

**Institut für Virologie der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. V. Erfle)**

**Entwicklung einer auf dem Durchflusszytometer
beruhenden Methode zur Messung Vaccinia Virus-
spezifischer neutralisierender Antikörper und Anwendung
in einer klinischen Studie an HIV-positiven Patienten**

Silja Bühler

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.**

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:

- 1. Univ.- Prof. V. Erfle**
- 2. Univ.- Prof. Dr. H. Schätzl**
- 3. apl. Prof. Dr. H. Hofmann**

**Die Dissertation wurde am 12.01.2006 bei der Technischen Universität
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007
angenommen.**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen meinen Dank aussprechen, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Erfle bedanken, der die Möglichkeit geschaffen hat, in seinen Instituten für Virologie, TU München, und dem Institut für Molekulare Virologie, gsf, diese Studien durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Antonio Cosma. Herr Dr. Cosma hat das Thema zu dieser Studie bereitgestellt und das Gelingen dieses Projektes durch seine ständige Anleitung, wertvolle Anregungen, Kritik, Begutachtung und Zeit unterstützt.

Rashmi Nagaraj danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Für das Impfen der Mäuse möchte ich mich bei Denise Boulanger bedanken.

Für Korrekturen, fachlich-konstruktive und auch freundschaftlich unterstützende Gespräche im Laufe der Dissertation möchte ich mich bei Florian Bujok, Peter Clauer, Kleonicki Daoula, Ute Finkel, Frank Großmann, Kirsten Kilchert, Michael Lehmann, Ronny Ljapoci, Yasemin Süzer und Uwe Tränkler bedanken.

Ganz besonders herzlich danke ich all meinen Lieben, meinen lieben Eltern und guten Freunden, ohne die nicht nur diese Promotionsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

München, 30. Dezember 2005

Silja Bühler

Abkürzungen

AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome
APZ	Antigen präsentierende Zelle
BMS	Basal Medium Supplement
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Cytotoxic T-Lymphocytes (Zytotoxische T-Lymphozyten)
DC	Dendritic Cells (Dendritische Zellen)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometer)
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
Gfp	Green fluorescence protein (Grün fluoreszierendes Protein)
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
Hi	Hitzeinaktiviert
IC50	Inhibitory Concentration 50 (50%ige inhibitorische Konzentration)
IFN- γ	Interferon Gamma
IU	Infectious Units (Infektiöse Einheiten)
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
MVA	Modified Vaccinia Virus Ankara

NYVAC	New York Vaccinia Virus
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque Forming Unit (Plaque bildende Einheit)
PRNT	Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test
SIV	Simian Immunodeficiency Virus
TNF	Tumornekrosefaktor
VIG	Vaccinia Immune Globulin

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	
Abkürzungen	2
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
<hr/>	
1.1 Ziele, wesentliche Ergebnisse und Gang der Arbeit	7
1.2 Pocken	10
1.2.1 Impfung gegen Pocken	12
1.2.2 Pocken-Viren als Vektoren	15
1.2.3 Bioterrorismus	17
1.3 Modified Vaccinia Virus Ankara – MVA	18
1.3.1 Abstammung	18
1.3.2 Sicherheit	19
1.3.3 Immunogenität	19
1.3.4 Anwendung als Vektor	20
1.4 AIDS	21
1.4.1 Geschichte und Entwicklung	21
1.4.2 HIV	22
1.4.3 Bisherige Therapiemöglichkeiten	23
1.4.4 Impfstoffentwicklung gegen HIV	23
1.4.5 Vektoren in der HIV-Impfstoffentwicklung	26
1.5 Immunsystem	28
1.5.1 Angeborenes Immunsystem	28
1.5.2 Erworbenes Immunsystem	28

1.6	Überwachung der humoralen Immunantwort nach einer Pockenimpfung	33
-----	---	----

2 Materialien und Methoden **35**

2.1	Kulturmedien	35
2.2	Aufreinigung von PBMC	35
2.3	Abgrenzung lebender von toten Zellen	36
2.4	EBV-Klone	36
2.5	Anti-Vaccinia Virus Immunglobulin (VIG)	37
2.6	Patienten und Impfplan	37
2.7	Mäuse	39
2.8	MVA-Präparation	39
2.8.1	CEF-Zellen	39
2.8.2	CEF-Infektion mit MVA- <i>gfp</i>	40
2.8.3	Aufreinigung des Vaccinia Virus MVA	40
2.8.4	Titration von MVA	41
2.9	MVA-Neutralisationstest	42

3 Ergebnisse **47**

3.1	Entwicklung des MVA-Neutralisationstests	47
3.1.1	Prinzip des MVA-Neutralisationstests	47
3.1.2	Differenzierung von toten und lebenden Zellen	50
3.1.3	Berechnung der prozentualen Neutralisation	52
3.1.4	Beziehung zwischen MVA- <i>gfp</i> -Konzentration und Anzahl der <i>gfp</i> -exprimierenden Zellen	53
3.1.4.1	MVA-Titration	53
3.1.4.2	Festlegung der optimalen MVA- <i>gfp</i> -Konzentration im Neutralisationstest	55

3.2	Überprüfung des MVA-Neutralisationstests	56
3.2.1	Messung neutralisierender Antikörper im Kaninchenserum	56
3.2.2	Schätzung des linearen Zusammenhangs zwischen Neutralisation und Verdünnung	57
3.2.3	Messung neutralisierender Antikörper im Mäuseserum	60
3.2.4	Messung neutralisierender Antikörper im menschlichen Plasma	61
3.2.5	Vergleich des MVA-Neutralisationstests mit Standard PRNTs	63
3.3	Einsatz des MVA-Neutralisationstests in einer klinischen Studie an HIV-positiven Individuen	65
3.3.1	Sicherheit der MVA- <i>nef</i> -Vakzine	67
3.3.2	Immunogenität von MVA: Verteilung der Neutralisation bei den einzelnen Patienten	68
3.3.3	Stichprobenanalyse unter Verwendung der ‚Area under the curve‘ (AUC) – Methode	69
3.3.4	Analyse der ‚Area under the curve‘ (AUC) für jeden einzelnen Patienten	72
4	Diskussion	75
5	Zusammenfassung	89
6	Internet-Seiten	91
7	Literaturverzeichnis	92
8	Veröffentlichungen	102

1 Einleitung

1.1 Ziele, wesentliche Ergebnisse und Gang der Arbeit

Pocken gelten aufgrund einer breit angelegten Impfkampagne als erste ausgerottete Infektionskrankheit. Bei dieser Kampagne wurde im Wesentlichen Vaccinia Virus zur Impfung verwendet. Aufgrund ernstzunehmender bioterroristischer Drohungen wird die Wiederaufnahme von Impfungen gegen Pocken erneut diskutiert. Einen wesentlichen Diskussionspunkt bilden hierbei die potentiell schweren Nebenwirkungen des Vaccinia Virus.

Bei Impfungen stellt die Überprüfung deren Wirksamkeit einen zentralen Aspekt dar. Als Kontrollinstrument erlangten dabei Neutralisationstests eine besondere Bedeutung. Im Falle des Vaccinia Virus werden neutralisierende Antikörper mit Hilfe des Plaque-Reduktions-Neutralisations-Tests (PRNT) gemessen. Dieser Test ist jedoch mit erheblichen Nachteilen verbunden. Er stellt eine sehr arbeitsaufwendige und zeitintensive Methode dar, basiert auf einer subjektiven Auswertung und erfordert ein gefahrenbelastetes Arbeiten mit in Säugetierzellen replikationsfähigen Vaccinia Viren.

Die vorliegende Arbeit verfolgt **zwei Zielsetzungen**. Erstens soll ein neuer Neutralisationstest entwickelt werden, der die oben skizzierten Nachteile des PRNT weitgehend vermeidet. Zweitens soll im Rahmen einer klinischen Studie untersucht werden, ob unter Verwendung dieses Tests die Wirksamkeit von Impfungen effizient und präzise bestimmt werden kann.

Das **erste Ziel** wurde durch die **Entwicklung und Überprüfung** eines auf dem Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) basierenden Neutralisationstests erreicht. Dabei wird ausgenutzt, dass MVA das Grün Fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert.

Der Test beruht auf der Messung der grünen Fluoreszenz des *Aequorea victoria gfp* Genprodukts in Zellen, die mit MVA-*gfp* infiziert werden.

Im Einzelnen werden bei dem neu entwickelten MVA-Neutralisationstest die zu untersuchenden Serum- bzw. Plasmaproben mit standardisierten Mengen an MVA-*gfp* inkubiert und anschließend Zielzellen hinzugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht lässt sich die MVA-*gfp*-Expression mit Hilfe des Durchflusszytometers für jede einzelne Zelle bestimmen. Hierbei kann jede Zelle über die grüne Fluoreszenz als infiziert oder nicht infiziert identifiziert werden. Je mehr Zellen infiziert sind, desto geringer war die Menge an Antikörpern in der Probe, die MVA neutralisieren konnte. Wichtig ist, dass der Einsatz des Durchflusszytometers eine objektive Auswertung erlaubt und zudem den Vorteil bietet, große Probenmengen schnell und genau auswerten zu können.

Beim MVA-Neutralisationstest handelt es sich um eine schnelle und sensitive Methode. Dieser Test bietet somit die Möglichkeit, die humorale Immunantwort und letztendlich die Effektivität großer Impfkampagnen gegen Pocken zu überwachen.

Ferner liegen die Sicherheitsvorkehrungen bei der Durchführung des MVA-Neutralisationstests deutlich niedriger als beim klassischen PRNT, da MVA in den meisten Säugetierzellen nicht repliziert.

Im Mittelpunkt der Überprüfung des MVA-Neutralisationstests stand die Frage, ob mit diesem Test die Höhe des Plasma- oder Serumspiegels an neutralisierenden Antikörpern verlässlich zu bestimmen ist. Der Test wurde getrennt für Serum- bzw. Plasmaproben von Kaninchen, Mäusen und Menschen durchgeführt. Für die Analyse wurde jede der drei Stichproben zusätzlich in zwei Teilstichproben zerlegt, wobei in einer Teilstichprobe die Komplementfaktoren durch Erhitzen inaktiviert wurden. Zusätzlich erfolgte für Serum- bzw. Plasmaproben von Mäusen und Menschen eine Unterteilung der Teilstichproben danach, ob früher eine Pockenimpfung erfolgte. Als wesentliches Ergebnis kann festgehalten werden, dass der MVA-Neutralisationstest verlässlich zum Nachweis der Existenz Vaccinia-spezifischer neutralisierender Antikörper und zur Messung deren Neutralisationsaktivität geeignet ist. So zeigte es sich, dass bei hitzeinaktivierten Serum- bzw. Plasmaproben ein genauer Nachweis von Antikörpern in Abhängigkeit von einer früheren Impfung möglich ist. Dagegen zeigte sich bei nicht hitzeinaktivierten Proben, dass beim Menschen das Komplement einen wesentlichen Einfluss auf den Neutralisierungsgrad besitzt, bei den tierischen Proben jedoch nicht.

Bei einem Vergleich des MVA-Neutralisationstests mit dem klassischen PRNT ergab sich, dass der MVA-Neutralisationstest eine vergleichbare Sensitivität bezüglich der Messung Vaccinia Virus-spezifischer neutralisierender Antikörper aufweist.

Zur Erreichung des **zweiten Ziels** wurde der MVA-Neutralisationstest in einer klinischen Studie zur Untersuchung neutralisierender Antikörper im menschlichen Plasma angewandt. Hierbei wurden zehn chronisch HIV-infizierte Personen unter der Verwendung von MVA als Vektor dreimal mit dem HIV-Protein Nef geimpft. Mit dem neu entwickelten Test wurde die Immunantwort auf den Vektor MVA untersucht. In einer Parallelstudie erfolgte darüber hinaus die Messung der zellulären Immunreaktionen auf das Nef-Protein. Dadurch konnte eine Beziehung zwischen den Immunantworten auf den MVA-Vektor und das exprimierte Protein bestimmt werden.

Als wichtigste Ergebnisse können genannt werden: Bereits nach der ersten Impfung ließ sich ein deutlicher Anstieg der Vaccinia-neutralisierenden Antikörper feststellen. Die durchschnittliche Neutralisationsfähigkeit wurde durch die zweite Impfung noch stark erhöht. Die dritte Impfung führte zu einer weiteren Steigerung gegenüber den ersten beiden Impfungen. Es stellte sich heraus, dass bei Patienten ohne vorherige Pockenimpfung, also ohne Vorsensibilisierung auf MVA, die Immunantwort gegen das HIV-Protein sehr viel stärker ausfiel als bei geimpften Personen. Die Vaccinia-spezifische Immunantwort fiel dagegen bei nicht gegen Pocken geimpften Patienten geringer aus als bei geimpften.

Die Arbeit ist wie folgt aufgebaut. Nach der Darstellung der Ziele und der wichtigsten Ergebnisse wird im einleitenden Kapitel der Kontext für die darauf folgenden Analysen entwickelt. Hierzu erfolgt eine kurze Präsentation von Fakten zur Pockenimpfung und der Überwachung der Immunantwort auf diese Impfung. Ferner werden die Eigenschaften von MVA und die Impfstoffentwicklung gegen HIV kurz dargestellt.

Im zweiten Kapitel erfolgt die Beschreibung der eingesetzten Materialien und eine prinzipielle Darstellung des MVA-Neutralisationstests. Den Kern der Arbeit bildet das Kapitel 3. In diesem Kapitel wird der neue MVA-Neutralisationstest detailliert beschrieben. Ferner werden die Ergebnisse seiner Überprüfung mit Hilfe von Kaninchen, Mäuse- und menschlichen Serum- bzw. Plasmaproben und seine

Anwendung in einer klinischen Studie an HIV-positiven Patienten präsentiert. Kapitel 4 ist der Diskussion der Ergebnisse sowie einem Ausblick auf die Verbesserungs- und zukünftigen Einsatzmöglichkeiten des MVA-Neutralsisationstests und des MVA-Vektors bei Impfungen gewidmet. Die Arbeit schließt mit einer Zusammenfassung.

1.2 Pocken

Nach indischen Quellen traten die Pocken mehr als 1000 Jahre v. Chr. in China und Indien auf. In Arabien wurden die Pocken um 370 v. Chr. zum ersten mal beschrieben und in Europa fällt die erste gesicherte Epidemie ins 6. Jahrhundert n.Chr. Im 13. Jhd. n.Chr. traten die Pocken in England, Ende des 15. Jhds. n.Chr. in Deutschland auf. Wenig später wurden auch in Amerika Pockenerkrankungen verzeichnet.

Die Pocken forderten jährlich hunderttausende Todesopfer und stellten somit einen Hauptgrund für den geringen Bevölkerungszuwachs dar. Der letzte große Ausbruch fand in Deutschland in den Jahren 1871-1873 statt und war auf den abnehmenden Impfschutz zurückzuführen. In diesen Jahren wurden 175.000 Erkrankungen und mehr als 100.000 Todesfälle gemeldet. Danach fanden größere Epidemien nur noch in Ländern mit niedrigen Hygienestandards statt.

Pocken sind eine schwere, ansteckende und manchmal tödlich endende Infektionskrankheit. Sie kommen in zwei Hauptvarianten vor: Variola major und minor. Beide Formen zeigen ein ähnliches Krankheitsbild, wobei Variola major sehr viel schwerer als Variola minor verläuft und eine Letalität von bis zu 30% aufweist. Variola minor verläuft nur in ca. 1% tödlich. Man unterscheidet zwei weitere schwere Unterformen, die malignen und die hämorrhagischen Pocken. Dabei handelt es sich um seltene aber fast immer tödlich verlaufende Formen.

Die mittlere Inkubationszeit nach Infektion mit dem Pockenvirus liegt bei 12 – 14 Tagen. Dieser folgt eine Phase mit grippeähnlicher Symptomatik: Kopfschmerzen, Fieber, Erschöpfung und starken Rückenschmerzen. Nach 2 – 3 Tagen fällt die Temperatur und der Patient fühlt sich besser. Zu diesem Zeitpunkt erscheint der typische Hautausschlag, beginnend im Gesicht und an den Extremitäten, der sich über den Körperstamm ausbreitet.

Auch im Mund- und Nasenraum entwickeln sich Läsionen, aus denen große Virusmengen freigesetzt werden. Der Hauptübertragungsweg ist somit die Tröpfcheninfektion. Die erkrankte Person ist vor allem in der ersten Woche nach Auftreten des Ausschlags infektiös, weil zu dieser Zeit das Virus durch den Respirationstrakt freigesetzt wird. Die Infektiosität bleibt jedoch so lange bestehen, bis die letzten Krusten abgefallen sind.

Das Pockenvirus ist umweltstabil und kann über mehrere Stunden infektiös bleiben.

Nach Exposition mit dem Pockenvirus ist es möglich, bis zu vier Tage lang vor Auftreten des Hautausschlags zu impfen, um die Erkrankung zu verhindern oder abzuschwächen.

Das Virus infiziert somit den Menschen über den Respirationstrakt und siedelt sich hier zunächst in der Mukosa an, um dann in die regionalen Lymphknoten zu wandern. Hier findet eine erste Replikation statt. Anschließend streut das Virus hämatogen und infiziert das Makrophagen/Phagozytensystem von Leber, Lunge, Milz und Knochenmark. In einer zweiten virämischen Phase gelangen die Viren in die Haut und Schleimhäute.

Infizierte Makrophagen wandern zu den Lymphknoten und induzieren die Produktion von B- und T-Zellen. Dadurch kommt die Ausdehnung der Infektion zum Stillstand.

Die humorale Immunantwort beginnt im Normalfall in der ersten Woche nach Infektion in Form von neutralisierenden Antikörpern mit der Abwehr der Pockenviren.



Abb. 1. Das klinische Bild der Pockenerkrankung (Internet-Seite 6)

Die Erreger der Menschenpocken, das Variolavirus, gehört zur Gruppe der Orthopoxviren, die zur Familie der Poxviridae gerechnet wird. Die Orthopoxviren umfassen zudem das Vaccinia Virus und acht weitere Viren, die für Tierpockenerkrankungen verantwortlich sind. Innerhalb dieser Gruppe kann man mit den Viren kreuzweise immunisieren, da sie zum gleichen Serotyp gehören.

Das virale Genom besteht aus einer einzelnen linearen doppelsträngigen DNA (dsDNA) mit 130.000 – 300.000 Basenpaaren. Das Virus ist in der Lage, sich mit Hilfe der viralen Transkriptionsmaschinerie im Zytoplasma der Wirtszellen zu vermehren.

1.2.1 Impfung gegen Pocken

Die Geschichte der Impfungen gegen das Pockenvirus, die zuletzt zu dessen Ausrottung führte, ist lang. Bereits 430 v. Chr. beschrieb Thukydides, dass man an Pocken niemals zweimal erkrankte.

Variolation. Traditionell übertrug man Sekret von abheilenden Pusteln auf gesunde Menschen, um eine milde Form der Infektion zu erzeugen und somit Schutz vor einer späteren, womöglich wesentlich schwereren Pockenerkrankung herzustellen. Es wurden getrocknete Krusten in die Nase geblasen oder eine wässrige Lösung von Pockenkrusten in die Haut injiziert. Diese Techniken werden als Variolation bezeichnet. Das Verfahren soll von Indien, China oder Persien über Konstantinopel nach Europa gekommen sein, wo es während des 17. Jahrhunderts eingeführt wurde.

Es bestand ein erhebliches Risiko durch den geimpften Pockeneiter ernsthaft zu erkranken. Man versuchte die Virulenz des Pockenmaterials durch bewährte Mittel wie Moschus und Kampfer oder über eine Behandlung mit Hitze, Kälte, Licht oder durch Trocknen, Faulen, Altern bzw. Verdünnung abzuschwächen (36).

Beginn der Vakzinationsära. In der zweiten Hälfte des 18. Jahrhunderts machte man die Beobachtung, dass Milchmägde und –knechte, die sich beim Melken mit Kuhpocken infiziert und diese leichte Form der Erkrankung ohne große Schäden

überstanden hatten, während Pockenepidemien nicht erkrankten. Man schloss daraus, dass der bislang aus Menschenpocken gewonnene Impfstoff auch aus Kuhpocken gewonnen werden konnte.

Im Jahr 1776 impfte der englische Landarzt Edward Jenner (1749-1823) den 8-jährigen Jungen James Phipps mit einem Kuhpockenvirus, das er aus Läsionen der Milchmagd Sarah Nelmes gewonnen hatte. Nach einer anschließenden Exposition mit Variola-Virus erkrankte der Junge nicht. Diese Beobachtung stellt den Beginn des Vakzinationszeitalters (L. vacca, lat. Kuh) dar.

Durch Verimpfen der Kuhpockenlymphe wurden die nach der Variolation auftretenden unangenehmen Begleiterscheinungen vermieden und die Vakzination wurde rasch von allen Seiten akzeptiert (Internet-Seite 5).



Abb. 2. Edward Jenner impft den 8-jährigen James Phipps mit dem aus Läsionen der Milchmagd Sarah Nelmes gewonnenem Kuhpockenvirus (Internet-Seite 7).

Impfen mit humanisierter Lymphe. Vom Ende des 18. Jahrhunderts bis in die 1880er Jahre war in Deutschland „humanisierte“ Lymphe der am häufigsten benutzte frische Impfstoff. Sie wurde nach dem Einimpfen originärere Kuhpocken auf einen Menschen aus diesem „Vorimpfling“ gewonnen und dann durch Verimpfen von Mensch zu Mensch weiter gezüchtet. Zu Beginn des 19. Jahrhunderts wurden sog. Impfinstitute oder Impfanstalten, zuerst in München 1801, in Berlin 1802 und in Köln 1803, gegründet. Von diesen Einrichtungen konnten Impfärzte Impfstoff zum

Animpfen der Vorimpflinge erwerben. Die Weiterzucht für eine gesamte Saison war Aufgabe des Impfarztes.

Jedoch wurde die Qualität des Impfstoffes durch Verunreinigungen beeinträchtigt und es wurden Krankheiten wie Hepatitis B, Wundrose und Syphilis übertragen.

Um die Impfstoffe sicherer zu machen, wurde in privaten Impfanstalten begonnen, vakzinale Tierlymphe zu entwickeln. Die Herstellungskosten lagen beachtlich oberhalb denen der humanisierten Lymphe, so dass die staatlichen Impfarzte die Anwendung von Tierlymphe ablehnten, obwohl damit die Übertragung vieler Krankheiten vermeidbar gewesen wäre (Internet-Seite 5).

Reichsimpfgesetz. Im weiteren Verlauf wechselten Phasen der Impfbegeisterung mit Phasen der Impfmüdigkeit. Im zweiten Drittel des 19. Jahrhunderts war die Nachfrage in Deutschland besonders zurückgegangen und somit war beim Ausbruch des deutsch-französischen Krieges 1870/1871 die deutsche Bevölkerung weitestgehend ungeimpft. Nur die Angehörigen des deutschen Heeres konnten Impfschutz aufweisen, weil für diese Impfwang bestand (92). Dem deutschen Heer konnte somit eine in Frankreich grassierende Pockenepidemie kaum etwas anhaben, während das französische Heer, dessen Soldaten nicht geimpft waren, schwer getroffen wurde. 459 pockentoten deutschen Soldaten standen 23400 pockentote Soldaten im französischen Heer gegenüber. Da jedoch die deutsche Zivilbevölkerung keinen ausreichenden Impfschutz besaß, gab es hier große Verluste, als die Seuche durch französische Kriegsgefangene nach Deutschland eingeschleppt wurde. Diese Erfahrungen führten zur Verabschiedung des Reichsimpfgesetzes im Jahr 1874, durch das die Pockenimpfung im gesamten deutschen Reich zur Pflicht wurde.

Zunächst wurde wieder hauptsächlich mit humanisierter Lymphe geimpft, erst 1917 wurde der Einsatz von Tierlymphe festgelegt.

Im weiteren Verlauf wurde das Kuhpockenvirus durch das Vaccinia-Virus ersetzt. Das Vaccinia Virus zeigt eine mildere Impfreaktion. In der Regel war die Vakzination mit dem Lebendimpfstoff Vaccinia gut verträglich, doch gelegentlich konnten Nebenwirkungen, wie Hautausschläge (Ekzema vaccinatum), eine generalisierte Vacciniainfektionen oder eine postvakzinale Enzephalitis auftreten (13). Diese unerwünschten Reaktionen traten besonders bei immunschwachen Personen auf.

Ab 1959 wurden weltweit Massenimpfungen mit dem Vaccinia Virus durchgeführt. Im Rahmen der Impfkampagne kam in Deutschland auch das stark abgeschwächte Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) zum Einsatz. Es wurde für die Vorimpfung zur Basisimmunisierung gegen Pocken durch die Bayrische Impfanstalt eingesetzt.

Das Impfgesetz in Deutschland wurde im Mai 1976 aufgehoben. Da MVA erst in der Endphase als Impfstoff verwendet wurde, konnte es nur ca. 120.000 Probanden verabreicht werden.

Nachdem im Jahre 1977 ein letzter Pockenfall in Somalia aufgetreten war, wurden die Pocken im Jahre 1980 von der WHO als erste Infektionskrankheit für ausgerottet erklärt.

Einige Eigenschaften des Virus erleichterten die Ausrottung der Menschenpocken: der alleinige Wirt ist der Mensch und das Virus kann somit nicht in Tierreservoirs persistieren. Außerdem verursacht das Variola Virus keine latenten Infektionen. Die Ansteckung verläuft entweder tödlich oder das Immunsystem der infizierten Person kann die Krankheit erfolgreich bekämpfen und die Person bleibt im Anschluss immun. Im Gegensatz zur HIV-Infektion, die sich über Jahre unbemerkt ausbreiten kann, sind die Symptome der Pockenerkrankung leicht zu erkennen. Man kann infizierte Personen folglich schnell isolieren und Kontaktpersonen impfen. Des Weiteren war die Pockenimpfung auch deshalb so erfolgreich, da das Pockenvirus nicht in der Lage ist, durch Variationen Resistenzen auszubilden. Der Impfstoff bietet weiterhin die Vorteile billig, effektiv, stabil, leicht herstellbar und verabreichbar zu sein (27).

1.2.2 Pocken-Viren als Vektoren

Im Jahr 1980, in der Phase als die WHO die Einstellung der Pockenimpfkampagnen empfahl, begann man die rekombinante Gentechnologie auf Vaccinia Viren anzuwenden (93,94). Sie ermöglicht den Einsatz von Pockenviren als Vektoren und Impfstoffe gegen andere Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen. Pockenviren zeichnen sich durch einige Merkmale aus, die sie zu geeigneten Vektorensystemen machen: sie können zusätzlich große Mengen an DNA in ihr Genom integrieren (49,74), infizieren viele verschiedene Zelltypen, ihre Replikation

findet im Zytoplasma der infizierten Zellen statt und sie besitzen ihr eigenes Transkriptionssystem. Außerdem ist das Virus relativ stabil. Das Vektorsystem ist relativ leicht zu konstruieren und es kommen virusspezifische Promotoren zur Fremdgenexpression zum Einsatz (50).

Vaccinia Virus wurde erfolgreich als Vektor in Impfkampagnen gegen Tollwut in Europa und in den USA eingesetzt (35) und stellte sich auch beim Impfen von Rindern gegen Rinderpest (25) und Hühner gegen Influenza-Virus als protektiv heraus. In einer Studie am Menschen wurde in China Vaccinia als Vektor für EBV-Membranglykoproteine verwendet. Dabei zeigte sich die immunogene Wirkung des Konstrukts und ein Infektionsschutz gegenüber EBV über mehrere Jahre (26).

Vaccinia wurde als rekombinanter Impfstoff für HIV-env-Glykoproteine im Menschen erprobt und induzierte verstärkte zelluläre und humorale Immunantworten (17,18).

Obwohl sich in diesen Fällen keine Nebenwirkungen zeigten, stellt das Vaccinia Virus besonders für immungeschwächte Individuen ein großes Risiko dar.

Die Entwicklung sicherer Vektorsysteme, besonders für die Impfung immuninkompetenter Menschen, wie HIV-Patienten, erwies sich als unerlässlich. Man begann attenuierte Pockenviren und von Natur aus wirtsspezifische Pockenviren, die der Gruppe der Aviviren angehören und sich nur in Vogelzelllinien vermehren, als Vektoren zu nutzen. Man testete das Kanarienspockenvirus und das Hühnerspockenvirus als Vakzine gegen Influenza und Masern in Tierversuchen (52). Dabei erwiesen sie sich als sichere Vektorensysteme, die protektive Immunantworten stimulieren können. Auch bei der Erprobung am Menschen stellte sich ein Kanarienspockenvirus-Konstrukt als ungefährlich und immunogen heraus (24).

Zwei attenuierte Vaccinia Viren haben sich bisher als Vektorsysteme etabliert: MVA (81) und NYVAC (84). Dabei erwies sich das in über 570 Passagen attenuierte MVA als ein außerordentlich sicherer Vektor (82). Bei NYVAC handelt es sich um eine gentechnisch stark abgeschwächte Variante des Vaccinia Virus Copenhagen (84). In bisher durchgeführten Studien zeigte sich, dass das NYVAC Virus ungefährlich war und spezifische Immunantworten induzieren konnte (76). Als Abkömmling vom Kanarienspockenvirus setzte man ALVAC als Vektor ein. Es hat sich als effektives und sicheres Vakzinationssystem erwiesen (76).

1.2.3 Bioterrorismus

In den letzten Jahren hat die potentielle Bedrohung durch biologische Waffen die politische und öffentliche Aufmerksamkeit erregt. Man fürchtet insbesondere den Einsatz von äußerst gefährlichen Anthraxsporen oder Pockenviren.

Nach der Ausrottung der Pocken, riet die WHO allen Laboratorien und Institutionen die verbliebenen Variolastämme zu zerstören oder in Zentren zu senden, die mit der WHO zusammenarbeiten und mit höchsten Sicherheitsvorkehrungen ausgestattet sind.

Derzeit sind nur zwei Laboratorien offiziell bekannt, die noch im Besitz von Variola Virus sind: The Centers of Disease Control (CDC) in Atlanta und The Russian State Research Center of Virology and Biotechnology in Koltsovo, Novosibirsk.

