G., ROSENBLATT, J. D., ZACK, J., SUN, L. Q., MILLER, M., ELY, J. AND GERLACH, W. (1999): A phase I trial of autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells transduced with an anti-HIV ribozyme. *Hum. Gene Ther.* **10**(13), 2255-2270.

AMIEL, C., DARCISSAC, E., TRUONG, M.J., DEWULF, J., LOYENS, M., MOUTON, Y., CAPRON, A. AND BAHR, G.M. (1999): Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J. Infect. Dis.* **179**, 83-91.

ASCH, J., WEINBERG, R.S., MUELLER, L., GALPERIN, Y., KIANG, L., JOLLY, D. AND ISOLA, L.M. (1998): Retroviral gene transfer into cord blood stem/progenitor cells using purified vector stocks. *Am. J. Hematol.* Jan **57**(1), 16-23.

AUKRUST, P., MULLER, F. AND FROLAND, S.S. (1998): Circulating levels of RANTES in human immunodeficiency virus type 1 infection: effect of potent antiretroviral therapy. *J Infect Dis.* Apr **177**(4), 1091-1096.

AUTRAN, B., CARCELAIN, G. AND LI, T.S (1997): Positive effects of combined anti-retroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* **277**, 112-116.

BADER, A., BROCKMEYER, N., SCHNAITMANN, E., MERTINS, L., OTTEKEN, A., KURTH, R. AND WERNER, A. (2001): Interleukin-16 serum levels during the course of HIV-1 infection. *AIDS* Mar 9, **15**(4), 528-529.

BAIER M AND KURTH R. (1997): Fighting HIV-1 with IL-16. *Nat. Med.* Jun;**3**(6), 605-606.

BAIER, M., WERNER, A., BANNERT, N., METZNER, K. AND KURTH, R. (1995): HIV suppression by Interleukin-16. *Nature* **373**, 560.

BALTIMORE D. AND HEILMAN C. (1998): HIV vaccines: prospects and challenges. *Sci. Am.* Jul, **279**(1), 98-103.

BAROUCH, D.H., SANTRA, S., TENNER-RACZ, K., RACZ, P., KURODA, M.J., SCHMITZ, J.E., JACKSON, S.S., LIFTON, M.A., FREED, D.C., PERRY, H.C., DAVIES, M.E., SHIVER, J.W. AND LETVIN, N.L.(2002): Potent CD4+ T cell responses elicited by a bicistronic HIV-1 DNA vaccine expressing gp120 and GM-CSF. *J. Immunol.* Jan 15, **168**(2), 562-568.

BARRE-SINOUSSE, F., CHERMANN, J.C., REY, F., NUGEYRE, M.T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIQUX, C., ROZENBAUM, W. AND MONTAGNIER, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

BAUER, G., SELANDER, D., ENGEL, B., CARONARO, D., CSIK, S., RAWLINGS, S., CHURCH, J. AND KOHN, D. B. (2000): Gene therapy for pediatric AIDS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **918**, 318-329.

BENVENISTE, R.E., ARTHUR, L.O., TSAI, C.C., SOWDER, R., COPELAND, T.D., HENDERSON, L.E. AND OROSZLAN, S. (1986): Isolation of a lentivirus from a macaque with lymphoma: comparison with HTLV-III/LAV and other lentiviruses. *J. Virol.* **60**, 483-490.

BERGER, E.A., MURPHY, P.M. AND FARBER, J.M. (1999): Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**, 657-700.

BISSET, L.R., ROTHEN, M., JOLLER-JEMELKA, H.I., DUBS, R.W., GROB, P.J. AND OPRAVIL, M. (1997): Change in circulating levels of the chemokines macrophage inflammatory proteins 1 alpha and 11 beta, RANTES, monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-16 following treatment of severely immunodeficient HIV-infected individuals with indinavir. *AIDS* Mar 15, **11**(4), 485-491.

BLAESE, R. M., CULVER, K. W., MILLER, D., CARTER, C. S., FLEISHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTOSHEV, P., GREENBLATT, J. J., ROSENBERG, S. A., KLEIN, H., BERGER, M., MULLEN, C. A., RAMSEY, W. J., MUUL, L., MORGAN, R. A. AND ANDERSON, W. F. (1995): T lymphocyte-directed gene therapy for ADA⁻ SCID: initial trial results after 4 years. *Science* **270**, 475-480.

BONYHADI, M. L., MOSS, K., VOYTOVICH, A., AUTEN, J., KALFOGLOU, C., PLAVEC, I., FORESTELL, S., SU, L., BOHNLEIN, E. AND KANESHIMA, H. (1997): RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **71**(6), 4707-4716.

BOOSALIS, M.S., IKUTA, T., PACE, B.S., DA FONSECA, S., WHITE, G.L., FALLER, D.V. AND PERRINE, S.P. (1997): Abrogation of IL-3 requirements and stimulation of hematopoietic cell proliferation in vitro and in vivo by carboxylic acids. *Blood Cells Mol. Dis.*, Dec **23**(3), 434-442.

BORROW, P., LEWICKI, H., WEI, X., HORWITZ, M.S., PEPPER, N., MEYERS, H., NELSON, J.A., GAIRIN J.E., HAHN, B.H., OLDSTONE, M.B. AND SHAW, G.M. (1997): Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus. *Nat. Med.* **3**, 205-211.

BORROW, P., LEWICKI, H., HAHN, B.H., SHAW, G.M. AND OLDSTONE, M.B. (1994): Virus-specific CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* Sep **68**(9), 6103-6110.

BOUR, S., GELEZIUNAS, R. AND WAINBERG, M.A. (1995): The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol Rev.* Mar, **59**(1), 63-93.

BOYER, J.D., COHEN, A.D., VOGT, S., SCHUMANN, K., NATH, B., AHN, L., LACY, K., BAGARAZZI, M.L., HIGGINS, T.J., BAINE, Y., CICCARELLI, R.B., GINSBERG, R.S., MACGREGOR, R.R. AND WEINER, D.B. (2000): Vaccination of seronegative volunteers with a human immunodeficiency virus type 1 env/rev DNA vaccine induces antigen-specific proliferation and lymphocyte production of beta-chemokines. *J. Infect. Dis.* Feb **181**(2), 476-83.

BRANDER, C. AND WALKER, B.D. (1999): T lymphocyte responses in HIV-1 infection: implications for vaccine development. *Curr. Opin. Immunol.* Aug **11**(4), 451-459.

BUKRINSKI, M. AND ADZHUBEI, A. (1999): Viral Protein R of HIV-1. *Rev. Med. Virol.* **9**, 39-49.

BUNNELL B.A., METZGER, M., BYRNE, E., MORGAN, R.A. DONAHUE, R.E. (1997): Efficient in vivo marking of primary CD4⁺ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector. *Blood* **89**, 1287-1995.

BUNNELL, B.A., MUUL, L.M., DONAHUE, R.E., BLAESE, R.M. AND MORGAN, R.A. (1995): High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug 15, **92**(17), 7739-43.

BURNS, J.C., FRIEDMANN, T., DRIEVER, W., BURRASCANO, M., AND YEE, J.K. (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8033.

BURTON, D.R. AND MONTEFIORI, D.C. (1997): The antibody response in HIV infection, *AIDS* (comments), **98**.

BUSEYNE, F., FEVRIER, M., GARCIA, S., GOUGEON, M.L. AND RIVIERE, Y. (1996): Dual function of a human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte clone: inhibition of HIV replication by non-cytolytic mechanisms and lysis of HIV-infected CD4⁺ cells. *Virology* **225**, 248-253.

BUSEYNE F AND RIVIERE Y. (1993): HIV-specific CD8+ T-cell immune responses and viral replication. *AIDS*. Nov, **7** Suppl 2, 81-5.

CALLAHAN, K.M., ROWELL, J.F., SOLOSKI, M.J., MACHAMER, C.E. AND SILICIANO, R.F. (1993): HIV-1 envelope protein is expressed on the surface of infected cells before its processing and presentation to class II-restricted T lymphocytes. *J Immunol*. Sep 15, **151**(6), 2928-42.

