Einfluss Adenovirus-spezifischer Immunantworten auf die Immunisierung mit Adenovirus-basierten Vektoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
M. Sc. Camilla Patrizia Hrycak
aus Schwientochlowitz

Essen, Oktober 2018

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Virologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ulf Dittmer
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Wiebke Hansen

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Herr Prof. Dr. Hendrik Streeck

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis III
Abkürzungsverzeichnis VIII
Abbildungsverzeichnis X
Tabellenverzeichnis XIII
1. Einleitung 1
1.1 Retroviren 1
1.1.1 Humanes Immundefizienz Virus (HIV) 2
1.1.1.1 Therapeutische Behandlungsmöglichkeiten einer HIV-1 Infektion 8
1.1.1.2 Impfstoffkandidaten in klinischen Studien für HIV 9
1.1.1.3 Herausforderungen der HIV-Impfstoffentwicklung 10
1.1.1.4 Tiermodelle für HIV 12
1.1.2 Friend Virus 15
1.1.2.1 Immunantworten gegen FV 18
1.1.2.2 Das FV-Modell 19
1.1.2.3 Vakzinierungsstudien im FV-Modell 20
1.2 Adenoviren 22
1.2.1 Adenovirale Vektoren 25
1.2.2 Adenovirus-basierte Impfstrategien im FV-Modell 27
1.2.3 Ad5-Prä-Immunität 28
1.2.4 Umgehungsstrategien der Ad5-Prä-Immunität 29
1.3 Zielsetzung 32
2. Material 34
2.1 Geräte 34
2.2 Verbrauchsmaterialien 35
2.3 Chemikalien 36
2.4 Enzyme 37
2.5 Reagenzsysteme 38
2.6 Puffer und Standardlösungen 38
2.7 Medien 40
2.7.1 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen 40
2.7.2 Medien für die Bakterienkultur (*Escherichia coli*) 41
2.8 Antibiotika 41
2.9 Plasmide 42
2.10 Oligonukleotide 43
2.11 Größenstandards 44

2.12 Peptide ... 44
2.12.1 Einzelpeptide ... 44
2.12.2 Adenovirus 5 Peptid-Pools ... 44
2.13 Antikörper ... 45
2.14 Fluoreszenzmarkierte Antikörper ... 45
2.15 Bakterien ... 46
2.16 Zelllinien ... 46
2.17 Viren ... 46
2.18 Versuchstiere ... 47
2.19 Datenbanken ... 47
3 Methoden ... 48
3.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden ... 48
3.1.1 Erstellung eigener Oligonukleotide ... 48
3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 48
3.1.3 Direkte Aufreinigung von PCR-Fragmenten ... 49
3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese ... 49
3.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ... 49
3.1.6 Restriktionsendonukleasenverdau von DNA-Fragmenten ... 49
3.1.7 DNA-Präzipitation (NaAc Fällung) ... 50
3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten ... 50
3.1.9 Site-directed Mutagenese über Kinase-Ligase-und DpnI-(KLD) Reaktion ... 50
3.1.10 Kultur von Bakterien ... 50
3.1.11 Transformation von Bakterien ... 50
3.1.11.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien ... 50
3.1.11.2 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien ... 51
3.1.11.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen ... 51
3.1.11.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien ... 51
3.1.12 Plasmidisolation im analytischen Maßstab (Mini-Präp) ... 51
3.1.13 Plasmidisolation im präparativen Maßstab (Maxi-Präp) ... 52
3.1.14 Plasmidisolation im präparativen Maßstab (Cäsium-Präp) ... 52
3.1.15 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen ... 53
3.1.16 Sequenzierung ... 53
3.2 Proteinbiochemische Methoden ... 53
3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen ... 53
3.2.2 Western Blot ... 54
3.2.3 Immunodetektion ... 54
3.2.4 Antikörper-Aufreinigung aus Hybridoma-Überständen ... 54

3.2.5 Entfernen von Antikörpern aus Serum mittels Protein G-Sepharose-Beads ... 54
3.3 Zytologische Methoden ... 55
3.3.1 Kultivierung von adhärenten Zelllinien ... 55
3.3.2 Kultivierung von Suspensionszelllen und Antikörperherstellung (Hybridomazellen) ... 55
3.3.3 Zellen einfrieren und auftauen ... 55
3.3.4 DNA Transfektion von Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode ... 56
3.3.5 DNA Transfektion von Zellen mittels Polyethylenimin (PEI) ... 56
3.3.6 Anzucht von Adenoviren ... 56
3.3.7 Aufreinigung von Adenoviren ... 57
3.3.8 Titerbestimmung mittels $TCID_{50}$ ... 57
3.3.9 Titerbestimmung über die optische Dichte ... 57
3.4 Immunologische Methoden ... 58
3.4.1 Vakzinierungen ... 58
3.4.1.1 DNA-Vakzinierung ... 58
3.4.1.2 Adenovirus-Vakzinierung ... 58
3.4.2 Belastungsinfektion ... 58
3.4.3 Kontrolle des Infektionsverlaufs ... 58
3.4.3.1 Palpation der Milz ... 58
3.4.3.2 Retroorbitale Blutentnahme ... 59
3.4.4 Bestimmung der Viruslast ... 59
3.4.4.1 Bestimmung der Plasma-Virämie (Virämie-Assay) ... 59
3.4.4.2 Immunzytochemische Bestimmung der Viruslast in der Milz (Infectious Center (IC)-Assay) ... 60
3.4.5 Bestimmung der humoralen Immunantwort ... 60
3.4.5.1 αAd-/ αOVA-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ... 60
3.4.5.2 In vitro Neutralisationstest ... 61
3.4.5.3 F-MuLV Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ... 61
3.4.5.4 F-MuLV Neutralisationstest ... 62
3.4.6 Bestimmung der zellulären Immunantwort ... 62
3.4.6.1 Probenvorbereitung ... 62
3.4.6.2 Peptidstimulation ... 62
3.4.6.3 Oberflächenfärbung ... 62
3.4.6.4 Intrazelluläre Färbung ... 63
3.4.6.5 Multimerfärbung (Tetramer/Dextramer) ... 63
3.4.6.6 IFNγ-Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay (ELISpot) ... 63
3.4.6.7 Zellisolation mit der MACS-Technologie ... 64

3.4.6.8 Zell-Transfer 64
3.4.6.9 Statistische Analysen 64
4. Ergebnisse 66
4.1 Konkurrenz adenoviraler Epitope mit Transgen-kodierten Epitopen in der Ad5-basierten Immunisierung 66
4.1.1 Vorarbeiten: Immundominanz adenoviraler Epitope über das FV $GagL_{85-93}$-Epitop 66
4.1.2 Einfluss der Ad5-$CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ auf die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops 69
4.1.3 Analyse der Immunantworten nach Impfung mit GagL.ΔDBP.Hexon in H-$2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen 72
4.1.4 Analyse der Immunantworten nach Impfung mit Ad5.Leader-Gag in H-$2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen 74
4.1.5 Einfluss der Co-Applikation von Interleukinen auf die $Hexon_{486-494}$-vermittelte Immundominanz gegenüber $GagL_{85-93}$ 75
4.1.6 Einfluss der kombinierten Co-Applikation von IL2 und IL23 auf die $Hexon_{486-494}$-vermittelte Immundominanz gegenüber $GagL_{85-93}$ 77
4.1.7 Einfluss der Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden Ad5-Vektoren auf die Immunisierung mit Ad5-Leader-Gag 79
4.1.8 Analyse Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit Ad5 81
4.1.9 Herstellung OT-I-Peptid-Varianten-kodierender rekombinanter Ad5.Vektoren 83
4.1.10 Immunisierungsexperimente mit für OT-I-Peptid-Varianten kodierenden Ad5-Impfvektoren 85
4.1.11 ELISpot-Analyse Vektor- und Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit OT-I-Peptid-Varianten-kodierenden Ad5-Vektoren 87
4.1.12 Analyse der Antikörperantwort nach der Immunisierung mit OT-I-Peptid-Varianten-kodierenden Ad5-Vektoren 90
4.2 Ad5-Prä-Immunität 92
4.2.1 Einfluss von zellulären und humoralen Immunantworten in der Ad5-Prä-Immunität 92
4.2.2 Einfluss Ad5-spezifischer Immunglobuline G in der Ad5-Prä-Immunität 95
4.2.3 Einfluss Ad5-bindender und –neutralisierender Antikörper in der Ad5-Prä-Immunität 98
4.3 Seltene Adenovirus-Typen 101
4.3.1 Herstellung von Impfvektoren basierend auf den Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 101