Es besteht die Sorge, dass Virusstämme noch außerhalb dieser zwei Laboratorien existieren und zu Kriegszwecken oder Terrorakten missbraucht werden könnten. Möglicherweise behielten Länder Virusstämme obwohl sie angaben, alle zerstört zu haben.

Die Angst vor Bioterrorismus wurde durch die absichtliche Freisetzung von Anthrax in den Vereinigten Staaten weiter geschürt.

Das absichtliche oder unabsichtliche Freisetzen von Pockenviren könnte eine große Epidemie mit katastrophalen Zuständen zur Folge haben. So starb 1978 bei einem Unfall in einem Labor in Birmingham, Großbritannien, eine Frau an ihrer Pockenerkrankung. Es kam zu weiteren Todesfällen bei ähnlichen Ereignissen (72).

Die Impfkampagnen gegen Pocken wurden vor mehr als 20 Jahren eingestellt. Somit ist ein Großteil der Bevölkerung gegenüber einer Infektion nicht geschützt. Der Ausbruch der Erkrankung kann zwar durch eine postexpositionelle Impfung verhindert oder abgeschwächt werden, aber die Impfbestände sind alt und nur in begrenzten Maßen vorhanden.

Die Krankheitssymptome setzen erst nach einer Latenzzeit von etwa 12 – 14 Tagen ein und in dieser Zeit kann sich das Virus unbemerkt weiter ausbreiten. Außerdem würde sich in der heutigen Zeit der Flugreisen Pocken sehr viel schneller und weiter ausbreiten als dies noch vor 20 Jahren der Fall war. Es ist anzunehmen, dass es oft

unmöglich wäre die Infektionsquelle zu orten und somit herauszufinden, ob weitere Personen exponiert wurden.

Um sich gegen die drohenden Gefahren, die durch ein Attentat mit Pockenviren drohen würde, zu schützen, wird in Betracht gezogen, wieder gegen Pocken zu impfen. Wegen den Nebenwirkungen des Vaccinia Virus-Impfstoffes ist es wichtig, eine sichere Alternative zu entwickeln, die weniger Nebenwirkungen aufweist, aber ebenso immunogen ist.

Zur Überwachung des Impfschutzes ist es darüber hinaus von großer Bedeutung, eine einfache, genaue, schnelle und in großen Mengen durchführbare Messmethode zu entwickeln.

1.3 Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)

1.3.1 Abstammung

Das MVA-Virus geht auf das Dermovacciniavirus Chorioallantois-Vaccinia Virus Ankara (CVA) zurück, das in der Türkei in der Impfanstalt von Ankara viele Jahre als Basis für die Pockenvakzination von Menschen diente. 1953 kam CVA nach Deutschland und wurde durch Mayr *et al.* aufgereinigt. Daraufhin wurde es ab 1954/55 in der Bundesrepublik als Pockenimpfstoff eingesetzt. Im Jahre 1958 begannen Mayr *et al.* CVA durch fortlaufende Passagen auf Hühnerembryo-fibroblasten zu attenuieren (in seiner Virulenz abzuschwächen) (45). Ab der 516. Passage erhielt es den Namen Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA). Es gleicht strukturell und morphologisch dem Aufbau der anderen Mitglieder der Orthopoxgruppe. Es lässt sich auch nach serologischen und immunbiologischen Kriterien dieser Gruppe zuordnen. Das MVA-Virus ist ein künstliches Laborprodukt, es kommt in der Natur nicht vor und lässt sich durch biologische Marker von den anderen Orthopoxviren unterscheiden.

1.3.2 Sicherheit

MVA kann in den meisten Säugetierzellen nicht replizieren (8) und es hat sich in Tierversuchen unabhängig von der Applikationsart auch in immunsupprimierten Tieren als avirulent erwiesen (46). Als auffälligstes Merkmal konnte man den Verlust der Neurovirulenz zeigen (45). Im Rahmen der Pockenimpfkampagne wurden in Deutschland 120.000 Menschen mit MVA ohne bedeutende Nebenwirkungen geimpft. Darunter waren auch immunschwache Personen, für die die konventionelle Pockenvakzination ein großes Risiko darstellte. Dabei stellte sich MVA auch bei immunschwachen Personen als unschädlich heraus. Beim Menschen kommt es nach intrakutaner Applikation lediglich zu einer leichten Lokalreaktion ohne Allgemeinreaktionen (77).

1.3.3 Immunogenität

MVA hat sich auf breiter Ebene als Impfstoff bei Menschen und Tieren bewährt (45). Es kam in Deutschland bei der Pockenimpfung zum Einsatz. Bei der Zweistufenimpfung wurde es zur Induktion der Vakzinationsgrundimmunität angewandt. Es wurde üblicherweise die intrakutane Applikation gewählt. Durch die epikutane Schnittimpfung mit dem Vaccinia Virus, Stamm Elstree, wurde der volle Pockenschutz aufgebaut (78).

MVA weist sechs größere Deletionen im Genom auf (73). Davon sind zwei Gene zumindest teilweise für die Wirtsspezifität verantwortlich.

Das Virus kann Säugetierzellen infizieren, ist aber nicht zur vollständigen Replikation fähig. Die Virusreplikation wird erst in der späten Phase während des Zusammenbaus der neuen Viruspartikel gestoppt und die viralen und die rekombinanten Gene können in hohen Dosen exprimiert werden (95). Es werden Virusproteine produziert, die zu einer effektiven Stimulation der Immunantwort führen, aber es kommt nicht zur Produktion kompletter infektiöser Partikel (81). Interessanterweise scheint die Expressionsrate rekombinanter Proteine durch MVA sogar höher zu sein als durch komplett replikationsfähige Vektoren.

Orthopoxviren haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um der Immunüberwachung zu entkommen. Mit den Deletionen im Virusgenom ist MVA möglicherweise eine Anzahl von Genen verloren gegangen, die für diese Aufgabe zuständig sind. Einige Vektoren der Pockenfamilie sondern Chemorezeptoren als Sekret ab, welche die Immunantwort des Wirtes hemmen können. Blanchard *et al.* konnten zeigen, dass MVA verschiedene dieser Chemorezeptoren nicht absondert (8). Dies könnte erklären warum MVA-Vektoren stärker immunogen wirken als manche andere Vektoren der Pockenfamilie (31).

Im Gegensatz zum CVA-Ausgangsvirus ist MVA in der Lage die paraspezifischen Abwehrmechanismen zu stimulieren, indem es die endogene Interferon-Bildung induziert und die Phagozytoserate erhöht.

1.3.4 Anwendung als Vektor

In verschiedenen Tierversuchen haben MVA-Vektoren sich als Erfolg versprechende Vakzinen gegen Viruserkrankungen und Tumoren herausgestellt.

Mäuse konnten durch die Vakzination mit rekombinantem MVA, das Influenza Virus Hämagglutinin und Nukleoproteine exprimiert (MVA-*ha-np*), gegen eine Influenza Virus-Infektion protektive Immunantworten aufbauen. Die dabei hervorgerufene humorale und zelluläre Immunantwort scheint sogar noch stärker zu sein als nach Vakzination mit replikationsfähigem Vaccinia Virus Western Reserve (WR-*ha-np*) (83). Das Impfen von Rhesus-Makaken mit einem rekombinanten MVA-Virus (MVA-*SIVenv/gag/pol*) stimulierte ebenfalls ihre Abwehrmechanismen. Die Affen zeigten nach darauffolgender Exposition mit SIV einen deutlich leichteren Krankheitsverlauf (31). Es konnte sowohl die Induktion spezifischer Antikörper- als auch CTL-Antworten im Rhesus-Makaken gezeigt werden (31, 70).

Diese Beobachtungen zeigen, dass MVA als Bestandteil einer HIV-Vakzine gut geeignet zu sein scheint.

Besonders ein MVA-Vektor, der Regulatorproteine exprimiert (vgl. Abschnitt 1.4.4: Impfstoffentwicklung gegen HIV), könnte eine vielversprechende immunogene Kombinationsmöglichkeit sein, um spezifische früh wirksame Immunantworten in HIV-Patienten hervorzurufen.

Die Effizienz von MVA als Vektorsystem hängt jedoch möglicherweise von der Grundimmunität gegen MVA ab. Bis in die siebziger Jahre wurden weite Teile der Bevölkerung gegen Pocken geimpft und weisen bis heute eine gewisse Vaccinia-Grundimmunität auf. Die Mechanismen, über die bestehende Immunantworten gegen MVA vorgehen, sind unbekannt. Antikörper vermindern möglicherweise die Aufnahme der Vakzine, indem sie das Inokulum neutralisieren. Eine andere Erklärung ist, dass infizierte Zellen über Antikörper vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) oder MVA-spezifische CTL direkt an der Applikationsstelle eliminiert werden. Dadurch wird die Replikation und Antigen-Produktion verhindert und die Impfung kann keine Wirksamkeit zeigen.

In Mäuseexperimenten konnten bei bestehender Immunität gegenüber Vaccinia nach subkutaner Impfung keine spezifischen CTL-Antworten oder humorale Immunreaktionen gegen HIV-Transgene induziert werden (6). Ebenso konnten SIV-spezifische Immunantworten bei Studien an Makaken, die mit einem MAV-SIV-Konstrukt geimpft wurden, über längere Zeit nur in Tieren ohne vorherige Immunität aufrechterhalten werden (71) und beim Menschen schien eine bestehende Vaccinia-Immunität den Erfolg rekombinanter Vaccinia-Vektoren einzuschränken (17).

1.4 AIDS

1.4.1 Geschichte und Entwicklung

Seitdem im Juni 1981 über die ersten AIDS-Fälle in den USA berichtet wurde, hat die erworbene Immunschwäche bis zum Ende des Jahres 2004 weltweit über 20 Millionen Todesopfer gefordert. Allein im vergangenen Jahr haben sich 5 Millionen Menschen neu infiziert und am Ende des Jahres 2004 sind mehr als 40 Millionen Menschen mit dem humanen Immunschwäche-Virus (HIV) infiziert oder leben mit der Krankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome).

Bei IAVI (International AIDS Vaccine Initiative) rechnet man bis Ende 2010 mit der Erkrankung von 45 Millionen weiteren Menschen (Internet-Seite 1).

1.4.2 HIV

Das HI-Virus wird zur Familie der Lentiviren gerechnet. Lentiviren können langfristige latente Infektionen von Zellen oder kurzfristige zytopathogene Effekte ausüben und langsam voranschreitende tödlich verlaufende Infektionen verursachen (1).

HIV hat zwei identische RNA-Stränge und das HIV-Genom besitzt die Basisstruktur aller bekannten Retroviren, einschließlich der Nukleotidsequenzen *gag*, *env* und *pol*. Gag kodiert für Kernstrukturproteine, *Env* für Hüllenglykoproteine und *Pol* für virale Enzyme. Zusätzlich beinhaltet das HIV-Genom mindestens sechs weitere Gene, einschließlich *vpr*, *vif*, *tat*, *rev*, *nef* und *vpu*, welche eine Regulatorfunktion auf die Virusproduktion ausüben (1).

HIV infiziert hauptsächlich CD4+ Zellen, einschließlich T-Helfer-Zellen, Makrophagen und follikulären dendritischen Zellen in Lymphknoten (1).

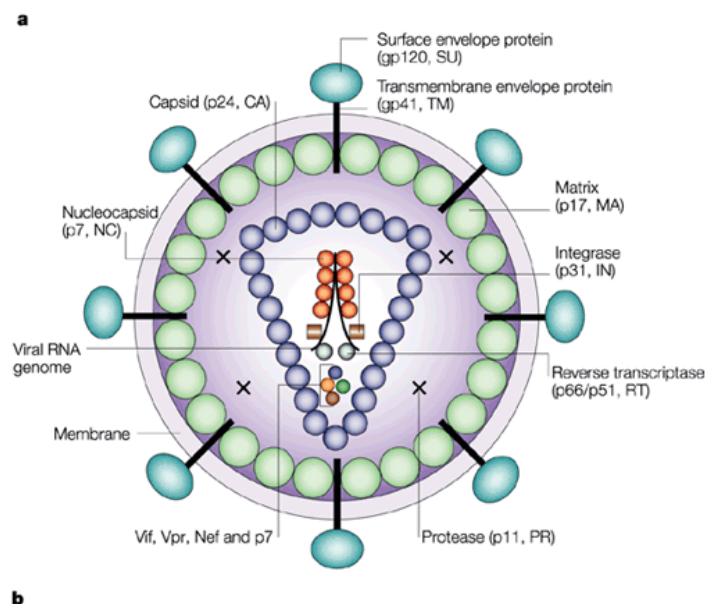


Abb. 3. Struktur von HIV-1. a | Schematische Darstellung von HIV-1. Die Hüllenglykoproteine stellen Zielstrukturen für neutralisierende Antikörper dar. Die Strukturproteine sind Ziel von T-Zellen (Internet-Seite 2).

1.4.3 Bisherige Therapiemöglichkeiten

Obwohl man bereits zu Beginn der achtziger Jahre HIV als den Verursacher von AIDS isolieren konnte (Internet-Seite 3), ist es bis heute nur gelungen Medikamente zu finden, die den Krankheitsverlauf verlangsamen oder aufhalten können, aber keine Medikamente, welche die Krankheit heilen können (23).

Mit AZT (Zidovudin) wurde im September 1986 das erste HIV-Medikament eingeführt. Die anfängliche Monotherapie (1986-1995) mit den Nukleosidanaloga (Inhibitoren der reversen Transkriptase) führte zu keiner deutlichen Verbesserung der Lebenserwartung, weil es zu raschen Resistenzentwicklungen kam. Erst die Zulassung der Proteaseinhibitoren (1996) und der Einführung einer Kombinationstherapie HAART (highly active antiretroviral therapy) hat zur deutlichen Besserung der Wirksamkeit geführt. Diese Kombinationstherapie besteht bevorzugt aus zwei Hemmstoffen der reversen Transkriptase (Nukleosidanaloga oder nicht-nukleosidischen Reverse-Transkriptase-Hemmer) und einem Protease-Inhibitor. Bei der Beurteilung der großen Fortschritte, die mit HAART in der Therapie HIV-infizierter Menschen erzielt werden konnten, muss berücksichtigt werden, dass erst eine 10-jährige Therapieerfahrung vorliegt und dass sich bereits heute Nachteile und Grenzen zeigen, die es notwendig machen nach Alternativen und neuen Therapieformen zu suchen.

Außer den hohen Kosten, die dem Großteil der HIV-Infizierten, die in Entwicklungsländern leben, eine Therapie unmöglich macht, stellen Nebenwirkungen und Resistenzentwicklungen einen limitierenden Faktor für die Kombinationstherapie dar, die insbesondere bei der Langzeittherapie auftreten (16).

Diese Beobachtungen zeigen, dass zusätzlich zur begrenzten Behandlungsmöglichkeiten mit HAART andere Therapiestrategien erforderlich sind, um die Viruslast dauerhaft zu senken.

1.4.4 Impfstoffentwicklung gegen HIV

Die Entwicklung einer wirksamen, prophylaktischen Impfung wäre der entscheidende Durchbruch, um die Ausbreitung der Erkrankung aufzuhalten. Eine therapeutische

Impfung könnte die Kontrolle der Erkrankung durch Stimulation der spezifischen Immunabwehr unterstützen.

Klassische Impfstoffe aus attenuierten (in ihrer Virulenz abgeschwächten) oder abgetöteten Krankheitserregern haben sich in der Entwicklungsgeschichte der Impfstoffe glänzend bewährt. Sie haben in der Vakzination gegen Pocken, Poliomyelitis, Masern, Röteln, Gelbfieber, Tuberkulose u.a. ihre Wirksamkeit bewiesen. Der Einsatz von ganzen Viruspartikeln ist in der HIV-Impfung aber zu gefährlich.

Es ist schwierig, eine für die Virus-Eliminierung wichtige spezifische CTL-Antwort hervorzurufen, wenn man mit abgetöteten ganzen Viruspartikeln, rekombinanten Proteinen oder synthetischen Peptiden impft, weil diese als exogene Peptide über MHC-II-Moleküle auf den Zellen präsentiert werden. Für die Virusinfektion haben die T-Killerzellen, die auf MHC-I-Molekülen präsentierte Peptide erkennen, aber eine wichtige Abwehrfunktion (9, 47). Abgeschwächte Lebendimpfstoffe werden auf MHC-I präsentiert und durch zytotoxische T-Zellen erkannt. Auch gentechnisch hergestellte DNA-Vakzinen haben den Vorteil, dass die Peptide auf MHC-I-Komplexen exprimiert werden können (86, 87).

Derzeit in der Entwicklung befindliche AIDS-Impfstoffe bestehen aus synthetisch hergestellten Kopien einer Untergruppe von Genen oder Proteinen von HIV. Somit besteht keine Gefahr der Infektion durch die Impfung. Im Tiermodell und beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die Vakzination mit HIV-Hüllenglykoproteinen oder Kernstrukturproteinen ungefährlich ist und spezifische Immunantworten hervorrufen kann (57, 90). In verschiedenen Studien stellte sich besonders die Vakzination mit Regulatorproteinen als vielversprechend heraus (14, 54, 79). Die Regulatorproteine Nef, Rev und Tat werden früh in infizierten Zellen exprimiert (37). Sie stellen somit ein frühes Ziel für die Immunantwort, speziell für zytotoxische T-Zellen dar (2). Spezifische CTL könnten in der Lage sein, infizierte Zellen zu töten, bevor diese infektiöse Viruspartikel freisetzen können. In der Latenzphase des Krankheitsverlaufes produzieren viele infizierte Zellen kein Virus, exprimieren aber für Regulatorproteine kodierende mRNA (22, 69). Regulatorprotein-spezifische CTL können diese Zellen lysieren, während sie von Strukturprotein-spezifischen Zellen nicht erkannt werden. Die Bildung Regulatorprotein-spezifischer

CTL-Antworten scheint mit einer langsamen Progression der Erkrankung zu korrelieren (88, 89).

Auch DNA-Impfstoffe haben sich im Tier und im Menschen als Stimulatoren spezifischer humoraler und zellulärer Abwehrmechanismen erwiesen und bieten Schutz vor Infektionen (12, 28, 42, 91, 97).

Dies konnte für gentechnologisch hergestellte Strukturgene (*env*, *gag*) und auch für Regulatorgene (15, 29, 30) gezeigt werden. Die therapeutische Vakzination HIV positiver mit HAART-therapierter Personen unter Einsatz eines Konstrukts aus den Regulatorgenen *nef*, *rev* und *tat* hat sich als weitgehend nebenwirkungsfrei herausgestellt und konnte spezifische CTL- und Antikörper-Antworten hervorrufen. Dabei wurde eine besonders starke Nef-spezifische Immunantwort beobachtet (15).

Es besteht die Möglichkeit, mit nackter DNA, die in ein Plasmid eingebaut wurde, zu impfen oder aber einen bakteriellen oder viralen Vektor als Transportsystem zu nutzen. In der vorliegenden Studie wurde zur Vakzination HIV positiver Individuen, die mit HAART behandelt werden, MVA, ein abgeschwächtes Pockenvirus, als Vektor für das HIV-Regulatorprotein benutzt.

Dabei wurde an der Entwicklung eines therapeutischen Impfstoffes geforscht, der das Immunsystem chronisch HIV-infizierter Patienten anregen soll.

Die Regulatorproteine Nef, Rev und Tat werden früh in infizierten Zellen exprimiert und erwiesen sich in verschiedenen Studien als vielversprechende Vakzinationskandidaten (14, 54, 79). Bei Nef handelt es sich um ein Protein, das in der Pathogenese der HIV-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Außerdem erwies sich das früh exprimierte Nef (37, 60) als besonders immunogen und konnte sowohl zelluläre als auch humorale Immunantworten hervorrufen (15). Bei Nef handelt es sich um ein 27-30 kDa schweres Protein, das in der Pathogenese der HIV-1-Infektion eine wichtige Rolle spielt. Als wichtiger Virulenzfaktor trägt es zu hohen Virusspiegeln im Plasma und zur Entwicklung von AIDS bei (34). Neben den Funktionen bei der Immunevasion und der Schwächung der Abwehrmechanismen des Körpers (MHC-I-Downregulation, Antiapoptose-Mechanismen, FasL-Expression), steigert es die Infektiosität von HIV. Nef stimuliert die virale Replikation, indem es nach Eintritt des Virus in die Wirtszelle die Synthese proviraler DNA fördert (4, 68). Eine recht gut

erforschte Aufgabe des Nef-Proteins ist die Internalisierung und der Abbau von CD4-Molekülen (55, 58). Dadurch unterstützt Nef die Virion-Freisetzung (63).

Welche notwendige und ausreichende Rolle Nef als Progressionsfaktor bei der HIV-Infektion und der Entwicklung von AIDS spielt wurde in verschiedenen Studien untersucht. Hanna *et. al.* zeigten in einer Untersuchung an transgenen Mäusen, dass das *nef*-Gen ausschlaggebend für die Pathogenität von HIV-1 ist. Die HIV-Gene *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, *vpu*, *rev* und *env* waren nicht zur Auslösung der Erkrankung nötig. Mäuse, die nur das *nef*-Gen intakt exprimierten, entwickelten eine dem Vollbild AIDS-ähnliche Erkrankung. Wohingegen Mäuse, bei denen alle Gene außer dem *nef*-Gen intakt waren, keine Krankheitssymptome entwickelten (27).

Simian Immunodeficiency Virus (SIV) konnte nicht das volle pathologische Potential in Rhesus Affen, die mit einer *nef*-deletierten SIV-Variante geimpft wurden, aufbauen. Nef war notwendig, um eine hohe Viruslast zu erhalten (59).

Bei Bluttransfusionen vor 1985 wurde in einer Blutbank in Sydney Blut von einem HIV-1 positiven Spender mit einer Deletion in der *nef*-Gen-Region auf acht Empfänger übertragen. Zwei der Empfänger verstarben im Alter von 77 bzw. 83 Jahren aus Gründen, die nicht mit der HIV-Infektion in Verbindung standen. Ein weiterer Empfänger war an systemischem Lupus Erythematoses erkrankt und starb möglicherweise an den Folgen der HIV-Infektion. Von den Überlebenden blieben bei drei Teilnehmern über einen Zeitraum von 14-18 Jahren die Viruslast unter der Nachweisgrenze. Keiner der Infizierten entwickelte über diesen Zeitraum Krankheitssymptome oder wurde mit einer antiretroviralen Therapie behandelt (38). Nef stellt also ein vielversprechendes Objekt für die Entwicklung von Impfstoffen dar.

1.4.5 Vektoren in der HIV-Impfstoffentwicklung

In der HIV-Impfstoffentwicklung wurden verschiedene Abkömmlinge der Pockenviren (MVA, NYVAC, ALVAC), der Adenoviren, Alphaviren, Rhabdoviren, Herpesviren und Picornaviren verwendet.

Jedes virale Vektorsystem hat spezifische Eigenschaften. Die Vektoren unterscheiden sich in der Größe der Gene, die sie exprimieren können, sowie in der Art der Zielzellen, die infiziert werden können. Des Weiteren können sie

unterschiedliche proinflammatorische Reaktionen beim Wirt hervorrufen und haben verschiedene Strategien entwickelt, um der Immunüberwachung des Wirtes zu entkommen.

Die beiden viralen Vektorsysteme, die bisher den größten präklinischen Erfolg zeigten, sind MVA und Adenovirus 5 (Ad5). Sowohl MVA als auch Ad5 sind in den meisten Säugetierzellen nicht replikationsfähig und somit für immungeschwächte Personen ungefährlich. Beide Vektoren können eine Vielzahl von menschlichen Zellen infizieren und regen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen an.

MVA bietet die Möglichkeit große Gene zu exprimieren und es bildet seine mRNA im Zytoplasma. In Adenoviren dagegen ist die Größe der integrierbaren DNA beschränkt und es wird meist zum Exprimieren einzelner HIV-Gene genutzt (61).

Vektor	Beispiel	Größe des exprimierbaren Gens	Replikationsfähigkeit	Gewebetropismus	Proinflammatorisch	Päexistente Immunantworten
Säugetierpockenvirus	MVA	>10kb	In Hühnerzellen, aber nicht in Zellen von Primaten	Breit, inklusive Dendritische Zellen	IFN-1	Ältere Menschen und im Gesundheitswesen tätige Menschen
Säugetierpockenvirus	NYVAC	>10kb	Replikationsfähig	Breit	IFN-1	Ältere Menschen und im Gesundheitswesen tätige Menschen
Avi-pockenvirus	ALVAC	>10kb	In Hühnerzellen, aber nicht in Zellen von Primaten	Breit	ND	keine
Adenovirus	Ad5	<5 kb	Benötigt Helferzellen, die E1 exprimieren	Breit, inklusive unreifer Dendritischer Zellen	TNF, IL-1, IL-6	Ca. 45 % der amerikanischen Bevölkerung haben neutralisierende Antikörper nach einer natürl. Infektion
Alphavirus	VEE	<5 kb	Lebend, abgeschwächt und nicht replikationsfähig	Lymphatisches Gewebe inklusive Dendritischer Zellen	ND	VEE-geimpfte Populationen
Rhabdovirus	Vesikuläres Stomatitis Virus	<5 kb	Lebend, abgeschwächt	Breit, inklusive mukosaler Gewebe	ND	Einige Arbeiter auf dem Land

Herpesvirus	HSV	>5 kb	Lebend, ab- geschwächt und nicht re- plikationsfähig	Epithelial- zellen und Ganglien	ND	Die meisten Menschen, nach natürl. Infektion
Picornavirus	Poliovi- rus	<2 kb	Lebend, ab- geschwächt	Mukosa- les Gewebe	ND	Menschen, die gegen Polio geimpft wurden

Tabelle 1. Beispiele für lebende virale Vektoren in der Impfstoffentwicklung (61)

Die exprimierbaren Gengrößen stellen ungefähre Angaben dar und schwanken naturgemäß. Ad5, Adenovirus 5; ALVAC, ein Kanarienvaccinavirus; IFN, Interferon; IL, Interleukin; MVA, Modified Vaccinia Virus Ankara; NYVAC, New York Vaccinia Virus; ND, nicht definiert; TNF, Tumornekrose Faktor; VEE, Venezuanisches Equines Enzephalitis Virus

1.5 Immunsystem

Der Organismus hat die Fähigkeit sich gegen eingedrungene pathogene Substanzen zu verteidigen. Wir bezeichnen das für diese Aufgabe zuständige Abwehrsystem als Immunsystem. Das Immunsystem erkennt und eliminiert mittels unterschiedlicher Strategien körperfremde Substanzen, seien es fremde Organismen oder toxische Stoffe. Es setzt sich aus angeborenen und erworbenen Abwehrvorgängen zusammen, die gemeinsam wirken und sich ergänzen.

1.5.1 Angeborenes Immunsystem

Zum angeborenen Immunsystem zählt man u.a. physische Barrieren, phagozytierende Zellen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Zytokine, das Komplementsystem und Akute Phase Proteine. Das angeborene Abwehrsystem des Körpers ist sofort nach Antigenkontakt bereit, ein infektiöses Agens nach dessen Eintritt in den Körper zu bekämpfen. Es attackiert eingedrungene Fremdstoffe unspezifisch (1, 53).

1.5.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene Immunsystem dagegen geht spezifisch gegen eingedrungene Erreger vor und es erkennt sowohl extra- als auch intrazelluläre Erreger. Seine

Elemente, darunter insbesondere B-/ T-Lymphozyten sowie Antikörper, sind in der Lage, eine körperfremde Substanz hochspezifisch zu erkennen und zu bekämpfen. Die Stammzellen der B-Lymphozyten und T-Lymphozyten liegen im Knochenmark. Während die B-Zellen dort ihre weiteren Reifungsstadien durchlaufen, wandern die Vorläufer der T-Zellen für ihre Proliferation und weitere Ausreifung in den Thymus. Im Thymus werden die T-Zellen, die sich in dieser Phase auch Thymozyten nennen, zur Expression der T-Zellrezeptoren (TZR) und anderer Oberflächenmoleküle wie CD3, CD4 und CD8 (CD = cluster of differentiation) angeregt.

Der Antigen-spezifische TZR setzt sich aus α - und β -Polypeptidketten zusammen. Er entsteht in einem Prozess aus Genrearrangement von mehreren DNA-Segmenten, den V, D, J und C-Segmenten und dem nachfolgenden Spleißen der messenger RNA. Diese Vorgänge, die vor der ersten Begegnung mit einem Antigen stattfinden, führen zu einer Vielfalt von mehr als 10^8 T-Zellrezeptoren, von denen jeder für ein Antigen spezifisch ist. Daraufhin erlernen die T-Lymphozyten bei der positiven Selektion, körpereigene MHC-Moleküle zu erkennen, und bei der negativen Selektion werden autoreaktive Klone, welche mit körpereigenen Peptiden beladene MHC-Moleküle binden, eliminiert. Diese Prozesse stellen sicher, dass immunkompetente und selbsttolerante T-Lymphozyten den Thymus verlassen und sich in den sekundären lymphatischen Organen ansiedeln.

Die T-Lymphozyten setzen sich aus zwei Hauptpopulationen, den CD4+ T-Helferzellen und den CD8+ zytotoxischen T-Zellen (CTL), zusammen. Das CD-Molekül ist ein Corezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Anhand des CD-Moleküls lassen sich T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen identifizieren.

Die Antigene können auf der Oberfläche von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) mit Hilfe von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC), den MHC-I- oder MHC-II-Molekülen, den T-Lymphozyten präsentiert werden.

Das MHC-I-Protein ist ein monomeres integrales Membranprotein, das sich auf allen kernhaltigen Zellen befindet. Es präsentiert endogene Peptide, die zytosolisch vorliegen und in den meisten Fällen intrazellulär synthetisiert wurden. Bei den endogenen Peptiden handelt es sich sowohl um körpereigenes, aber auch um körperfremdes Eiweiß, wie virale, bakterielle oder auch Tumorantigene. Das MHC-I-

Molekül besteht aus einer extrazellulären α -Kette und ist mit einem β 2-Mikroglobulin assoziiert. Die in einer Zelle zum Abbau vorgesehenen Proteine werden im Proteasom proteolytisch gespalten und gelangen mittels des TAP-Transporters (TAP=transporter in antigen processing) ins ER. Hier binden vorwiegend immundominante Peptide an den MHC-I-Komplex, der sich drauffhin vom TAP-Protein löst und über den Golgi-Apparat vesikulär an die Zelloberfläche transportiert wird, um dort das gebundene Epitop zu präsentieren. CD8+ T-Zellen erkennen an MHC-I-Moleküle gebundene Peptide und können aufgrund ihrer Prägung im Thymus (negative und positive Selektion) zwischen fremden und eigenen unterscheiden. Handelt es sich bei dem Peptid um ein körperfremdes, wird die zytotoxische T-Zelle die Zerstörung der Zelle einleiten.