CAO, Y., QIN, L., ZHANG, L., SAFRIT, J. AND HO, D.D. (1995): Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.*, Jan 26, **332**(4), 201-208.

CARTER, L.M., PETERS, B.S., ELLIS, B.A. AND WOLSTENCROFT, R.A. (2000): Highly active antiretroviral therapy normalizes the potential for MIP-1 alpha production in HIV infection. *J. Infect*. Nov **41**(3), 252-255.

CECILIA, D., KEWAL-RAMANI, V.N., O'LEARY, J., VOLSKY, B., NYAMBI, P., BURDA, S., XU, S., LITTMAN, D.R. AND ZOLLA-PAZNER, S. (1998): Neutralization profiles of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates in the context of coreceptor usage. *J. Virol*. **72**, 6988-6996.

CHAKRABARTI, L., GUYADER, M., ALIZON, M., DANIEL, M.D., DESROSIERS, R.C, TIOLLAIS, P. AND SONIGO, P. (1987): Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* **328**, 543-547.

CHAN, D.C., FASS, D., BERGER, J.M. AND KIM, P.S. (1997): Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.

CHANG, H.K., GENDELMAN, R., LISZIEWICZ, J., GALLO, R.C. AND ENSOLI, B. (1994): Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. *Gene Ther*. May **1**(3), 208-216.

CHEN, J., REEVES, L., SANBURN, N., CROOP, J., WILLIAMS, D.A. AND CORNETTA, K. (2001). Packaging cell line DNA contamination of vector supernatants: implication for laboratory and clinical research. *Virology* **282**, 186-97.

CHEN, Z., TELFIER, P., GETTIE, A., REED, P., ZHANG, L., HO, D.D. AND MARX, P.A. (1996): Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol*. **70**, 3617-3627.

CHOE, H., FARZAN, M., SUN, Y., SULLIVAN, N., ROLLINS, B., PONATH, P.D., WU, L., MACKAY, C.R., LAROSA, G., NEWMAN, W., GERARD, N., GERARD, C. AND SODROSKI, J. (1996): The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**, 1135-1148.

CICHUTEK, K. AND NORLEY, S. (1993): Lack of immune suppression in SIV-infected natural hosts. *AIDS* **7** Suppl 1, S25-S35.

CLAPHAM, P.R., BLANC, D. AND WEISS, R.A. (1991): Specific cell surface requirements for the infection of CD4-positive cells by human immunodeficiency virus types 1 and 2 and by the simian immunodeficiency virus. *Virology* **181**, 703-715.

CLAVEL, F., GUETARD, D., BRUN-VEZINET, F., CHAMARET, S., REY, M.A., SANTOS-FERREIRA, M.O., LAURENT, A.G., DAUGUET, C., KATLAMA, C. AND ROUZIOUX, C. (1986): Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**, 343-346.

CLAVEL, F., GUYADER, M., GUETARD, D., SALLE, M., MONTAGNIER, L. AND ALIZON, M. (1986): Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* Dec 18-31, **324**(6098), 691-695.

COCCHI, F., DEVICO, A.L., GARZINO-DEMO, A., CARA, A., GALLO, R.C., AND LUSSO, P. (1996): The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* **2**, 1244-1247.

COCCHI, F., DEVICO, A.L., GARZINO, D.A., ARAYA, S.K., GALLO, R.C. AND LUSSO, P. (1995): Identification of RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**(5243), 1811-1815.

COCCHI, F., DEVICO, A.L., GARZINO-DEMO, A., ARYA, S.K., GALLO, R.C. AND LUSSO, P. (1995): Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* **270**, 1811-1815.

COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., VOGT, P. ET AL. (1986): What to call the AIDS virus? *Nature* **321**, 10.

COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J.A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., VOGT, P. ET AL. (1986): Human immunodeficiency viruses. *Science* May 9, **232**(4751), 697.

COFFIN, J.M. (1986): Genetic variation in AIDS viruses. *Cell* Jul 4, **46**(1), 1-4.

CONNOR, R.I., SHERIDAN, K.E., CERADINI, D., CHOE, S. AND LANDAU, N.R. (1997): Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J. Exp. Med.* **185**, 621-628.

COOPER, D.A., GOLD, J., MACLEAN, P., DONOVAN, B., FINLAYSON, R., BARNES, T.G., MICHELMORE, H.M., BROOKE, P. AND PENNY, R. (1985): Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* **1**, 537-540.

CORBEAU, P., KRAUS, G. AND WONG-STAAAL, F. (1996): Efficient gene transfer by a human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived vector utilizing a stable HIV packaging cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Nov 26, **93**(24), 14070-14075.

CRUIKSHANK, W.W., CENTER, D.M., NISAR, N., WI, M. NATKE, B., THEODORE, A.C. AND KORNFELD, H. (1994): Molecular and functional analysis of a lymphocyte chemoattractant factor: Association of biologic function with CD4 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5109-5113.

CRUIKSHANK, W.W., BERMAN, J.S., THEODORE, A.C., BERARDO, J. AND CENTER, D.M (1987): Lymphokine activation of T4+ T-lymphocytes and monocytes. *J. Immunol.* **138**, 3817-3823.

CULLEN, B.R. (1998): HIV-1 auxiliary proteins: making connections in a dying cell. *Cell* **93**, 685-692.

DANIEL, M.D., SEHGAL, P.K., KODAMA, T., WYAND, M.S., RINGLER, D.J. KING, N.W., SCHMIDT, D.K., TROUP, C.D AND DESROSIERS, R.C. (1990): Use of simian immunodeficiency virus for vaccine research. *J. Med. Primatol.* **19**, 395-399.

DANIEL, M.D., LETVIN, N.L., KING, N.W., KANNAGI, M., SEHGAL, P.K., HUNT, R.D., KANKI, P.J., ESSEX, M. AND DESROSIERS, R.C. (1985): Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science* **228**, 1201-1204.

DEAN, M., CARRINGTON, M., WINKLER, C., HUTTLEY, G.A., SMITH, M.W., ALLIKMETS, R., GOEDERT, J.J., BUCHBINDER, S.P., VITTINGHOFF, E., GOMPERTS, E., DONFIELD, S., VLAHOV, D., KASLOW, R., SAAH, A., RINALDO, C., DETELS, R., O'BRIEN, S.J. (1996): Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science*, Sep 27, **273**(5283), 1856-1862.

DENG, H., LIU, R., ELLMEIER, W., CHOE, S., UNUTMAZ, D., BURKHART, M., DI MARZIO, P., MARMON, S., SUTTON, R.E., HILL, C.M., DAVIS, C.B., PEIPER, S.C., SCHALL, T.J., LITTMAN, D.R. AND LANDAU, N.R. (1996): Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* **381**, 661-666.

DIMMOCK, N.J. (1993): Neutralization of animal viruses. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **183**, 1-149.

DORANZ, B.J., GROVIT-FERBAS, K., SHARRON, M.P., MAO, S.H., GOETZ, M.B., DAAR, E.S., DOMS, R.W. AND O'BRIEN, W.A. (1997): A small-molecule inhibitor directed against the chemokine receptor CXCR4 prevents its use as an HIV-1 coreceptor. *J. Exp. Med.*, Oct 20, **186**(8), 1395-1400.

DORANZ, B.J., RUCKER, J., YI, Y., SMYTH, R.J., SAMSON, M., PEIPER, S.C., PARMENTIER, M., COLLMAN, R.G. AND DOMS, R.W. (1996) : A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, Jun 28, **85**(7), 1149-58.

DUAN, L., ZHU, M., OZAKI, IL, ZHANG, H., WEI, D. L. AND POMERANTZ, R. J. (1997): Intracellular inhibition of HIV-1 replication using a dual protein- and RNA-based strategy. *Gene Ther.* **4**, 533-543.

DUBRIDGE, R.B., TANG, P., HSIA, H.C., LEONG, P.M., MILLER, J.H. AND CALOS, M.P. (1987): Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* Jan **7**(1), 379-387.

EDINGER, A.L., CLEMENTS, J.E. AND DOMS, R.W. (1999): Chemokine and orphan receptors in HIV-2 and SIV tropism and pathogenesis. *Virology* **260**, 211-221.