4.3.2 Charakterisierung der seltenen Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 in Immunisierungsexperimenten 105
4.3.2.1 Immunisierungsstudien mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} und Ad50.Leader-Gag_{C1K} 105
4.3.2.2 Immunisierungsstudien mit Ad48.TxnGagL und Ad50.TxnGagL 108
4.3.2.3 Analyse Vektor-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48- und Ad50-basierten Vektoren 110
4.3.2.4 Immunisierungsexperimente mit OVA-kodierenden Ad48- und Ad50-Vektoren 112
4.3.2.5 Analyse Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.OVA und Ad50.OVA 114
4.3.2.6 Immunisierungsexperimente mit Env-kodierenden Ad48- und Ad50-Vektoren 116
4.3.2.7 Analyse Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env 119
4.3.2.8 Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad5.Env, Ad48.Env und Ad50.Env 121
4.3.2.9 Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Induktion Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env 125
5. Diskussion 128
6. Zusammenfassung 144
7. Summary 146
Literaturverzeichnis 148
Danksagung 165
Erklärungen 166

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
A.dest	destilliertes Wasser
Ad5	Adenovirus 5
Ad	Adenovirus
AEC	Aminoethylcarbazol
AF 700	Alexa Fluor 700
AIDS	*Acquired Immune deficiency syndrome*
αm	anti-Maus
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAR	Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor
CD	*cluster of differentation*
cDNA	*complementary* DNA
ChAd	*chimpanzee* Adenovirus
CTL	*cytotoxic T lymphocyte*
DBP	DNA bindendes Protein
Dex	Dextramer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2-Desoxyribonukleotid-5-Triphosphat
dpi	*days post infection* Tage nach der Infektion
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eF450	eFluor 450
eF605	eFluor 605
eF710	eFluor 710
ELISA	*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
Env	*Envelope*
EtOH	Ethanol
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*, Durchflusszytometrie
FBS/FCS	fötales Rinderserum
FFU	*Focus forming units*
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
F-MuLV	Murines Friend Leukämievirus
F-MuLV-B	b-tropes Murines Friend Leukämievirus
F-MuLV-N	n-tropes Murines Friend Leukämievirus
FV	Friend Virus Komplex
FV-B	b-troper Friend Virus Komplex
FV-N	n-troper Friend Virus Komplex
Gag	*group-specific antigen*
$GagL_{85-93}$	*leader* Epitop des FV
GFP	*green fluorescent protein*
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
HAART	*Highly active antiretroviral therapy*
HCV	Hepatitis C Virus
HEK	*human embryonic kidney*
HIV	Humanes Immundefizienzvirus

HRP	*Horseradish peroxidase*
HTLV	Humanes T-Zell-Leukämie Virus
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IC	*infectious center*
ICS	*intracellular cytokine staining*
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITR	*inverted terminal repeats*
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LTR	l*ong terminal repeat*
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	*major histocompatibility complex*
mRNA	*messenger* RNA
MVA	modifiziertes Vaccinia-Ankara Virus
NHP	*non-human primate*
NK	Natürliche Killerzelle
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
p.i.	post infection
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	*Polymerase chain reaction*
PE	Phycoerythrin
Pe-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
Per-CP	Peridinin-Chlorophyll-Proteinkomplex
PFU	*Plaque-forming units*
Pol	Polymerase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur in Material/Methoden
RT	Reverse Transkription/Reverse Transkriptase in Einleitung
Sad	simianer Adenovirus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFFU	*Spleen focus-forming units*
SFFV	*Spleen focus-forming virus*
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
$TCID_{50}$	*Tissue Culture Infection Dose 50*
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetramer
Tfh	follikuläre T-Helferzelle
T_{reg}	Regulatorische T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
Txn	Thioredoxin
UV	Ultraviolett
vp	virale Partikel
Wt	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion 3
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HIV-1-Partikels 5
Abbildung 3: Aufbau des proviralen Genoms von HIV-1 6
Abbildung 4: Replikationszyklus von HIV-1 7
Abbildung 5: Schema der proviralen Genome des F-MuLV und des SFFV 15
Abbildung 6: Verlauf einer FV-Infektion 17
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Adenoviruspartikels 23
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Genoms des humanen Adenovirus 5 24
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Ad5 25
Abbildung 10: Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach Impfung mit den adenoviralen Vektoren Ad5.Leader-Gag oder Ad5.Leader-Gag_{C1K} 66
Abbildung 11: Impfung mit DNA-Plasmiden pCG.Leader-Gag bzw. pCG.Leader-Gag_{C1K} 67
Abbildung 12: Einfluss DNA-Plasmid-kodierter, adenoviraler Epitope auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten 68
Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung zur Untersuchung der Immundominanz adenoviraler Epitope 69
Abbildung 14: Einfluss der adenoviralen Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten 71
Abbildung 15: DNA-Immunisierungsexperimente zur Immundominanz des adenoviralen $Hexon_{486-494}$-Epitopes in H-$2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen 73
Abbildung 16: Immunisierungsexperimente zur Immundominanz des adenoviralen $Hexon_{486-494}$-Epitopes in H-$2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen mit Ad5-Vektoren 74
Abbildung 17: Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden DNA-Plasmiden 76
Abbildung 18: Co-Immunisierung von GagL.DBP.Hexon mit IL2- und IL23-kodierenden DNA-Plasmiden 78
Abbildung 19: Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden Ad5-Vektoren 80
Abbildung 20: $CD8^+$ T-Zellantworten gegen adenovirale $CD8^+$T-Zell-Epitope 82
Abbildung 21: AdEasy-System 84
Abbildung 22:Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit OT-I-Peptidvarianten-kodierenden Ad5-Vektoren 85

Abbildung 23: Untersuchung Transgen- und Ad5-Vektor-spezifischer CD8$^+$T Zellantworten nach Immunisierung mit Transgenen unterschiedlicher Immunogenität 86
Abbildung 24: CD8$^+$ T-Zellantworten nach Stimulation mit verschiedenen CD8$^+$ T-Zellpeptiden 89
Abbildung 25: Induktion Transgen- und Vektor-spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit Ad5-Vektoren 91
Abbildung 26:Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus der Immunisierungsexperimente zur Untersuchung der Ad5-Prä-Immunität 93
Abbildung 27: Auswirkung des Transfers von CD4$^+$ T-Zellen, CD8$^+$ T-Zellen oder Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen auf die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL 94
Abbildung 28: Auswirkung des Transfers von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen vor und nach Behandlung mit Protein G 97
Abbildung 29: Transfer von Ad5-bindenden und Ad5-neutralisierenden Antikörpern aus Hybridoma-Zellüberständen 100
Abbildung 30: Herstellung von Ad48-Impfvektoren 103
Abbildung 31: Herstellung von Ad50 Impfvektoren 104
Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit Ad48- und Ad50-basierenden Vektoren 105
Abbildung 33: Immunisierung mit FV Leader-Gag$_{C1K}$-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren 107
Abbildung 34: Immunisierung mit Txn.GagL-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren 109
Abbildung 35: Induktion bindender und neutralisierender Antikörper nach Impfung mit verschiedenen Ad-Typen 111
Abbildung 36: Immunisierung mit OVA-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-basierten Vektoren 113
Abbildung 37: Induktion Ad Typ-spezifischer und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit OVA-kodierenden Ad-Vektoren 115
Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env 116
Abbildung 39: Immunisierung mit FV Env-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren 118
Abbildung 40: Induktion Ad-Typ-spezifischer bindender und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden AdV 120
Abbildung 41: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env 121

Abbildung 42: Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren 122
Abbildung 43: Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Induktion Ad-Typ-spezifischer bindender und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden Ad-Vektoren 126

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:PCR Ansatz 48
Tabelle 2: Gel-Zusammensetzung bei der SDS-PAGE 53
Tabelle 3: Elektroporationsprotokoll 58
Tabelle 4: Korrelation zwischen Palpationskategorie und Milzgewicht 59
Tabelle 5: Transgen-kodierenden pAdApt-Plasmide zur Herstellung der unterschiedlichen Ad48- und Ad50-Vektoren 102

1. Einleitung

1.1 Retroviren

Bei den *Retroviridae* handelt es sich um Viren, deren infektiöse Partikel einen Durchmesser von ca. 80-120 nm haben. Das virale Kapsid ist von einer von der Zytoplasmamembran der Wirtszelle abgeleiteten Hüllmembran umgeben. Es enthält das Virusgenom in Form von zwei identischen Molekülen linearer einzelsträngiger RNA mit Plusstrang-Polarität. Eine Besonderheit bei den Retroviren ist die Reverse Transkriptase, welche das virale RNA Genom zunächst in ein DNA Molekül umschreibt, das im weiteren Verlauf der Virusreplikation in das Wirtszellgenom integriert wird. Retrovirusinfektionen treten vor allem bei Wirbeltieren auf und können je nach Spezies entweder asymptomatisch verlaufen oder aber Immundefizienzen oder Tumorerkrankungen hervorrufen. Man unterscheidet einfache Retroviren, deren Genom lediglich die essentiellen Gene *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) und *env* (*envelope*) enthält, von komplexen Retroviren, welche zusätzliche Gene für verschiedene regulatorische und akzessorische Proteine besitzen [169].