MHC-II-Proteine werden nur auf Antigen präsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. Das MHC-II-Protein ist ein Heterodimer, das sich aus einer α - und einer β -Kette zusammensetzt und dient der Präsentation exogener Peptide auf der Zelloberfläche. Nach ihrer Synthese assoziieren die α - und β -Ketten im endoplasmatischen Retikulum. Ihnen lagert sich eine dritte Kette an, die sogenannte unvariable oder γ -Kette. Diese erfüllt zwei Hauptfunktionen. Zum einen verhindert sie das Binden endogener Peptide an das MHC-II-Molekül und zum anderen leitet sie den MHC-II-Komplex vesikulär durch den Golgi-Apparat zum Vesikel, in dem das exogene Peptid zum Binden bereit liegt.

Nachdem ein Antigen an eine APZ gebunden hat, wird es in Minutenschnelle durch Phagozytose, Rezeptor-vermittelte Endozytose oder Pinozytose aufgenommen. In Endosomen und Lysosomen wird es bei sauren pH-Werten durch hydrolytische Enzyme zu Peptiden fragmentiert. Beim Verschmelzen des Vesikelinhaltes mit den Vesikeln, in denen sich die MHC-II-Moleküle befinden, wird die γ -Kette vom MHC-II-Protein abgespalten. Ein zunächst an der Antigenbindungsstelle verbleibendes Fragment, CLIP, wird schließlich durch ein immundominantes Antigen-Peptid ersetzt. Dann wird der MHC-Komplex mit dem gebundenen Epitop in die Plasmamembran translociert. Hier kann es von CD4+ T-Zellen erkannt werden.

T-Helferzellen spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung der zellulären und der humoralen Immunantwort. Sie sind auf die Antigenpräsentation durch mononukleäre

Phagozyten, interdigitierende dendritische Zellen, B-Lymphozyten oder andere Antigen präsentierende Zellen (APZ) angewiesen. Sie erkennen kein freischwimmendes Antigen, sondern nur bereits durch APZ prozessiertes und präsentiertes Antigen. Der Hauptort der Antigenpräsentation sind die Lymphknoten und die Milz.

T-Helferzellen erkennen nur exogenes Antigen, das auf MHC-II-Molekülen präsentiert wird. Die Interaktion zwischen dem T-Zellrezeptor und seinem spezifischen Antigen setzt eine Aktivierungskaskade in Gang. Einerseits wird die Proliferation der T-Helfer-Lymphozyten stimuliert, andererseits regen sie durch Zytokinausschüttung zytotoxische T-Zellen und Makrophagen an. Somit wird die zelluläre Abwehr aktiviert. Weiterhin werden die B-Zellen durch Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 stimuliert und somit die humoralen Abwehrmechanismen eingeleitet.

Zytotoxische T-Lymphozyten bewirken direkt den Tod infizierter Zellen. Sie erkennen solche Zellen, die ihr spezifisches Antigen tragen. Sie interagieren dabei mit MHC-I-Molekülen. Zusätzlich regen die T-Killerzellen durch Zytokinproduktion verschiedene Abwehrmechanismen an.

B-Lymphozyten stellen die Träger der humoralen spezifischen Immunantwort dar. Sie stammen genauso wie die T-Lymphozyten aus dem Knochenmark und ihre Entwicklung läuft auch hier ab. Sie exprimieren membrangebundene Antikörper (Ak) als Rezeptoren. Die Rezeptoren entstehen in einem Prozess aus Rearrangement und Spleißen, ähnlich den Vorgängen bei der TZR-Entwicklung. Nach Abschluss dieser Differenzierungsschritte bei der B-Zellentwicklung liegt eine Diversität von etwa 10^{10} B-Zellklonen vor. Ein Klon kann nur einen Antikörper einer Spezifität produzieren und ist schon vor dem ersten Antigenkontakt diesbezüglich festgelegt.

Auf unreifen B-Zellen findet man Antikörper der Klasse IgM, auf reifen naiven B-Zellen IgM und IgD. Nach Antigen-Kontakt und erfolgter Stimulation differenzieren sie sich zu Antikörper-sezernierenden Zellen, den Plasmazellen. Der Großteil der ausgereiften B-Zellen ist in lymphatischen Geweben zu finden, ein geringerer Anteil in der peripheren Zirkulation. Sie erkennen freies Antigen oder durch follikuläre dendritische Zellen präsentierte Antigenpartikel. Nachdem ein Antigen durch einen B-

Zellrezeptor erkannt wurde, wird es intern prozessiert und auf dem MHC-II-Molekül einer spezifischen CD4+ T-Zelle präsentiert. Die T-Zelle produziert nun die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10, die Wachstum, Teilung und Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen stimulieren. Im Anschluss differenziert sich ein Teil der aktivierten B- und T-Zellen nicht zu Effektorzellen, sondern zu Gedächtniszellen. Diese Zellen können über Jahrzehnte auch ohne Antigenstimulation überdauern. Bei erneutem Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen werden sie zu einer rascheren und effektiveren Immunantwort angeregt. Eine erfolgreiche Impfung zeichnet sich durch die Bildung von Gedächtniszellen aus.

Die von Effektor-B-Zellen sezernierten Antikörper erfüllen eine Vielfalt von Aufgaben. Sie neutralisieren bakterielle Toxine und Viren, indem sie deren Interaktion mit zellulären Rezeptoren verhindern. Durch die Bindung von Antikörpern an Pathogene (Opsonierung) werden diese für phagozytierende Zellen leichter erkennbar und somit besser eliminiert. Antikörper markieren Tumorzellen und infizierte Zellen, welche durch z.B. NK-Zellen, eosinophile, basophile Granulozyten und T0-Zellen leichter erkannt und abgetötet werden können. Man spricht hierbei von der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC).

Ferner aktivieren Antigen-Antikörper-Komplexe die Komplementkaskade über den klassischen Weg, was Bakteriolyse, Virusneutralisation, Opsonierung und die Anlockung von Entzündungszellen zur Folge hat. Der klassische und der alternative Weg der Komplementaktivierung führen zur Bildung des Membran-Angriff-Komplexes (membrane attack complex-MAC) in der Endstrecke der Komplementkaskade. Dabei bilden verschiedene Komplementfaktoren den C5b, 6, 7 Komplex, der stark lipophil ist und sich in hydrophile zelluläre und virale Membranen einlagert. Dieser Komplex kann die Lyse von einigen Mikroorganismen und eukaryotischen Zellen initiieren. Die lytische Aktivität wird durch das Binden des Faktors C9 verstärkt. Hat der MAC 12-15 C9-Moleküle assoziiert mit einem C5b-8 Komplex gebunden, erhält er die Fähigkeit Poren in Zellmembranen zu formen und somit eine osmotische Lyse der Zellen einzuleiten. Durch diese verschiedenen Wirkungsmechanismen verstärken Antikörper die Elemente des angeborenen Immunsystems.

Die humorale Immunantworten werden als gute Marker für den Schutz gegen virale Infektionen angesehen. In mehreren Studien, die vor der Ausrottung der Pocken

durchgeführt wurden, konnte eine Korrelation zwischen Vaccinia-spezifischen Antikörpern und dem Schutz vor der Erkrankung mit Pocken gezeigt werden (43,66).

1.6 Überwachung der humoralen Immunantwort nach einer Pockenimpfung

Um die Wirksamkeit einer Vakzine beurteilen zu können, benötigt man empfindliche und effektive Messmethoden zur Erfassung der zellulären und der humoralen Immunantwort. Bei der Entwicklung eines Impfstoffs gegen virale Infektionen ist es wichtig, die neutralisierenden Antikörper im Blut von Impfkandidaten vor und nach Erhalt der Vakzination zu bestimmen. Die wichtigste Methode dafür sind die Neutralisationstests.

Neutralisationstests werden als sensitive und spezifische Messmethoden zur Erfassung der Wirksamkeit einer Vakzine angesehen und sie liefern bessere Informationen als Bindungstests. Ein Neutralisationstest sollte folgende Eigenschaften haben:

1. Er sollte es möglich machen, Antikörper in verschiedenen Proben zu messen, z.B. Serumproben von Patienten und von Versuchstieren genauso wie aufgereinigte (monoklonale) Antikörper.
2. Er sollte die Neutralisation einer großen Bandbreite von Virusproben bestimmen können: z.B. Primärisolierungen, Laborstämme, Synzytien-induzierende und nicht Synzytien-induzierende Stämme.
3. Er sollte einen messbaren quantitativen Endpunkt liefern, ohne dass eine Langzeitkultivierung und multiple Infektionszyklen benötigen (Internet-Seite 4).

Es existieren verschiedene Neutralisationstest, die zur Bestimmung der humoralen Immunantwort auf eine Vakzine dienen. Der konventionelle Test zur Messung der Vaccinia-neutralisierenden Antikörper, ist der Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT). Er funktioniert nach dem folgenden Prinzip:

Eine festgelegte Menge von Vaccinia Virus wird mit dem gleichen Volumen von Serienverdünnungen einer Blutprobe vermischt. Nach einer Inkubation wird dieses Gemisch auf eine Einzelschicht von Zielzellen aufgetragen. Diese Virus-Antikörper-Suspension wird mit den Zielzellen 4 – 6 Tage lang inkubiert, um diskrete Plaques zu erhalten. Die durch Vaccinia gebildeten Plaques werden von Hand ausgezählt und

es wird aus der verminderten Anzahl von Plaques auf die vorhandenen neutralisierenden Antikörper geschlossen. Dieser Test hat einige Nachteile. Er ist sehr zeitaufwendig und arbeitsintensiv. Außerdem wird er subjektiv ausgewertet und erfordert die Arbeit mit in Säugetierzellen replikationsfähigem Vaccinia Virus.

In dieser Arbeit wird ein Neutralisationstest auf der Basis von Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) entwickelt und in einer klinischen Studie angewandt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Kulturmedien

Zur Durchführung der Experimente wurde RPMI 1640 Medium versetzt mit 10% (vol/vol) fötalem Kälberserum (FCS) (beides Biochrom, Berlin, Deutschland) und 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) (Gibco, Paisley, Großbritannien) verwendet. Dieses Medium wird im Folgenden als Kompletmedium bezeichnet. Zusätzlich wurde phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS) eingesetzt, die ebenfalls von der Firma Biochrom stammte.

2.2 Aufreinigung der PBMCs

Zur Gewinnung von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde zehn HIV-negativen Kontrollpersonen und zehn HIV-positiven Personen peripheres Blut in heparinisierten Spritzen abgenommen. In ein 50 ml Falcon Röhrchen (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) wurden jeweils 25 ml Blut gefüllt und zehn Minuten lang bei 1.800 Umdrehungen/Minute zentrifugiert (Zentrifuge von der Firma Heraeus, Hanau, Deutschland).

Anschließend wurde das Plasma im Überstand abpipettiert. Zu den zellulären Blutbestandteilen wurde RPMI 1640 bis zur 35 ml Marke hinzugefügt. Dann wurden 10 ml Ficoll (Biocoll separating solution, Biochrom, Berlin, Deutschland) auf den Boden des Falcon Röhrchens pipettiert und ohne Bremse 17 Minuten lang bei 2.100 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Der bei dieser Prozedur abgetrennte Lymphozytenring wurde in ein neues 50 ml Falcon Röhrchen transferiert und die Lymphozyten wurden durch mehrere Waschvorgänge gereinigt. Sie wurden für die EBV-B-Zelllinienherstellung verwandt.

Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur.

2.3 Abgrenzung lebender von toten Zellen

Um die toten Zellen von den lebenden Zellen abzugrenzen, wurde ein EMA-Staining unter Verwendung einer EMA- (Ethidium Monoazid, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) Lösung in FACS-Puffer (1:1000) durchgeführt. Um die toten Zellen zu identifizieren, wurden sie 20 Minuten mit 50 µl EMA-Lösung pro 500.000 Zellen auf einer Rundbodenplatte im Dunkeln auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten starkem Licht ausgesetzt. EMA durchdringt spezifisch die Membranen toter Zellen und interkaliert in den Zellen in doppelsträngige DNA. Außerdem interkaliert EMA in freie DNA. Die anschließende Photoaktivierung führt zur kovalenten Bindung an die DNA. Im FACS können die toten Zellen durch ein photoreaktives fluoreszierendes Label des EMA von den lebenden Zellen unterschieden werden. Anschließend wurde das Ethidium Monoazid durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt.

2.4 EBV-Klone

Von den Probanden wurden Epstein-Barr Virus transformierte B-Zelllinien (EBV-immortalisierte B-Zelllinien, B lymphoblastoid cell lines, B-LCL) hergestellt.

Vorbereitung des Virus. In 1 ml Komplettmedium (RPMI-1640, 10% FCS, 1% Antibiotika) wurden $1 \cdot 10^6$ EBV-produzierende Zellen der Zelllinie B95-8 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) drei Tage im Brutschrank bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Min. bei 1.200 Umdrehungen/Min. und 4°C zentrifugiert, um den EBV-enthaltenden Überstand von den Zellen zu trennen. Der Überstand wurde durch einen 0,45 µm Filter filtriert.

Infektion von PBMC mit EBV. 10^7 PBMC wurden in 2,5 ml Komplettmedium in einem 50ml Falcon Becher zusammen mit 2,5 ml EBV-Überstand 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Alternativ wurden $5 \cdot 10^6$, $2 \cdot 10^6$ und 10^6 PBMC verwandt und EBV-Klone ausgehend von diesen Zellzahlen hergestellt.

Anschließend wurde 5 ml Kompletmedium, das 1 µg/ml Cyclosporin A (Sandoz Pharma, Basel, Schweiz) enthielt, hinzugegeben und die gesamte Zellsuspension von 10 ml in eine 25 cm³ Zellkulturflasche transferiert. Diese wurde drei Wochen bei 37°C und 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Gegen Ende der dritten Woche wurde das Kulturmedium sauer und die Zellen begannen makroskopisch sichtbare Zellhaufen zu bilden. Die Zellen wurden (nach drei Wochen) gemischt und in zwei neue 25 cm³ Zellkulturflaschen überführt. 5 ml Kompletmedium wurden hinzugefügt und die Zellen eine weitere Woche in 5%iger CO₂ Atmosphäre und bei 37° C inkubiert. Nach diesem Prozess wurde ein Teil der Zellen zunächst bei –80°C und zur Langzeitaufbewahrung in Stickstoff eingefroren. Den anderen Teil hielten wir in Kultur, indem wir die Zellen einmal in der Woche im Verhältnis 1:3 splitteten und bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre aufbewahrten.

2.5 Anti-Vaccinia Virus Immunglobulin (VIG)

Das menschliche Anti-VIG-Präparat lieferte uns das Statens Bakteriologiska Laboratorium (Stockholm, Schweden); die Konzentration des menschlichen Immunglobulins gegen Vaccinia Virus lag bei 160 mg/ml und das Präparat wurde in flüssiger Form aufbewahrt. Das VIG-Präparat stammt von gesunden mit Vaccinia Virus geimpften Schweden. Im Zeitraum 1960 bis 1975 wurde ihnen zu diesem Zweck regelmäßig Blut abgenommen.

2.6 Patienten und Impfplan

Die Einschlusskriterien von Patienten in die Studie waren eine stabile Viruslast in den letzten sechs Monaten und eine CD4+ Lymphozytenzahl von mindestens 400/µl Blut. Genauere Angaben zu den einzelnen Patienten sind aus der Tabelle 2 zu entnehmen. Es waren zehn HIV-positive Patienten an der Studie beteiligt. Die HIV+ Individuen waren zuvor mit HAART durchschnittlich 71,7 Monate therapiert worden (32 bis 156 Monate) und die Viruslast war bei acht Patienten unter der Nachweisgrenze. Die CD4+ Lymphozytenzahl betrug im Mittel 711/µl Blut (407 bis 1421 Zellen/µl Blut). Neun der teilnehmenden Patienten waren gegen Pocken

geimpft. Die Studie wurde durch die Bundesärztekammer und die lokale IRB genehmigt. Von allen Teilnehmern wurde eine Einverständniserklärung unterzeichnet. Außerdem wurden zehn HIV-negative Kontrollpersonen in die Studie involviert, von denen drei eine Pockenimpfung erhalten hatten.

Tabelle 2

Patienteneigenschaften

Patient	Geburtsjahr	Jahr der Diagnose	Dauer der Therapie (Monate)	Befunde zu Beginn der Studie A		Pockenimpfung
				Viruslast im Plasma (RNA Kopien/ml)	CD4-Zellzahl (Zellen/mm ³)	
1	1959	Juli-86	65	<50	407	ja
2	1944	Juli-89	75	6077	803	ja
3	1955	Juli-84	77	8710	1116	ja
4	1955	Jan-98	42	<50	1421	ja
5	1962	Juni-86	76	<50	584	ja
6	1937	Okt-93	51	<50	782	ja
7	1949	Juli-96	70	<50	473	ja
8	1960	Feb-85	73	<50	549	ja
10	1963	Aug-85	156	<50	488	nein
11	1962	Feb-00	32	<50	488	ja

A Gemessen zum Zeitpunkt der HIV-1 spezifischen T-Zell Analyse oder in der Woche – 6 bei den 10 Patienten, die an der MVA-*nef* Impfstudie teilgenommen haben

Folgender **Impfplan wurde** angewandt: Die HIV-infizierten Personen wurden in den Wochen 0, 2 und 16 mit jeweils $5 \cdot 10^8$ IU (infectious units) MVA-*nef* in 1 ml Phosphatpuffer subkutan geimpft. Der MVA-*nef* Impfstoff wurde nach GMP durch die Impfstoffwerke Dessau hergestellt und durch Bavarian Nordic (München, Deutschland) unter dem EU-Vertrag BIO4 CT-97-2109 zur Verfügung gestellt.

2.7 Mäuse

Es kamen insgesamt fünf HLA-A*0201 Kb Mäuse zum Einsatz. Von diesen wurden drei mit jeweils 10^8 IU MVA-Tyr geimpft und zwei blieben naiv. Zwei Monate nach der Vakzination wurden alle Mäuse durch Genickbruch getötet.

Anschließend wurde Herzblut entnommen und über Nacht bei 4°C koaguliert. Danach wurde es zentrifugiert und die Sera für den MVA-Neutralisationstest gewonnen.

2.8 MVA-Präparation

2.8.1 CEF-Zellen

Hühnerembryofibroblasten (CEF, chicken embryo fibroblasts) wurden auf Minimum Essential Medium (MEM), 5% Basalmedium Supplement (BMS), 10% Laktalbumin und 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) bei 37°C in 5%iger CO₂-Atmosphäre in zehn Zellkulturflaschen (22,5 cm³) der Firma Corning Inc., Corning, NY, USA gezüchtet.

Als sie konfluent waren wurden sie im Verhältnis 1/5 gesplittet. Dazu wurde der flüssige Überstand abgegossen und 3 ml Trypsin-EDTA (Gibco, Paisley, Großbritannien) hinzugefügt, um die Bindungen zwischen den Zellen und der Oberfläche zu zerstören. Nach mehrmaligem Schütteln wurden 7 ml einer Mischung bestehend aus Minimum Essential Medium (MEM), 5% Basalmedium Supplement (BMS), 10% Laktalbumin, 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) hinzugefügt. MEM und BMS wurde von der Firma Biochrom, Berlin, Deutschland und Laktalbumin von Sigma, Taufkirchen, Deutschland geliefert.

In fünf 22,5 cm³ Flaschen wurden jeweils 23 ml der MEM (5% BMS, 10% Laktalbumin, 1% Antibiotika)-Mischung gefüllt und je 2 ml der in Trypsin-EDTA und MEM (BMS, Laktalbumin, Antibiotika) suspendierten Hühnerembryofibroblasten hinzugefügt. Die Flaschen wurden 48 Stunden bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert.

2.8.2 CEF-Infektion mit MVA-*gfp*

Die Konzentration des MVA-*gfp* betrug $3,75 \cdot 10^9$ infektiöse Einheiten/ml. Die Hühnerembryofibroblasten wurden mit 0,1 IE/Zelle infiziert. Es wurde dabei von $30 \cdot 10^6$ Zellen in einer 22,5 cm³ Flasche ausgegangen und MVA-*gfp* in 5ml MEM gelöst. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C, während der die Flaschen einmal bewegt wurden, um eine gleichmäßige Verteilung des Virus zu erreichen, wurden 25ml MEM, 5% BMS, 10% Laktalbumin, 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) hinzugefügt und bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre 72 Std. inkubiert.

2.8.3 Aufreinigung des Vaccinia Virus MVA

Unter dem Mikroskop konnte die MVA-*gfp*-Infektion durch die Fluoreszenz des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP) bestätigt werden und die Zellen wurden bei 4000 Umdrehungen/Min. 10 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Dann wurden die Zellen in 10 mM Tris-Puffer (Merck, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert und dreimal bei -80°C eingefroren und im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen sechs mal 15 Sekunden mit einem Ultraschallgerät von Bandelin, Berlin, Deutschland mit der Stufe MS 73D sonifiziert.

Sowohl das Einfrieren und Auftauen als auch das Sonifizieren dienten dazu, die Zellen zu zerstören und somit alle intrazellulären Viruspartikel freizusetzen. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 Umdrehungen/Min. 5 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in 50ml Falcon Röhren pipettiert und das zelluläre Pellet in 8 ml 10mM Tris Puffer resuspendiert.

Der Sonifikationsschritt wurde mit den Zellen wiederholt, um mögliches noch intrazelluläres Virus zu gewinnen und anschließend wurden die Zellen erneut bei 3000 Umdrehungen/Min. 5 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert.

Wiederum wurde der flüssige Überstand gewonnen und die gesamte Virussuspension über 17,5 ml 36% Sucrose (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 10 mM Tris-Puffer 80 Minuten bei 13.500 Umdrehungen/Min. bei 4°C in der Ultrazentrifuge (Beckmann, Palo Alto, CA, USA) zentrifugiert. Das Sucrosekissen dient dazu, Virus von Zellmaterial zu trennen.

Anschließend wurde der flüssige Überstand abpipettiert und das Pellet, welches MVA-*gfp* enthielt, in 10 ml 1mM Tris Puffer resuspendiert. Danach erfolgte erneut eine einminütige Sonifikation. Um den Sucrose-Pool zu entfernen, wurde es bei 15.000 Umdrehungen/Min. 1 Std. bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgekippt und die virushaltigen Pellets in 4 ml 1 mM Tris-HCl resuspendiert. Nach einem einminütigen Sonifikationsschritt wurde das Virus bei -80°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.8.4 Titration von MVA

Das Kaninchen-Serum mit Anti-Vaccinia-Antikörpern (Polyclonal rabbit anti-vaccinia antibody IgG fraction) wurde bei der Firma Quartett, Berlin, Deutschland erworben und der Sekundärantikörper (horseradish peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-rabbit IgG (H+L)) bei der Firma Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA. Nach dem Auftauen des Virusmaterials wurde es dreimal jeweils 30 Sekunden lang sonifiziert. Anschließend wurde es zehnfach in RPMI 1640, 2% FCS, 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) verdünnt. Von den letzten sechs Verdünnungsschritten wurden in doppelter Ausführung jeweils 1 ml pro Well auf 6-Well Platten mit CEF-Zellen gegeben. Die Platten wurden daraufhin 48 Std. bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Danach wurde das Medium entfernt, die Wells mit reinem PBS gewaschen und die Zellen 5 Min. bei Raumtemperatur in 2 ml

Aceton-Methanol (1:1) pro Well fixiert. Aceton und Methanol wurden von der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland geliefert.

Nach einem erneuten Waschvorgang mit PBS wurden unspezifische Proteinbindestellen dadurch blockiert, dass 2 ml PBS in 3% FCS 1 Std. auf dem Schüttler einwirkten. Zur Markierung von MVA-infizierten Zellen, wurden diese zusammen mit einem Anti-Vaccinia-Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-3% FCS 1 Std. auf dem Schüttler (B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland) inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen zweimal 2 Min. in PBS-3% FCS unter ständiger Bewegung gewaschen und dadurch überschüssige Antikörper entfernt. Dann wurden die Zellen mit einem zweiten Antikörper 45 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Es handelte sich dabei um einen Peroxidase-konjugierten Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war. Nichtgebundene Antikörper wurden danach durch drei Waschschriffe mit PBS entfernt.

Im Anschluss wurde eine Dianisidin-Lösung als Substrat zubereitet, indem eine kleine Menge Dianisidin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) in 500µl absolutem Ethanol aufgelöst wurde. Nach einer halbminütigen Zentrifugierung wurden 200µl der Dianisidin-Lösung in 10 ml PBS pipettiert und filtriert (Porengröße des Filters 0,2 µm).

Schließlich wurde als Substrat für die Peroxidase 10 µl H₂O₂ hinzugefügt und 0,5 ml der Substratlösung pro Well verteilt. Nach einer Einwirkzeit von 5-10 Minuten wurden die markierten Foci der mit MVA-*gfp* infizierten Zellgruppen gezählt und ein Titer von $5 \cdot 10^9$ IU/ml errechnet. Das aufgereinigte und titrierte MVA-*gfp* wurde für den MVA-Neutralisationstest verwendet.

2.9 MVA-Neutralisationstest

Nachfolgend wird die Durchführung des MVA-Neutralisationstest detailliert dargestellt. Für die Beschreibung des Prinzips dieses Tests wird der Leser auf das Ergebniskapitel 3.1 verwiesen. Die MVA-Neutralisationsfähigkeit von Kaninchen- und Mäuseserum sowie von menschlichem Plasma wurde bestimmt. Dazu wurde ein

MVA-*gfp*-Konstrukt und B-Zellen genutzt. Im Experiment mit menschlichem Plasma wurden in der Regel Zielzellen desselben Patienten verwendet, bei HIV-positiven Patienten wurden immer Zellen desselben Patienten eingesetzt. Diese Zellen nennt man autologe Zellen. Um die Neutralisationsaktivität unbehandelten Plasmas mit der hitzeinaktivierten Plasmas zu vergleichen, wurde ein Teil des Plasmas 30 Min. bei 56°C erhitzt und anschließend 2 Min. bei 13.000 Umdrehungen/Min. zentrifugiert. Durch die Hitze wurden die Komplementbestandteile inaktiviert und es konnte der Anteil subtrahiert werden, der durch Komplementfaktoren neutralisiert wurde. Zunächst wurden 40 bzw. 45µl RPMI 1640, 10% FCS, 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl), wie in Abb. 5a dargestellt, auf eine 96-Well-Rundbodenplatte (Corning Inc., NY, USA) aufgetragen.

w-6 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w-6 h.i.
w0 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w0 h.i.
w2 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w2 h.i.
w4 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w4 h.i.
w16 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w16 h.i.
w18 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w18 h.i.
w32 n.i.	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	45µl	40µl	40µl	40µl	40µl	w32 h.i.
pos.contr	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	40µl	neg.contr

Abb.5a: 40µl bzw. 45µl RPMI 1640, das 10% FCS und 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100µg/µl) enthält, wurde auf einer 96-Well Rundbodenplatte aufgetragen. n.i. steht für nicht hitzenaktiviert und h.i. bedeutet hitzeinaktiviert. Als pos. contr. dienen die Felder, auf die MVA-*gfp* zu einem späteren Zeitpunkt aufgetragen wird, aber kein Plasma bzw. Serum, welches neutralisierende Antikörper enthält. Auf die mit neg. contr. beschrifteten Felder wird weder MVA-*gfp* noch Plasma oder Serum aufgetragen.

Das Plasma oder Serum wurde anschließend, wie in Abb. 5b gezeigt, mit einer Anfangsverdünnung von 1:16,25 in fünf Verdünnungsschritten im Verhältnis 1:5 bis zu einer Verdünnung von 1: 10312,5 hinzugegeben.

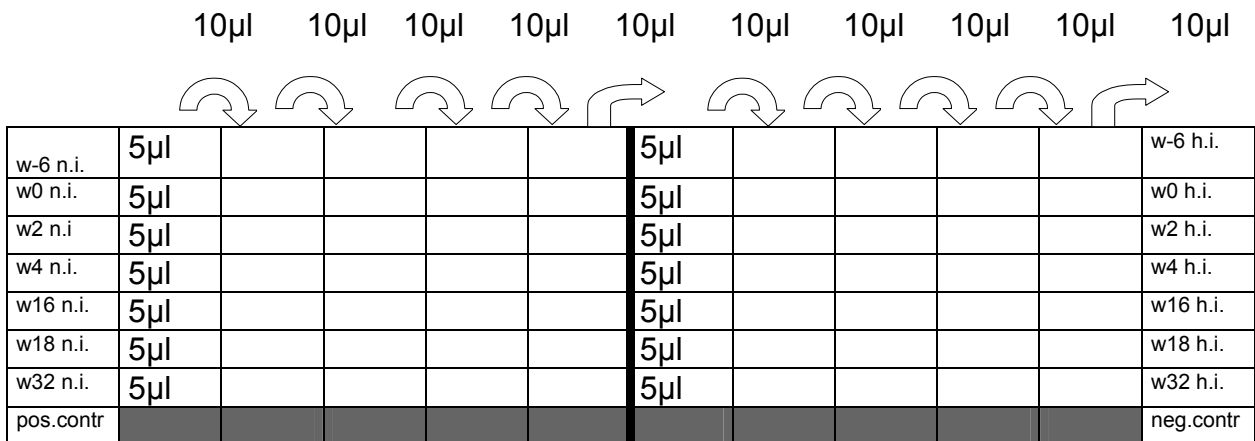


Abb.5b: Das Plasma oder Serum wird in einem Anfangsvolumen von 5µl zu den 45µl RPMI der ersten Spalte hinzugegeben. Nach Mischung werden aus dieser Spalte 10µl entnommen und zu den 40µl der zweiten Spalte hinzugefügt. Auf diese Weise entstehen zunehmend verdünnte plasma- bzw. Serumlösungen. Die grauen Felder werden ausgelassen.