EIDEN, M.V., FARREL, K.B. AND WILSON, C.A. (1996): Substitution of a single amino acid residue is sufficient to allow the human amphotropic murine leukemia virus receptor to also function as gibbon ape leukemia virus receptor. *J. Virol.* **70**, 1080-1085.

ENNEN, J., FINDEKLEE, H., DITTMAR, M.T., NORLEY, S., ERNST, M. AND KURTH, R. (1994): CD8+ T lymphocytes of African green monkeys secrete an immunodeficiency virus-suppressing lymphokine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(15), 7207-7211.

FALK, S., MULLER, H., SCHMIDTS, H.L., AND STUTTE, H.J. (1986): [Morphological findings in the lymphadenopathy syndrome (LAS) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **111**, 714-718.

FEINBERG, M.B. AND MCLEAN, A.R. (1997): AIDS: Decline and fall of immune surveillance? *Current Biology* **7**(3), R136-140.

FENG, Y., BRODER, C.C., KENNEDY, P.E., AND BERGER, E.A. (1996): HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* **272**, 872-877.

FINZI, D. AND SILICIANO, R.F. (1998): Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* **93**, 665-671.

FISH, D.C., GILDEN, R.V., BARE, R.M., TRIMMER, R.M. AND HUEBNER, R.J. (1979): Prevention of spontaneous leukaemia in AKR mice by passive immunization and type specificity of this protection. *J. Natl. Cancer Inst.* **62**, 943-945.

FRANKEL, A.D. AND YOUNG, J.A. (1998): HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 1-25.

FREED, E.O. (1998): HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15.

FUST, G., DIERICH, M.P. AND HIDVEGI, T. (1995): Role of humoral factors in the progression of HIV disease. *Immunol. Today* Apr **16**(4), 167-169.

GALLARDO, H.F., TAN, C., ORY, D. AND SADELAIN, M. (1997): Recombinant retroviruses pseudotyped with the vesicular stomatitis virus G glycoprotein mediate both stable gene transfer and pseudotransduction in human peripheral blood lymphocytes.

GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D.L., CHEN, Y., RODENBURG, C.M., MICHAEL, S.F., CUMMINS, L.B., ARTHUR, L.O., PEETERS, M., SHAW, G.M., SHARP, P.M., AND HAHN, B.H. (1999): Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* **397**, 436-441.

GARZINO-DEMO, A., MOSS, R.B., MARGOLICK, J.B., CLEGHORN, F., SILL, A., BLATTNER, W.A., COCCHI, F., CARLO, D.J., DEVICO, A.L. AND GALLO, R.C. (1999): Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory beta-chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Oct 12, **96**(21), 11986-11991.

GOLDING, H., P, D.S., BRADAC, J., MATHIESON, B. AND FAST, P. (1994): Neutralization of HIV-1. *AIDS Research and Human Retroviruses* **10**(6), 633-643.

GOMEZ, A.M., SMAILL, F.M. AND ROSENTHAL, K.L. (1994): Inhibition of HIV replication by CD8+ T cells correlates with CD4 counts and clinical stage of disease. *Clin Exp Immunol.* Jul, **97**(1), 68-75.

GOTTLIEB, M.S., SCHROFF, R., SCHANKER, H.M., WEISMAN, J.D., FAN, P.T., WOLF, R.A. AND SAXON, A. (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1425-1431.

GOULDER, P.J. AND WALKER, B.D. (1999): The great escape - AIDS viruses and immune control. *Nat. Med.* **5**(11), 1233-1235.

GOULDER, P.J., PHILLIPS, R.E., COLBERT, R.A., MCADAM, S., OGG, G., NOWAK, M.A., GIANGRANDE, P., LUZZI G., MORGAN, B., EDWARDS, A., MCMICHAEL, A.J. AND ROWLAND-JONES, S. (1997): Late escape from an immunodominant cytotoxic T-lymphocyte response associated with progression to AIDS. *Nat. Med.* Feb, **3**(2), 212-217.

GRAHAM, B.S. (1994): Serological responses to candidate AIDS vaccines. *AIDS Research and Human Retroviruses*, **8**.

GUYADER, M., EMERMAN, M., SONIGO, P., CLAVEL, F., MONTAGNIER, L. AND ALIZON, M. (1987): Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature* **326**, 662-669.

HAHN, B.H., SHAW, G.M., DECOCK, K.M., AND SHARP, P.M. (2000): AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* **287**, 607-614.

HAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W. AND MONTAGNIER, L. (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.

HAN XD, CHUNG SW, WONG PM. (1995): Identification of a unique membrane-bound molecule on a hemopoietic stem cell line and on multipotent progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 21, **92**(24), 11014-8.

HANAHAH, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.

HANENBERG, H., XIAO, X.L., DILLOO, D., HASHINO, K., KATO, I. AND WILLIAMS, D.A. (1996): Co-localization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat. Med.* **2**, 876-82.

HILLIS, D.M. (2000): AIDS. Origins of HIV. *Science* **288**, 1757-1759.

HIRSCH, V.M. AND JOHNSON, P.R. (1994): Pathogenic diversity of simian immunodeficiency viruses. *Virus Res.* **32**, 183-203.

HIRSCH, V.M., OLMSTED, R.A., MURPHEY-CORB, M., PURCELL, R.H. AND JOHNSON, P.R. (1989): An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**, 389-392.

HIRSCH, R.L. (1982): The complement system: its importance in the host response of viral infection. *Microbiological Reviews* **46**(1), 71-85.

HITTINGER, G., POGGI, C., DELBEKE, E., PROFIZI, N. AND LAFEUILLADE, A. (1998): Correlation between plasma levels of cytokines and HIV-1 RNA copy number in HIV-infected patients. *Infection* Mar-Apr **26**(2), 100-103.

HO, W. Z., LAI, J. P., BOUHAMDAN, M., DUAN, L., POMERANTZ, R. J. AND STARR, S. E. (1998): Inhibition of HIV type 1 replication in chronically infected monocytes and lymphocytes by retrovirus mediated gene-transfer of anti-Rev single-chain variable fragments. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **14**, 1573-1580.

HO, D.D., NEUMANN, A.U., PERELSON, A.S., CHEN, W., LEONARD, J.M. AND MARKOWITZ, M. (1995): Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* **373**, 123-126.

HOMSY, J., MEYER, M., TATENO, M., CLARKSON, S. AND LEVY, J.A. (1989): The Fc and not CD4 receptor mediates antibody enhancement of HIV infection in human cells. *Science* Jun 16, **244**(4910), 1357-60.

HORTON, R.M., HUNT, H.D., HO, S.N., PULLEN, J.K. AND PEASE, L.R. (1989): Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-68.

HUANG, Y., PAXTON, W.A., WOLINSKY, S.M., NEUMANN, A.U., ZHANG, L., HE, T., KANG, S., CERADINI, D., JIN, Z., YAZDANBAKHS, K., KUNSTMAN, K., ERICKSON, D., DRAGON, E., LANDAU, N.R., PHAIR, J., HO, D.D. AND KOUP, R.A. (1996): The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat. Med.* Nov **2**(11), 1240-1243.

HUNSMANN, G., MOENNING, V. AND SCHAEFER, W. (1975): Properties of mouse leukaemia viruses. IX. Active and passive immunization of mice against Friend leukaemia with isolated viral GP71 glycoprotein and its corresponding antiserum. *Virology* **66**, 327-329.

IRWIN, M.J., LAUBE, L.S., LEE, V., AUSTIN, M., CHADA, S., ANDERSON, C.G., TOWNSEND, K., JOLLY, D.J. AND WARNER, J.F. (1994): Direct injection of a recombinant retroviral vector induces human immunodeficiency virus-specific immune responses in mice and nonhuman primates. *J. Virol.* Aug **68**(8), 5036-5044.

JOHNSON, P.R., MONTEFIORI, D.C., GOLDSTEIN, S., HAMM, T.E., ZHOU, J., KITOV, S., HAIGWOOD, N.L., MISHNER, L., LONDON, W.T., GERIN, J.L., ALLISON, A., PURCELL, R.H., CHANOCK, R.M. AND HIRSCH, V.M. (1992): Inactivated whole-virus vaccine derived from a proviral DNA clone of simian immunodeficiency virus induces high levels of neutralizing antibodies and confers protection against heterologous challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2175-2179.