Die taxonomische Klassifizierung der Retroviridae basiert unter anderem auf morphologischen und genetischen Unterschieden und führte zur Einteilung in zwei Unterfamilien: die Spumavirinae, welche lediglich die Gattung Spumavirus enthalten und die Orthoretrovirinae, zu welchen die α-, β-, γ-, δ- und ε-Retroviren, sowie die Lentiviren gezählt werden. Die Mehrheit der Retroviren verbreitet sich von Organismus zu Organismus, indem sie einen vollständigen Infektionszyklus durchlaufen, welcher sich mit der Freisetzung infektiöser Partikel und der Neuinfektion weiterer Zellen ständig fortsetzt. Diese Viren werden als exogen bezeichnet und verfügen entweder selbst über die für die Replikation erforderlichen Enzyme und Transkriptionsfaktoren oder sind in der Lage Proteine der Wirtszelle zu nutzen. Endogene Retroviren hingegen liegen ausschließlich im Wirtszellgenom integriert vor. Sie machen einen hohen Anteil eukaryotischer DNA aus und werden vertikal, über viele Generationen hinweg, ohne die Bildung viraler Partikel übertragen. Das endogene virale Genom kann vollständig oder mit Deletionen integriert sein. Es kann aktiv transkribiert werden oder als stummes Gen vorliegen. Die Bildung und Freisetzung endogener Viren kann spontan auftreten, ist jedoch nach Grad der im Virusgenom enthaltenen Deletionen nur bei Co-Infektion mit einem Helfervirus möglich, welches die fehlenden Informationen komplementiert [169].

Die ersten in der Wissenschaft beschriebenen Retroviren sind das Virus der equinen infektiösen Anämie [272] sowie das aviäre Leukosevirus [69]. In beiden Fällen übertrugen

die Forscher eine Erkrankung durch den Transfer von zellfreiem Filtrat von kranken auf gesunde Tiere derselben Art. Mehr Bekanntheit erlangte allerdings Peyton Rous, dem es 1911 in einem ähnlichen Experiment gelang, Sarkome durch die Injektion von Ultrafiltraten aus Geflügeltumoren bei gesunden Hühnern hervorzurufen [218]. Das verursachende Agens wurde ihm zu Ehren Rous-Sarkomvirus genannt und führte zu weiteren wissenschaftlichen Entdeckungen, wie beispielsweise der Reversen Transkriptase [260] und von Onkogenen [244]. Weitere Beispiele für tierpathogene Vertreter der Familie der Retroviren sind das Simian Foamy Virus [70], das Friend Virus [83] sowie das Feline Immundefizienzvirus, welches die feline Immunschwäche verursacht und als Modell für die Erforschung des Humanen Immundefizienzvirus (HIV) dient [284]. Das erste bekannte humanpathogene Retrovirus war das 1980 von Robert C. Gallo beschriebene humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV-1) [88], welches nach einer Latenzphase von ca. 60 Jahren eine T-Zell-Leukämie oder HTLV-1-assoziierte Myelopathie in 1-2 % der HTLV-1 infizierten Menschen auslösen kann. Ein weitaus aggressiverer Repräsentant der humanpathogenen Retroviren ist das Humane Immundefizienz Virus (HIV-1), welches 1983 am Pariser Institut Pasteur von Montagnier und Barré-Sinoussi isoliert wurde [18] und in ca. 100 % der HIV Infizierten das *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) verursacht [31].

1.1.1 Humanes Immundefizienz Virus (HIV)

Das Humane Immundefizienz Virus (HIV) gehört zur Gattung der Lentiviren innerhalb der Retroviridae. Es löst das erworbene Immunschwächesyndrom AIDS aus. Dieses manifestiert sich in der Kompromittierung des Immunsystems durch einen hohen Verlust an $CD4^+$ T-Zellen und daraus resultierenden letalen Folgen. Eine unbehandelte HIV-Infektion beginnt zunächst mit einer akuten Phase, deren Symptome einem grippalen Infekt ähneln (Abb. 1). Diese ist durch die massive Proliferation virusspezifischer $CD4^+$ T- und $CD8^+$ T-Zellen gekennzeichnet. Durch ein komplexes Zusammenwirken induzierter $CD4^+$ T- und $CD8^+$ T-Zellen, sowie ca. 3-6 Wochen nach der Infektion auftretender HIV-spezifischer Antikörper wird die Viruslast im Patienten gesenkt und konstant niedrig gehalten. In dieser Latenzzeit, die wenige Monate bis hin zu mehreren Jahrzehnten dauern kann, sind die meisten Patienten symptomfrei. Es findet jedoch weiterhin kontinuierlich Virusreplikation statt. HIV etabliert vor allem in ruhenden $CD4^+$ T -Zellen persistierende Reservoirs. In diesen Zellen entgeht das Virus der Beseitigung durch das Immunsystem und liegt transkriptionell inaktiv im Genom integriert vor, bis es zu einer Reaktivierung der Infektion kommt [179].

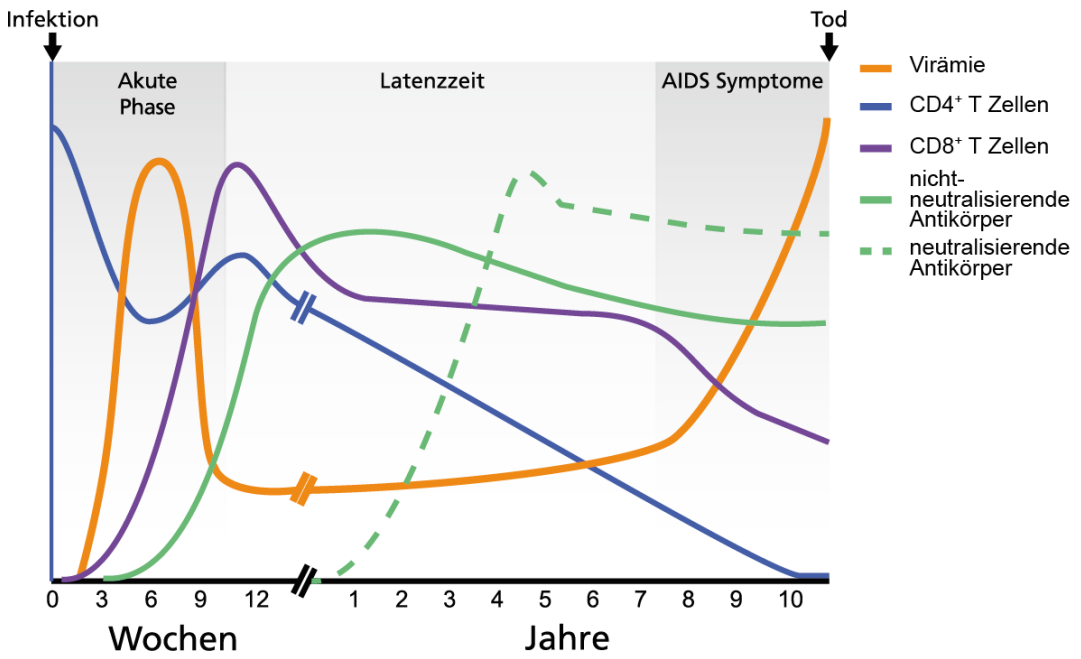

Abbildung 1: Verlauf einer unbehandelten HIV-Infektion
Die akute Phase zu Beginn der Infektion ist durch starke Virusreplikation und der zeitlich dazu versetzten, massiven Proliferation virusspezifischer $CD4^+$- und $CD8^+$ T-Zellen gekennzeichnet. Die Bildung von nicht-neutralisierenden Antikörpern setzt erst zu Beginn der latenten Phase ein. Nur wenige Patienten generieren breitgefächerte, neutralisierende Antikörperantworten gegen HIV, welche erst im späteren Verlauf der Infektion auftreten. Durch ein Zusammenspiel der humoralen und zellulären Immunantwort werden freie Viren und infizierte Zellen mit aktiver Virusreplikation eliminiert, wodurch die Viruslast im Patienten sinkt. In der folgenden Lantenzzeit findet weiterhin kontinuierlich Virusreplikation statt. Zudem etabliert HIV persistierende Reservoirs, vor allem in ruhenden $CD4^+$ T-Zellen. In diesen Zellen entgeht das Virus der Beseitigung durch das Immunsystem und liegt transkriptionell inaktiv im Genom integriert vor, bis es zu einer Reaktivierung der Infektion kommt. Durch die kontinuierliche Eliminierung infizierter $CD4^+$ T-Zellen, sowie durch weitere Einwirkung des Virus werden $CD4^+$ T-Zellen depletiert. Unterschreitet die Zahl der $CD4^+$ T-Zellen einen bestimmten Schwellenwert, kann das Immunsystem die Infektion nicht weiter kontrollieren. Die $CD8^+$ T-Zellantwort nimmt ab, während die Virusreplikation wieder ansteigt. Es kommt vermehrt zum Ausbruch opportunistischer Infektionen und Krebserkrankungen mit letalen Folgen. Verändert nach [262, 293]