MVA-*gfp* wurde dreimal eine Minute lang gevortexed und zwischendurch auf Eis gestellt. $0,5 \cdot 10^6$ IE MVA-*gfp* in 25µl RPMI, 10% FCS, 1% Antibiotika pro Well wurden auf die Platte aufgebracht (Abb. 5c) und 1 Std. bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Durch diesen Schritt sollten die Antikörper die Möglichkeit haben, MVA zu binden, bevor die Zellen hinzugefügt wurden.

w-6 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w-6 h.i.
w0 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w0 h.i.
w2 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w2 h.i.
w4 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w4 h.i.
w16 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w16 h.i.
w18 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w18 h.i.
w32 n.i.	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl	w32 h.i.
pos.contr	25µl	25µl	25µl	25µl	25µl							neg.contr

Abb. 5c: 25µl MVA-*gfp* pro Well werden auf die Platte aufgebracht. Auf die grau schattierten Felder wird kein MVA aufgebracht. Sie dienen als negative Kontrollen.

Als Zielzellen wurden von den einzelnen Patienten gewonnene Zellen verwandt, die mit EBV immortalisiert wurden. In jedem Experiment wurde die Neutralisation des

Patientenplasmas mit autologen Zellen untersucht. $0,5 \cdot 10^6$ autologe Zellen pro Well wurden in 50 μ l RPMI dazu pipettiert und die Inkubation unter den gleichen Bedingungen für zwei Stunden fortgesetzt.

w-6 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w-6 h.i.
w0 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w0 h.i.
w2 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w2 h.i.
w4 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w4 h.i.
w16 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w16 h.i.
w18 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w18 h.i.
w32 n.i.	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	w32 h.i.
pos.contr	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	neg.contr

Abb. 5d: Schematische Darstellung der Zugabe von 50 μ l RPMI-Medium, das $0,5 \cdot 10^6$ Zellen enthält.

Im Anschluss wurden die Zellen zweimal in RPMI 1640 gewaschen, mit 100 μ l RPMI 1640, 10% FCS, 1% Antibiotika (Penicillin 100U / Streptomycin 100 μ g/ μ l) auf eine 96-Well-Platte mit flachem Boden transferiert und über Nacht bei 37°C in 5%iger CO₂ Atmosphäre inkubiert. Dann wurden sie nach einem Transfer auf eine 96-Well-Rundbodenplatte in PBS gewaschen und in PBS-1% Paraformaldehyd (Fluka, Buchs, Schweiz) fixiert. Anschließend wurde der Anteil der MVA infizierten Zellen im FACScalibur bestimmt, indem die *gfp*-Expression gemessen wurde. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuest Pro Software. Die Neutralisation wurde als die Abnahme der *gfp*-Expression im Vergleich zu Kontrollen, die wir ohne Plasma inkubiert hatten, bestimmt. Um den Zusammenhang zwischen der Plasmadosierung und der Neutralisation abzuschätzen, wurde unter Verwendung von sieben Beobachtungen pro Woche eine lineare Regressionsanalyse auf Basis der kleinsten Quadrate durchgeführt. Der Logarithmus der Verdünnung wurde hierbei als unabhängige Variable und die Neutralisierung als abhängige Variable verwendet. Unter Verwendung der Regressionsergebnisse konnte für die Mehrzahl der Patienten für jede untersuchte Woche die zu einer 80%igen (IC80), 50%igen (IC50) und 20%igen (IC20) Neutralisation führende Plasmakonzentration bestimmt werden. Unter 16,25 liegende Titer wurden im Weiteren nicht beachtet. Alle Plasmaproben einer Person wurden in einem Durchgang untersucht.

Die Neutralisationstests mit Mäuseserum wurden mit einer Anfangsverdünnung des Serums von 1:40 in RPMI 1640 mit sieben Verdünnungsschritten im Verhältnis von 1:6 durchgeführt.

Beim Kaninchen wurde die Neutralisation des Serums (s.o.) in fünf verschiedenen Verdünnungen getestet, wobei die Anfangsverdünnung 1:12 und die Endverdünnung 1:15552 betrug.

Die Neutralisationsfähigkeit von Plasma von Kontrollpersonen wurde mit denselben Bedingungen vom Kaninchen untersucht, jedoch lediglich bis zu einer Verdünnung von 1:2592.

3 Ergebnisse

Kapitel 3 stellt den Kern der vorliegenden Arbeit dar. Es enthält das Prinzip des neu entwickelten MVA-Neutralisationstests sowie die Ergebnisse dessen Überprüfung in unterschiedlichen Serum- bzw. Plasmaproben und die Resultate der klinischen Studie.

Teile der nachfolgenden Ergebnisse wurden unter Cosma *et al.* (19, März 2004) bereits veröffentlicht. Die Autorin war Mitglied dieser Arbeitsgruppe. Die folgenden mit * versehenen Abbildungen und Tabellen beruhen auf Versuchen, die von der Autorin im Zeitraum von Dezember 2001 bis Februar 2003 durchgeführt wurden.

3.1 Entwicklung des MVA-Neutralisationstests

3.1.1 Prinzip des MVA-Neutralisationstests

Eine Impfung stimuliert die spezifischen Immunantworten. Zur Messung von humoralen Immunantworten nach einer Impfung spielen Neutralisationstests eine wichtige Rolle. Sie können zur Beurteilung der Effektivität einer Impfung dienen. Klassischerweise wird der Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test zur Messung Vaccinia-neutralisierender Antikörper angewandt.

Die Nachteile, die ein solcher Test aufweist, liegen in der subjektiven Auswertung, dem großen Zeitaufwand und der bedeutenden Arbeitsintensität. Außerdem erfordert er die Arbeit mit in Säugetierzellen replikationsfähigem Vaccinia Virus.

In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer Neutralisationstest etabliert. Dieser basiert auf dem stark abgeschwächten MVA (Modified Vaccinia Virus Ankara), welches ein grün fluoreszierendes Protein trägt (MVA-*gfp*). Mit dem Test können infizierte Zellen anhand der grünen Fluoreszenz des *Aequorea victoriae* *gfp* Genprodukt erkannt und gemessen werden.

Es wurden Proben von Kaninchen, Mäusen und vom Menschen auf Antikörperantworten und deren Neutralisationsfähigkeit untersucht.

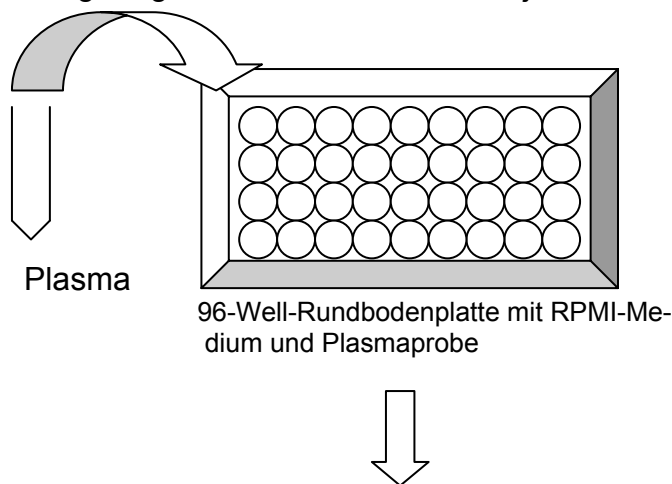
Um zu bestimmen, welcher Anteil durch Antikörper neutralisiert wird, wurden die Komplementfaktoren durch Erhitzen inaktiviert und die Versuche jeweils für nicht

hitzeinaktiviertes und hitzeinaktiviertes Untersuchungsmaterial (Serum bzw. Plasma) durchgeführt. Die MVA-*gfp*-Konzentration betrug 1PFU/Zelle.

Die Proben wurden mit MVA-*gfp* inkubiert und dann die Zielzellen hinzugefügt. Nach einer Inkubation über Nacht wurde die Akquisition und Analyse mit Hilfe des Durchflusszytometers (FACScalibur) durchgeführt. Das Prinzip des durchgeführten Neutralisationstests ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.

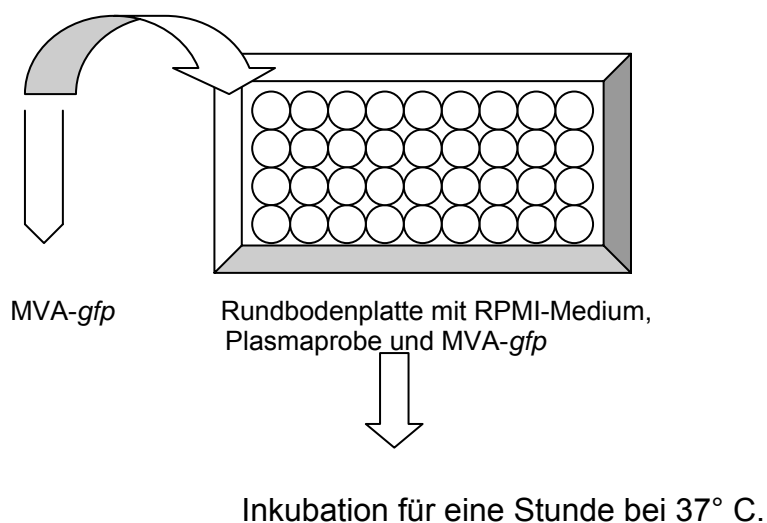
1. Schritt Serienverdünnung des Plasmas

Plasma wird auf die Rundbodenplatte mit einer Anfangsverdünnung von 1/ 16,25 aufgetragen und in 5 Schritten um jeweils 1/5 verdünnt.



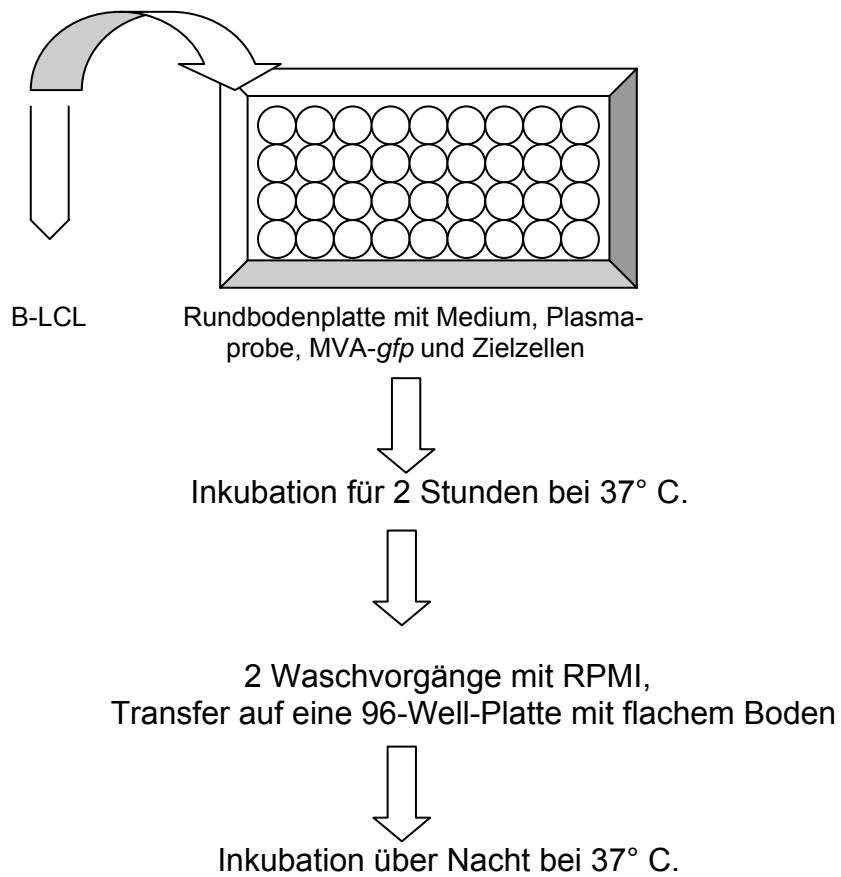
2. Schritt: Zugabe von MVA

MVA-*gfp* wird in 25µl Medium/ Well hinzupipettiert.



3. Schritt: Zugabe der Zielzellen

B- Lymphozyten werden in 50µl/ Well Medium hinzugefügt.



4. Schritt: Fixation und FACS-Analyse

Transfer auf eine Rundbodenplatte
2 Waschvorgänge mit PBS

Fixierung mit 1% PFA

FACSCytometer - Analyse

*Abb. 4 : Schema für den MVA-Neutralisationstest

3.1.2 Differenzierung von toten und lebenden Zellen

Zunächst wurden die Eigenschaften der Zielzellen unter dem Mikroskop und mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht.

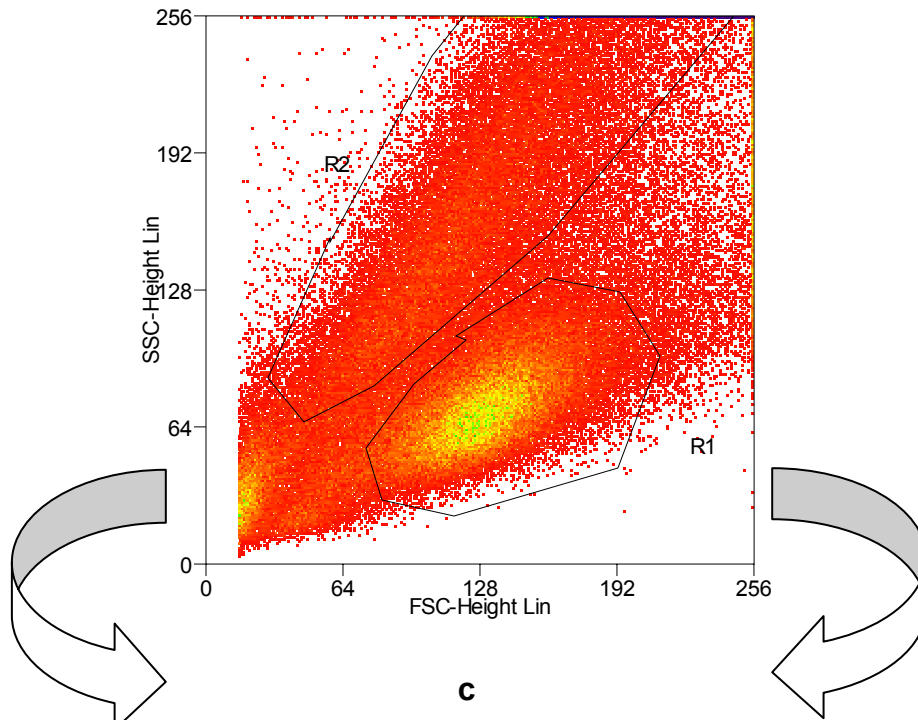
Um im Durchflusszytometer lebende von toten Zellen abzugrenzen, wurde in einem Streudiagramm ein Fenster R1 um die Hauptpopulation gesetzt. Aus Dimension und Granulierung konnte auf lebende Zellen geschlossen werden. Um eine kleine Population mit niedrigem forward und sideward scatter wurde ein Fenster R2 gelegt. Aus Granulierung und Dimension dieser Zellgruppe konnte geschlossen werden, dass es sich um tote Zellen oder Zelltrümmer handelte.

Um zu bestätigen, dass mit dem R1 Fenster im Wesentlichen die lebenden Zellen abgegrenzt wurden, wurde eine Anfärbung mit Ethidium Monoazid (EMA) durchgeführt, um die toten Zellen zu markieren (Abb. 6). EMA diffundiert in tote Zellen und interkaliert mit Zell-DNA. Wenn man es starkem Licht aussetzt bindet es kovalent an die DNA und kann, auch nachdem man die Zellen permeabel gemacht hat, nicht aus den Zellen entweichen. Nach Fixation konnten die toten Zellen durch FACS-Analyse identifiziert werden.

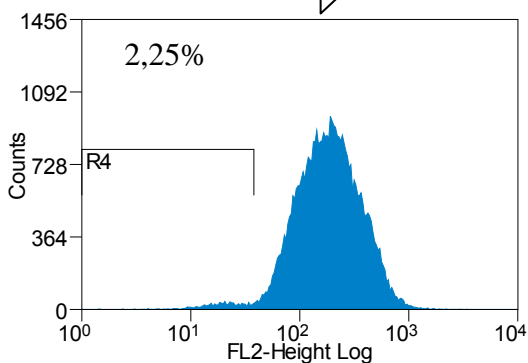
Es war möglich zu zeigen, dass 92,7% der Zellen im Fenster R1 lebendig waren. In R2 dagegen fanden sich nur 2,25% lebende Zellen.

Deswegen war es nicht notwendig die Anfärbung mit EMA bei den weiteren Experimenten durchzuführen und in allen weiteren Schritten wurde das Fenster R1 verwandt, um lebende von toten Zellen und Zelltrümmern abzugrenzen. Innerhalb dieser Zellpopulation wurden die *MVA-gfp* positiven bzw. negativen Zellen gezählt.

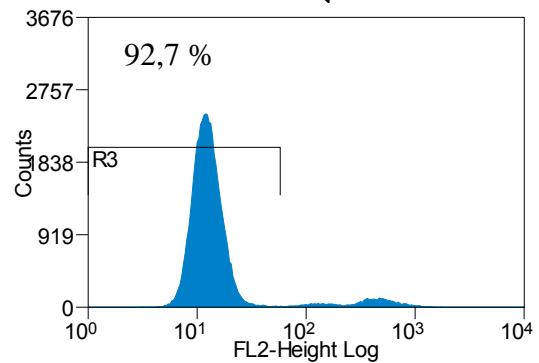
a



b



c



***Abb. 6.** Aufbau des Neutralisationstests.

6a. Repräsentatives Streudiagramm mit einem Fenster (R1), das intakte Zellen von toten Zellen und Zelltrümmern (R2) abgrenzt. FSC-Height lin steht für Forward Scatter Channel und repräsentiert die Größe der Zellen auf einer linearen Messskala. SSC-Height lin bedeutet Sideward Scatter Channel und repräsentiert die Granulierung der Zellen auf einer linearen Messskala.

Abb. 6b und c. EMA-Anfärbung der Zellen. FL steht für Fluoreszenz. FL-2 bedeutet, dass die Emission des Lichts in dem Bereich 585/42nm gemessen wird. In diesem Fall wird eine logarithmische Skala verwendet.

In **Abb. 6b** ist die Verteilung der Zellen aus R2 dargestellt. Dem Fenster R4 werden die in R2 befindlichen lebenden Zellen zugeordnet. Ihr Prozentsatz beträgt 2,25%.

In **Abb. 6c** ist die Verteilung der Zellen aus dem Fenster R1 dargestellt. Dem Fenster R3 werden die in R1 befindlichen lebenden Zellen zugeordnet. Ihr Prozentsatz beträgt 92,66%.

3.1.3 Berechnung der prozentualen Neutralisation

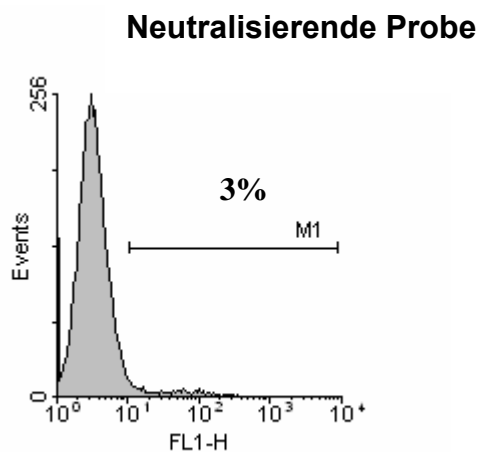
Mit der Hilfe eines Histogramms wurde der Prozentanteil der *gfp* exprimierenden Zellen im Fenster M1 für jede Probe dargestellt. Nach Inkubation von MVA-*gfp* mit einer neutralisierenden Probe wurden 3% der Zielzellen infiziert und exprimierten somit MVA-*gfp* (Abb. 7a).

Dahingegen wurden 35% der Zielzellen mit MVA-*gfp* infiziert, wenn MVA-*gfp* mit einer nicht neutralisierenden Kontrollprobe inkubiert wurde (Abb. 7b).

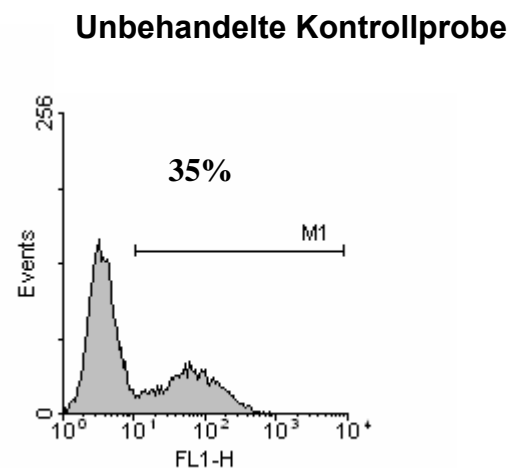
Der Prozentanteil der Neutralisation für jede Serumkonzentration wurde mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\left(1 - \frac{\% \text{ der } \textit{gfp} \text{ exprimierenden Zellen}}{\% \text{ der } \textit{gfp} \text{ exprimierenden Zellen in Kontrollproben}}\right) \times 100$$

a



b



***Abb. 7.** Repräsentative Histogramme. Bei FL-1 handelt es sich um einen Filter, der Licht bei 510/20 nm misst. GFP kann bei dieser Wellenlänge detektiert werden. Im Fenster M1 werden die *gfp* exprimierenden Zellen dargestellt.

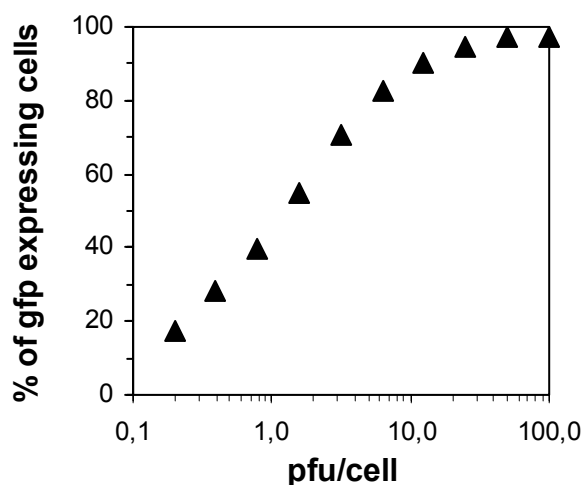
7a. zeigt eine neutralisierende Probe. Der Anteil der *gfp* exprimierenden Zellen beträgt 3%.

7b. zeigt eine nicht behandelte Probe. Der Anteil der *gfp* exprimierenden Zellen beträgt 35%.

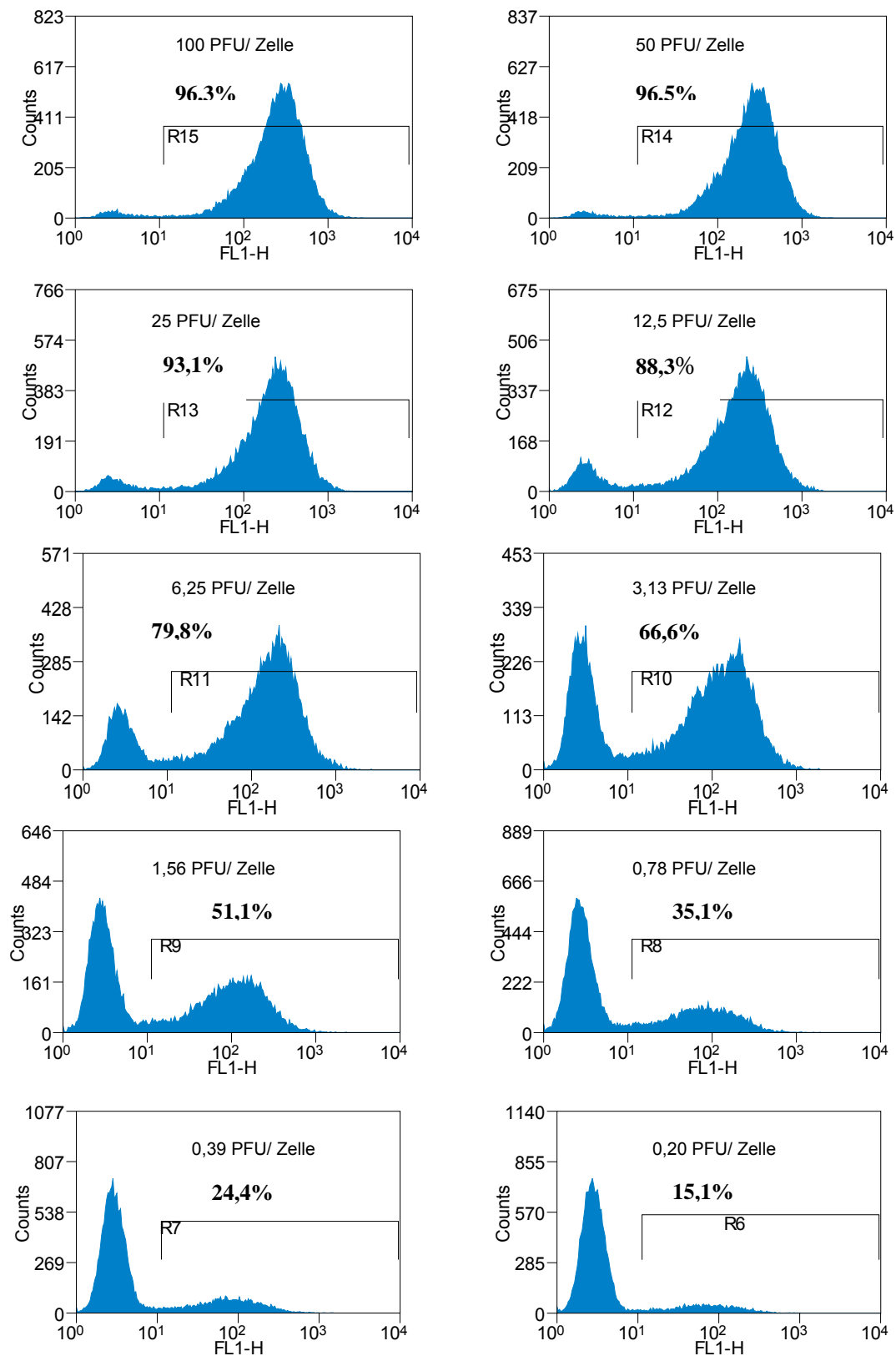
3.1.4 Beziehung zwischen MVA-*gfp* Konzentration und Anzahl der *gfp*-exprimierenden Zellen

3.1.4.1 MVA-Titration

Als ersten Schritt im MVA-Neutralisationstest wurde eine MVA-*gfp*-Titration (Konzentration $5 \cdot 10^9$ IE/ml) mit EBV-immortalisierten Zellen ohne Plasma durchgeführt, um eine geeignete Konzentration für den MVA-Neutralisationstest zu ermitteln (Abb. 8). Dazu wurde eine Anfangskonzentration von 100 IE/Zelle gewählt, und in zehn Schritten jeweils um 50% bis zu einer Endkonzentration von 0,2 IE/Zelle reduziert. Die Zahl der infizierten Zellen wurde im FACScalibur bestimmt und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellquestPro Software. Es ergab sich eine typische sigmoide Kurve zwischen MVA-*gfp* Virusmenge und dem Prozentanteil der infizierten Zellen. Die Kurve stieg zwischen 0,5 PFU pro Zelle und 5 PFU pro Zelle am steilsten an und erreichte bei ca. 10 PFU pro Zelle ein Plateau. Es wurde ein Wert aus dem steilsten Teil der Kurve gewählt, 1 PFU pro Zelle, bei dem die Zahl der infizierten Zellen sich in Abhängigkeit von der Konzentration am schnellsten änderte. Dies geschah unter der Annahme, dass der MVA-Neutralisationstest für einen solchen Wert am sensibelsten sein würde. In Abb. 9 wird die MVA-*gfp*-Infektion der Zellen für die unterschiedlichen MVA-*gfp*-Konzentrationen aufgezeigt. Den Fenstern R6-R15 wird der Prozentanteil der MVA-*gfp*-Infektion zugeordnet.



*Abb. 8. B-Lymphozyten wurden mit verschiedenen Mengen an PFU (plaque forming units) infiziert und die *gfp*-Expression nach 14 Stunden gemessen.

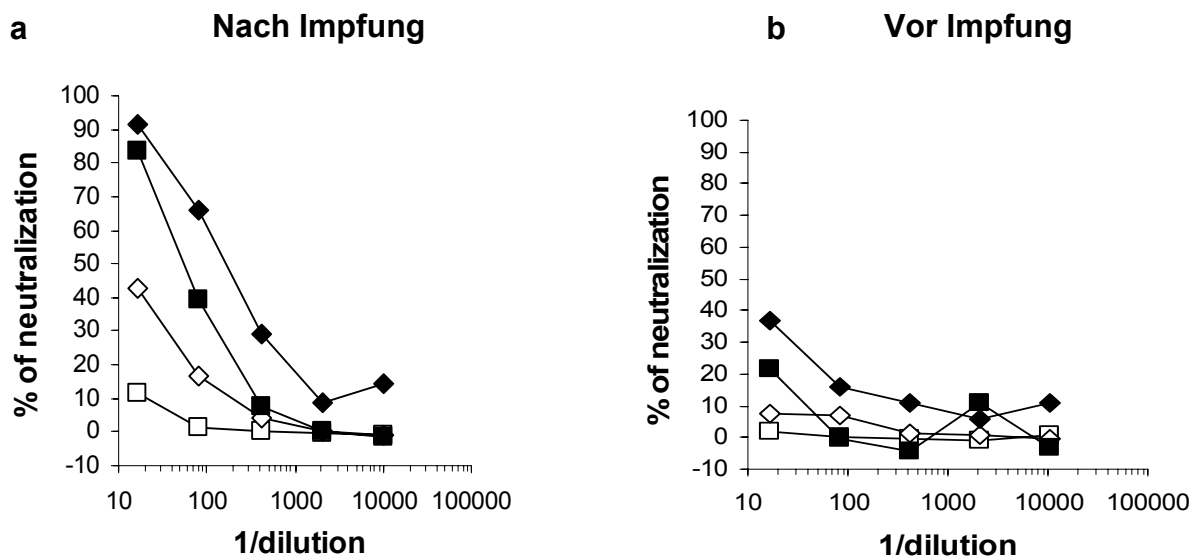


***Abb. 9.** Prozentuale Infektion der Zellen bei abnehmender MVA-*gfp*-Konzentration. Anfangskonzentration von 100 PFU/ Zelle. Reduktion der Konzentration in 10 Schritten jeweils um 50%. In den Regionen R6-R15 befindet sich der Prozentanteil der MVA-*gfp*-infizierten Zellen. Bei FL-1 handelt es sich um einen Filter, der Licht bei 510/20nm misst. GFP kann bei dieser Wellenlänge detektiert werden.