JOLLY, D.J. AND WARNER, J.F. (1990): Retroviral vectors as vaccines and immunotherapeutics. *Semin. Immunol.* Sep **2**(5), 329-339.

KANBE, K., SHIMIZU, N., SODA, Y., TAKAGISHI, K. AND HOSHINO, H. (1999): A CXC chemokine receptor, CXCR5/BLR1, is a novel and specific coreceptor for human immunodeficiency virus type 2. *Virology* **265**, 264-273.

KAUFMANN, G.R., DUNCOMBE, C., ZAUNDERS, J., CUNNINGHAM, P. AND COOPER, D. (1998): Primary HIV-1 infection: a review of clinical manifestations, immunologic and virologic changes. *AIDS Patient Care STDS* Oct **12**(10), 759-767.

KAVANAUGH, M.P., MILLER, D.G., ZHANG, W., LAW, W., KOZAK, S. L., KABAT, D. AND MILLER, A.D. (1994): Cell-surface receptor for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7071-7075.

KEARNS, K., BAHNER, I., BAUER, G., WEI, S.F., VALDEZ, P., WHEELER, S., WOODS, L., MILLER, R., CASCIATO, D., GALPIN, J., CHURCH, J. AND KOHN, D.B. (1997): Suitability of bone marrow from HIV-1-infected donors for retrovirus-mediated gene transfer. *Hum. Gene Ther.* Feb 10, **8**(3), 301-311.

KIKUKAWA, R., KOYANAGI, Y., HARADA, S., KOBAYASHI, N., HATANAKA, M. AND YAMAMOTO, N. (1986): Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4. *J. Virol.* **57**, 1159-1162.

KINTER, A.L., OSTROWSKI, M., GOLETTI, D., OLIVA, A., WEISSMAN, D., GANTT, K., HARDY, E., JACKSON, R., EHLE, L. AND FAUCI, A.S. (1996): HIV replication in CD4⁺ T cells of HIV-infected individuals is regulated by a balance between the viral suppressive effects of endogenous beta-chemokines and the viral inductive effects of other endogenous cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* Nov 26, **93**(24), 14076-14081.

KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CHAMARET, S., GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J.C. AND MONTAGNIER, L. (1984): T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature*, **312**, 767-768.

KLEIN, M.R., VAN BAALEN, C.A., HOLWERDA, A.M., GARDE, S.R.K., BENDE, R.J., KEET, I.P.M., EEF TINCKSCHATTENKERK, J.K.M., OSTERHAUS, A.D.M.E., SCHUITEMAKER, H. AND MIEDEMA, F. (1995): Kinetics of Gag-specific cytotoxic T lymphocyte responses during the clinical course of HIV-1 infection: longitudinal analysis of rapid progressors and long-term asymptomatic. *J. Exp. Med.* **181**, 1365-1372.

KORBER, B., MULDOON, M., THEILER, J., GAO, F., GUPTA, R., LAPEDES, A., HAHN, B.H., WOLINSKY, S. AND BHATTACHARYA, T. (2000): Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**, 1789-1796.

KOUP, R.A., SAFRIT, J.T., CAO, Y., ANDREWS, C.A., MCLEOD, G., BORKOWSKY, W., FARTHING, C. AND HO, D.D. (1994): Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* **68**(7), 4650-4655.

KOZAK, S.L., SIESS, D.C., KAVANAUGH, M.P., MILLER, A.D. AND KABAT, D. (1995): The envelope glycoprotein of an amphotropic murine retrovirus binds specifically to the cellular receptor / phosphate transporter of susceptible species. *J. Virol.* **69**, 3433-3440.

KURTH, R., KRAUS, G., WERNER, A., HARTUNG, S., CENTNER, P., BAIER, M., NORLEY, S. AND LOEWER, J. (1988): AIDS: animal retrovirus models and vaccines. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **1**, 284-294.

LAEMMLI U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LAUBE, L.S., BURRASCANO, M., DEJESUS, C.E., HOWARD, B.D., JOHNSON, M.A., LEE, W.T., LYNN, A.E., PETERS, G., RONLOV, G.S., TOWNSEND, K.S., ET AL. (1994): Cytotoxic T lymphocyte and antibody responses generated in rhesus monkeys immunized with retroviral vector-transduced fibroblasts expressing human immunodeficiency virus type-1 III_B ENV/REV proteins. *Hum. Gene Ther* Jul **5**(7), 853-862.

LEAVITT, M.C., YU, M., WONG-STAAAL, F. AND LOONEY, D.J. (1996): Ex vivo transduction and expansion of CD4⁺ lymphocytes from HIV⁺ donors: prelude to a ribozyme gene therapy trial. *Gene Ther.* **3**, 599-606.

LEVY, J.A. (1996): The value of primate models for studying human immunodeficiency virus pathogenesis. *J. Med. Primatol.* **25**(3), 163-174.

LEVY, J.A. (1993): Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Micrbiol. Rev.* **57**, 183.

LEVY-MINTZ, P., DUAN, L., ZHANG, H., HU, B., DORNADULA, G., ZHU, M., KULKOSKY, J., BIZUB-BENDER, D., SKALKA, A.M. AND POMERANTZ, R.J. (1996): Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* **70**, 882-8832.

LI, Z.-X., SCHADE, Z.M., FEHSE, B., STOCKSCHLÄDER, M., UHDE, A., KOCH, S. GOLLER, B., RÜGER, R., FEHSE, N. AND ZANDER A.R. (1998): High-efficiency retroviral vector-mediated gene transfer into human lymphocytes. *Gene Therapy of Cancer, Plenum Press, New York*, 375-378.

LODGE, R., SUBBRAMANIAN, R.A., FORGET, J., LEMAY, G. AND COHEN, E.A. (1998): MuLV-based vectors pseudotyped with truncated HIV glycoproteins mediate specific gene transfer in CD4⁺ peripheral blood lymphocytes. *Gene Therapy* **5**, 655-664.

- LOWENSTINE, L.J., LERCHE, N.W., YEE, J.L., UYEDA, A., JENNINGS, M.B., MUNN, R.J., MCCLURE, H.M., ANDERSON, D.C., FULTZ, P.N. AND GARDNER, M.B. (1992): Evidence for a lentiviral etiology in an epizootic of immune deficiency and lymphoma in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). *J. Med. Primatol.* **21**, 1-14.
- LU, Z.H., BERSON, J.F., CHEN, Y.H. TURNER, J.D., ZHANG, T.Y., SHARRON, M., JENKS, M.H., WNG, Z.X., KIM, J., RUCKER, J., HOXIE, J.A., PEIPER, S.C. AND DOMS, R.W. (1997): Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 6426-6431.
- LUCIW, P.A. AND SHACLETT, B.L. (1993): Molecular biology of the human and simian immunodeficiency viruses. In: HIV molecular organization, pathogenicity and treatment (W.J.W. Morrow and N.L. Hiaighwood, Eds). *Esevier Sciences Publishers*, 123-219.
- MACGREGOR, R.R., BOYER, J.D., CICCARELLI, R.B., GINSBERG, R.S. AND WEINER, D.B. (2000): Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data. *J Infect Dis.* Jan, **181**(1), 406.
- MACKEWICZ, C. AND LEVY, J.A. (1992): CD8 + cell anti-HIV activity: nonlytic suppression of virus replication. *AIDS Res.Hum. Retroviruses* **8**, 1039-1050.
- MAMMANO, F., SALVATORI, F., INDRACCOLO, S., DE ROSSI, A., CHIECO-BIANCHI, L. AND GÖTTLINGER, H. (1997): Truncation of the Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney Murine Leukemia Virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J. Virol.* **71**, 3341-3345.
- MARASCO, W.A., LAVECCHIO, J. AND WINKLER, A. (1999): Human anti-HIV tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1 infection and AIDS. *J. Immunol.* **231**, 223-238.
- MARODON, G. (2001): CD4 down modulation on T-cells: an 'immune' checkpoint for HIV. *Immunol Lett.* Dec 3, **79**(3), 165-8.
- MARSCHANG, P., KRUEGER, U., OCHSENBAUER, C., GUERTLER, L., HITTMAIR, A., BOSCH, V., PATSCH, J.R. AND DIERICH, M.P. (1997): Complement activation by HIV-1-infected cells: the role of transmembrane glycoprotein gp41. *Journal of Aquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* **14**(2), 102-109.
- MARSCHANG, P., SODROSKI, J., WURZNER, R. AND DIERICH, M.P. (1995): Decay-accelerating factor (CD55) protects human immunodeficiency virus type 1 from inactivation by human complement. *European Journal of Immunology* **25**, 285-290.
- MARX, J.C., ALLAY, J.A., PERSONS, D.A., NOONER, S.A., HARGROVE, P.W., KELLY, P.F., VANIN, E.F. AND HORWITZ, E.M. (1999): High-efficiency transduction and long-term gene expression with a murine stem cell retroviral vector encoding the green fluorescent protein in human marrow stromal cells. *Hum. Gene Ther.* May 1, **10**(7), 1163-1173.
- MASUR, H., MICHELIS, M.A., GREENE, J.B., ONORATO, I., STOUWE, R.A., HOLZMAN, R.S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H.W. AND CUNNINGHAM-RUNDLES, S. (1981): An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1431-1438.
- MCKENZIE, S.W., DALLALIO, G., NORTH, M., FRAME, P. AND MEANS, R.T (1996): Serum chemokine levels in patients with non-progressing HIV infection. *AIDS* Aug **10**(9), F29-33.
- MCMICHAEL, A. AND HANKE, T. (2002): The quest for an AIDS vaccine: is the CD8+ T-cell approach feasible? *Nat. Rev. Immunol.* Apr **2**(4), 283-291.
- MCCUNE, J.M. (2001): The dynamics of CD4+ T-cell depletion in HIV disease. *Nature* **410**, 974-979.
- MELLORS, J.W., RINALDO, C.R.JR., GUPTA, P., WHITE, R.M., TODD, J.A. AND KINGSLEY, L.A. (1996): Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **272**, 1167-1170.