Durch die kontinuierliche Eliminierung infizierter $CD4^+$ T-Zellen, sowie durch das Pyroptose-vermittelte Abtöten nicht infizierter *bystander* $CD4^+$ T-Zellen werden langfristig $CD4^+$ T-Zellen durch das Virus depletiert [63]. Unterschreitet die Zahl der $CD4^+$ T-Zellen einen bestimmten Schwellenwert, kann das Immunsystem die Infektion nicht weiter kontrollieren. Die $CD8^+$ T-Zellantwort nimmt ab, während die Virusreplikation wieder ansteigt. Es kommt vermehrt zum Ausbruch opportunistischer Infektionen und Krebserkrankungen mit letalen Folgen. Die Übertragung des Virus erfolgt durch direkten Kontakt mit kontaminierten Körperflüssigkeiten wie Blut, Sperma, Vaginalsekret oder Muttermilch. Laut einer Schätzung von UNAIDS, einem gemeinsamen Programm der Vereinten Nationen zur Bekämpfung von HIV/AIDS, waren 36,9 Millionen Menschen im Jahr 2017 mit HIV infiziert; davon handelte es sich bei 1,8 Millionen um Neuinfektionen [270]. Die Rate der HIV-Neuinfektionen war über die letzten Jahre durch vermehrte Aufklärung und Prävention regressiv, jedoch ist eine komplette Heilung der Infektion nach

heutigem Standard weiterhin nicht möglich. Seit der erstmaligen Beschreibung des Virus wurden weltweit ungefähr 70 Millionen Menschen mit HIV infiziert. Etwa 35 Millionen Menschen starben an den Folgen von AIDS. Die überwiegende Mehrheit aller HIV-Infizierten ist vor allem in strukturschwachen Ländern mit niedrigem oder mittlerem Einkommen angesiedelt. Ca. 25,5 Millionen HIV-Infizierte leben in Subsahara-Afrika und 6,5 Millionen weitere verteilen sich auf Asien und Osteuropa [270].

Basierend auf Genom- und Antigenvarianzen unterscheidet man zwei Hauptvirustypen, HIV-1 und HIV-2. Diese werden weiter in einzelne Untergruppen eingeteilt, deren Ursprungsviren bei HIV-1 auf separate speziesübergreifende Übertragungen von Simianen Immundefizienz Viren (SIV) aus dem Schimpansen (*Pan troglodytes troglodytes*; SIVcpz, [89]), oder dem Gorilla (*Gorilla gorilla*, SIVgor, [56]) oder im Fall von HIV-2 aus dem Rußmangaben (*Cercocebus atys*; SIVsmm; [224]) zurückgeführt werden können. Die erste Übertragung auf den Menschen erfolgte vermutlich zwischen 1920 und 1940 [73]. HIV-2 (Subtypen A-H), dessen Hauptverbreitungsgebiet Westafrika ist, gilt aufgrund seiner verringerten Übertragungsrate, niedrigerer Viruslasten und niedrigeren Mengen viraler RNA im Serum von Patienten im Vergleich zu HIV-1 als die weniger pathogene Variante [7, 128, 200]. Bei HIV-2-Infizierten ist das Fortschreiten von der Infektion zu AIDS verlangsamt und auftretende Krankheitssymptome sind teilweise schwächer ausgeprägt [151, 156]. HIV-1 wird weiter in die Gruppen M, N, O und P eingeteilt [199, 241, 271]. Menschliche Infektionen mit Viren der Gruppen N und O treten seltener auf. Ihr Vorkommen ist geografisch weitgehend auf Kamerun und die umliegenden Länder beschränkt [233]. Die Viren der Gruppe M (Subtypen A-K) hingegen sind vor allem für die HIV-Pandemie verantwortlich. Ihnen werden über 90 % aller heutigen HIV Infektionen weltweit zugeordnet.

Die ungefähr 120 nm großen HIV-1 Partikel (Abb. 2) sind außen von einer Hüllmembran umgeben, in die Glykoproteinkomplexe eingelagert sind. Diese *Envelope* (Env) Glykoproteinkomplexe bestehen aus Trimeren eines externen Env-Glykoproteins (gp) mit einem Molekulargewicht von 120 kDa (gp120), welche durch Trimere eines transmembranen Env Glykoproteins mit einem Molekulargewicht von 41 kDa (gp41) nicht kovalent in der Membran verankert sind. Über Env gp120 bindet HIV an das *cluster of differentiation* 4 (CD4) Oberflächenprotein einer Wirtszelle, beispielsweise an $CD4^+$ T-Helferzellen, aber auch Makrophagen, Monozyten oder dendritischen Zellen.

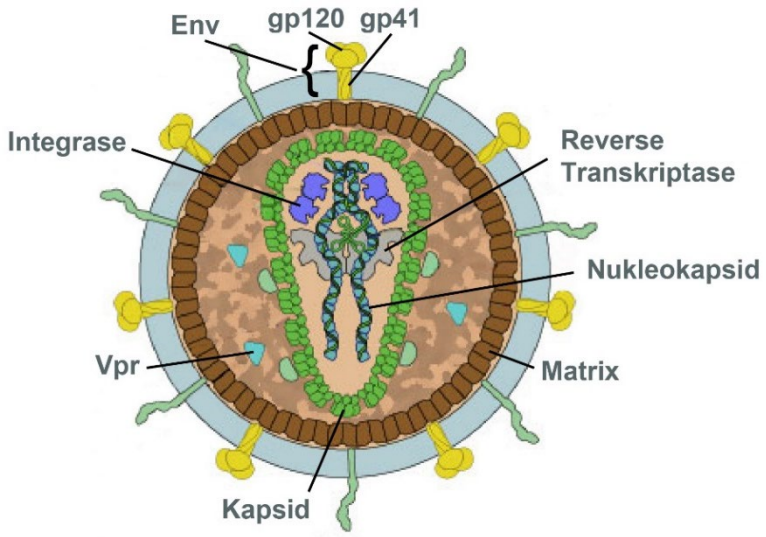

Abbildung 2: Schematische Darstellung eines HIV-1-Partikels

Der Partikel ist außen von einer Hüllmembran umgeben, in welche die Env Oberflächenproteine gp120 und gp41 als nicht-kovalent verbundene Trimerkomplexe eingelagert sind. Darunter befindet sich eine Hülle aus Matrixproteinen, die das virale Kapsid umschließt, welches virale Enzyme, sowie zwei Kopien der genomischen RNA enthält. Abbildung verändert nach [34]

Dies führt zu Konformationsänderungen in Env gp120, wodurch dieses mit einem weiteren Co-Rezeptor, dem Chemokinrezeptor 5 (CCR5) oder dem Chemokinrezeptor 4 (CXCR4) interagieren kann [75, 172, 279, 280]. R5-trope HIV-Stämme nutzen CCR5 als Co-Rezeptor und infizieren vor allem Gedächtnis-$CD4^+$ Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten, sowie Makrophagen. R5-trope Stämme treten in allen Stadien einer HIV Infektion auf. Im Gegensatz dazu treten X4-trope HIV-1 Stämme ausschließlich im späteren Verlauf der Erkrankung auf [278]. Diese Viren binden CXCR4 als Co-Rezeptor, den ruhende oder naive T-Lymphozyten, sowie andere T-Zell-Linien, beispielsweise follikuläre T-Helferzellen (T_{FH}) oder zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) exprimieren. R5X4-trope HIV-1 Stämme können sowohl CCR5- als auch CXCR4-exprimierende Zellen infizieren. Die Interaktionen zwischen Env gp120, CD4 und dem Co-Rezeptor führen über die Aktivierung der sogenannten fusogenen Domäne von Env gp41 letztlich zur Fusion der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran [280].