3.1.4.2 Festlegung der optimalen MVA-*gfp*-Konzentration im Neutralisationstest

Um zu überprüfen, ob die geeignete MVA-*gfp* Konzentration gewählt wurde, wurden die Neutralisationsaktivitäten von menschlichen Plasmaproben verglichen, indem sie mit verschiedenen MVA-*gfp* Konzentrationen beimpft wurden (Abb. 10a und b).

Die Plasmaproben wurden von einem Patienten nach der Impfung mit MVA-*nef* gewonnen. Als eine hohe Konzentration von 6 PFU/ Zelle verwendet wurde, konnte keine signifikante Neutralisationsaktivität festgestellt werden. Auch eine Konzentration von 2 PFU/ Zelle erwies sich nicht als sensitiv. Jedoch bei niedrigeren Konzentrationen von 1PFU/ Zelle und 0,5 PFU/ Zelle wurde eine deutliche Neutralisationsaktivität erkennbar (Abb. 10a). In Kontrollproben, die von demselben Patienten vor der Impfung mit MVA gewonnen wurden, konnten unter Verwendung von 0,5 PFU/ Zelle noch sehr hohe Neutralisationsaktivitäten gefunden werden (Hintergrund) (10b). Die Experimente bestätigten somit das Ergebnis, dass eine Konzentration von 1PFU/ Zelle als guter Kompromiss zwischen der Neutralisationsaktivität und dem Anteil der MVA-*gfp*-infizierten Zellen in unbehandelten Kontrollen zu werten ist.



***Abb. 10.** Im Neutralisationstest wurden verschiedene MVA-*gfp*-Mengen verwendet. (◆ 0,5 PFU/ Zelle; ■ 1 PFU/ Zelle; ◇ 2 PFU/ Zelle; □ 6PFU/ Zelle) und die Prozentanteile der Neutralisation werden für 5 Verdünnungen in Serie gezeigt. Das gleiche Experiment wurde sowohl mit menschlichem Plasma, das 2 Wochen nach der Impfung mit MVA gewonnen wurde durchgeführt (a), als auch mit vor der Impfung gewonnenem menschlichem Plasma (b).

3.2 Überprüfung des MVA-Neutralisationstests

3.2.1 Messung neutralisierender Antikörper im Kaninchenserum

Die Evaluierung des MVA-Neutralisationstest wurde am Kaninchenmodell begonnen. Das Kaninchenserum konnte käuflich erworben werden und die Neutralisationsaktivitäten des Serums wurden in fünf verschiedenen Verdünnungen, beginnend bei 1:12 bis hin zu einer Verdünnung von 1:15552, verglichen. Die Neutralisationsaktivität wurde mit Hilfe des FACScalibur bestimmt.

Die verminderte MVA-*gfp* Expression der Zellen wurde gegenüber Zellen bestimmt, die mit MVA-*gfp* ohne die Anwesenheit von Serum inkubiert wurden. Dabei wurden mit Hilfe des FACS-Gerätes die MVA-*gfp*-infizierten Zellen für jeden Verdünnungsschritt bestimmt. Bei der geringen Verdünnung von 1/12 (hohe Serumkonzentration) wurde eine Infektionsrate von 0,6% gemessen. Bei der Verdünnung von 1/72 wurden 5,9% der Zielzellen von MVA infiziert, bei einer Dilution von 1/432 wurden 30,6% der Zellen infiziert. Als das Serum im Verhältnis 1/2592 verdünnt wurde, konnte in 45,8% der Zellen das MVA-*gfp* Konstrukt nachgewiesen werden und bei einer Verdünnung von 1/15552 bei 50,4% der Lymphozyten (Tab. 3a).

Der Prozentanteil der Neutralisation wurde für jede Serumkonzentration mit Hilfe der **im Abschnitt 3.1.3** beschriebenen Formel berechnet.

Bei der geringen Verdünnung von 1/12 fand sich eine Neutralisation des MVA von 98,9%. Bei höherer Verdünnung nahm die Neutralisationsfähigkeit kontinuierlich ab und lag bei einer Endverdünnung von 1/15552 bei 2,7% (Tab. 3b).

In Abbildung 11a ist der empirisch ermittelte Zusammenhang zwischen der prozentualen Neutralisation von MVA und der Verdünnung dargestellt. Dabei wird auf der Abszisse die Verdünnung logarithmisch in der Form $1/\text{Verdünnung}$ aufgetragen. Es liegen 5 Beobachtungsergebnisse vor, die wie zu erwarten eine deutliche Abnahme der prozentualen Neutralisation in Abhängigkeit von den Verdünnungsvariablen zeigen.

3.2.2 Schätzung des linearen Zusammenhangs zwischen Neutralisation und Verdünnung

Zur Ermittlung der Beziehung zwischen Neutralisation und $\ln(1/\text{Verdünnung})$ wurde eine lineare Regressionsanalyse auf Basis der Methode der kleinsten Quadrate durchgeführt. Mit Hilfe der linearen Regression ergibt sich ein geschätzter Zusammenhang zwischen der prozentualen Neutralisation und der exogenen Größe $1/\text{Verdünnung}$ von

$$\text{Neutralisation} = b - a \ln(1/\text{Verdünnung})$$

Hierbei bezeichnen

b den Schnittpunkt mit der Ordinate und

$-a$ die Steigung der Regressionsgeraden.

Diese Beziehung besagt, dass die Zunahme der Variablen $\ln(1/\text{Verdünnung})$ um einen Punkt zu einer Abnahme der prozentualen Neutralisation von a führt.

Die Schätzung der beiden Parameter a und b mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse auf Basis der Kaninchenserumstichprobe ergab die folgende Schätzgleichung (vgl. Abb. 11b):

$$\text{Neutralisation} = 149,45 - 17,285 \ln(1/\text{Verdünnung})$$

In anderen Worten, steigt die Verdünnung beispielsweise um den Faktor 10, so nimmt die prozentuale Neutralisation um $a \ln(10) = 40,95\%$ ab.

Für die lineare Regression ergibt sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,9508$. Dieses hohe Bestimmtheitsmaß zeigt, dass ein guter linearer Zusammenhang zwischen der prozentualen Neutralisation und dem Logarithmus der Verdünnung besteht. Allerdings dürfte das hohe Bestimmtheitsmaß vor allem auf die kleine Zahl der Beobachtungen zurückzuführen sein.

Die Auswertung der Experimente wird im Weiteren beispielhaft anhand der Ergebnisse des Kaninchen-MVA-Neutralisationstests beschrieben. Sie wurde auf die gleiche Weise bei den Untersuchungen von Maus und Menschen durchgeführt.

Es wurden die Werte für eine 20%ige (IC20), eine 50%ige (IC50) und eine 80%ige Neutralisation (IC80) errechnet.

Um zu bestimmen, welcher Anteil durch Antikörper neutralisiert wird, wurden die Komplementfaktoren durch Erhitzen inaktiviert. Es konnte festgestellt werden, dass hitzeinaktiviertes Serum fast gleich stark MVA neutralisiert wie unbehandeltes Serum. Somit konnte das Komplement keinen großen Einfluss auf die Neutralisierung gehabt haben. Aus dieser Beobachtung lässt sich folgern, dass Anti-Vaccinia Virus Antikörper im Kaninchenserum das MVA-gfp in unserem Versuch neutralisieren konnten.

Das kommerzielle Anti-Vaccinia-Virus Serum neutralisierte MVA-gfp mit einer IC50 von 315 (Abb. 11c). Das Plasma neutralisierte nicht ein Nef-Protein, wie eine Kontrollanalyse ergab.

MVA-gfp-Neutralisationstest

a Kaninchensera

1/ Verdünnung	Anti-MVA	Anti-MVA hi	Anti-Nef	Anti-Nef hi
12	0,6	0,7	49,4	47,4
72	5,9	12,9	50,9	45,9
432	30,6	38,7	51,8	49,6
2592	45,8	48,8	51,9	50,3
15552	50,4	52,0	51,7	51,3

Median Positive control 51,82

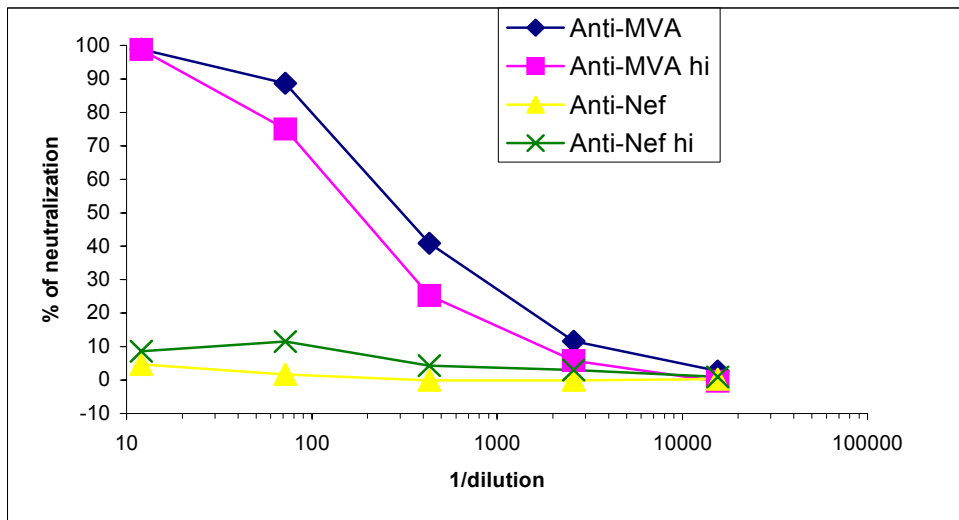
1/ Verdünnung	Anti-MVA	Anti-MVA hi	Anti-Nef	Anti-Nef hi
12	98,9	98,7	4,7	8,6
72	88,7	75,0	1,7	11,5
432	40,9	25,3	0,0	4,3
2592	11,6	5,8	-0,1	3,0
15552	2,7	-0,3	0,3	1,0

b

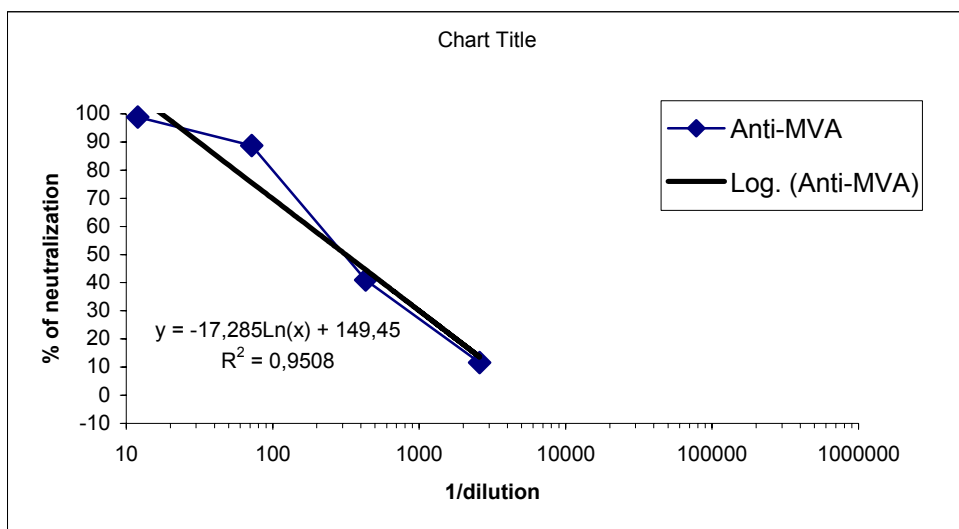
*Tabelle 3a. gibt die Anzahl der MVA-infizierten Zellen in Prozent an (entspricht den *gfp*-exprimierenden Zellen).

*Tabelle 3b. gibt den Prozentanteil der Neutralisation des Serums wieder.

a



b



c

	a	b	50% neutr	20%	80%
Anti-MVA	-17,285	149,45	315	1789	56

*Abb. 11a. Das Schaubild zeigt die Kurven der prozentualen Neutralisation in Abhängigkeit von der Verdünnung.

Ein Anti-Vaccinia Kaninchenserum, das für den auf Plaquebildung basierenden Titrationstest verwendet wurde, wurde mit dem MVA-Neutralisations-Test untersucht (hitzeinaktiviert ■, nicht hitzeinaktiviert ♦), zusammen mit einem unabhängigen Kaninchenkontrollserum (hitzeinaktiviert x, nicht hitzeinaktiviert ▲).

*Abb. 11b und c. Lineare Regressionsanalyse am Kaninchen

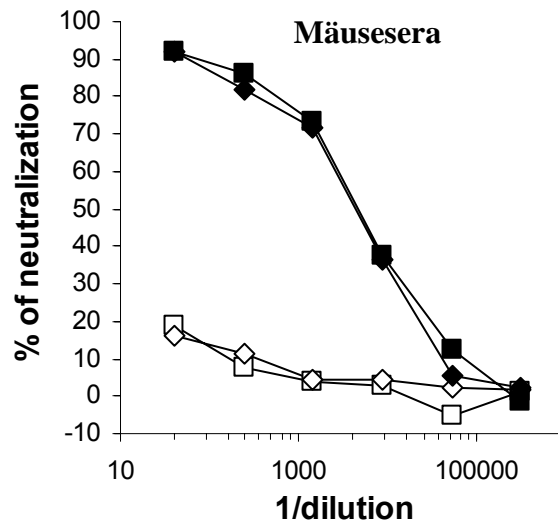
3.2.3 Messung neutralisierender Antikörper im Mäuseserum

Drei HLA-A*0201 Kb Mäuse wurden zweimal mit 10^8 IE MVA-Tyr immunisiert und Serum zwei Monate nach der zweiten Impfung gewonnen. Wie erwartet, fanden sich mit einem Standard ELISA hohe Spiegel MVA-spezifischer Antikörper in den Sera der drei geimpften Mäuse. In den Sera von zwei ungeimpften Mäusen, die der Kontrolle dienten, wurden keine Antikörper detektiert.

Die gleichen Sera wurden auch mit dem MVA-Neutralisationstest untersucht (Abb. 12). Der Neutralisationstest wurde auf die gleiche Art wie beim Kaninchenserum durchgeführt. In diesem Fall wurden aber 7 unterschiedliche Verdünnungen: 1/ 40, 1/ 240, 1/ 1440, 1/ 8640, 1/ 51840, 1/ 311040 und 1/1866240 verwandt. Dabei ergaben sich für hitzeinaktivierte und unbehandelte Seren nur geringe Unterschiede.

Als Kontrolle dienten die Seren von zwei naiven A2.1 KB Mäusen. Während die Seren der naiven Mäuse nur geringe Neutralisationsfähigkeiten zeigten, die wahrscheinlich auf das Komplement zurückzuführen sind, neutralisierten die MVA-Tyr geimpften Mäuse bei einer Verdünnung von 1:40 fast vollständig. Die prozentuale Neutralisation lag bei 96,8% bzw. 96,4%. Die Neutralisationsfähigkeit nahm mit zunehmender Verdünnung, wie zu erwarten, ab und erreichte bei einer Verdünnung von 1/ 1866240 Werte von 5,5 bzw. -0,2. Dabei waren die Unterschiede für nicht inaktiviertes Serum und hitzeinaktiviertes Serum gering. Daraus lässt sich folgern, dass die durch die Immunisierung hervorgerufene Antikörperantwort die Hauptrolle bei der Inaktivierung des MVA übernimmt. Die Sera neutralisierten MVA-*gfp* mit einer 50%igen inhibitorischen Konzentration IC_{50} von jeweils 5679 bzw. 6092.

MVA-gfp-Neutralisationstest



***Abb. 12.** Neutralisierende Antikörper in Mäuseproben.

Die Sera von zwei MVA-geimpften (■, ◆) und zwei naiven Mäusen (□, ◇) wurden mit dem Neutralisationstest auf MVA-bindende Antikörper getestet. Das Schaubild zeigt die repräsentativen Ergebnisse aus einem von drei Experimenten.

3.2.4 Messung neutralisierender Antikörper in menschlichem Plasma

Als nächstes wurde der MVA-Neutralisationstest zur Messung Vaccinia Virus-spezifischer Immunantworten beim Menschen angewandt. Dazu wurde in einem ersten Schritt das Plasma von HIV-negativen Probanden mit dem gleichen Versuchsaufbau wie bei den Analysen von Kaninchen- und Mäuseserum untersucht. Die Experimente wurden in den Plasmaverdünnungen 1/12, 1/72, 1/432 und 1/2592 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Neutralisationsaktivitäten von Individuen, die gegen Pocken geimpft waren mit denen von ungeimpften Personen verglichen.

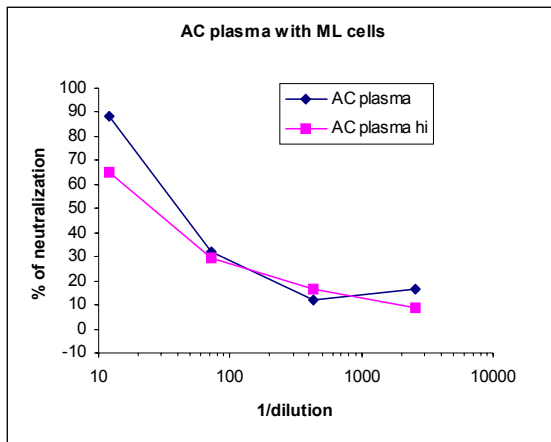
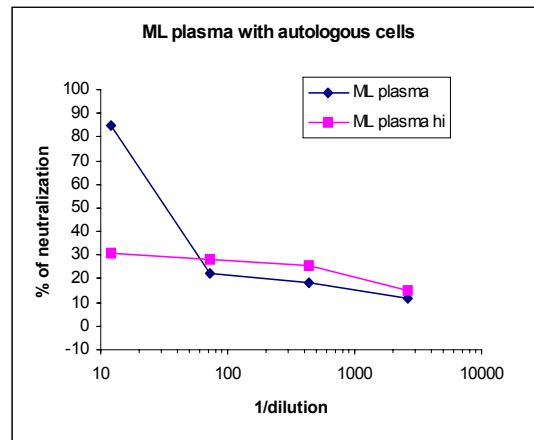
Die prozentuale Neutralisation eines nicht gegen Pocken geimpften Individuums (Abb. 14b) lag nach Hitzeinaktivierung des Plasmas bei einer Verdünnung von 1/12 bei 31%, während es ohne Hitzeinaktivierung deutlich höher bei 85% lag. Die Werte nahmen beim weiteren Verdünnen wie zu erwarten kontinuierlich ab (Abb. 14b).

Dagegen zeigte eine gegen Pocken geimpfte Person (Abb. 14a) höhere Neutralisierungsaktivitäten des Plasmas. So ergaben sich bei einer Verdünnung von 1/12 in der Versuchsdurchführung mit Hitzeinaktivierung eine prozentuale Neutralisation von 64,9%, während die nicht hitzeinaktivierten Plasmaproben eine Neutralisationsfähigkeit von 88,7% aufwiesen. Bei Verdünnung der Plasmaproben nahm auch bei diesem Experiment die prozentuale Neutralisation kontinuierlich ab (Abb. 14a).

Insgesamt fanden sich deutliche Unterschiede zwischen den Neutralisierungsfähigkeiten hitzeinaktivierten und unbehandelten Plasmas. Bei den ungeimpften Individuen waren diese Unterschiede deutlicher. Das Plasma ohne aktives Komplement (hitzeinaktiviert) der nicht immunisierten Personen neutralisierte kaum. Die immunisierten Individuen wiesen deutliche Antikörper-Aktivitäten auf.

Zusammenfassend kann nach der Untersuchung von Kaninchenserum, Mäuseserum und menschlichem Plasma festgestellt werden, dass der MVA-Neutralisationstest zur Messung neutralisierender Antikörper beim Kaninchen, bei der Maus und beim Menschen geeignet ist. Der Neutralisationstest wurde jeweils für hitzeinaktivierte und nicht hitzeinaktivierte Spezimen durchgeführt.

Bei Kaninchen und Maus ergaben sich keine großen Unterschiede. Beim Menschen jedoch wichen die Meßwerte beträchtlich voneinander ab. Vor Hitzeinaktivierung zeigten sich sehr viel höhere Werte als nach der Hitzeinaktivierung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die höhere Aktivität in nicht hitzeinaktivierten Proben durch Komplement hervorgerufen wurde. Die Neutralisationsfähigkeit der hitzeinaktivierten Plasma- bzw. Serumproben entspricht der Neutralisationsaktivität durch Antikörper. Die Neutralisationsaktivität des Komplements steht in keiner Korrelation zur Impfung oder Immunantwort und ist deshalb für uns nicht von Interesse. Den weiteren Experimenten liegen deshalb ausschließlich nach Hitzeinaktivierung ermittelte Werte zugrunde.

a**b**

***Abb. 14.** **a.** AC: Individuum mit Pockenimpfung.
b. ML: Individuum ohne Pockenimpfung. Repräsentatives Beispiel aus 2 Experimenten
 Die Buchstaben repräsentieren nicht die Initialen von Probanden.

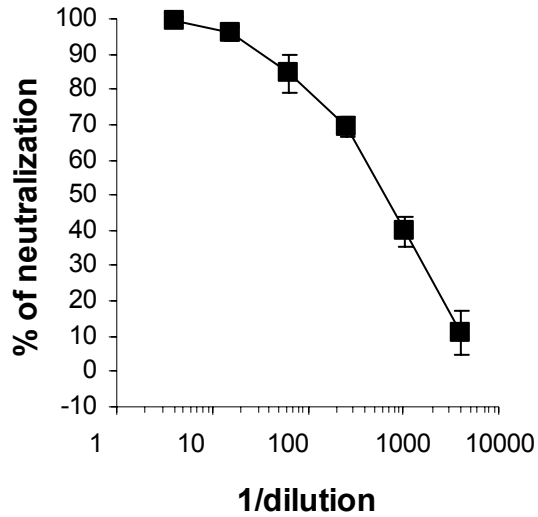
3.2.5 Vergleich des MVA-Neutralisationstests mit Standard PRNTs

Im nächsten Schritt wurden die Ergebnisse der Anwendung des MVA-Neutralisationstests auf menschliche Proben mit den Plaque-Reduktions-Neutralisations-Tests (PRNTs) verglichen. Dazu wurde die Neutralisationsfähigkeit von Anti-Vaccinia Virus Immunglobulin (VIG) untersucht. Bei VIG handelt es sich um Anti-Vaccinia Virus Immunglobulin-Präparate, die aus dem Blut mit Vaccinia Virus geimpfter Individuen gewonnen wurden. Diese Präparate dienen der therapeutischen Anwendung bei progressiver Vaccinia nach Pockenimpfung.

Das VIG-Präparat wurde mit Hilfe des Vaccinia-Virus Elstree PRNT untersucht und eine IC50 von 607 (Abb. 13a) gemessen. Die Analyse mittels MVA PRNT lieferte eine IC50 von 642 (Abb. 13b), ein nahezu identisches Ergebnis. Mit dem MVA-Neutralisationstest konnten ebenfalls Vaccinia Virus Antikörper entdeckt werden und es wurde eine IC50 von 284 (Abb. 13c) gefunden.

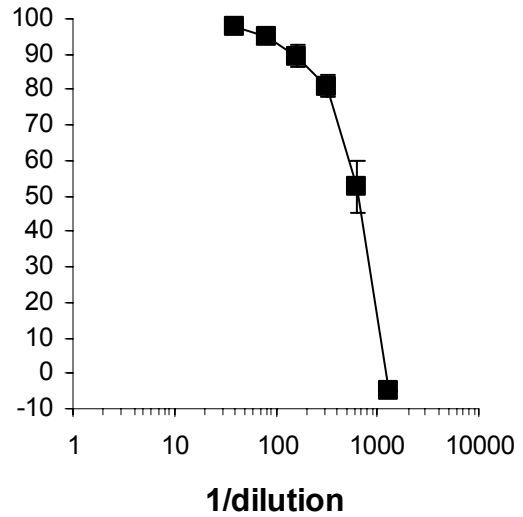
a

Vaccinia-Virus Elstree PRNT



b

MVA PRNT



c

MVA-gfp-Neutralizationstest

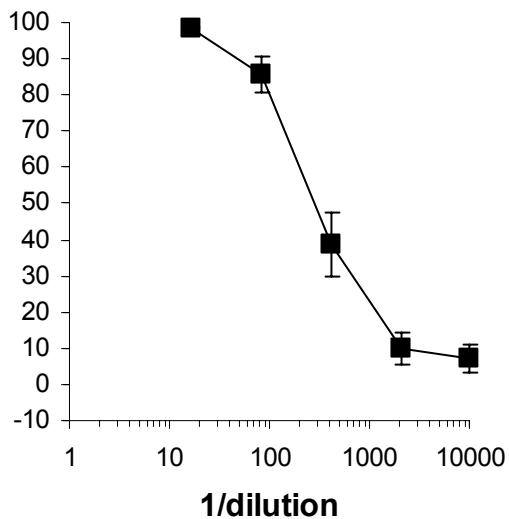


Abb. 13. Eine Präparation von VIGs (Anti-Vaccinia Virus-Immunglobulin) wurde in 3 parallelen Ansätzen getestet.

Abb. 13a. Neutralisationsaktivität gemessen mit Hilfe des Standard Vaccinia Virus Elstree PRNT (plaque reduction neutralisation test). Die Durchschnittswerte aus 6 Experimenten werden gezeigt.

Abb. 13b. Neutralisationsaktivität des VIG gemessen mit Hilfe eines MVA-PRNT. Es werden die Durchschnittswerte aus 2 Experimenten gezeigt.

***Abb. 13c.** Neutralisationsaktivität des VIG gemessen mit dem MVA-gfp-Neutralisationstest. Es werden die Durchschnittswerte aus 3 Experimenten gezeigt. Es wurde jeweils die Standardabweichung mit aufgetragen.

3.3 Einsatz des MVA-Neutralisationstests in einer klinischen Studie an HIV-positiven Individuen

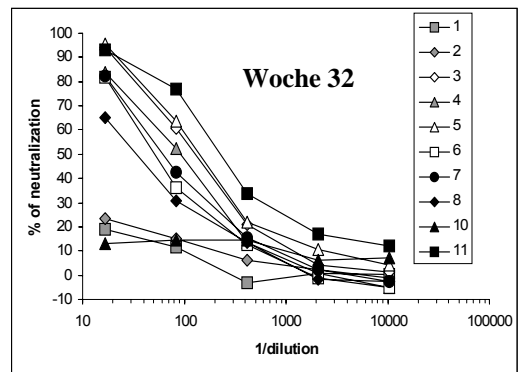
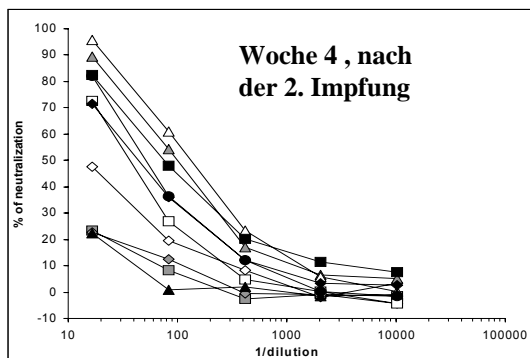
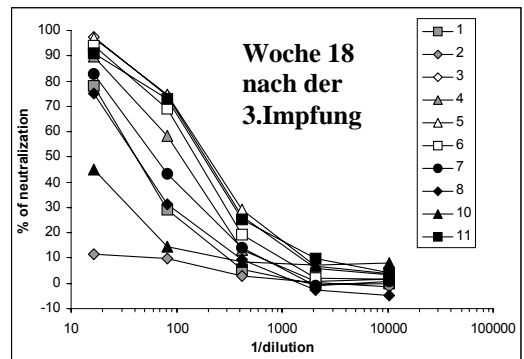
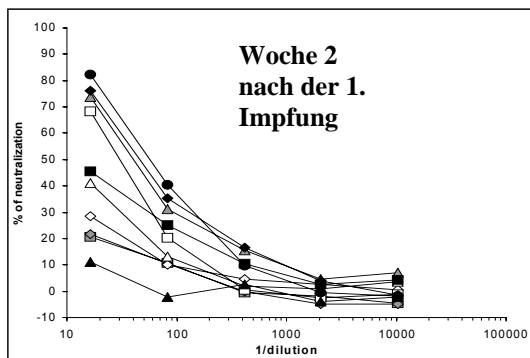
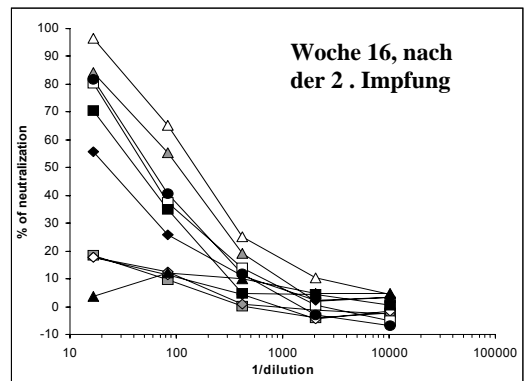
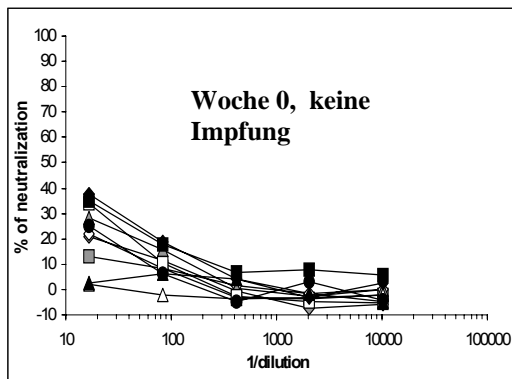
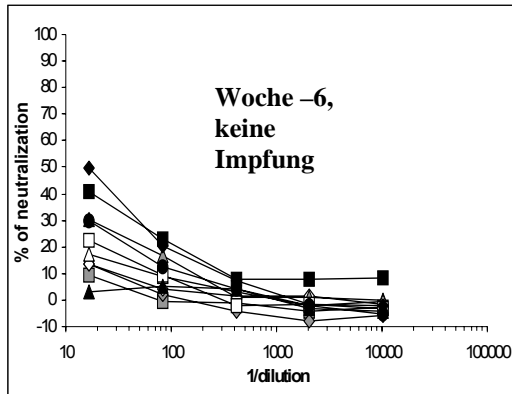
Im Abschnitt 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass mit dem MVA-Neutralisationstest die Immunantwort bei Menschen untersucht werden kann, die mit Vaccinia Virus geimpft wurden.