MIEDEMA, F., TERSMETTE, M. AND VAN LIER, R.A. (1990): AIDS pathogenesis: a dynamic interaction between HIV and the immune system. *Immunol. Today* **11**, 293-297.

MODROW S. AND D. FALKE (1997): Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verlag; ISBN 3860252747

MONTEFIORI, D.C., CORNELL, R.J., ZHOU, J.Y., ZHOU, J.T., HIRSCH, V.M. AND JOHNSTON, P.R. (1994): Complement control proteins CD46, CD55 and CD69 as common surface constituents of human and simian immunodeficiency viruses and possible targets for vaccine protection. *Virology* **205**(1), 82-92.

MOOIJ, P. AND HEENEY, J.L. (2001): Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins. *Vaccine*. Nov 12, **20**(3-4), 304-321.

MORITZ, T. AND WILLIAMS, D.A. (1994): Gene transfer into the hematopoietic system. *Curr Opin Hematol*. Nov **1**(6), 423-428.

MORRE, J.P., CAOP, Y., HO, D.D. AND KOUP, R.A (1994): Development of the anti-gp120 antibody response during seroconversion to human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **68**(8), 5142-5155.

MORROW, C.D., PARK, J. AND WAKEFIELD J.K. (1994): Viral gene products and replication of the human immunodeficiency type 1 virus. *Am. J. Physiol.* May **266**(5 Pt 1), 1135-1156.

MORROW, C.D., PORTER, D.C., ANSARDI, D.C., MOLDOVEANU, Z., FULTZ, P.N. (1994): New approaches for mucosal vaccines for AIDS: encapsidation and serial passages of poliovirus replicons that express HIV-1 proteins on infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10** Suppl 2, S61-6.

MÜLLER, PETER (1999). Antiretrovirale Therapie begleitende Surrogatmarker und [MLV(HIV-1)]-vermittelter Gentransfer. *Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*

MULLER, P., ENGELSTADTER, M., WERNER, A., BRANER, J., STASZEWSKI, S., MILLER, V., DOERR, H.W., KURTH, R. AND CICHUTEK, K. (1997): Increased serum and mRNA levels of RANTES associated with elevated levels of activated CD8+CD38+ T cells in HIV-1 infected individuals. *Intervirology*, **40**(4), 263-70.

MULLIS, H. B. AND FALOONA, F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**, 335-360.

MURPHY, P.M. (1994): The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol.* **12**, 593-633.

MUSEY, L., HUGHES, J., SCHACKER, T., SHEA, T., COREY, L. AND MCEL RATH, M.J. (1997): Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* Oct 30, **337**(18), 1267-1274.

MYERS, G., KORBER, B.T. AND HAHN, B.H. (1996): Human Retroviruses and AIDS Database. *Los Alamos National Laboratory Los Alamos, NM, USA.*

MYERS, G., KORBER, B.T., WAIN-HOBSON, R.F., SMITH, R.F. AND PAVLAKIS, G.N. (1994): Human retroviruses and AIDS 1994, A compilation and analysis of nucleic acid and amino acid sequences. *Los Alamos National Laboratory Los Alamos, NM, USA.*

NABEL, G.J. (2001): Challenges and opportunities for development of an AIDS vaccine. *Nature* Apr 19, **410**(6831), 1002-1007.

NARAYAN, O. (1989): Immunopathology of lentiviral infections in ungulate animals. *Curr. Opin. Immunol.* **2**(3), 399-402.

NATHANSON, N., HIRSCH, V.M. AND MATHIESON, B.J. (1999): The role of nonhuman primates in the development of an AIDS vaccine. *AIDS* **13** Suppl A, S113-20.

- NELSON, P.J., KIM, H.T., MANNING, W.C., GORALSKI, T.J. AND KRENSKY, A.M. (1993): Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene. *J. Immunol.* Sep 1, **151**(5), 2601-2612.
- NORLEY, S.G., KRAUS, G., ENNEN, J., BONILLA, J., KONIG, H. AND KURTH, R. (1990): Immunological studies of the basis for the apathogenicity of simian immunodeficiency virus from African green monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9067-9071.
- NOWAK, M.A. AND MCMICHAEL, A.J. (1995): How HIV defeats the immune system. *Scientific American*, **273**(2), 58-65.
- O'BRIAN, T.R., BLATTNER, W.A., WATERS, D., EYSTER, E., HILGARTNER, M.W., COHEN, A.E., LUBAN, N., HATZAKIS, A., ALEDORT, L.M., ROSENBERG, P.S., MILEY, W.J., KRONER, B.L. AND GOEDERT, J.J. (1996): Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Hemophilia Cohort Study. *Jama* **276**(2), 105-110.
- OGATA, H., BRADLEY, W.G., INABA, M., OGATA, N., IKEHARA, S. AND GOOD, R.A. (1995): Long-term repopulation of hematolymphoid cells with only a few hemopoietic stem cells in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Jun 20, **92**(13), 5945-5949.
- OGG, G.S., JIN, X., BONHOEFFER, S., DUNBAR, P.R., NOWAK, M.A., MONARD, S., SEGAL, J.P., CAO, Y., ROWLAND-JONES, S.L., CERUNDOLO, V., HURLEY, A., MARKOWITZ, M., HO, D.D., NIXON, D.F. AND MCMICHAEL, A.J. (1998): Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* Mar 27, **279**(5359), 2103-2106.
- OLDSTONE, M. (1994): The role of cytotoxic T-lymphocytes in infectious disease. In "Cytotoxic T-Lymphocytes in human viral and malaria infection" (M. Oldstone, Ed.), Vol. 189, Springer-Verlag, Berlin.
- OLSEN, J.C. AND SECHELSKI, J. (1995): Use of sodium butyrate to enhance production of retroviral vectors expressing CFTR cDNA. *Hum. Gene Ther.* **6**, 1195-202.
- ORY, D.S., NEUGEBOREN, B.A. AND MULLIGAN, R.C. (1996): A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Oct 15, **93**(21), 11400-11406.
- PAN, D. AND WHITLEY, C.B. (1999): Closed hollow-fiber bioreactor: a new approach to retroviral vector production. *J. Gene Med.* **1**, 433-440.
- PANTALEO, G. AND FAUCI, A.S. (1994): Tracking HIV during disease progression. *Curr. Opin. Immunol.* Aug **6**(4), 600-604.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., DEMAREST, J.F., COHEN, O.J., VACCAREZZA, M., GANTT, K., MURO-CACHO, C. AND FAUCI, A.S. (1994): Role of lymphoid organs in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Immunol. Rev.* Aug **140**, 105-130.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C. AND FAUCI, A.S. (1993a): The role of lymphoid organs in the immunopathogenesis of HIV infection. *AIDS* **7** Suppl 1, S19-S23.
- PANTALEO, G., GRAZIOSI, C. AND FAUCI, A.S. (1993b): New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* **328**, 327-335.
- PEAR, W.S., NOLAN, G.P., SCOTT, M.L. AND BALTIMORE, D. (1993): Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **90**, 8392-8396.
- PERELSON, A.S., ESSUNGER, P., CAO, Y., VESANEN, M., HURLEY, A. SAKSELA, K., MARKOWITZ, M. AND HO, D.D. (1997): Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**(6629), 188-191.
- PERELSON, A.S., NEUMANN, A.U., MARKOWITZ, M., LEONARD, J.M. AND HO, D.D. (1996): HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span and viral generation time. *Science* **271** (5255), 1582-1586.