Nach dem Eintritt und darauffolgenden Zerfall des viralen Kapsids werden Enzyme, wie die Reverse Transkriptase, Integrase und Protease, sowie zwei Kopien des einzelsträngigen RNA-Genoms in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt. Hier erfolgt schrittweise die reverse Transkription der viralen RNA zu einem doppelsträngigen DNA-Molekül, welches als Präintegrationskomplex mit bestimmten viralen Proteinen in den Zellkern transportiert und in das Wirtsgenom integriert wird. Das revers transkribierte Genom oder Provirus (Abb. 3) hat eine Länge von ungefähr 9 kb.

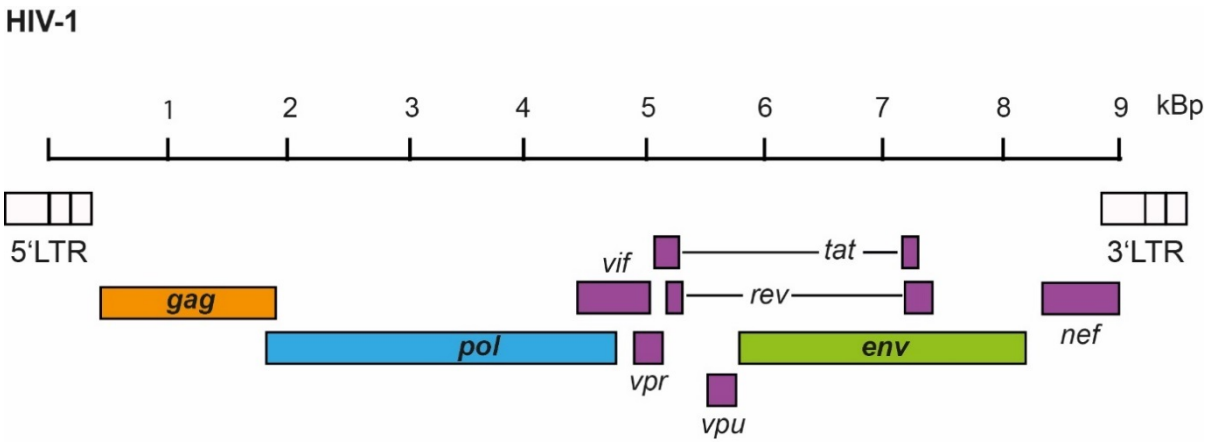

Abbildung 3: Aufbau des proviralen Genoms von HIV-1

Das ungefähr 9 kb lange Genom des HIV-1 Provirus wird von zwei LTR-Regionen flankiert und kodiert die viralen Proteine Gag, GagPol und Env, die regulatorischen Proteine Tat, Rev und Tev, sowie die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef. Adaptiert nach [1].

Die Leserahmen der Hauptgene *gag*, *pol* und *env* werden auf beiden Seiten von zur Integration in das Wirtszellgenom benötigten *long terminal repeats* (LTR) flankiert. In diesen sind cis-aktive Sequenzen, Promotor- und *Enhancer*-Elemente angesiedelt. *gag* kodiert für die Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine der entstehenden Virionen. Durch eine Verschiebung des Leserasters um -1 während der Translation entstehen durch das Überlesen eines Stoppcodons Gag/Pol-Fusionsproteine, aus welchen die enzymatisch aktiven Einzelkomponenten Protease, Reverse Transkriptase mit RNAse H und Integrase gespalten werden. Der *env* Leserahmen kodiert die Hüllmembran-Glykoproteine Env gp41 und Env gp120. Zusätzlich zu den Hauptgenen besitzt HIV Gene für weitere akzessorische Proteine. Tat (*transactivator protein*) ist vor allem an der initialen Phase der HIV Replikation beteiligt, während Rev (*RNA splicing regulator*), Nef (*negative regulating factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*viral protein rapid*) und Vpu (*viral protein out*) die Infektiosität, sowie die Freisetzung und Verbreitung der Virionen im Wirt unterstützen. HIV-2 kodiert ein Vpx Protein anstatt des Vpu Proteins, welches die Infektiosität des Virus in Makrophagen beeinflusst. Die bei HIV-1 Vpu-vermittelte Freisetzung viraler Partikel wird bei HIV-2 durch dessen Env-Glykoprotein unterstützt [29].

HIV kann seinen Replikationszyklus (Abb. 4) in der Zelle vollenden und infektiöse virale Partikel hervorbringen, oder eine latente Infektion ausbilden und in einem transkriptionell inaktiven Zustand in das Wirtszellgenom integriert vorliegen. Durch welche Ereignisse der Infektionsverlauf entschieden wird, bzw. wodurch HIV aus der Latenz heraus reaktiviert wird, ist Gegenstand aktueller Forschung.

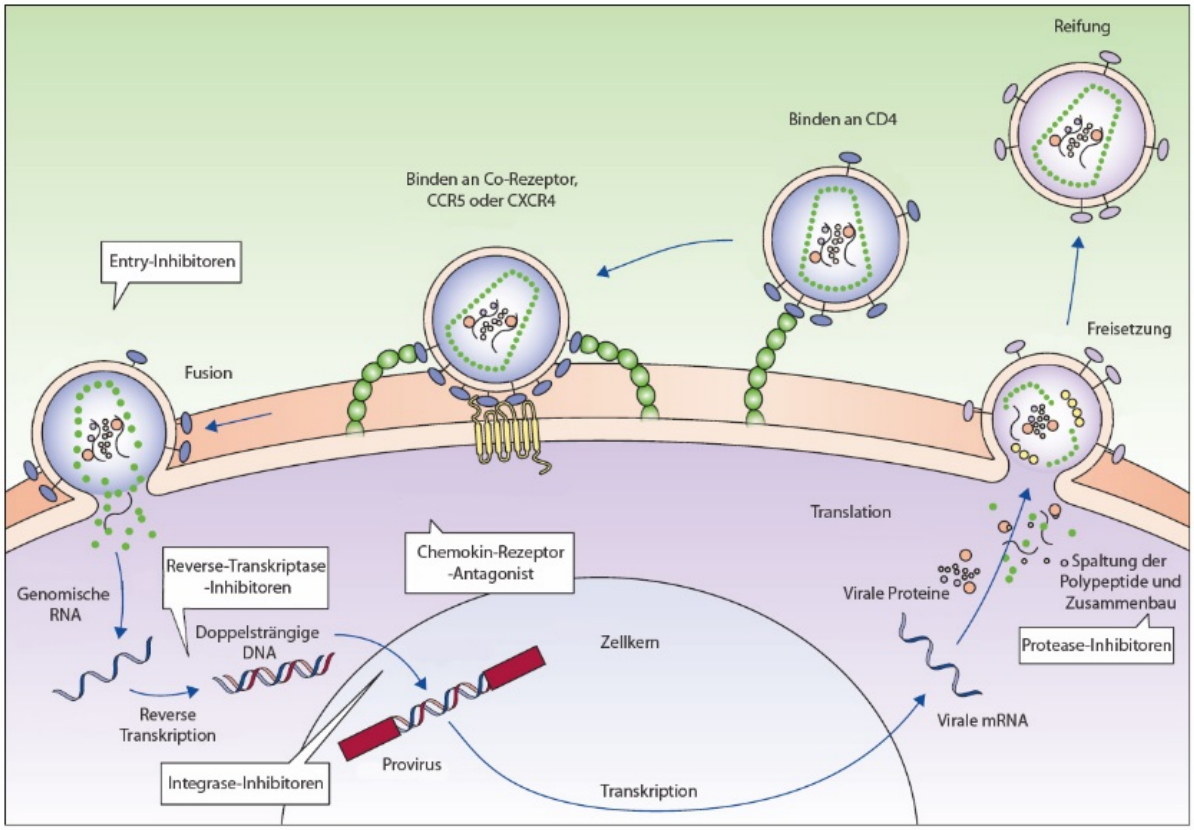

Abbildung 4: Replikationszyklus von HIV-1

Nach Binden von gp120 an CD4 und CXCR4 oder CCR5, erfolgt die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Der Inhalt des Viruskapsids wird in das Zytoplasma der Zelle eingebracht, wo die Reverse Transkription der RNA zu DNA stattfindet. Die DNA wird anschließend in den Zellkern transportiert und dort von der Integrase in das Wirtszellgenom integriert. Hier wird das Provirus durch zelleigene Polymerasen transkribiert. Es folgt die Translation viraler Proteine im Zytoplasma, welche sich an der Zellmembran mit je zwei Kopien viraler RNA zu neuen Viruspartikeln zusammenlagern. Nach der Abschnürung reifen die Virionen zu infektiösen Viruspartikeln, welche erneut Zellen infizieren können. Jeder Abschnitt des Replikationszyklus bietet Angriffspunkte für antivirale Therapeutika, die in weißen Kästchen markiert sind. Verändert nach [38]

Es wird vermutet, dass eine aktive Infektion oder eine Reaktivierung des Virus mit dem Aktivierungszustand der infizierten Zellen und damit verbundenen intrazellulären Prozessen korrelieren. Die Aktivierung einer $CD4^+$ T-Zelle führt unter anderem zu einer gesteigerten Expression von NF-κB oder NFAT, welche als Transkriptionsfaktoren die Transkription des HI-Provirus initiieren [2]. Als erste virale Transkripte werden vermehrt Tat und Rev gebildet. Tat fördert die Transkription des Provirus und stabilisiert entstehende RNA-Transkripte für eine effizientere Translation, während Rev den Transport der Transkripte in das Zytosol unterstützt. An der Zytoplasmamembran erfolgt die Zusammenlagerung aller benötigten Virionkomponenten und die Formung unreifer Viruspartikel, die anschließend von der Zellmembran umhüllt und abgeschnürt werden. Dies ereignet sich schätzungsweise 2,6 Tage nach der ursprünglichen Infektion der Zelle [192].