Im nächsten Schritt wurde nun der MVA-Neutralisationstest in einer klinischen Studie angewandt. MVA diente in dieser Studie als Vektor für ein Regulatorprotein von HIV, dem Nef-Protein. Zehn chronisch HIV-infizierte Patienten wurden mit einer MVA-*nef* Vakzine geimpft. Der Impfstoff wurde dreimal zu den Zeitpunkten Woche 0, 2 und 16 verabreicht. In einer retrospektiven Studie wurden dann die Vektor-spezifischen Immunantworten untersucht. Darüber hinaus wurde von Cosma *et al.* die Nef-spezifische Zellreaktion auf die Impfung untersucht (19). Durch intrazelluläres Zytokinstaining mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die IFN- γ -Produktion von CD4+ und CD8+ Zellen, nach in vitro Stimulation mit Nef-Proteinen, gemessen.

Es sollte in diesem Zusammenhang untersucht werden, welche Beziehung zwischen der Immunantwort gegen den Vektor und gegen das exprimierte HIV-Protein besteht.

Patient 10 entwickelte besonders starke Nef-spezifische CD4+ T-Zell-Antworten, die nach jeder Applikation der Nef-Vakzine verstärkt wurden. Nach der dritten Impfung in der 18. Woche waren 1% der CD4+ Lymphozyten spezifisch für Nef.

Bei keinem anderen Patienten zeigte die Impfung eine solch starke Wirksamkeit. Alle untersuchten Individuen bis auf Patient 10 hatten in ihrer Kindheit eine Pockenimpfung erhalten (Tabelle 2). Es besteht deshalb die Vermutung, dass die Pockenimpfung und die damit stimulierte Immunantwort einen Einfluss auf den Impferfolg hat. Damit stellte sich die Frage, ob MVA-spezifische Antikörper negative Auswirkungen auf die Wirksamkeit des MVA-*nef*-Vektors haben. Aus diesem Grund wurde ein MVA-Neutralisationstest durchgeführt, mit dem die humoralen Immunantworten im Plasma der geimpften Individuen gegen MVA vor der Vakzination in der Woche -6 und 0 und an fünf Zeitpunkten nach der ersten Applikation des Impfstoffes untersucht wurden.



***Abb. 15.** Verlauf der prozentualen Neutralisation von MVA in Abhängigkeit von der Verdünnung des Serums bei zehn chronisch HIV-infizierten Patienten im Rahmen einer Impfstudie mit einem MVA-*nef*-Konstrukt.

Die Impfung erfolgte zum Zeitpunkt 0, und weiterhin in der 2. und 16. Woche.

Zum Zeitpunkt –6 und 0 bestanden niedrige MVA-Neutralisierungsaktivitäten bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten mit Titern von 0 bis 13 (Mittelwert 2,05) (Abb. 15a, b). Nach der ersten Impfung wurde in der 2. Woche ein deutlicher Anstieg in den Neutralisationsaktivitäten mit Titern von 0 bis 64 gemessen (Mittelwert 24,7) (Abb. 15c). Diese Werte wurden durch die zweite Impfung nochmals deutlich gesteigert (Werte der Wochen 4 und 16: von 0 bis 166,4, Mittelwert 49,23) (Abb. 15d, e). Nach der dritten Vakzination stiegen die Titer in der Woche 18 weiterhin stark an (8 bis 208,6; Mittelwert 110,9) und konnten auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden (Woche 32: IC50=0 bis 251, Mittelwert 86,34).

MVA zeigte somit eine starke immunogene Wirkung und es konnte ein Anstieg der humoralen Immunantwort festgestellt werden.

3.3.1 Sicherheit der MVA-*nef*-Vakzine

Die Viruslast lag vor den Impfungen bei acht von zehn Patienten unter der Nachweisgrenze von 50 RNA Kopien/ml. Patienten 2 und 3 dagegen hatten eine höhere Viruslast (Tab. 2). CD4+ Zellzahlen und die Höhe der Viruslast konnten bei allen Teilnehmern während den Impfungen aufrechterhalten werden.

Zudem wurden praktisch keine ernsthaften Nebenwirkungen während eines Zeitraums von 1 Jahr beobachtet.

Die meisten Nebenwirkungen, über die berichtet wurde, traten an der Einstichstelle der Impfung auf. Sie wurden von den Patienten als leichte oder mäßige Rötung, Schwellung oder Verhärtung beschrieben. Solche eine Reaktion wurde bei neun von zehn Patienten mindestens einmal, bei zwei Patienten auch nach der zweiten Impfung und bei einem Teilnehmer nach allen 3 Impfungen beschrieben. Ein Patient hatte gar keine Nebenwirkungen.

Fünf Teilnehmer entwickelten einen leichten Temperaturanstieg (immer <38°), zwei fühlten sich insgesamt geschwächt nach der ersten Injektion.

Weitere leichte Symptome wurden sowohl vom Patienten als auch vom Arzt als unabhängig von der Impfung und vom Impfstoff eingeordnet. Nach den Impfungen wurden keine klinischen Zeichen wahrgenommen, die in Bezug zu einer MVA-Replikation stehen konnten.

3.3.2 Immunogenität von MVA: Verteilung der Neutralisation bei den einzelnen Patienten

Nach drei Vakzinationen mit MVA-*nef* wurden MVA-neutralisierende Antikörper bei allen geimpften Personen entdeckt (Abb. 15). Im Weiteren wird die Reaktion der einzelnen Patienten auf die Impfung beschrieben.

Vor Verabreichung von MVA-*nef* konnten bei Patient 10 keine MVA-spezifischen Antikörper entdeckt werden. Auch nach der ersten und zweiten Impfung konnte kein bedeutender Titer gemessen werden an. In Woche 18 nach der dritten Impfung zeigte Patient 10 einen vorübergehenden Anstieg des Titers auf 8. Dieser fiel jedoch bereits in Woche 32 wieder ab. Auch Patient 2 entwickelte nur eine sehr schwache humorale Immunantwort auf MVA.

Bei Patient 1 und 3 ließen sich vor und nach den ersten beiden Impfungen keine humorale Immunantwort gegen MVA entdecken. In Woche 18 dagegen, nach Verabreichung der dritten Vakzination, fanden sich Titer von 47,46, respektive von 187,03. Diese hohen Werte konnten bei Patient 3 auch noch in Woche 32 (IC₅₀ = 127,44) gemessen werden, während sie bei Patient 1 wieder abfielen (IC₅₀ = 0,21).

Dagegen wurden hohe Antikörper-Titer gegen MVA bei den Patienten 4, 5, 6, 7, 8 und 11 beobachtet, die alle in ihrer Kindheit gegen Pocken geimpft wurden. Vor den Impfungen lag der mittlere Titer bei 3,28, mit Werten von 0 bis 13. Nach der ersten Verabreichung von MVA-*nef* stiegen die Titer auf Werte von 7,3 bis 64, Mittelwert 40,8.

Besonders deutlich fiel der Anstieg bei Patienten 4, 6 und 7 aus. Patient 4 zeigte vor der MVA-*nef*-Vakzination Antikörper-Titer von 2,06, und nach der ersten Impfung in Woche 2 Titer von 42,6. Bei Patient 5 stiegen die Werte von durchschnittlich 2 in Woche -6 und 0 auf Werte von 31 in Woche 2 und Patient 7 steigerte seine Antikörper-Antwort von einem durchschnittlichen Titer von 1 auf einen Titer von 64.

Nach der zweiten Impfung wurde der Titer bei den Patienten 4, 5, 6, 7, 8 und 11 aufrechterhalten oder meistens sogar noch gesteigert.

So fanden sich Werte von 0,05 bis 166,4 (Mittelwert 75,5). Nach der 3. Impfung wurden in Woche 18 noch einmal erhöhte humorale Immunantworten mit Titern von 47 bis 208,6 gemessen. (Mittelwert 126). Diese wurden in allen Fällen über einen

längeren Zeitraum aufrechterhalten und mit dem MVA-Neutralisationstest wurden in Woche 32 Werte von 36 bis 251 ermittelt (Mittelwert 105,1).

Unter den auf Nef ansprechenden Patienten die niedrigste Immunantwort gegen MVA bei Patient 10 gefunden wurde. Bei Patient 10 fanden sich lediglich in der 18. Woche eine schwache Neutralisationsaktivität mit einer IC50 von 8, dagegen aber hohe Nef-spezifische CD4+ T-Zell-Antworten. Somit scheint das nicht gegen Vaccinia bereits immunisierte Individuum besser auf die Nef-Vakzine anzusprechen als die immunisierten Personen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dem MVA-Neutralisationstest humorale Immunantworten gegen MVA nach Vakzination mit MVA-Nef entdeckt werden konnten. Bereits nach der ersten Impfung konnte ein deutlicher Anstieg der Neutralisationsfähigkeit entdeckt werden. Durch die zweite Impfung wurden die Werte nochmals gesteigert. Nach der dritten Vakzination stiegen die Titer in der Woche 18 weiterhin deutlich an und konnten auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Es ließ sich somit zeigen, dass MVA eine starke immunogene Wirkung hatte.

3.3.3 Stichprobenanalyse unter Verwendung der „area under the curve (AUC)“-Methode

Für eine komprimierte Darstellung der Untersuchungsergebnisse wird unter Verwendung des „area under the curve (AUC)“-Konzepts die durchschnittliche prozentuale Neutralisation von MVA durch das Patientenplasma ermittelt. Dazu wurde die Fläche unter den in Abb. 15 wiedergegebenen Kurven der prozentualen Neutralisation in Abhängigkeit des Verdünnungsgrades für jeden Patienten berechnet. Diese Methode wurde bereits von Lubaki *et al.* (40) verwendet, um die ermittelten Daten besser vergleichbar zu machen.

Die Fläche unter der Kurve eines einzelnen Patienten ist definiert als das Integral der MVA-spezifischen prozentualen Neutralisation, $\ln(r)$, wobei r die Variable $1/\text{Verdünnung}$ repräsentiert. Somit ergibt sich folgende Formel für die „area under the curve“ A_{ij} des Patienten i ($i= 1, \dots, 11$) in der Woche j ($j=w-6, \dots, w32$):

$$A_{ij} = \int_{1/16,5}^{1/10312,5} \ln(r) dr$$

Die ermittelten Werte sind in Abb. 16 dargestellt. Dabei befinden sich auf der Abszisse die unterschiedlichen Wochen von –6 bis 32 und auf der Ordinate die Fläche unter der Kurve (AUC) für jeden einzelnen Patienten.

Die waagrechte Linie stellt dabei den Median dar, um den sich die einzelnen Werte gruppieren.

Auf diese Weise können die prozentualen Neutralisationen, für jede Woche spezifisch, übersichtlich aufgetragen werden.

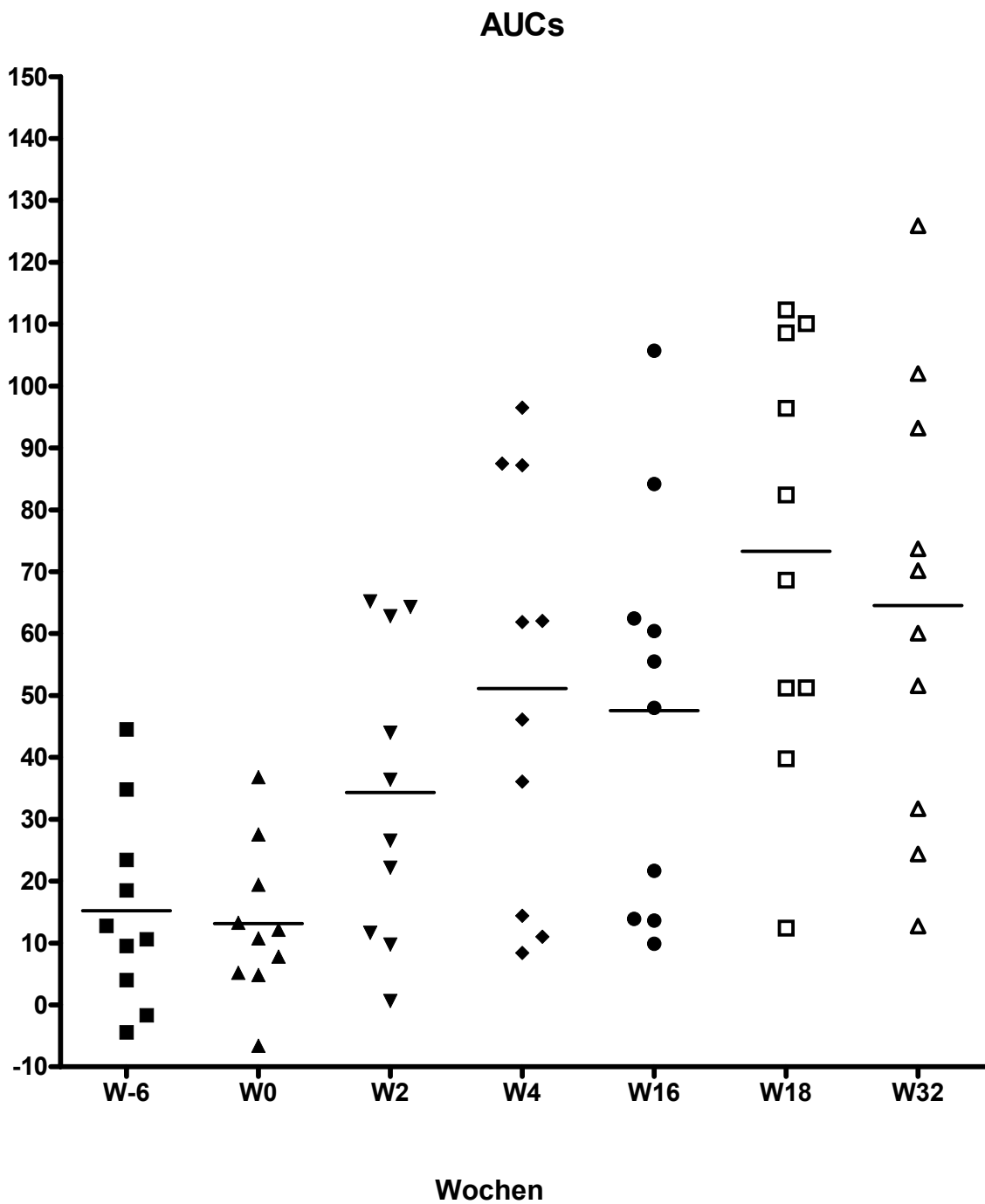
Aus Abb. 16 ist zu erkennen, dass die mittlere MVA-Neutralisationsaktivität nach jeder MVA-Nef-Impfung in Woche 0, 2 und 16 ansteigt.

Der Mittelwert der AUC liegt in den Wochen –6 und 0 bei 14,2 (Werte von –6 bis 44,5) (Median w–6: 11, 7, w0 11,4).

In der Woche 2 nach der ersten Impfung steigt dieser auf 34,3 (Werte von 0,6 bis 65,2) Median (w2:31,5) und nach der zweiten Impfung in der Woche 4 findet sich eine mittlere AUC von 51,1 (Werte von 8,4 bis 96,5) (Median w4: 54,01).

Die AUC fällt in der Woche 16 leicht auf Werte von 45,2 (Werte von 9,9 bis 105,7) (Median 51,7) ab und steigt nach der dritten Vakzination auf 73,3 (Werte von 12,4 bis 112,3) (Median 75,5).

Am letzten Beobachtungszeitpunkt, der Woche 32, ließen sich Werte von im Mittel 64,5 messen (Werte von 12,8 bis 126) (Median 65,1). Diese sind wieder niedriger als in Woche 18, aber noch immer deutlich höher als die Werte, die vor der Verabreichung der Vakzine und nach den ersten beiden Impfungen ermittelt wurden.



***Abb. 16.** Area under the curve (AUC) der prozentualen Neutralisation. Darstellung der Entwicklung im Verlauf der klinischen Studie. Über jeder der Wochen –6 bis 32 sind die durchschnittlichen Neutralisationswerte der zehn Patienten aufgetragen. Die Einheiten der AUC wurden unter Verwendung von GraphPad Prism version 4.02 (San Diego, California, USA) berechnet.

3.3.4 Analyse der „Area under the curve (AUC)“ für jeden einzelnen Patienten

In Abb. 17 ist die AUC für jeden Patienten einzeln zu den sieben Untersuchungszeitpunkten w-6, w0, w2, w4, w16, w18, w32 aufgetragen. Aus ihr lässt sich die zeitliche Entwicklung der Immunantwort auf MVA für jeden Teilnehmer der klinischen Studie ablesen.

Für Patient 10 ist zu erkennen, dass die Werte bis zur 18. Woche konstant niedrig bleiben, sie liegen zwischen 0,6 und 21,7. Erst nach der 3. Impfung konnten sich Werte von 39,8 gemessen werden. Jedoch bereits in Woche 32 lässt sich eine abnehmende Tendenz erkennen.

Patienten 1 und 3 zeigen auch erst nach der 3. Vakzination eine deutliche Reaktion mit AUC-Werten von 51, 25 bzw. 110,1. Bei Patient 1 fielen diese Werte rasch wieder ab, wohingegen Patient 3 auch in Woche 32 noch eine AUC von 93,2 aufweist.

Bei den Patienten 4, 5, 6, 7, 8, 11 zeichnet sich ein deutlicher Anstieg der Titer bereits nach der 1. Impfung ab. Danach stagnierten die Werte oder stiegen über den gesamten Studienverlauf an.

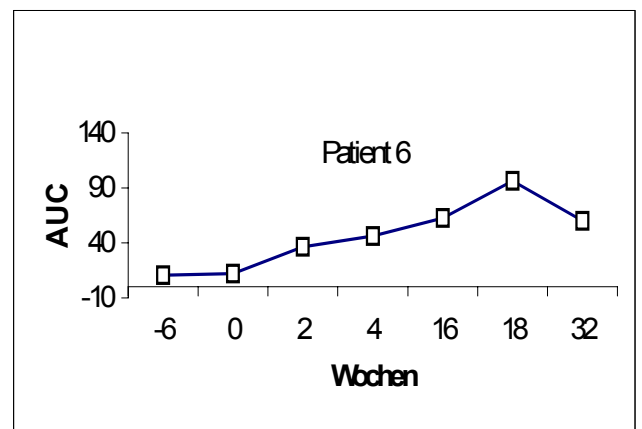
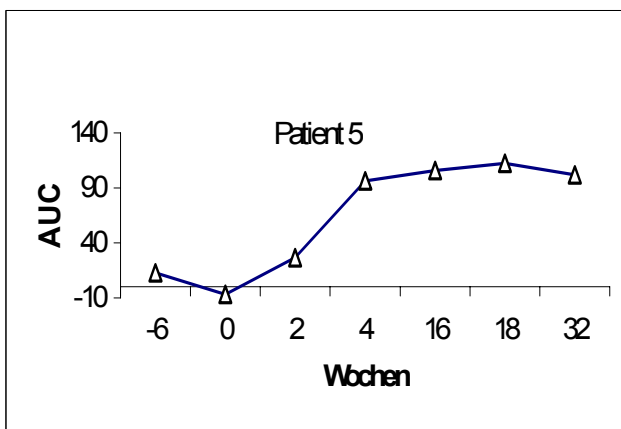
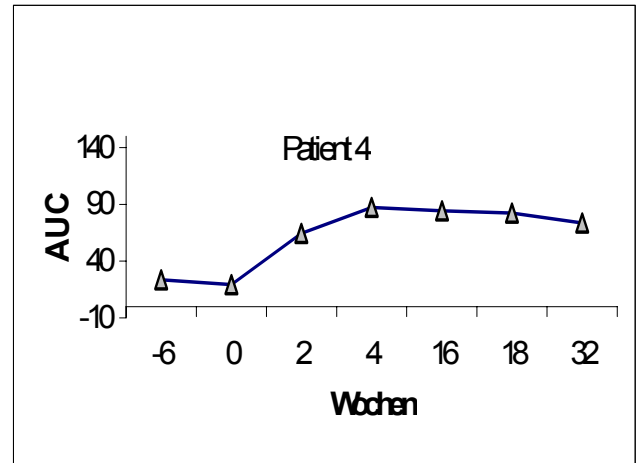
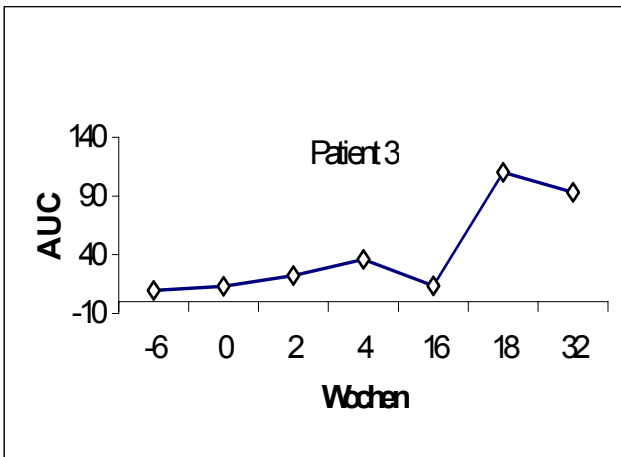
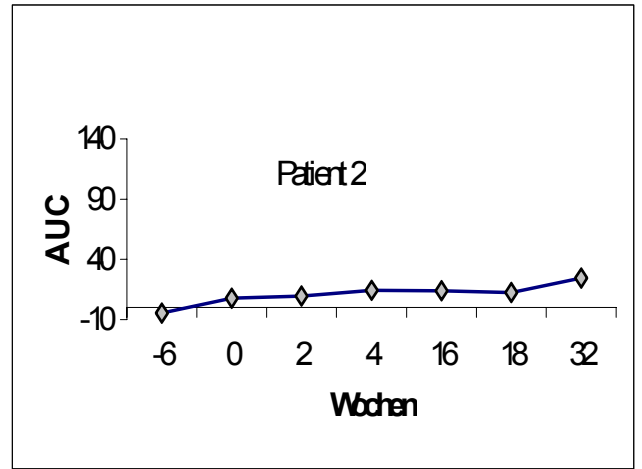
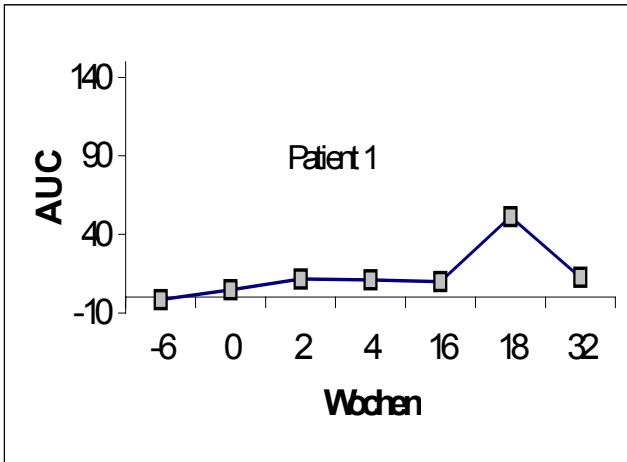
Beispielsweise erreichte Patient 4 nach einem anfänglichen Durchschnittswert von 21,4 vor der 1. Vakzination in der 2. Woche einen Titer von 64,3, nach der 2. Vakzination stieg dieser auf 87,4 und nach der dritten Impfung wurde ein Wert von 82,4 gemessen. Noch in Woche 32 konnte ein Titer von 73,7 bestimmt werden.

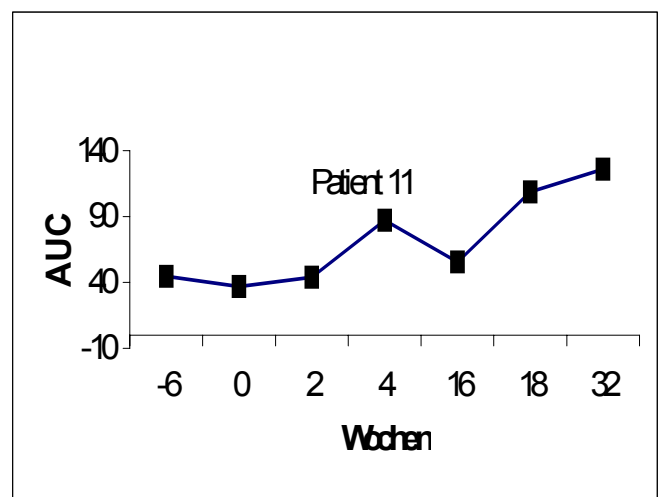
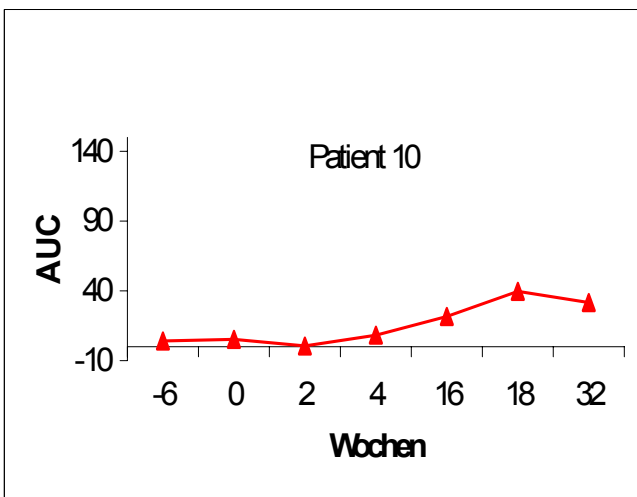
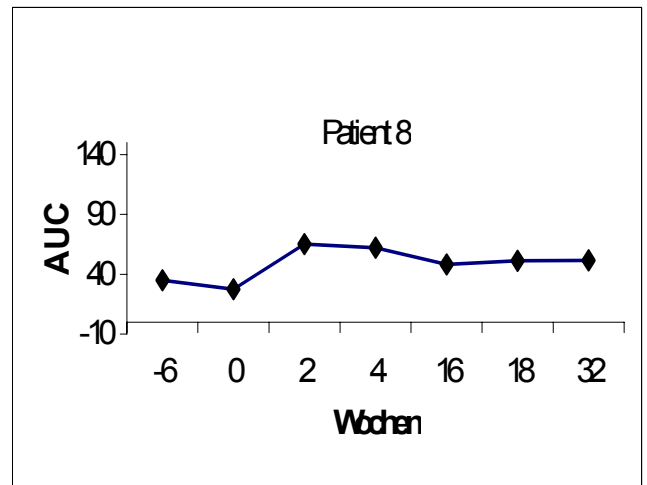
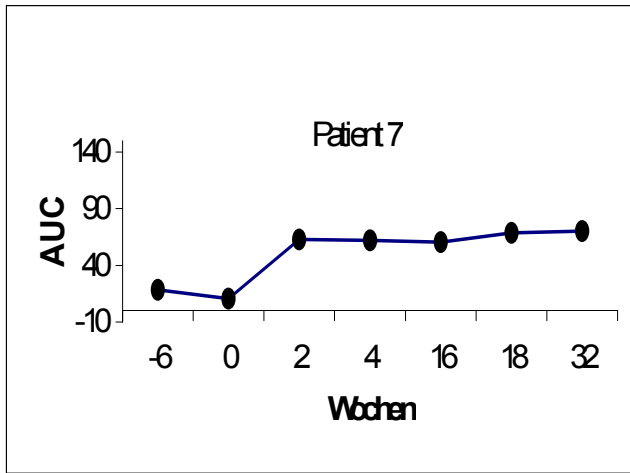
Bei Patient 5 stieg der Durchschnittswert von 3,1 in Woche -6 und 0 auf 26,5 in der 2. Woche, 96,5 in der 4. Woche und 112,3 in der 18. Woche. Auch in der 32. Woche fand sich noch ein Titer von 102.

Für die Patienten 6, 7, 8 und 11 zeigte sich ein sehr ähnlicher Verlauf der Werte.

Durch die „area under the curve (AUC)“- Methode konnte der Verlauf der Immunantworten des nicht gegen Pocken geimpften Patienten 10 und der pockengeimpften Patienten komprimiert dargestellt und analysiert werden. Diese Darstellung erlaubt einen besseren Vergleich der Entwicklung der Immunantwort der einzelnen Patienten. An den Schaubildern lässt sich zudem deutlich die immunogene Wirkung von MVA ablesen.

Abb. 17





***Abb. 17.** Diese Abbildung zeigt die durchschnittliche prozentuale Neutralisation von MVA für jeden Patienten über den zeitlichen Verlauf der Studie hinweg. Jeder einzelne Punkt stellt die durchschnittliche prozentuale Neutralisation mit Hilfe des AUC-Konzepts in Abhängigkeit von der Verdünnung dar.

4 Diskussion

Notwendigkeit und Vorteile des MVA-Neutralisationstests

Nachdem die Immunisierung mit Vaccinia Virus in groß angelegten Pockenimpfkampagnen in den letzten Jahren wieder vermehrt in Betracht gezogen wird, ist die Entwicklung von schnellen mit großem Durchsatz arbeitenden Testsystemen von Vaccinia spezifischen Immunantworten zur Überwachung des Impferfolges notwendig.