PETERS, S.O., KITTLER, E.L.W., RAMSHAW, H.S. AND QUESENBERRY, P.J. (1996): *Ex vivo* expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11 and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* **87**, 30-37.

PHAM, L., YE, H., COSSET, F.L., RUSSELL, S.J. AND PENG, K.W. (2001): Concentration of viral vectors by co-precipitation with calcium phosphate. *J. Gene Med.* **3**(2), 188-194.

PIERDOMINICI, M., GIOVANNETTI, A., ENSOLI, F., MAZZETTA, F., MARZIALI, M., DE CRISTOFARO, M.R., SANTINI-MURATORI, D., LETI, W. AND AIUTI, F. (2002): Changes in CCR5 and CXCR4 expression and beta-chemokine production in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* Feb 1, **29**(2), 122-131.

PINTO, L.A., SULLIVAN, J., BERZOFSKY, J.A., CLERICI, M., KESSLER, H.A., LANDAY, A.L. AND SHEARER, G.M. (1995): ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids. *J. Clin. Inv.* **96**(2), 867-876.

PIZZATO, M., MERTEN, O.W., BLAIR, E.D. AND TAKEUCHI, Y. (2001): Development of a suspension packaging cell line for production of high titre, serum-resistant murine leukemia virus vectors. *Gene Ther.* **8**, 737-745.

POESCHLA, E., CORBEAU, P. AND WONG-STAAAL, F. (1996): Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Oct 15, **93**(21):11395-11399.

POLI, G., VICENZI, E., GHEZZI, S. AND LAZZARIN, A. (1995): Cytokines in the acquired immunodeficiency syndrome and other infectious diseases. *Int. J. Clin. Lab. Res.* **25**(3), 128-134.

POLI, G., KINTER, A.L., VICENZI, E. AND FAUCI, A.S. (1994): Cytokine regulation of acute and chronic HIV infection in vitro: from cell lines to primary mononuclear cells. *Res. Immunol.* Oct-Dec **145**(8-9), 578-582.

POLI, G., KINTER, A.L., JUSTEMENT, J.S., BRESSLER, P., KEHRL, J.H., FAUCI, A.S. (1991): Transforming growth factor beta suppresses human immunodeficiency virus expression and replication in infected cells of the monocyte/macrophage lineage. *J. Exp. Med.* Mar 1, **173**(3), 589-97.

POLLOK, K.E., HANENBERG, H., NOBLITT, T.W., SCHOEDER, W.L., KATO, I., EMANUEL, D. AND WILLIAMS, D.A. (1998): High-Efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J. Virol.* **72**, 4882-4892.

POLO, S., VEGLIA, F., MALNATI, M.S., GOBBI, C., FARCI, P., RAITERI, R., SINICCO, A. AND LUSSO, P. (1999): Longitudinal analysis of serum chemokine levels in the course of HIV-1 infection. *AIDS* Mar 11, **13**(4), 447-454.

POWDERLY, W.G. AND CARR, A. (2001): Clinical treatment. *AIDS* **15** Suppl 5, S159-60.

POWELL, J.D., BEDNARIK, D.P., FOLKS, T.M., JEHUDA-COHEN, T., VILLINGER, F., SELL, K.W. AND ANSARI, A.A. (1993): Inhibition of cellular activation of retroviral replication by CD8+ T-cells derived from non-human primates. *Clinical AND Experimental Immunology* **91**(3), 473-81.

PRESTON, B.D., POIESZ, B.J. AND LOEB, L.A. (1988): Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. *Science* **242**, 1168-1171.

QUINN, E.R., LUM, L.G. AND TREVOR, K.T. (1998). T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression. *Hum. Gene Ther.* **9**, 1457-1467.

REIMANN, K.A., LI, J.T., VEAZEY, R., HALLORAN, M., PARK, I.W., KARLSSON, G.B., SODROSKI, J. AND LETVIN, N.L. (1996): A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**(10), 6922-6928.

REIMANN, K.A., TENNER-RACZ, K., RACZ, P., MONTEFIORI, D.C., YASUTOMI, Y., LIN, W., RANSIL, B.J. AND LETVIN, N.L. (1994): Immunopathogenic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J. Virol.* **68**(4), 2362-2370.

RICHMAN, D.D. (2001): HIV chemotherapy. *Nature* Apr 19, **410**(6831), 995-1001

RIVIERE, Y., ROBERTSON, M.N. UND BUSEYNE, F. (1994): Cytotoxic T lymphocytes in human immunodeficiency virus infection: regular genes. *Current Topics In Microbiology And Immunology* **74**.

ROBINSON, H.L. (2002): New hope for an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* Apr **2**(4), 239-250.

ROBINSON, W.E. JR, GORNY, M.K., XU, J.Y., MITCHEL, L W.M. AND ZOLLA-PAZNER, S. (1991): Two immunodominant domains of gp41 bind antibodies which enhance human immunodeficiency virus type 1 infection in vitro. *J. Virol.* Aug **65**(8), 4169-4176.

ROEDERER, M. (1998): Getting to the HAART of T cell dynamics. *Nat. Med.* Feb **4**(2), 145-146.

SAFRIT, J.T., LEE, A.Y., ANDREWS, C.A., KOUP, R.A. (1994): A region of the third variable loop of HIV-1 gp120 is recognized by HLA-B7-restricted CTLs from two acute seroconversion patients. *J Immunol.* Oct 15, **153**(8), 3822-30.

SAIKI, R.K., SCHARF, S.J., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., EHRLICH, H.A. AND ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.

SCALA, E., D'OFFIZI, G., ROSSO, R., TURRIZIAN, I O., FERRARA, R., MAZZONE, A.M., ANTONELLI, G., AIUTI, F. AND PAGANELLI, R. (1997): C-C chemokines, IL-16, and soluble antiviral factor activity are increased in cloned T cells from subjects with long-term nonprogressive HIV infection. *J. Immunol.* May 1, **158**(9), 4485-4492.

SCHNIERLE, B.S., STITZ, J., BOSCH, V., NOCKEN, F., MERGET-MILLITZER, H., ENGELSTÄDTER, M., KURTH, R. AND CICHUTEK, K. (1997): Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 8640-8645.

SHARMA, S., CANTWELL, M., KIPPS, T.J. AND FRIEDMANN, T. (1996): Efficient infection of a human T-cell line and of human primary peripheral blood leukocytes with a pseudotyped retrovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* Oct 15, 93(21), 11842-11847.

SHAW, G.M., HARPER, M.E., HAHN, B.H., EPSTEIN, L.G., GAJDUSEK, D.C., PRICE, R.W., NAVIA, B.A., PETITO, C.K., O'HARA, C.J., GROOPMAN, J.E. ET AL. (1985): HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. *Science* **227**, 177-182.