Während der nachfolgenden Reifung erfolgt die proteasomale Spaltung der gepackten viralen Polyproteine in ihre funktionellen Einheiten innerhalb der Virionen. Es entstehen neue infektiöse Partikel, welche wiederum neue Zellen infizieren können.

1.1.1.1 Therapeutische Behandlungsmöglichkeiten einer HIV-1 Infektion

Heutzutage sind in Deutschland ungefähr 30 Präparate, welche an verschiedenen Punkten in den HIV Replikationszyklus eingreifen (Abb. 4) und die weitere Vermehrung des Virus inhibieren, zur Behandlung einer HIV-1 Infektion zugelassen [4]. Die größte Klasse antiretroviraler Medikamente umfasst die nukleosidischen und nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase Hemmer, welche entweder als Nukleotid-Analogon bei der Reversen Transkription eingebaut werden und zum Kettenabbruch führen oder die Reverse Transkriptase direkt binden und inhibieren können. Andere Präparate blockieren gezielt die Aktivität der viralen Protease (Protease-Inhibitoren) oder Integrase (Integrase-Inhibitoren) oder verhindern die Fusion des Virus mit der Zytoplasmamembran und somit die Aufnahme des Virus in die Zielzelle (*Entry*-Inhibitoren). Fast alle Präparate sind klassenunabhängig ungeeignet für die Monotherapie, da sie die Replikation von HIV-1 nur unvollständig inhibieren und die Entstehung von resistenten Mutanten fördern. Sehr häufig werden daher bei der sogenannten hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART) zwei verschiedene nukleosidische Reverse-Transkriptase-Inhibitoren mit einem nicht-nukleosidischen Reverse Transkriptase-Inhibitor, einem Protease-Inhibitor oder einem Integraseinhibitor kombiniert verabreicht [150]. Kontinuierliche HAART dient nicht nur dem Erhalt der Gesundheit infizierter Individuen, sondern stellt auch eine Möglichkeit dar, die Übertragung von HIV-1 zu vermindern [46]. Dies wurde bereits unter anderem in der HIV Präventions-Netzwerk-Studie HPTN 052 dargelegt, in welcher die Infektionsraten serodiskordanter Paare untersucht wurden, welche entweder sofort oder mit anfänglicher Verzögerung kontinuierlich antiretroviral behandelt wurden. Aus der Studie ging hervor, dass die HIV-Übertragung in HAART-behandelten Patienten fast komplett verhindert werden konnte. Studienteilnehmer, welche unmittelbar nach Feststellung der Infektion mit antiretroviralen Medikamenten behandelt wurden, hatten eine 93 % niedrigere Chance, ihre Partner zu infizieren, als jene, welche erst nach Abfall der $CD4^+$ T-Zellzahl behandelt wurden [47]. In weiteren Studien konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen einem deutlich verminderten Übertragungsrisiko bei reduzierter Viruslast in den Patienten gezeigt werden [205], welches unter 400 HIV RNA Kopien/ml gleich null war [12].

Um die replikationshemmende Wirkung der HAART effektiv zur Eliminierung der HIV Epidemie nutzen zu können, müssten laut UNAIDS bis 2020 mindestens 90 % aller HIV-Infizierten ihren Status kennen, davon müssten mindestens 90 % regelmäßig und

kontinuierlich mit HAART behandelt werden, von denen wiederum in mindestens 90 % das Virus bis unter die Nachweis- bzw. Übertragungsgrenze supprimiert werden müsste [270]. Dieses Ziel ist bislang noch entfernt. So wussten in 2016 ca. 30 % aller HIV-Infizierten weltweit nicht um ihren Infektionsstatus. Des Weiteren erschweren Einschränkungen in der Zugänglichkeit, beispielsweise durch hohe Kosten, mangelnde Infrastruktur, mangelnde Verfügbarkeit, oder aber soziale Hürden eine kontinuierliche Einhaltung der HAART [81, 183, 227]. Verfügbare HAART Kombinationspräparate müssen täglich eingenommen werden und sind zum Teil immer noch mit kardiovaskulären, gastrointestinalen, psychologischen oder auch metabolistischen Nebenwirkungen mit zum Teil kosmetischen Implikationen verbunden. Jeder Patient reagiert abhängig von Alter, Geschlecht, HLA-Typ und weiteren genetischen Merkmalen unterschiedlich auf die Medikation, was eine regelmäßige Beobachtung der Patienten zur Feststellung der Effektivität der Therapie und dem Auftreten schwerwiegender Nebenwirkungen mit eventueller Anpassung der Therapie erfordert. Daraus resultiert in zahlreichen Fällen mitunter absichtliche oder unabsichtliche Non-Compliance zu der Therapie.
Trotz Hemmung der viralen Replikation bis unter die Nachweisgrenze, ist die Behandlung mit HAART zudem weiterhin nicht in der Lage, die HIV Infektion vollständig zu beseitigen, da das Virus schon zu Beginn der Infektion Reservoirs latent infizierter, ruhender $CD4^+$-Gedächtnis-T-Zellen etabliert, welche weder vom Immunsystem, noch durch HAART erreicht und eliminiert werden können [44, 77]. Die Entwicklung eines Impfstoffes wäre eine Option, der Entstehung viraler Reservoirs entgegenzuwirken und die Verbreitung der HIV-Epidemie aufzuhalten. Aus einer Modellanalyse ging hervor, dass ein mindestens 70 % effizienter Impfstoff die jährlichen Neuinfektionen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen um 65 % in den nächsten 25 Jahren senken könnte [100].

1.1.1.2 Impfstoffkandidaten in klinischen Studien für HIV

In klinischen Studien wurden bereits mehr als 100 Kandidaten für einen HIV-1-Impfstoff untersucht, von denen lediglich 5 Phase IIb/III erreichten [235]. Die ersten Phase III Studien untersuchten die Schutzwirkung breit neutralisierender Antikörper gegen HIV-1 gp120 (Env). Die VAX004-Studie verwendete hierfür AIDSVAX® B/B, bestehend aus bivalentem rekombinantem Klade B gp120 mit Alum als Adjuvans [79].

In der VAX003-Studie wurde die Effektivität von AIDSVAX® B/E mit gp120 aus Klade B und E mit Alum analysiert [198]. In beiden Studien konnte der jeweilige Impfstoffkandidat nicht-neutralisierende Antikörper induzieren, aber nicht effektiv vor einer HIV Infektion schützen. In der darauffolgenden STEP-Studie (HVTN 502) lag der Fokus auf der Induktion spezifischer $CD4^+$- und $CD8^+$ T-Zellantworten, ohne eine simultane Induktion neutralisierender Antikörper gegen Env [32]. Das Ziel war die Senkung der Viruslast in

geimpften Teilnehmern. Verwendet wurde hierfür ein trivalenter, replikations-inkompetenter Adenovirus Typ 5 Vektor (Ad5), welcher HIV-1 Klade B *gag*, *pol* und *nef* kodierte. Die Studie wurde an Ad5-seronegativen und Ad5-seropositiven Teilnehmern durchgeführt. Aufgrund einer erhöhten Infektionsinzidenz, sowie keiner signifikanten Minderung der Viruslast in der Gruppe der Geimpften im Vergleich zu den Placeboempfängern wurde die Studie vorzeitig beendet [67]. Die fast zeitgleich eingeleitete Phambili-Studie, die der Überprüfung von Kreuz-Effektivität des Ad5-Vektors gegen Infektion mit Viren der Klade C in ausschließlich seropositiven Teilnehmern dienen sollte, wurde zusammen mit der STEP-Studie vorzeitig mangels Effektivität abgebrochen. In der HVTN 505-Studie wurde die Effektivität eines Impfregimes aus HIV-1 Gag-, Pol-, Nef- und Env-exprimierenden DNA-Plasmiden als *Prime*, in Kombination mit vier Ad5-basierten Vektoren als *Boost*, welche Env-Proteine verschiedener Kladen, sowie ein Gag-Pol-Fusionsprotein der Klade B kodierten, untersucht. Diese Studie wurde ebenfalls aufgrund von Ineffektivität vorzeitig beendet [99].