Des Weiteren wird für klinische Studien mit Lebendviren die Verwendung von Vektoren, die vom Vaccinia Virus abstammen, immer üblicher.

Diese und klinische Studien, die zum Ziel haben neue Vakzinationskandidaten mit verbesserten Sicherheitsprofilen zu finden, erfordern die genaue Messung der Antikörper vermittelten Neutralisation. Außerdem müssen neue VIG-Präparationen, die zur Vorbeugung oder zur Behandlung durch Vaccinia hervorgerufener Nebenwirkungen dienen, auf ihre Neutralisationsfähigkeiten getestet werden.

Der hier vorgestellte MVA-Neutralisationstest kann neutralisierende Immunantworten auf Vaccinia Virus messen und bietet gegenüber den Standard PRNTs einige Vorteile. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode ermöglicht es, große Probenmengen in kurzer Zeit zu analysieren. Es können mehrere Proben gleichzeitig untersucht werden, da man mit 96-Well Zellkulturplatten arbeitet. Dieser Prozess könnte leicht automatisiert werden.

Standard PRNTs haben einen geringen Durchsatz und es können nur wenige Proben in jedem Test untersucht werden. Das macht sie zur Untersuchung mehrerer hundert Proben aus klinischen Studien ungeeignet. Ferner sind sie schwierig zu normieren, wodurch Testergebnisse verschiedener Laboratorien nur schwer verglichen werden können.

Zur Durchführung des MVA-Neutralisationstests benötigt man weniger als einen Tag, da man die GFP-Expression der mit MVA infizierten Zielzellen bereits nach 14 Stunden messen kann. Der Standard PRNT erfordert dagegen mehrere Replikationsrunden bis zur Bildung eines sichtbaren Plaques und seine Durchführung dauert je nach verwendetem Protokoll 2 bis 5 Tage (33,80).

Der MVA-Neutralisationstest ist eine Methode, mit der man Dank der Analyse jeder einzelnen Zelle mit dem Durchflusszytometer objektive und präzise Ergebnisse erhält. Die Auswertung des PRNTs erfolgt dagegen nach subjektiven Maßstäben.

Ein weiterer wichtiger Vorteil, den der vorgestellte Test bietet, ist die Sicherheit. Da MVA in den meisten Säugetierzellen nicht repliziert (81), muss das Laborpersonal nicht geimpft werden und es kann unter weniger strengen Sicherheitsvorkehrungen gearbeitet werden als beim Umgang mit Vaccinia Virus. Der Test lässt sich somit in diagnostischen Laboratorien der Sicherheitsstufe 1 anwenden.

Der MVA-Neutralisationstest erlaubt es, autologe Zielzellen zu verwenden, denn die einzige Bedingung, welche die Zielzellen zu erfüllen haben, ist, dass sie die Infektion mit MVA erlauben.

Schließlich kann MVA menschliche B-Zellen nur infizieren, aber es kann aufgrund eines genetischen Defekts nicht in humanen B-Zellen replizieren. Diese Tatsache erlaubt die genaue Bestimmung der Viruspartikel, welche die Wirtszellen infizierten.

Die Standard Vaccinia Virus Elstree und MVA PRNTs werden mit einer MOI von 0,0007 bzw. 0,0008 PFU/ Zelle durchgeführt, während in der vorliegenden Studie den MVA-Neutralisationstest mit einer MOI von 1 PFU/ Zelle durchgeführt wurde. Niedrigere MOI-Konzentrationen werden normalerweise mit einer höheren Sensitivität in Neutralisationstests assoziiert (Abb. 10). Es zeigte sich jedoch sehr ähnliche Neutralisationsaktivitäten für eine VIG-Präparation, die in drei parallelen Ansätzen mit dem Vaccinia Virus Elstree PRNT, MVA-PRNT und MVA-*gfp*-Neutralisationstest untersucht wurde (Abb. 13). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der MVA-Neutralisationstest unter Verwendung von niedrigeren MOI-Konzentrationen sogar noch sensitiver als der herkömmliche Plaque Reduktionstest würde.

Zusammenfassend ergeben sich für den MVA-Neutralisationstest gegenüber den herkömmlichen Standard PRNTs zahlreiche Vorteile, die ihn zu einem wichtigen Hilfsmittel zur Bewertung präklinischer und klinischer Studien von Pockenimpfungen macht.

β - Galaktosidase – Neutralisationstest

Nach Beendigung der Experimente der vorliegenden Arbeit beschrieben Manischewitz *et al.* einen interessanten Vaccinia Virus Neutralisationstest auf der Basis eines β-Galaktosidase rekombinanten Vaccinia Virus (44). Das bakterielle β-Galaktosidase Enzym wird unter der Kontrolle eines synthetischen Promoters exprimiert. Jedes Enzymmolekül setzt multiple Substratmoleküle um und die Reaktion wird mit Hilfe eines ELISA ausgewertet. Mittels des β-Galaktosidase-Tests wurden die Serumproben von Pocken geimpften Individuen und Kontrollpersonen untersucht und die Titer bestimmt.

Dieses neue Testsystem ist sensitiv, schnell und ermöglicht den Durchsatz großer Probenmengen und ist zudem objektiv auswertbar. Jedoch hat es den Nachteil, mit dem in menschlichen Zellen replikationsfähigen Vaccinia Virus zu arbeiten und somit nicht die Verfahrenssicherheit zu bieten, die beim MVA-Neutralisationstest gegeben ist. Außerdem ist es zur Entdeckung Vaccinia Virus infizierter Zellen abhängig vom Substrat. Der MVA-Neutralisationstest bietet weiterhin den Vorteil, durch die Verwendung des Durchflusszytometers leicht analysierbar zu sein.

Anwendung des MVA-Neutralisationstest am Kaninchen, Maus und Menschen

Der MVA-Neutralisationstest wurde zunächst dazu eingesetzt, Vaccinia-spezifische Immunantworten am Kaninchen, an der Maus und am Menschen zu untersuchen. Die jeweiligen Plasma- oder Serumproben wurden dabei in mehreren Verdünnungen untersucht. Der MVA-Neutralisationstest basiert auf MVA, das das Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Nach der Inkubation von MVA-*gfp* mit den Proben, die MVA neutralisierten, wurde es mit Zielzellen inkubiert und die Anzahl der mit MVA infizierten Zellen mit Hilfe des Durchflusszytometers anhand der *gfp*-

Expression bestimmt. Daraus ließ sich die prozentuale Neutralisation errechnen. Um einen Zusammenhang zwischen der prozentualen Neutralisation und der Verdünnung herzustellen, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt und die 50%ige inhibitorische Konzentration (IC₅₀) errechnet.

Mit dem MVA-Neutralisationstest konnten Vaccinia-Antikörper im Kaninchenserum entdeckt werden und die Sera von mit Vaccinia Virus geimpften Mäusen analysiert werden.

Hitzeinaktivierte und nicht hitzeinaktivierte Proben wurden untersucht. Die Hitzeinaktivierung diente der Ausschaltung des Komplements und es ergaben sich für Mäuse und Kaninchen sehr ähnliche Werte, während die Ergebnisse beim Menschen stark voneinander abwichen. Deshalb empfiehlt es sich die Neutralisierungsaktivitäten von menschlichem Plasma nach Hitzeinaktivierung zu ermitteln, um die Störfaktoren durch das Komplement zu eliminieren.

Im nächsten Schritt wurde der MVA-Neutralisationstest mit dem Standard Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test (PRNT) verglichen. Dazu wurde die Neutralisationsfähigkeit von Anti-Vaccinia Virus Immunglobulin (VIG) untersucht.

Es ließ sich in dem Experiment zeigen, dass die neue Methode menschliche Vaccinia Virus Antikörper mit einer ähnlichen Sensitivität entdecken kann, wie der herkömmliche Vaccinia Elstree und MVA PRNT. Somit lässt sich der MVA-Neutralisationstest genauso wie die herkömmlichen PRNTs zur Ermittlung von Antikörperantworten geimpfter Personen anwenden.

Die Neutralisationsaktivitäten von Individuen, die gegen Pocken geimpft waren, wurden mit denen von ungeimpften Personen verglichen. Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die Inaktivierung durch Komplement spielte bei beiden Kollektiven eine wichtige Rolle, wichtiger als bei Kaninchen und Mäusen.

Dann wurde der MVA-Neutralisationstest zur Untersuchung von Antikörpern im menschlichen Plasma in einer klinischen Studie angewandt. In dieser Studie wurden zehn HIV-positive Patienten mit einer MVA-*nef*-Vakzine geimpft und die Immunantworten auf Nef und den Vektor MVA untersucht.

Es wurden Proben der Studienteilnehmer in 5 Verdünnungsschritten an 7 Zeitpunkten auf die Neutralisationsaktivität getestet. Zum Zeitpunkt -6 und 0 konnten

bei allen an der Studie teilnehmenden Patienten niedrige MVA-Neutralisierungsaktivitäten gemessen werden. Bereits zum Zeitpunkt Woche 2 nach der ersten Impfung konnte ein deutlicher Anstieg der Neutralisationsfähigkeit entdeckt werden. Die Werte wurden durch die zweite Impfung nochmals gesteigert. Nach der dritten Vakzination stiegen die Titer in der Woche 18 weiter an und konnten auch über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. MVA zeigte somit eine starke immunogene Wirkung und es konnte ein Anstieg der humoralen Immunantwort festgestellt werden.

Zelluläre Immunantwort auf MVA

Bei der Bekämpfung eines in den Körper eingedrungenen Erregers wirken die unterschiedlichen Bereiche des Immunsystems zusammen. In dieser Arbeit wurden die neutralisierenden Antikörper nach der Impfung mit dem Vektor MVA untersucht. Die Studie zeigt, dass MVA einen starken und anhaltenden Anstieg der neutralisierenden Antikörper in chronisch HIV-infizierten Individuen hervorrufen konnte.

Cosma *et al.* analysierten diese ein Jahr nach Verabreichung der 3. MVA-Vakzine und konnten feststellen, dass bei allen Individuen neutralisierende Titer erhalten blieben, und dass diese signifikant höher waren als vor den Impfungen (21). Bei Patient 1, 2 und 10 waren die Titer abgesunken, aber lagen auch bei diesen Studienteilnehmern noch oberhalb der Titer, die vor Erhalt der Vakzinationen gemessen wurden. Die Untersuchungen von Cosma *et al.* unterstützen somit den Einsatz von MVA als Impfaltemative gegen Pocken.

Zur umfassenden Darstellung der Immunreaktion ist es von Bedeutung auch die zelluläre Abwehr zu analysieren. Dazu stimulierten Cosma *et al.* (21) PBMC in vitro mit MVA und maßen die intrazelluläre IFN- γ -Produktion in CD4+ und CD8+ Zellen. Es zeigte sich, dass eine verstärkte IFN- γ -Produktion in den CD4+-Lymphozyten nur bei 4 Individuen nach den Impfungen gemessen werden konnte und nach einem Jahr war nur eine schwache IFN- γ -Produktion der CD4+ Zellen nach Stimulation mit MVA zu entdecken. Auf MVA-Stimulation in vitro stieg die IFN- γ -Produktion in den CD8+ Zellen dagegen nach der MVA-Impfung stark an und war auch nach einem Jahr noch

deutlich erhöht. Es konnten demnach durch die MVA-Vakzination auch starke und lang anhaltende zelluläre Immunreaktionen stimuliert werden.

Interessanterweise bestand kein Zusammenhang zwischen der humoralen und zellulären Immunantwort gegen MVA. So fanden Cosma *et al.* gerade bei Patienten 2 und 10, die nur schwache humorale Reaktionen zeigten, starke zelluläre Immunantworten. Zur vollständigen Beurteilung von Impfungen müssen demnach zelluläre und humorale Immunantworten untersucht werden und getrennt voneinander bewertet werden.

Welche Rolle die verschiedenen Immunantworten gegen Pocken spielen, ist noch nicht vollständig verstanden, unter anderem deshalb, da die Immunologie während der Kampagnen zur Ausrottung der Pocken noch in ihren Kinderschuhen steckte. Die Methoden zur Erforschung der humoralen Immunabwehr waren schon weiter entwickelt als die Methoden zur Erforschung der zellulären Abwehrmechanismen. Deshalb ist über die Abwehr durch Antikörper bereits größeres Wissen vorhanden und erst heute durch fortgeschrittene Technologien, wie dem intrazellulären Zytokinstaining, ELISPOT und dem Tetramer Staining auch in den Bereichen der zellulären Immunabwehr eine vollständigere Aufklärung möglich. Erst kürzlich wurden Studien zum Vergleich der humoralen und der zellulären Immunabwehr gegen Pocken durchgeführt.

Belyakov *et al.* (5) fanden im Mäusemodell heraus, dass nach der akuten Infektion Virus-spezifische Antikörper entscheidend zu sein scheinen, um die Virusreplikation zu verhindern und um den Körper vom Virus zu befreien. CD8⁺ Zellen sind dagegen zur Viruseliminierung nach einer akuten Infektion nicht essentiell. Jedoch in der Abwesenheit von humoraler Abwehr konnten CD8⁺ Zellen Überleben und Erholung sichern (5). CD4⁺ Zellen scheinen eine wichtigere Funktionen als die CD8⁺ Zellen in der Bekämpfung der Infektion einzunehmen (5).

MVA konnte Vaccinia-spezifische Immunantworten bei Individuen, die vor langer Zeit gegen Pocken geimpft wurden, reaktivieren, aber auch Vaccinia-spezifische Immunantworten in Vaccinia-naiven Personen zu erzeugen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das stark abgeschwächte MVA als Impfaltemative gegen Pocken in HIV-infizierten Individuen und anderen immungeschwächten Personen verwendet werden kann.

Untersuchung der zellulären Immunantwort auf das Nef-Protein

Vor den Impfungen mit MVA-gfp maßen Cosma *et al.* (20) bei den HIV-positiven Personen den Anteil der Nef-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl und untersuchten wie viele Nef-Epitope durch die Lymphozyten erkannt wurden.

Zunächst wurde die CD8+ T-Zell-Immunantwort in 24 chronisch HIV-infizierten Individuen untersucht, eingeschlossen die zehn Patienten, die an der MVA-Nef-Impfstudie teilnahmen. Dabei wurden CD4+ und CD8+ T-Zellen *in vitro* mit Nef stimuliert und die IFN- γ -Produktion gemessen. 18 von 23 Individuen zeigten eine signifikante Nef-spezifische IFN- γ -Produktion der CD8+ T-Zellen, wobei diese spezifischen CD8+ T-Zellen 0,01-2,72% der Gesamtlymphozyten einnahmen.

Eine gesteigerte IFN- γ -Produktion der CD4+Zellen nach Nef-Stimulierung war dagegen bei der Mehrzahl der getesteten Individuen nicht zu entdecken. Nur in 4 von 24 Personen wurde nach *in vitro* Stimulation mit Nef eine signifikante IFN- γ Produktion in den CD4+ Lymphozyten gemessen, jedoch lag der Anteil der Nef-spezifischen CD4+ Zellen bei unter 0,1% (Spannbreite von 0,01-0,07%, Median 0,01 %).

Nach den Impfungen

Beim intrazellulären Zytokinstaining des IFN- γ nach der ersten Impfung wurde eine Nef-spezifische CD4+ Antwort bei 8 von 10 an der Studie teilnehmenden Individuen entdeckt. Einen weiteren Anstieg der Nef-spezifischen CD4+ Antwort nach der zweiten und dritten Impfung konnte bei Patient 4 und 10 verzeichnet werden. Außerdem konnten Patient 4 und 10 die Nef-spezifische CD4+ Antwort über einen langen Zeitraum aufrechterhalten, was Experimente aus der 32. bzw. 34. Woche nach der ersten Vakzination zeigten. Einen deutlichen Anstieg der Nef-spezifischen CD8-Immunantwort nach den Impfungen konnte nur bei den Patienten 8 und 10 beobachtet werden.

Patient 10 hatte in seiner Kindheit keine Pockenimpfung erhalten und er zeigte in unserer Studie nur eine geringe MVA-spezifische Antikörper-Bildung. Bei ihm fand sich ein deutlicher Anstieg der Nef-spezifischen CD4+ Antwort, die nach jeder Impfung verstärkt wurde und über lange Zeit bestehen blieb. In Woche 18 nach der 3. Impfung waren 1% der CD4+ Lymphozyten spezifisch für Nef. Zudem kam es zu einem bemerkenswerten Anstieg der IFN- γ Produktion der Nef-spezifischen CD8+ Zellpopulation und zu einem Anstieg der durch CD4+ und CD8+ Zellen erkannten Epitope. Offensichtlich hatte eine vorherige Pockenimpfung und die Immunantwort auf den Vektor MVA Einfluss auf die Entwicklung einer Nef-spezifischen Immunantwort.

Der von Cosma *et al.* gemessene Anstieg der zellulären MVA-spezifischen Immunantwort des Patienten 10, in Form der gesteigerten IFN- γ -Produktion nach MVA-Stimulierung *in vitro*, hatte keinen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit der Nef-Impfung, d.h. auf die Stimulierung der CD4+ und CD8+ Zellen.

In der durchgeführten Studie wurden nur neun Patienten mit Pockenimpfung und ein Patient ohne vorherige Pockenimpfung untersucht. Es müssten größer angelegte Studien mit mehr Teilnehmern durchgeführt werden. Dabei sollte die humorale Immunantwort in Kombination mit der zellulären Immunantwort analysiert werden.

Unterschiedliche Vaccinia Formen

Das Vaccinia Virus wird in 4 verschiedenen Formen produziert, dem IMV (intracellular mature virus), dem IEV (intracellular enveloped virus), dem CEV (cell-associated enveloped virus) und dem EEV (extracellular enveloped virus) (75).

Bei IMV handelt es um eine recht robuste Form, die innerhalb der Zelle bleibt bis diese lysiert und dient der Übertragung der Infektion zwischen verschiedenen Wirten. Aus dieser Form entsteht IEV, indem IMV mit intrazellulären Membranen aus Endosomen und Golgi-Apparat umhüllt wird. IEV bewegt sich zur Zelloberfläche, wo es mit der Zellmembran verschmilzt und als CEV auf der Zelloberfläche bleibt oder als EEV freigesetzt wird. EEV dient der Ausbreitung der Infektion von Zelle zu Zelle

Boulter *et al.* untersuchten die Antikörperantworten gegenüber den unterschiedlichen Vaccinia-Formen und fanden heraus, dass Antikörper gegen EEV größeren Schutz vor einer Infektion gewähren als IMV-Antikörper (10,11).

Es ist also interessant, genauer zu erforschen, welcher Antikörper bei der in der vorliegenden Studie stimulierten Immunantwort vorherrschen. In einer neuen Studie von Cosma *et al.* (21) wurde die Vaccinia-spezifische Immunantwort weiter aufgeschlüsselt. Man fand heraus, dass ein Jahr nach der letzten MVA-Nef-Impfung in 7 von 9 Individuen Antikörper gegen IMV Protein A27 entdeckt werden konnten, während keine höheren Antikörperspiegel gegen das EEV A33 Protein gemessen werden konnten. Möglicherweise regt MVA vermehrt die Antikörperbildung gegen IMV oder andere EEV-Proteine an.

MVA als Impfalternative zu Vaccinia

Wegen der Nebenwirkungen des klassischen Pockenimpfstoffes, ganz besonders bei immungeschwächten Personen, ist es wichtig, einen sicheren Pockenimpfstoff zu finden. Besonderer Grund zur Sorge besteht dadurch, dass in den letzten 20 Jahren die Zahl der HIV-infizierten Menschen, also der Immungeschwächten, ständig zugenommen hat. Die Rate der Nebenwirkungen bei einer erneut durchgeführten Impfkampagne mit dem klassischen Pockenimpfstoff läge wahrscheinlich um einiges höher als noch in den siebziger Jahren. MVA könnte eine solche Impfalternative darstellen.

Insbesondere auch durch die potentielle Bedrohung durch Bioterrorismus ist es dringend notwendig einen neuen sicheren und effektiven Impfstoff gegen Pocken zu entwickeln.

Die Sicherheit und Immunogenität von MVA wurde in einer retrospektiven klinischen Studie an chronisch HIV-infizierten Menschen untersucht, die dreimal mit einer MVA-*nef* Vakzine geimpft wurden. Es zeigte sich, dass die Impfungen weitgehend ohne das Auftreten von Nebenwirkungen vertragen wurden und MVA sich somit als sicher erwies. In dieser Studie wurde zum erstenmal gezeigt, dass der stark abgeschwächte Vaccinia Virus Vektor MVA als sicherer Vektor in einer Kohorte von HIV-1 infizierten, immungeschwächten Personen angewandt werden kann.

Die durchgeführte Studie kann als Pilotstudie für zukünftige Einsätze des MVA-Vektors bei Patienten dienen, für die der Einsatz von nicht abgeschwächtem Vaccinia Virus nicht empfehlenswert ist. Zu dieser Gruppe von Personen zählen Patienten mit angeborenen Immunschwächeerkrankungen, Empfänger von Organtransplantaten, Menschen, die wegen eines Tumorleidens behandelt werden und Personen, die sich einer lang dauernden Kortisontherapie unterziehen.

MVA zeigte wie oben beschrieben eine immunogene Wirkung und war in der Lage starke Vaccinia-spezifische Immunantworten zu induzieren.

Sicherheit der Pockenimpfungen von HIV-positiven Patienten in Abhängigkeit von der CD4+ Zellzahl

HIV-Patienten haben eine geschwächte Immunabwehr. Die Höhe der CD4+ Zellzahl wird zur Bewertung der Funktionsfähigkeit des Immunsystems angewendet. Die Höhe der CD4+ Zellen beeinflusst die Fähigkeit zur Entwicklung einer spezifischen Immunantwort nach einer Impfung (62) und kann als Vorhersagekriterium für die Wirksamkeit von Impfungen bei HIV-Kranken angewendet werden. Es konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass in einer Kohorte von chronisch-HIV-infizierten Individuen mit CD4+ Zellzahlen von 407 bis 1421 Zellen/ μ l (Tabelle 2) MVA eine dauerhafte Immunantwort erzeugte.

CD4+ Zellzahlen können auch Auskunft darüber geben, ob Nebenwirkungen von der klassischen Pockenimpfung mit Vaccinia Virus zu erwarten sind. Das geschwächte Immunsystem kann in diesen Fällen nicht verhindern, dass sich das replikationsfähige Vaccinia Virus im Körper ausbreitet.

Es wurden HIV-infizierte Personen mit CD4+ Zellzahlen $> 200/\mu$ l geimpft (85) und es zeigte sich, dass die klassische Pockenimpfung oberhalb einer Schwelle von 200 Zellen/ μ l sicher zu sein scheint, unterhalb dieser Schwelle ist mit Nebenwirkungen zu rechnen.

The Centers of Disease Control and Preventions (Atlanta) gaben jedoch die Empfehlung heraus, replikationsfähiges Vaccinia Virus in der Vakzination von HIV-kranken Personen generell nicht zu verwenden. MVA könnte eine sichere und immunogene Impfaltemative darstellen. Mit MVA müssen in der Zukunft Studien an

Patienten durchgeführt werden, die eine CD4+ Zellzahl von weniger als 400 Zellen/ μ l aufweisen.

HIV-Impfungen

In der Entwicklungsgeschichte von Impfstoffen wurden verschiedene Ansätze getestet. Abgetötete Krankheitserreger, rekombinante Proteine und synthetisch hergestellte Peptide können die Immunantwort stimulieren. Als Impfstoff gegen HIV haben sie jedoch den Nachteil, nicht als endogene Peptide auf MHC-I-Molekülen präsentiert zu werden, wo sie von CTL erkannt werden könnten. Den CTL wird aber zur Bekämpfung von HIV eine essentielle Rolle zugeschrieben. Lebendvakzinen werden endogen prozessiert und somit auf MHC-I-Komplexen den CTL dargeboten. Die Verwendung von Lebendvakzinen ist in der HIV-Impfstoffentwicklung zu riskant. Es bietet sich an mit DNA Vakzinen oder Vektorsystemen zu arbeiten, die HIV-Peptide exprimieren können. Bisher verwendete Vektorsysteme waren u.a. Ad5, MVA, ALVAC, NYVAC und Rhabdoviren. Diese haben sich bereits in mehreren Studien als erfolgversprechend herausgestellt.

Ein Ansatz zur Verbesserung der Wirksamkeit einer Vakzine ist der Einsatz von Zytokinen. Dadurch lassen sich sowohl die Immunantwort erhöhen als auch selektiv bestimmte Arten der Immunität stimulieren. In Studien von Ahlers *et al.* (3) erwies sich GM-CSF als fähig, eine breite Immunantwort anzuregen: CTL, TH-1, TH-2-Zellen und neutralisierende Antikörper wurden aktiviert. Andere Zytokine stimulierten eher selektiv. So erhöhte IL-12 besonders die CTL- und die TH-1 Zellantwort und verminderte die TH-2-Zellantworten. Der Ort der Administration schien dabei eine wichtige Rolle zu spielen. So konnten die Zytokine das Immunsystem in viel größerem Ausmaß anregen, wenn sie zusammen mit dem Antigen lokal verabreicht wurden.

Ferner kann man von HIV-positiven Patienten autologe dendritische Zellen gewinnen und mit Hilfe von diesen „natürlichen Helfern“ CTL-Antworten induzieren (65). Durch Proteingaben könnte man die Immunantwort verstärken (boosten). Ein weiterer Ansatz, der sich zur Verbesserung der Wirksamkeit als vielversprechend herausgestellt hat (7), ist die mukosale Verabreichung von HIV-Vakzinen.

Durch eine mukosale, z. B. intrarektale Gabe, konnten sowohl systemische als auch lokale Immunantworten stimuliert werden, aber umgekehrt konnte durch eine systemische Gabe nur systemische, aber keine gesteigerte mukosale Abwehr erreicht werden. Doch stellt die Mukosa eine häufige Eintrittspforte für das HI-Virus dar, weshalb besonders hier eine starke Immunabwehr gegen HIV gebraucht wird.

Weitere Ansatzpunkte, die an HIV-Impfungen zu verbessern sind:

1. Verstärkung und Verlängerung der Antigenexpression
2. Vergrößerung der Kapazität des Vektors, um mehr virale Gene exprimieren zu können und damit eine breitere Immunantwort zu erzeugen, die gegen mehrere Virus-Antigene gerichtet ist
3. Verbesserung der Stabilität des Impfstoffes
4. Die Effizienz der Impfstoffherstellung zu verbessern
5. Vermeidung oder Umgehung von präexistenter Immunität gegen den Vektor

Präexistente Immunität

Der Einsatz von lebenden Vektorsystemen wird durch präexistente Immunität gegenüber dem Vektor eingeschränkt.

So besteht bei älteren Menschen, die gegen Pocken geimpft wurden, bereits Immunität gegen MVA. Bei Wiedereinführung von Pockenimpfungen würde diese Immunität universell.

Gegen Ad5 haben sich bei fast 50% der amerikanischen Bevölkerung neutralisierende Antikörper als Folge einer natürlichen Infektion mit Adenoviren gebildet (61).

Das Problem der präexistenten Immunität könnte man lösen, indem man höhere Impfdosen appliziert und indem man nach einem Modell mit unterschiedlicher Erst- und Zweitimpfung arbeitet. So hat es sich in Studien als vielversprechend herausgestellt, mit DNA vorzuimpfen, gegen die bei der Person keine Immunität besteht, und dann mit einem MVA-Konstrukt nachzuimpfen, um ausreichend hohe Immunantworten zu erzeugen (67, 96).

Die große Effizienz dieser Vorgehensweise konnte dadurch verursacht werden, dass die Immunantwort durch die alleinige DNA-Vorimpfung auf das Impfantigen

konzentriert wird (und nicht gleichzeitig auf den Vektor). Die Booster-Impfung mit MVA erhöht im zweiten Schritt die Immunantwort, indem dieser größere Mengen des Impfantigens exprimieren kann und indem er die Bildung proinflammatorischer Stoffe induziert, welche die Immunität verstärken können. So ist MVA in der Lage die paraspezifische Immunabwehr zu stimulieren, indem es z. B. die Interferonbildung anregt.

Ein weiterer Weg zur Umgehung von bereits existierender Immunität gegen Vaccinia ist die mukosale Verabreichung einer Impfung. Belyakov *et al.* stellten am Mäusemodell fest, dass eine systemisch (s.c.) verabreichte Impfung mit Vaccinia lediglich im systemischen lymphatischen Gewebe Immunität erzeugen konnte, während das mukosale lymphatische Gewebe nicht reagierte (6). Deshalb nahm man an, dass die Immunität im mukosalen Gewebe durch eine Pockenimpfung unbeeinflusst bleibt.

In Mäusen, die zuvor mit Vaccinia geimpft wurden, konnte über eine systemische Verabreichung einer MVA-*env* Vakzine keine HIV-spezifische CTL-Antwort hervorgerufen werden, während jedoch bei Vaccinia geimpften Mäusen über den mukosalen intrarektalen Weg gleich hohe HIV-spezifische Immunantworten wie in pockennaiven Mäusen induziert werden. Die gleichzeitige Verabreichung des Zytokins IL-12 konnte auf dem mukosalen Weg die HIV-spezifische CTL-Antwort zusätzlich steigern.

In Studien von Ramirez *et al.* zeigte sich, dass MVA als HIV-Gene exprimierender Vektor verwendet werden kann, wenn die präexistente Immunität gegen Pockenviren durch MVA hervorgerufen wurde. Wurden die Personen dahingegen zuvor mit Vaccinia geimpft, konnten im Anschluss an eine Impfung mit dem HIV-Gen exprimierenden Vektor MVA nur niedrigere HIV-spezifische Titer gemessen werden (56).

Doppelte Vakzination

Die Impfung mit MVA oder einem anderen Vektor, der vom Pockenvirus abstammt, kann einen doppelten Zweck erfüllen. Es kann gleichzeitig eine Immunantwort gegen Pocken als auch gegen das exprimierte Gen hervorgerufen werden. Eine

rekombinante MVA-Vakzine, die wie in unserer Studie ein HIV-Protein exprimiert, könnte gleichzeitig eine Immunität gegenüber Pocken und HIV hervorrufen. Eine solche Doppelimpfung hätte sowohl praktische als auch ökonomische Vorteile und diese Möglichkeit kann weiter untersucht werden.