SIMON, F., MAUCLERE, P., ROQUES, P., LOUSSERT-AJAKA, I., MUELLER-TRUTWIN, M.C., SARAGOSTI, S., GEORGES-COURBOT, M.C., BARRE-SINOUSSE, F. AND BRUNBRUN-VEZINET, F. (1998): Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Medicine* **4**(9), 1032-1037.

SISSONS, J.G. AND OLDSTONE, M.B. (1980): Antibody mediated destruction of virus-infected cells. *Adv. Immunol.* **29**, 209-260.

SISSONS, J.G. AND OLDSTONE, M.B. (1980): Antibody-mediated destruction of virus-infected cells. *Adv. Immunol.* **29**, 209-260.

SMITH, C., LEE, S.W., WONG, E., GALLARDO, H., PAGE, K., GASPAR, O., LEBKOWSKI, J. AND GILBOA, E. (1996): Transient protection of human T-cells from human immunodeficiency virus type 1 infection by transduction with adeno-associated viral vectors which express RNA decoys. *Antiviral Res.* Oct **32**(2), 99-115.

SONEAKA, Y., CANNON, P.M., RAMSDALE, E.E., GRIFFITH, J.C., ROMANO, G., KINGSMAN, S.M. AND KINGSMAN, A.J. (1995): A transient three plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucl. Acids Res.* **23**, 628-633.

SONG, W., KONG, H.L., TRAKTMAN, P. AND CRYSTAL, R.G. (1997): Cytotoxic T lymphocyte responses to proteins encoded by heterologous transgenes transferred in vivo by adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* Jul 1, **8**(10), 1207-1217.

SONG, W., KONG, H.L., CARPENTER, H., TORII, H., GRANSTEIN, R., RAFII, S., MOORE, M.A. AND CRYSTAL, R.G. (1997): Dendritic cells genetically modified with an adenovirus vector encoding the cDNA for a model antigen induce protective and therapeutic antitumor immunity. *J. Exp. Med.* Oct 20, **186**(8), 1247-1256.

SPEAR, G.T., LANDAY, A.L., SULLIVA, B. L., DITTEL, B. AND LINT, T.F. (1990): Activation of complement on the surface of cells infected by human immunodeficiency virus. *J. Immunol.* **144**, 1490-1496.

STEIDL, S. (2001): Entwicklung und Charakterisierung sicherer CD4-spezifischer retroviraler Vektoren des Typs [MLV(SIVagm)] für die Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt

STEVENSON, M., STANWICK, T.L., DEMPSEY, M.P. AND LAMONICA, C.A. (1990): HIV-1 replication is controlled at the level of T cell activation and proviral integration. *EMBO J.* **9**, 1551-1560.

STOIBER, H., CLIVIO, A. AND DIERICH, M.P. (1997): Role of complement in HIV infection. *Ann. Review of Immunology* **74**, 153-155.

SULLIVAN, B.L., KNOPOFF, E.J., SAIFUDDIN, M., TAKEFMAN, D.M., SAARLOOS, M.N., SHA, B.E. AND SPEAR, G.T. (1996): Susceptibility of HIV-1 plasma virus to complement-mediated lysis. Evidence for a role in clearance of virus in vivo. *J. Immunol.* **157**(4), 1791-1798.

TARTAKOVSKY, B., TURNER, D., VARDINON, N., BURKE, M. AND YUST, I. (1999): Increased intracellular accumulation of macrophage inflammatory protein 1beta and its decreased secretion correlate with advanced HIV disease. *J. Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* Apr 15, **20**(5), 420-2.

TILLING, R., KINLOCH, S., GOH, L.E., COOPER, D., PERRIN, L., LAMPE, F., ZAUNDERS, J., HOEN, B., TSOUKAS, C., ANDERSSON, J. AND JANOSSY, G. (2002): Parallel decline of CD8+/CD38++ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS* Mar 8, **16**(4), 589-596.

TINDALL, B. AND COOPER, D.A. (1991): Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* **5**, 1-14.

TOWBIN, H., STAEBLIN, T. AND GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

UGEN, K.E., NYLAND, S.B., BOYER, J.D., VIDAL, C., LERA, L., RASHEID, S., CHATTERGOON, M., BAGARAZZI, M.L., CICCARELLI, R., HIGGINS, T., BAINE, Y., GINSBERG, R., MACGREGO, R.R. AND WEINER, D.B. (1998): DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* Nov **16**(19), 1818-1821.

UNUTMAZ, D., KEWALRAMANI, V.N. AND LITTMAN, D.R. (1998): G protein-coupled receptors in HIV and SIV entry: new perspectives on lentivirus-host interactions and on the utility of animal models. *Semin. Immunol.* **10**, 225-236.

WALKER, B.D. AND PLATA, F. (1990): Cytotoxic T-lymphocytes against HIV. *AIDS* **4**, 177-184.

WATTS, C. AND POWIS, S. (1999): Pathways of antigen processing and presentation. *Rev Immunogenet.* **1**(1), 60-74.

WEI, X., GHOSH, S.K., TAYLOR, M.E., JOHNSON, V.A., EMINI, E.A., DEUTSCH, P., LIFSON, J.D., BONHOEFFER, S., NOWAK, M.A., HAHN, B.H. AND SHAW, G.M. (1995): Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* **373**, 117-122.

WEISS, L., SI-MOHAMED, A., GIRAL, P., CASTIEL, P., LEDUR, A., BLONDIN, C., KAZATCHKINE, M.D. AND HAEFFNER-CAVAILLON, N. (1997): Plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 but not those of macrophage inhibitory protein-1 α and RANTES correlate with virus load in human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* Dec **176**(6), 1621-1624.

WEISSENHORN, W., DESSEN, A., HARRISON, S.C., SKEHEL, J.J. AND WILEY, D.C. (1997): Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-430.

WEISSMAN, D., POLI, G. AND FAUCI, A.S. (1994): Interleukin 10 blocks HIV replication in macrophages by inhibiting the autocrine loop of tumor necrosis factor α and interleukin 6 induction of virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* Oct **10**(10), 1199-1206.

WILK, T., PFEIFFER, T. AND BOSCH, V. (1992): Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product. *Virology* **189**, 167-177.

WONG-STAAAL, F., POESCHLA, E. M. AND LOONEY, D. J. (1998): A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum. Gene Ther.* **9**(16), 2407-2425.

WU, L., GERARD, N.P., WYATT, R., CHOE, H., PAROLIN, C., RUFFING, N., BORSETTI, A., CARDOSO, A.A., DESJARDIN, E., NEWMAN, W., GERARD, C. AND SODROSKI, J. (1996): CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**, 179-183.

XIAO, L., RUDOLPH, D.L., OWEN, S.M., SPIRA, T.J. AND LAL, R.B. (1998): Adaptation to promiscuous usage of CC and CXCR4-chemokine coreceptors in-vivo correlates with HIV-1 disease progression. *AIDS* **12**, F137-F143.

XIN, K.Q., URABE, M., YANG, J., NOMIYAMA, K., MIZUKAMI, H., HAMAJIMA, K., NOMIYAMA, H., SAITO, T., IMAI, M., MONAHAN, J., OKUDA, K., OZAWA, K. AND OKUDA, K.A. (2001): Novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* Jun 10, **12**(9), 1047-1061.

YAGITA, H., NAKATA, M., KAWASAKI, A., SHINKAI, Y. AND OKUMURA, K. (1992): Role of perforin in lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Adv. Immunol.* **51**, 215-242.

YANG, O.O., KALAMS, S.A., ROSENZWEIG, M., TROCHA, A., JONES, N., KOZIEL, M., WALKER, B.D. AND JOHNSTON, R.P. (1996): Efficient lysis of human immunodeficiency virus type 1-infected cells by cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **70**(9), 5799-5806.

YASUTOMI, Y., KOENIG, S., HAUN, S.S., STOVER, C.K., JACKSON, R.K., CONARD, P., CONLEY, A.J., EMINI, E.A., FUERST, T.R. AND LETVIN, N.L. (1993): Immunization with recombinant BCG-SIV elicits SIV-specific cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys. *J. Immunol.* Apr 1, **150**(7), 3101-7.