Die bislang einzige Phase-III-Studie an Menschen, in welcher eine statistisch signifikante Effektivität von 31,2 % drei Jahre nach Verabreichung der letzten Impfdosis belegt werden konnte, war die RV144-Studie in Thailand [208]. Hier wurde als Prime der Kanarienpocken-Vektor ALVAC vCP1521, welcher Gag und Pro der Klade B, sowie gp120 der CRF_01(A/E) gebunden an die transmembrane Domäne von gp41 exprimierte, zusammen mit der VAX003 *Subunit*-Vakzine als *Boost* kombiniert. Beide Komponenten hatten in vorherigen Studien als Alleinimpfstoffe nur mittelmäßige Antikörper- und T-Zellantworten erzielt, weshalb die Durchführung der Studie im Vorfeld stark diskutiert wurde. Tatsächlich aber konnten in der RV144-Studie in den Geimpften nicht-neutralisierende Antikörper gegen die variablen Schleifen V1 und V2 von gp120/Env nachgewiesen und mit dem moderaten Schutz vor einer HIV-Infektion in Zusammenhang gebracht werden. T-Zellantworten konnten hingegen nur in 19,7 % der Geimpften belegt werden. Als zugrundeliegender Mechanismus wird vermutet, dass V2-spezifische Antikörper, an der Oberfläche primär-infizierter $CD4^+$ T-Zellen gebunden, die Eliminierung dieser infizierten Zellen vermitteln [28, 144].

1.1.1.3 Herausforderungen der HIV-Impfstoffentwicklung

Nach mehr als 35 Jahren intensiver Forschung existiert bis zum heutigen Tag noch kein effektiver Impfstoff, der wirksamen und langanhaltenden Schutz vor einer HIV-Infektion vermittelt. Durch den Mangel von Patienten, deren Immunsystem eine HIV-Infektion auf natürlichem Weg beseitigen konnte, sind die genauen Korrelate des Schutzes vor einer HIV-Infektion weiterhin unvollständig geklärt [134, 188]. Zudem wird die Entwicklung eines effektiven Vakzins durch Eigenschaften des Virus erschwert. Eine Schlüsselkompetenz

der meisten erfolgreich eingesetzten Impfstoffe ist die Induktion neutralisierender Antikörper [171]. Zielstrukturen für breit-neutralisierende Antikörper bei HIV-1 beherbergen beispielsweise die auf der Virusoberfläche befindlichen trimeren Env-Glykoproteinkomplexe. Das Virus besitzt von diesen Strukturen 8-14, welche sich auf seiner gesamten Oberfläche verteilen. Die weiten Abstände zwischen den Env-Glykoproteinkomplexen sind unvorteilhaft für die Aktivierung von B-Zellen, welche effektiver mit repetitiven, starren Strukturen reagieren [15]. Zudem sind die Oberflächenproteine hochgradig glykosyliert und damit vor dem Zugriff neutralisierender Antikörper abgeschirmt [136, 283]. Andere konservierte Bereiche und potenzielle Ziele neutralisierender Antikörper sind die CD4-Bindestelle, die *membrane proximal external region* oder die Chemokin-Co-Rezeptor-Bindestelle des Virus. Diese sind aufgrund ihrer Lokalisation schwer zugänglich, oder entstehen, wie im Fall der Chemokin-Co-Rezeptor-Bindestelle, erst durch beträchtliche Konformationsänderungen des Env-Proteins nach der Bindung an CD4 [37, 294]. Der Eintritt des Virus geschieht nach der sexuellen Übertragung hauptsächlich über die Schleimhäute des Patienten, wo bevorzugt Makrophagen und $CD4^+$ T-Zellen infiziert werden. Von hier verbreitet sich das Virus über die lymphatischen Gewebe im gesamten Organismus [96]. Bereits sehr früh während der HIV-Infektion etabliert das Virus persistierende Reservoirs latent infizierter ruhender $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen oder regulatorischer T-Zellen [34, 121, 266], in welchen das Virus aufgrund seiner transkriptionellen Inaktivität nicht vom Immunsystem bzw. der antiretroviralen Therapie erreicht werden kann [236]. HIV infiziert zudem follikuläre T-Helferzellen, die innerhalb von B-Zell-Follikeln lokalisiert sind und somit dem Zugriff zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen entgehen [246]. Virale Reservoirs konnten bereits unter anderem im Gehirn, in Fettgewebe, in der Milz oder auch in der Lunge nachgewiesen werden [181]. Die hohe Mutations- und Rekombinationsrate des Virus bedingt eine hohe Variabilität der HI-Viren. Die Einteilung von HIV-1 in vier Kladen basiert auf genetischen Sequenzunterschieden, die, unter anderem, in einer hohen Diversität der immunogenen Zielstrukturen des Env-Glykoproteins resultieren. Diese Unterschiede erreichen innerhalb einer Klade der HIV-1 Gruppe M beispielsweise bis zu 20 % und mehr als 35 % zwischen den Kladen [91].

Bei simultaner Infektion eines Patienten mit mehreren HIV-Typen können durch Rekombinationsereignisse während der Replikation neue Virusvarianten oder sogenannte *circulating recombinant forms* (CRFs) entstehen, welche über die Mutation immunologisch relevanter Strukturen des Virus der etablierten Immunantwort des Patienten entkommen können [211]. Daher ist ein Kriterium für einen effektiven, langanhaltenden Impfstoff die Induktion breiter humoraler und zellulärer Antworten gegen möglichst viele HIV-Typen gleichzeitig.

Um einen effektiven Schutz vor einer HIV-Infektion zu gewährleisten, so wird vermutet, werden sowohl HIV-spezifische bindende und neutralisierende Antikörper, sowie die Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort, vor allem in mucosalen Geweben, benötigt [276]. Zu den effektivsten Impfstoffen, die solche breiten, langlebigen Immunantworten induzieren, zählen die lebend-attenuierten Formen pathogener Viren und Bakterien. Die Verwendung eines lebend-attenuierten HIV-Impfstoffes ist aufgrund seiner Integration in das Wirtszellgenom, der hohen und rapiden Mutationsrate des Virus, des Fehlens einer Heilungsmöglichkeit, sowie der fatalen Folgen der ausgelösten Erkrankung durch die Langzeit-Depletion von $CD4^+$ T-Zellen stark umstritten. Die Pathogenität von *nef*-deletierten, lebend-attenuierten SIVmac239Δ3 wurde beispielsweise im Makaken-Modell beschrieben. So entwickelten ausgewachsene Makaken nach einer Infektion mit SIVmac239Δ3 über den Zeitraum von drei Jahren keine Immundefizienzen und waren vor einer nachfolgenden Infektion mit pathogenem SIV geschützt. Neugeborene Makaken hingegen entwickelten nach Infektion mit SIVmac239Δ3 AIDS-verwandte Symptome [13]. In einer nachfolgenden Studie resultierte zudem die Infektion adulter Makaken mit SIVmac239Δ3 nach fünf Jahren in einer chronischen Infektion einiger Tiere, sowie im Tod eines Makaken durch AIDS [14]. In Australien wurde außerdem die Infektion mehrerer humaner Individuen über ein verunreinigtes Blutprodukt beschrieben, das ein durch eine *nef*-Deletion natürlich attenuiertes HIV-1 enthielt. Obwohl die Patienten über einen langen Zeitraum von 14-18 Jahren ohne HAART symptomfrei blieben, resultierte die Infektion letztlich in der Reduktion der $CD4^+$ T-Lymphozytenzahl in einigen der untersuchten Individuen und machte eine Therapie erforderlich [140].