Verbesserungsvorschläge zum MVA-Neutralisationstest

Der MVA-Neutralisationstest kann auch zur Erfassung vieler Proben in größer angelegten klinischen Studien angewandt werden, da viele Proben in großer Durchsatzgeschwindigkeit bearbeitet werden können.

Ein Verbesserung kann erreicht werden, indem weitere Arbeitsschritte automatisiert werden könnten. Mit dem Multiwell AutoSampler von Becton Dickinson können beispielsweise 96-Well Zellkulturplatten automatisch bearbeitet werden.

Außerdem könnte man ihn mit niedrigeren MVA-Konzentrationen durchführen, um eine noch bessere Sensitivität zu erreichen.

Da das Variola Virus heute als ausgerottet gilt, kann man die wahre Wirkung von Pockenimpfstoffen, insbesondere die protektive Rolle, die MVA in der Pockenimpfung spielt, nicht feststellen. Man kann die Wirksamkeit von Impfstoffen nur indirekt durch bestimmte Indikatoren untersuchen, wie beispielsweise die Höhe verschiedener Immunantworten. Studien im Tiermodell kann man mit einer genauen Analyse der Immunantwort des Menschen kombinieren. Dadurch erhofft man sich eine Vorhersage über die Wirksamkeit der Impfstoffe.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Studie zeigte den Anstieg der humoralen Immunabwehr, der durch den stark abgeschwächten Vaccinia Virus Stamm MVA in immungeschwächten Personen hervorgerufen werden konnte. Diese Ergebnisse bilden die Basis für eine weiterführende Grundlagenforschung und für weitere Studien am Tiermodell. Ferner sind sie für weitere klinische Studien von Bedeutung, in denen am Menschen die Immunogenität von MVA oder Vaccinia evaluiert werden soll. So werden derzeit Studien durchgeführt, bei denen Patienten, die an atopischen Erkrankungen leiden, mit MVA geimpft werden. Die Immunantwort wird dabei mit Hilfe des MVA-Neutralisationstests gemessen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsschrift werden die Ergebnisse der Entwicklung und Anwendung eines neuen Neutralisationstests dargestellt. Dieser Test basiert auf dem Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Vektor, das ein Grün Fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert.

Die Testmethode beruht auf der Messung der grünen Fluoreszenz des *Aequorea victoria* *gfp*-Genprodukts in Zellen, die mit MVA-*gfp* infiziert werden. Ein wichtiger Vorteil, den das neue Testsystem bietet, ist seine große Sicherheit. Da MVA in den meisten menschlichen Zellen nicht replizieren kann, erfordert der Umgang mit MVA geringere Sicherheitsvorkehrungen als der Umgang mit replikationsfähigem Vaccinia Virus, das im klassischen Plaque-Reduktions-Neutralisations-Test zum Einsatz kommt. Ferner handelt es sich um eine schnelle, objektive und sensitive Methode. Die Auswertung mit Hilfe des Durchflusszytometers ermöglicht die Bearbeitung großer Mengen. Der MVA-Neutralisationstest bietet somit die Möglichkeit, auch bei großen Impfkampagnen gegen Pocken deren Effektivität durch Messung der humoralen Immunantwort zu überwachen. Ebenso kann in klinischen Studien, in denen gentechnisch hergestellte Vaccinia Viren als Vektoren verwendet werden, die vektorspezifische Immunantwort erfasst werden.

Der MVA-Neutralisationstest wurde zur Erfassung der humoralen Immunantwort gegen Vaccinia am Kaninchen, an der Maus und am Menschen erfolgreich angewandt. Bei einem Vergleich mit der Standardmethode, dem Plaque-Reduktionstest, erwies sich der MVA-Neutralisationstest als ebenso sensitiv.

Im Rahmen einer klinischen Studie wurden zehn chronisch HIV-infizierte Patienten mit einer MVA-Nef Vakzine als therapeutische Vakzination geimpft. MVA diente dabei als Vektor für Nef, einem Regulatorprotein von HIV. Mit Hilfe des MVA-Neutralisationstest wurde in einer retrospektiven Studie die humorale Immunantwort gegen MVA zu 7 verschiedenen Zeitpunkten während der Studie gemessen.

Hierbei zeigte sich, dass MVA in unserer Untersuchung eine immunogene Wirkung hatte und humorale Immunantworten hervorrufen konnte, die sich nach jeder

Verabreichung des Impfstoffes verstärkten. Es bietet sich an, weitere Studien zur Erforschung eines MVA-Einsatzes als Impfalternative zum Vaccinia Virus für mögliche in der Zukunft erforderliche Impfkampagnen durchzuführen

Erstmals wurde das stark abgeschwächte Vaccinia Virus MVA als sicherer Vektor in einer klinischen Studie an HIV-1 positiven Patienten eingesetzt. MVA stellte sich bei der Verabreichung an immungeschwächte Personen als weitgehend nebenwirkungsfrei heraus. Es besteht die Vermutung, dass MVA als Vektor bei anderen Erkrankungen oder Schwächungen des Immunsystems erfolgreich als Vektor eingesetzt werden kann.

Ergänzend wurde die Immunantwort auf Nef von Cosma *et al.* (19) untersucht. Es zeigte sich, dass MVA sich als effektiver Vektor für das HIV-Protein Nef erwies.

Schließlich wurde geprüft, welche Beziehung zwischen der Immunantwort gegen den Vektor und gegen das exprimierte Gen besteht. Es stellte sich heraus, dass bei Patienten ohne vorherige Pockenimpfung, also ohne Vorsensibilisierung auf MVA, die Immunantwort gegen das HIV-Protein sehr viel stärker ausfiel als bei geimpften Personen. MVA-spezifische Antikörper scheinen demnach negative Auswirkungen auf die Wirksamkeit des MVA-Nef-Vektors zu haben.

Aus diesem Grund ist es von Bedeutung, bei pockengeimpften Personen Methoden zur Überwindung der präexistenten Immunität zu entwickeln.

Der MVA-Neutralisationstest selbst kann noch in mindestens zwei Komponenten verbessert werden. Erstens können Einzelschritte des Tests automatisiert werden und damit eine kürzere Durchlaufzeit erreicht werden. Zweitens kann man mit niedrigeren MVA-Konzentrationen arbeiten, um eine noch bessere Sensitivität des Tests zu erreichen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen ferner, dass eine Impfung mit MVA und einem exprimierten Protein gleichzeitig eine Vaccinia-spezifische und eine gegen das Protein gerichtete Immunität stimuliert. Es bietet sich deshalb an, in umfangreichen Studien die Vorteile einer solchen Doppelvakzination intensiv zu untersuchen.

6 Internet-Seiten

Internet-Seite 1: <http://www.iavi.org>

Internet-Seite 2: http://www.sh.lsuhs.edu/intragrad/289/M289L_12.ppt#25

Internet-Seite 3: <http://www.avert.org/origins.htm>

Internet-Seite 4: <http://www.niaid.nih.gov/daids/vaccine/NAWG.htm#CHAR>

Internet-Seite 5: <http://www.apotheker-zeitung.de/pza/1999-38/titel.htm>

Internet-Seite-6: <http://www.who.int/emc/diseases/smallpox/slideset/>

Internet-Seite 7: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/109/Introduction.html>

7 Literaturverzeichnis

1. Abbas, A. K., Pober, J. S., and Lichtman, A. H. Cellular and molecular immunology. 1994. Philadelphia, W.B. Saunders Company. Ref Type: Serial (Book , Monograph)
2. Addo, M. M., Altfeld, M., Rosenberg, E. S., Eldridge, R. L., Philips, M. N., Habeeb, K., Khatri, A., Brander, C., Robbins, G. K., Mazzara, G. P., Goulder, P. J., Walker, B. D. The HIV-regulatory proteins Tat and Rev are frequently targeted by cytotoxic T lymphocytes derived from HIV-1-infected individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 1781-1786
3. Ahlers, J. D., Dunlop, N., Alling, D. W., Nara, P. L. Berzofsky, J. A. Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: GM-CSF and TNF- α synergize with IL-12 to enhance induction of CTL. *J. Immunol.* 158 (1997) 3947-3958
4. Aiken, C., Trono, D. Nef stimulates human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis. *J Virol* 69 (1995) 5048-5056
5. Belyakov, I. M., Earl, P., Dzutsev, A. et al. Shared modes of protection against poxvirus infection by attenuated and conventional smallpox vaccine viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 100 (2003) 9458-9463
6. Belyakov, I., Moss, B., Strober, W., Berzofsky, J. A. Mucosal vaccination overcomes the barrier to recombinant vaccinia immunization caused by preexisting poxvirus immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 4512-4517
7. Berzofsky, J. A., Ahlers, J. D., Derby, M. A., Pendleton, C. D., Arichi, T., Belyakov, I. M. Approaches to improve engineered vaccines for human immunodeficiency virus and other viruses that cause chronic infections. *Immunol. Rev.* 170 (1999) 151-172
8. Blanchard, T. J., Alcami, A., Andrea, P., Smith, G. L. Modified vaccinia virus Ankara undergoes limited replication in human cells and lacks several immunomodulatory proteins: implications for use as a human vaccine. *J Gen Virol* 79 (1998) 1159-1167
9. Borrow, P., Lewicki, H., Shaw, G., Oldstone, M. Virus-specific CD8+ cytotoxic-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 68 (1998) 6103-6110

10. Boulter, E. A. Protection against poxviruses. *Proc. Roy. Soc. Med.* 62 (1969) 295-297
11. Boulter, E. A., Appleyard, G. Differences between extracellular and intracellular forms of poxviruses and their implications. *Pro. Med. Virol.* 16 (1973) 86-108
12. Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W. V, et al. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA-vaccination. *Nat Med* 3 (1997) 526-532
13. Bray, M., Wright M. E. Progressive Vaccinia. *Clin. Inf. Dis.* 36 (2003) 766-774
14. Cafaro, A., Caputo, A., Fracasso, C., Maggiorella, M. T., Goletti, D., Baroncelli, S., Pace, M., Sernicola, L., Koanga-Mogtomo, M. L., Betti, M., Borsetti, A., Belli, R., Akerblom, L., Corrias, F., Butto, S., Heeney, J., Verani, P., Titti, F., Ensoli, B. Control of SHIV-89.6P-infection of cynomolgus monkeys by HIV-1 Tat protein vaccine. *Nat Med* 5 (1999) 643-650
15. Calarota, S.A., Leandersson, A. C., Bratt, G., Hinkula, J., Klinman, D. M., Weinhold, K. J., Sandstrom, E., Wahren, B. Immune responses in asymptomatic HIV-1-infected patients after HIV-DNA immunization followed by highly active antiretroviral treatment. *J Immunol* 163 (1999) 2330-2338
16. Carr, A., Cooper, D. A. Adverse effects of antiretroviral therapy. *Lancet* 356 (2000) 1423-1430
17. Cooney, E. L., Collier, A. C., Greenberg, P. D., Coombs, W., Zarling, J., Arditti, D. E., Hoffmann, M. C., Hu, S. L., Corey, L. Safety of and immunological response to a recombinant vaccinia virus vaccine expressing HIV envelope glycoprotein. *Lancet* 337 (1991) 567-572
18. Cooney, E. L., McElrath, M. J., Corey, L., Hu, S., Collier, A. C., Arditti, D., Hoffman, M., Coombs, R. W., Smith, G. E., Greenberg, P. D. Enhanced immunity to human immunodeficiency virus (HIV) envelope elicited by a combined vaccine regimen consisting of priming with a vaccinia recombinant expressing HIV envelope and boosting with gp160 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1882-1886
19. Cosma A., Bühler S., Nagaraj R., Staib C., Hammarin A.L., Wahren B., Goebel F.D., Erfle V., Sutter G. Neutralization assay using a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the green fluorescent protein is a high-throughput method to monitor the humoral immune response against vaccinia virus. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11(2) (2004) 406-10

20. Cosma, A., Nagaraj, R., Bühler, S., Hinkula, J., Busch, D. H., Sutter, G., Goebel, F. D., Erfle, V. Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals. *Vaccine* 22 (2003) 21-29
21. Cosma, A., Nagaraj, R., Staib, C., Diemer, C., Wopfner, F., Schätzl, H., Busch, D. H., Sutter, G., Goebel, F. D., Erfle, V. Evaluation of modified vaccinia virus Ankara as alternative vaccine against smallpox. (in Arbeit)
22. Embretson, J., Zupanic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., Haase, A. T. Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature* 362 (1993) 359-362
23. Finzi, D., Hermankova, M., Pierson, T., Carruth, L. M., Buck, C., Chaisson, R. E., Quinn, T. C., Chadwick, K., Margolick, J., Brookmeyer, R., Gallant, J., Markowitz, M., Ho, D. D., Richman, D. D., Siliciano, R. F. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 278 (1997) 1295-1300
24. Fries, L. F., Tartaglia, J., Taylor, J., Kauffman, E. K., Meignier, B., Paoletti, E., Plotkin, S. Human safety and immunogenicity of a canarypox-rabies glycoprotein recombinant vaccine: an alternative to poxvirus vector system. *Vaccine* 14 (1996) 428-434
25. Giavedoni, L., Jones, L., Mebus, C., Yilma, T. A vaccinia virus double recombinant expressing the F and H genes of rinderpest virus protects cattle against rinderpest and causes no pock lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 8011-8015
26. Gu, S.Y., Huang, T.M, Ruan, L., Miao, Y.H., Lu, H., Chu, C.M., Motz, M., Wolf, H. First EBV vaccine trial in humans using recombinant vaccinia virus expressing the major membrane antigen. *Dev. Biol. Stand.* 84 (1995) 171-177
27. Hanna, Z., Kay, D. G., Rebai, N., Guimond, A., Jothy, S., Jolicoeur, P. Nef Harbors a Major Determinant of Pathogenicity for an AIDS-like Disease Induced by HIV-1 in Transgenic Mice. *Cell* 95 (1998) 163-175
28. Heydenburg-Fuller, D., Haynes, J. R. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* 10 (1994) 1433-1441
29. Hinkula, J., Lundholm, P., Wahren, B. Nucleid acid vaccination with HIV regulatory genes: a combination of HIV-1 genes in separate plasmids induces strong immune responses. *Vaccine* 15 (1997) 874-878

30. Hinkula, J., Svanholm, C., Schwartz, S., Lundholm, P., Brytting, M., Engström, G., Benthin, R., Glaser, H., Sutter, G., Kohleisen, B., et al. Recognition of prominent viral epitopes induced by immunization with human immunodeficiency virus type 1 regulatory genes. *J Virol* 71 (1997) 5528-5539
31. Hirsch, V. M., Fuerst, T. R., Sutter, G., Carroll, M. W., Yang, L. C., Goldstein, S., Piatak, M., Jr., Elkins, W. R., Alvord, W. G., Montefiori, D. C., Moss, B., Lifson, J. D. Patterns of viral replication correlate with outcome in simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques: effect of prior immunization with a trivalent SIV vaccine in modified vaccinia virus Ankara. *J Virol* 70 (1996) 3741-3752
32. Huemer H.P., Strobl B., Shida H., Czerny C.P. Induction of recombinant gene expression in stably transfected cell lines using attenuated vaccinia virus MVA expressing T7 RNA polymerase with a nuclear localisation signal. *J Virol Methods*. 85 (2000) 1-10
33. Katz, J. B. The effect of the virus-serum incubation period upon vaccinia virus serum neutralization titers. *J. Biol. Stand.* 15 (1987) 389-392
34. Kestler, H. W. d., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C. Importance of the Nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* 65 (1991) 651-662
35. Kieny, M. P., Lathe, R., Drillien, R., Spehner, D., Skory, S., Schmitt, D., Wiktor, T., Koprowski, H., Lecocq, J. P. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. *Nature* 312 (1984) 163-166
36. Klebs, A. C. Die Variolation im achtzehnten Jahrhundert. Ein historischer Beitrag zur Immunitätsforschung. Zur historischen Biologie der Krankheitserreger. Materialien, Studien und Abhandlungen, Heft 7. Gießen 1914
37. Klotmann, M. E., Kim, S., Buchbinder, A., DeRossi, A., Baltimore, D., Wong-Staal, F. Kinetics of expression of multiply spliced RNA in early human immunodeficiency virus type 1 infection of lymphocytes and monocytes (published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 Feb 1;89(3):1148). *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 5011-5015
38. Learmont, J. C., Geczy, A. F., Mills, D. Sc. J. et al. Immunologic and Virologic Status after 14 to 18 Years of Infection with an Attenuated Strain of HIV-1-A Report from the Sydney Blood Bank Cohort. *N Engl J Med* 340 (1999) 1715-1722
39. Lennette, E. H., Schmidt, N. J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections, 5th ed. 10 (1979) 257-308

40. Lubaki, N. M., Shepherd, M. E., Brookmeyer, R. S., Hon, H., Quinn, T. C., Kashamuka, M., Johnson, M., Gottle, R., Devers, J., Lederman, H. M., Bollinger, R. C. HIV-1-specific cytolytic T-Lymphocyte activity correlates with lower viral load, higher CD4 count, and CD8+CD38⁻DR⁻ phenotype: comparison of statistical methods for measurement. *J AIDS* 22 (1999) 19-30
41. Lucchiari-Hartz, M., van Endert, P. M., Lauvau, G., Maier, R., Meyerhans, A., Mann, D., Eichmann, K., Niedermann, G. Cytotoxic T lymphocyte epitopes of HIV-1 nef: generation of multiple definitive major histocompatibility complex class I ligands by proteasomes. *J Exp Med* 191 (2000) 239-252
42. MacGregor, R. R., Boyer, J. D., Ugen, K. E., Lacy, K. E., Gluckman, S. J., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M. A., Baine, Y., Higgins, T. J., Ciccarelli, R. B., et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host responses. *J Inf Dis* 178 (1998) 92-100
43. Mack, T. M., Noble, J., Jr Thomas, D. B. A prospective study of serum antibody and protection against smallpox. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 21 (1972) 214-218
44. Manischewitz, J., King, L. R., Bleckwenn, N. A., Shiloach, J., Taffs, R., Merchlinsky, M., Eller, N., Mikolajczyk, M., Clanton, D. J., Monath, Th., Weltzin, R. A., Scott, D. E., Golding, H. Development of a Novel Vaccinia-Neutralization Assay Based on Reporter-Gene Exession. *J. Inf. Dis.* 188 (2003) 440-448
45. Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., Stickl, H. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* 3 (1975) 6-14
46. Mayr, A., Stickl, H., Müller, H. K., Danner, K., Singer, H. Der Pockenimpfstamm MVA: Marker, genetische Struktur, Erfahrungen mit der parenteralen Schutzimpfung und Verhalten im abwehrgeschwächten Organismus. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 167 (1978) 375-390
47. McMichael, A. J., Rowland-Jones, S. L. Cellular immune responses to HIV. *Nature* 410 (2001) 980-987
48. Mellors, J. W., Rinaldo, C., Gupta, P., White, R. M., Todd, J. A., Kingsley, L. A. Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* 272 (1996) 1167-1170
49. Merchlinsky, M., Moss, B. Introduction of foreign DNA into the vaccinia virus genome by in vitro ligation: Recombination-independent selectable cloning vectors. *Virology* 190 (1992) 522-526
50. Moss, B., Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996) 11341-11348

51. Oxenius, A., Price, D. A., Gunthard, H. F., Dawson, S. J., Fagard, C., Perrin, L., Fischer, M., Weber, R., Plana, M., Garcia, F., Hirschel, B., McLean, A., Phillips, R. E. Stimulation of HIV-specific cellular immunity by structured treatment interruption fails to enhance viral control in chronic HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 13747-13752
52. Paoletti, E. Applications of pox virus vectors to vaccination: An update. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 11349-11353
53. Parkin, J., Cohen, B. An overview of the immune system. *The Lancet* 357 (2001) 1777-1789
54. Pauza, C. D., Trivedi, P., Wallace, M., Ruckwardt, T. J., Le Buanec, H., Lu, W., Bizzini, B., Burny, A., Zagury, D., Gallo, R. C. Vaccination with Tat toxoid attenuates disease in simian / HIV-challenged macaques. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 3515-3519
55. Piguet, V., Gu, F., Foti, M., Demaurex, N., Gruenberg, J., Carpentier, J-L., Trono, D. Nef-Induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of β -COP in endosomes. *Cell* 97 (1999) 63-73
56. Ramirez, J. C., Gherardi, M. M., Rodriguez, D., Esteban, M. Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara can be used as an immunizing agent under conditions of preexisting immunity to the vector. *J. Virol.* 74 (2000) 7651-7655
57. Redfield, R. R., Birx, D. L., Ketter, N., Tramont, E., Polonis, V., Davis, C., Brundage, J. F., Smith, G., Johnson, S., Fowler, A., Wierzba, T., Shafferman, A., Volvovitz, F., Oster, C., Burke, D., and the Military Medical Consortium for Applied Retroviral Research. A phase I evaluation of the safety and immunogenicity of vaccination with recombinant gp160 in patients with early human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 324 (1991) 1677-1684
58. Rhee, S. S., Marsh, J. W. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. *J Virol* 68 (1994) 5156-5163
59. Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., Desrosiers, R. C. Importance of the Nef Gene for Maintenance of High Virus Loads and for Development of AIDS. *Cell* 65 (1991) 651-662
60. Robert-Guroff, M., Popovic, M., Gartner, S., Markham, P., Gallo, R. C., Reitz, M. S., Structure and expression of Tat-, Rev-, and Nef-specific transcripts of human immunodeficiency virus type 1 in infected lymphocytes and macrophages. *J. Virol.* 64 (1990) 3391-3398
61. Robinson, H. L. New hope for an AIDS vaccine. *Nat. Rev.* 2 (2002) 239 – 250

62. Rodriguez-Barradas M. C., Musher, D. M. Lahart, C., et al. Antibody to capsular polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae* after vaccination of human immunodeficiency virus-infected subjects with 23-valent pneumococcal vaccine. *J. Inf. Dis.* 165 (1992) 825-831
63. Ross, T. M., Oran, A. E., Cullen, B. R. Inhibition of HIV-1 progeny virion release by cell-surface CD4 is relieved by expression of the viral Nef protein. *Curr Biol* 9 (1999) 613-621
64. Saksela, K., Stevens, C., Rubinstein, P., Taylor, P., Baltimore, D. HIV-1 messenger RNA in peripheral blood mononuclear cells as an early marker of risk for progression to AIDS. *Ann Intern Med* 123 (1995) 641-648
65. Sapp, M., Engelmayer, J., Larsson, M., Granelli-Piperno, A., Steinman, R., Bhardwaj, N. Dendritic cells generated from blood monocytes of HIV-1 patients are not infected and act as competent antigen presenting cells eliciting potent T-cell responses. *Immunol. Lett.* 66 (1999) 121-128
66. Sarkar, J. K. Mitra, A. C., Mukherjee, M. K. The minimum protective level of antibodies in smallpox. *Bull. WHO* 52 (1975) 307-311
67. Schneider, J. et al. Induction of CD8 T cells using heterologous prime-boost immunisation strategies. *Immunol. Rev.* 170 (1999) 29-38
68. Schwartz, O., Marechal, V., Danos, O., Heard, J.-M. Human immunodeficiency virus type 1 Nef increases the efficiency of reverse transcription in the infected cell. *J Virol* 69 (1995) 4053-4059
69. Seshama, T., Bagasra, O., Trono, D., Baltimore, D., Pomerantz, R. J.. Blocked early-stage latency in the peripheral blood cells of certain individuals infected with human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 10663-10667
70. Seth, A., Ourmanov, I., Kuroda, M. J., Schmitz, J. E., Carroll, M W., Wyatt, L. S., Moss, B., Forman, M. A., Hirsch, V. M., Letvin, N. L. Recombinant modified vaccinia virus Ankara-simian immunodeficiency virus Gag Pol elicits cytotoxic T lymphocytes in rhesus monkeys detected by a major histocompatibility complex class I/ peptide tetramer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 10112-10116
71. Sharpe, S., Polyanskaya, N., Dennis, M., Sutter, G., Hanke, T., Erfle, V., Hirsch, V., Cranage, M. Induction of simian immunodeficiency virus (SIV)-specific CTL in rhesus macaques by vaccination with modified vaccinia virus Ankara expressing SIV transgenes: influence of preexisting anti-vector immunity. *J Gen Virol* 82 (2001) 2215-2223

72. Shooter, R. A. Report of the investigation into the cause of the 1978 Birmingham smallpox occurrence. London; H. M. Stationery Office (1980)
73. Smith, G. L., McFadden, G. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev* 2 (2002) 521-527
74. Smith, G. L., Moss, B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. *Gene* 25 (1983) 21-28
75. Smith, G. L., Vanderplasschen, A., Law, M. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J. Gen. Virol.* 83 (2002) 2915-2931
76. Stephensen, C. B., Welter, J., Thaker, S. R., Taylor, J., Tartaglia, J., Paoletti, E. Canine Distemper Virus (CDC) infection of ferrets as a model for testing Morbillivirus vaccine strategies: NYVAC- and ALVAC-based CDC recombinants protect against symptomatic infection. *J Virol* 71 (1997) 1506-1513
77. Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V. Die intrakutane Pockenimpfung mit einem schwach virulenten Vakzinia-Virus („MVA-Virus“). *Aus der Bayer. Landesimpfanstalt München* 1149-1153
78. Stickl, H., Hochstein-Mintzel, V., Mayr, A., Huber, H. Ch., Schäfer, H., Holzner, A. MVA-Stufenimpfung gegen Pocken. *Dtsch. Med. Wschr.* 99 (1974) 2386-2392
79. Stittelaar, K. J., Gruters, R. A., Schutten, M., van Baalen, C. A., van Amerongen, G., Cranage, M., Liljeström, P., Sutter, G., Osterhaus, A. D. M. E. Comparison of the efficacy of early versus late viral proteins in vaccination against SIV. *Vaccine* 20 (2002) 2921-2927
80. Sutter G., Ohlmann M., Erfle V. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett.* 371 (1995) 9-12
81. Sutter, G., Moss, B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 10847-10851
82. Sutter, G., Moss, B. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev. Biol. Stand.* 84 (1995) 195-200
83. Sutter, G., Wyatt, L. S., Foley, P. L., Bennink, J. R., Moss, B. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine* 12 (1994) 1032-1040
84. Tartaglia, J., Perkus, M. E., Taylor, J., Norton, E. K., Audonnet, J-C., Cox, W. I., Davis, S. W., Van der Hoeven, J., Meignier, B., Riviere, M., Languet, B.,

- Paoletti, E. NYVAC: A Highly Attenuated Strain of Vaccinia Virus. *Virology* 188 (1992) 217-232
85. Tasker, S. A., Schnepf, G. A., Lim, M., et al. Unintended smallpox vaccination of HIV-1-infected individuals in the United States military. *Clin. Inf. Dis.* 38 (2004) 1320-1322
 86. Tighe, H., Corr, M., Roman, M., Raz, E. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 19 (1998) 89-97
 87. Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman A., et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259 (1993) 1745-1749
 88. Van Baalen, C. A., Pontesilli, O., Huisman, R. C., Geretti, A. M., Klein, M. R., de Wolf, F., Miedema, F., Gruters, R. A., Osterhaus, A. D. Human immunodeficiency virus type 1 Rev- and Tat-specific lymphocyte frequencies inversely correlate with rapid progression to AIDS. *J Gen Virol* 78 (1997) 1913-1918
 89. Venet, A., Bourgault, I., Aubertin, A. M., Kieny, M. P., Levy, J. P. Cytotoxic T lymphocyte response against multiple simian immunodeficiency virus (SIV) proteins in SIV-infected macaques. *J Immunol* 148 (1992) 2899-2908
 90. Wahren, B., Bratt, G., Persson, C., Leven, B., Hinkula, J., Gilljam, G., Nordlund, S., Eriksson, L., Volvovitz, F., Broliden, P. A., Sandström, E. Improved cell-mediated immune responses in HIV-1-infected asymptomatic individuals after immunization with envelope glycoprotein gp160. *J AIDS* 7 (1994) 220-225
 91. Wang, B., Boyer, J., Srikantan, V., Coney, L., Carrano, R., Phan, C., Merva, M., Dang, K., Agadjanyan M., Gilbert, L., et al. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol* 12 (1993) 799-805
 92. Werner, Die Schutzpockenimpfung in der preussischen Armee. *Deutsche Medicinische Wochenschrift* 22 (1896) 311-314
 93. Wittek, R., Cooper, J., Barbosa, E., Moss, B. Expression of the vaccinia virus genome: Analysis and mapping of mRNAs encoded within the inverted terminal repetition. *Cell* 21 (1980) 487-493
 94. Wittek, R., Moss, B. Tandem repeats within the inverted terminal repetition of vaccinia virus. *Cell* 21 (1980) 277-284

95. Wyatt, L. S., Moss, B., Rozenblatt, S. Replication-deficient vaccinia virus encoding bacteriophage T7 RNA polymerase for transient gene expression in mammalian cells. *Virology* 210 (1995) 202-205
96. Yang, Z., Wyatt, L. S., Kong, W., Moodie, Z., Moss, B., Nabel, G. J. Overcoming immunity to a viral vaccine by DNA priming before vector boosting. *J. Virol.* 77 (2003) 799-803
97. Yasutomi, Y., Robinson, H. L., Lu, S., Mustafa, F., Lekutis, C., Arthos, J., Mullins, J. I., Voss, G., Manson, K., Wyand, M., Letvin, N. L. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T-lymphocyte induction through DNA vaccination of rhesus monkeys. *J Virol* 70 (1996) 678-681

Veröffentlichungen

Cosma, A., Nagaraj, R., Bühler, S., Hinkula, J., Busch, D. H., Sutter, G., Goebel, F. D., Erfle, V.

Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits Nef-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals.

Vaccine 22 (2003) 21-29

Cosma A., Bühler S., Nagaraj R., Staib C., Hammarin A.L., Wahren B., Goebel F.D., Erfle V., Sutter G.

Neutralization assay using a modified vaccinia virus Ankara vector expressing the green fluorescent protein is a high-throughput method to monitor the humoral immune response against vaccinia virus.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11(2) (2004) 406-10