YEE, J.K., FRIEDMANN, T. AND BURNS, J.C. (1994): Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* **43** Pt A, 99-112.

ZANUSSI, S., D'ANDREA, M., SIMONELLI, C., TIRELLI, U. AND DE PAOLO, P. (1996): Serum levels of RANTES and MIP-1 β in HIV-positive long-term survivors and progressor patients. *AIDS* **10**, 1431-1432.

ZHANG, Z.Q., NOTERMAN, D.W., SEDGEWICK, G., CAVERT, W., WIETGREFFE, S., ZUPANCIC, M., GEBHARD, K., HENRY, K., BOIES, L., CHEN, Z., JENKINS, M., MILLS, R., MCDADE, H., GOODWIN, C. SCHUWIRTH, C.M., DANNER, S.A. AND A.T. HAASE (1998): Kinetics of CD4⁺ T cell repopulation of lymphoid tissues after treatment of HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 1154-1159.

ZINKERNAGEL, R.M. (1994): The role of antigen in maintaining T cell memory. *Dev. Biol. Stand.* **82**, 189-191.

ZHOU P, GOLDSTEIN S, DEVADAS K, TEWARI D, NOTKINS AL. (1997): Human CD4+ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nat Med.* Jun;3(6):659-64.

ZHOU, P., DEVADAS, K., TEWARI, D., JEGOROW, A. AND NOTKINS, A.L. (1999): Processing, secretion, and anti-HIV-1 activity of IL-16 with or without a signal peptide in CD4+ T cells. *J Immunol.* Jul 15, **163**(2), 906-12.

7 Abkürzungsverzeichnis

AGM	Afrikanische Grüne Meerkatze
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
aMLV	amphotropes Murines Leukämie Virus
bp	Basenpaare
CA	Kapsid
CD	Cluster of Differentiation; Oberflächenantigene
CDC	Center for Disease Control
CIP	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte
CCR5	Rezeptor des fünften CC-Chemokins
CXCR4	Rezeptor des vierten CXC-Chemokins
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Ribonukleosid-Triphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>env</i>	retrovirales Strukturgen für die Hüllproteine TM und SU kodierend
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting; Analytische Durchflußzytometrie
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>gag</i>	retrovirales Strukturgen für das Virion kodierend
GFP	Green Fluorescent Proteine
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hu	human
i.E.	infektiöse Einheit
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
IN	Integrase
IPA	Immunperoxidase-Assay
IRES	Internal Ribosome Entry Site
kDa	Kilodalton

LB	Luria Bertani-Medium
LNGFR	Low Affinity Nerve Growth Factor Receptor
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrixprotein
MACS	Magnetic Cell Sorting
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MLV	Murines Leukämie Virus
moi	Multiplicity Of Infection
mRNA	Messenger-RNA
MSCV	Mouse Stem Cell Virus
NC	Nucleocapsid-Protein
OD	optische Dichte
OPD	o-Phenylendiamin
p.A.	post Applikation
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin
PI	Propidium-Iodid
<i>pol</i>	retrovirales Gen für die viralen Enzyme kodierend
PR	Protease
p.T.	post Transduktion
r	rekombinant
RANTES	Regulated-upon-Activation Normal T cell Expressed and Secreted
Rev	Regulator of Expression of Virion proteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium aus dem "Roswell Park Memorial Institute"
RRE	Rev-Responsive Element
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
SA	Splice-Akzeptor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SD	Splice-Donor

SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SHIV	Simian-Human Immunodeficiency Virus
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
SU	Surface; Oberflächenhüllprotein
TAR	Trans-Activation Region
Tat	Trans-activator of transcription
TM	Transmembranprotein
Tr	Trunkierung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit; Einheit der Enzymaktivität
üN	über Nacht
Vol	Volumen
VPCL	Vector Packaging Cell Line
VSV	Vesikuläres Stomatitis-Virus

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, für die sehr angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre sowie für die wissenschaftliche Anleitung und ständige Diskussionsbereitschaft bei der Durchführung dieser Arbeit, die in seiner Arbeitsgruppe „Medizinische Biotechnologie“ entstand.

Für die freundliche fachübergreifende Betreuung danke ich Frau Prof. Dr. Starzinski-Powitz vom Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Egbert Flory für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit und für seine engagierte und hilfsbereite Art, mit der er mir stets zur Seite stand.

Frau Dr. Bettina Gröschel und Dr. Anne Spielhofen (Institut für medizinische Virologie, Universitätsklinikum der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main) möchte ich für die Zusammenarbeit während der Durchführung der klinischen Studie danken.

Herrn Dr. Steve Norley und Herrn Dipl. Biol. Erik Seibold möchte ich für die Bereitstellung eines kurzzeitigen Arbeitsplatzes am Robert-Koch-Institut in Berlin und der Möglichkeit zur Durchführung des ELIspot-Assays danken.

Bei Herrn Dr. Cheick Coulibaly, Dr. Edgar Holznagel und Dr. Roland Plesker möchte ich mich für die Zusammenarbeit und Durchführung der Immunisierungen bedanken.

Allen ehemaligen und jetzigen Kollegen der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ ein großes Dankeschön für die technische Unterstützung im Labor, für die fachlichen Diskussionen sowie für die Kollegialität und den Humor, die den Laboralltag stets begleiteten. Danke an: Maria Bobkova, PD Dr. Christian Buchholz, Dr. Martin Engelstädter, Sabine Fengler, Carsten Finger, Irene Hartl, Matthias Hamdorf, Dörte Kahlenberg, Tanja Kearns, Yulyia Medwedowska, Christoph Merten, Heide Muckenfuß, Michael Mühlebach, Dr. Peter Müller, Sylvia Raupp, Dr. Ralf Sanzenbacher, Isabel Schmitt, Richard Schneider, Manuela Schütze, PD Dr. Matthias Schweizer, Dipl. Ing. Martin Selbert, Dr. Steffi Steidl, Dr. Yuansheng Sun, Uli Tschulena, Dr. Jörn Stitz, Bernhard Völker, Renate Wenig und Nina Wolfrum.

Ein besonderer Dank geht an Dr. Renate König, die mir über den Laboralltag hinaus mit Rat und Tat stets zur Seite stand und die mir immer wieder Mut machte, dass alles gut wird. Ein besonderes Dankeschön auch an Dr. Jörn Stitz für die wertvollen Diskussionen sowie für die technische und mentale Unterstützung, auf die ich mich während der letzten dreieinhalb Jahre immer verlassen konnte.

Ein großes Dankeschön an Frank Esbach und Andreas Reuter für die letzten Korrekturen und wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung das Biologie-Studium und die anschließende Promotion nicht möglich gewesen wäre sowie meinen Freunden, auf deren Hilfe und Unterstützung ich mich während meines Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit stets verlassen konnte. Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht entstanden.

9 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Jeanette Neumann
Geburtsdatum: 20.08.1971
Geburtsort: Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

- 01 / 1999 - dato **Doktorarbeit**
Paul-Ehrlich-Institut, Langen
Abt. Medizinische Biotechnologie
Leitung: Prof. Dr. K. Cichutek
Titel: Analyse von Surrogatmarkern zur Beurteilung der Effizienz der antiretroviralen Kombinationstherapie bei HIV (HAART) und Entwicklung einer neuen HIV-Immunisierungsstrategie mittels [MLV(SHIV)]-Pseudotypvektoren
- 08 / 1998 **Diplom**
Diplom-Biologin Univ., Gesamtnote „sehr gut“
- 10 / 1997 - 08 / 1998 **Diplomarbeit**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Abt. Molekularendokrinologie der Klinik I im Zentrum der Inneren Medizin
Leitung: Prof. Dr. Badenhoop
Titel: Genomische Organisation von retroviralen Elementen in der HLA-Region und ihre Bedeutung für den Typ-1-Diabetes
- 10 / 1992 - 09 / 1997 **Studium der Biologie**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Schwerpunkte: Humangenetik/Anthropologie, Mikrobiologie, Pharmakologie
- 10 / 1991 - 10 / 1993 **Studium der Geographie**
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
- 06 / 1991 **Abitur (Allgemeine Hochschulreife)**
Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt am Main