1.1.1.4 Tiermodelle für HIV

Zur Untersuchung der Pathogenese, zur Entwicklung von Therapeutika, sowie zur Testung von Impfstoffkandidaten werden unterschiedliche HIV-Tiermodelle genutzt. Nicht-humane Primaten (NHPs), wie beispielsweise Makaken, können nicht direkt mit HIV-1 infiziert werden. Die Infektion von Makaken mit dem HIV-verwandten SIV besitzt einen sehr ähnlichen Krankheitsverlauf und wurde daher sehr früh als das beste verfügbare Modell für die Infektion von Menschen mit HIV-1 angesehen [90]. Während afrikanische Makaken, wie Rußmangaben (*Cercocebus atys*), als natürliche Wirte von SIV keine Krankheitssymptome entwickeln [239], führt die Infektion asiatischer Affenspezies, beispielsweise von Rhesusmakaken (*Macaca mulatta*), zu ausgeprägten Immunpathologien und AIDS [240]. Zwischen der SIV-Infektion nicht-humaner Primaten und der HIV-1-Infektion des Menschen gibt es einige Überschneidungen [247]: die Übertragung über die Schleimhäute, die bevorzugte Infektion von $CD4^+$ T-Zellen und Makrophagen, die Integration beider Viren in das Wirtszellgenom mit ähnlicher Präferenz

der Integrationsstelle [54], die Verteilung der infizierten Zellen im Blut, den Lymphknoten und an den Schleimhäuten [153], Veränderungen in der Immunaktivierung, hohe Mutationsraten der Viren zur Ausbildung von Resistenzen gegen die Langzeit-Eliminierung durch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen [94], sowie das Auftreten von Lymphomen und opportunistischen Infektionen in späteren Stadien der Erkrankung [249]. Für eine Annäherung des SIV-Modells an die HIV-1-Infektion wurden SIV/HIV Chimären (SHIV) generiert, welche einzelne oder eine Kombination unterschiedlicher HIV-Gene, häufig Env-Varianten, in einem SIV-Hintergrund exprimieren [242]. Die Herstellung durch Amplifikation in Zellkultur mit anschließender wiederholter, serieller Passage in Rhesusaffen resultierte jedoch in einer verminderten Replikationskompetenz und reduzierter genetischer Varianz der Chimären. Hierdurch erzielten diese bei Vakzinationsstudien gegen SHIVs in Makaken sehr gute, aber nicht aussagekräftige Ergebnisse bei der Induktion von Schutz und der Viruskontrolle [237]. Die Impfung mit einem Gag-kodierenden Ad5-Vektor schützte beispielsweise indische Rhesusaffen vor der Infektion mit SHIV89.6P. Wurden die immunisierten Rhesusaffen allerdings mit SIVmac239 infiziert, konnte kein Langzeitschutz vor einer Infektion nachgewiesen werden [159]. Die Verwendung nicht-humaner Primaten bei Studien zur Vakzinentwicklung hat einige Vorteile. Es können verschiedene Übertragungsrouten und -dosen analysiert und der Infektionsverlauf sowie korrelierende Immunmechanismen längerfristig von der Virusaufnahme bis hin zum Tod durch einsetzende Immundefizienz beobachtet werden. Die Wahl der Primatenspezies und des zur Infektion verwendeten Virustyps kann jedoch Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. So wurden für bestimmte SIV-Stämme (SIVmac239, SIVmac251) niedrigere Viruslasten im Plasma [147], Unterschiede in den T-Zellantworten [155] und verzögerte Ausprägung zu AIDS [267] beschrieben. Nachteile nicht humaner Primatenmodelle sind die eingeschränkte Verfügbarkeit gesunder, nicht-infizierter Tiere, die genetische Varianz der Tiere, ethische Restriktionen und ein erhöhter Haltungs- und Kostenaufwand, welche zusammengenommen die Versuchsgruppengröße und somit den Datengewinn limitieren.

Ein anderer Modellorganismus, welcher häufig in der Impfstoffentwicklung gegen unterschiedliche Pathogene eingesetzt wird, ist die Farbmaus (*Mus musculus forma domestica*). Generelle Vorteile von Mausmodellen sind das Vorhandensein von Inzucht-Tieren mit demselben genetischen Hintergrund, platzgünstige Haltung und die Generierung aussagekräftiger Datenmengen in kurzer Zeit. Gewöhnliche Mäuse sind aufgrund fehlender Eintrittsrezeptoren auf der Zellmembran, sowie Restriktionsfaktoren im Zytoplasma und im Zellkern gegenüber einer HIV-Infektion permissiv [25]. Daher ist es erforderlich, die Tiere soweit zu verändern, dass sie zum einen mit HIV-1 infiziert werden

können und zum anderen in der Lage sind, möglichst die humane Immunantwort zu replizieren. Zwei in der HIV-Forschung prominente Modelle sogenannter humanisierter Mäuse mit humanen Immunsystemkomponenten sind hu-HSC (humane hämatopoetische Stammzellen) -Mäuse und BLT (*bone marrow, liver, thymus* = Knochenmark, Leber, Thymus) -Mäuse. Es handelt sich um immundefiziente Mausstämme, die aufgrund einer Zerstörung des Gens der IL-2 Rezeptor Gamma Kette (IL2-Rcγ) keine eigenen Zytokin- und Natürliche-Killer (NK)-Zellantworten ausbilden und denen das eigene murine Immunsystem inklusive reifer muriner T-Zellen und B-Zellen fehlt [139]. Durch Bestrahlung werden in neugeborenen Tieren eigene Stammzellen zerstört und mit humanen hämatopoetischen $CD34^+$ Stammzellen aus fötalem Lebergewebe oder aus Nabelschnurblut ersetzt, welche über einen Zeitraum von mehr als sechs Monaten Immunzellen generieren und so die Etablierung einer chronischen HIV-Infektion ermöglichen. Bei den BLT-Mäusen wird zusätzlich humanes fötales Thymus- und Lebergewebe transplantiert, was die *in vivo* Generierung multipotenter humaner T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und dendritischer Zellen in den Tieren verbessert [119]. Hu-HSC-Mäuse und BLT-Mäuse wurden bisher beispielsweise zur Untersuchung Typ-I-Interferon-regulierter Immunantworten, der Wirkung antiretroviraler Medikamente, oder des passiven Transfers neutralisierender Antikörper in der HIV-Therapie eingesetzt [157]. Die Nachteile humanisierter Mäuse sind z.B. die aufwendige Generierung der erwünschten Humanisierung, oder das Auftreten von Graft-versus-Host Reaktion ca. sechs Monate nach Transplantation, welches vor allem Langzeitstudien beeinträchtigen kann. Der Hauptnachteil ist allerdings die eingeschränkte Fähigkeit zur Produktion hoher Konzentrationen spezifischer Immunglobulin G (IgG) Antikörper nach einer Impfung oder nach der Infektion mit HIV-1 [158], was die Nutzbarkeit des Modells vor allem für Vakzinationsstudien einschränkt.

Heutzutage gibt es eine Vielzahl von Tiermodellen, welche zur Erforschung neuer Impfstoffkandidaten gegen HIV-1 eingesetzt werden. Eine direkte Übertragung der in Tiermodellen erlangten Ergebnisse auf den Menschen ist aufgrund von physiologischen Unterschieden zwischen Mensch und Modell nicht vollständig möglich und birgt in jedem Fall ein variierendes Restrisiko. Jedoch können die in Tiermodellen gewonnenen Kenntnisse dazu genutzt werden, die immunologischen Abläufe während einer HIV-1-Infektion im Menschen bestmöglich zu antizipieren und letztlich zu dechiffrieren. Ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung einer natürlich vorkommenden, komplexen retroviralen Infektion und der damit verbundenen immunologischen Mechanismen stellt das murine Friend Virus (FV)-Modell dar, welches zudem die praktischen Vorzüge eines

Mausmodells, wie die Untersuchung kongener Tiere, geringe Kosten und einfache Handhabung einbindet.

1.1.2 Friend Virus

1957 untersuchte Charlotte Friend eine Erkrankung bei Mäusen, welche sich durch starke Milzvergrößerung sowie die Ausbildung von Erythroleukämie mit tödlichen Folgen auszeichnete und über die Injektion zellfreier Filtrate aus den Milzen infizierter Tiere auf gesunde Mäuse transferiert werden konnte [83]. Als Verursacher der Erkrankung konnte das zu den γ-Retroviren gehörende Friend Virus identifiziert werden, bei dem es sich um einen immunsuppressiven retroviralen Komplex aus dem replikationskompetenten, apathogenen Helfer-Virus Friend murines Leukämie Virus (F-MuLV) und dem replikationsdefizienten, pathogenen *spleen focus forming virus* (SFFV) handelt [126]. Bisher werden zwei natürlich vorkommende SFFV Stämme nach dem von ihnen ausgelösten Krankheitsbildern unterschieden. Mit $SFFV_A$ infizierte Tiere entwickeln eine starke Anämie, während die Infektion mit $SFFV_P$ in einer abnormen Vermehrung roter Blutzellen, oder Polyzythämie, und Hyperplasie der Milz resultiert [253].

Sowohl F-MuLV als auch SFFV sind Retroviren mit einfachem Genomaufbau (Abb. 5). Eine Besonderheit des SFFV Genoms ist der hohen Grad an Deletionen, durch welchen unter anderem ein einzigartiges *env*-Gen (gp55) entsteht. Im Gegensatz zu herkömmlichen MuLV Env-Proteinen funktioniert das SFFV Env nicht als Strukturprotein

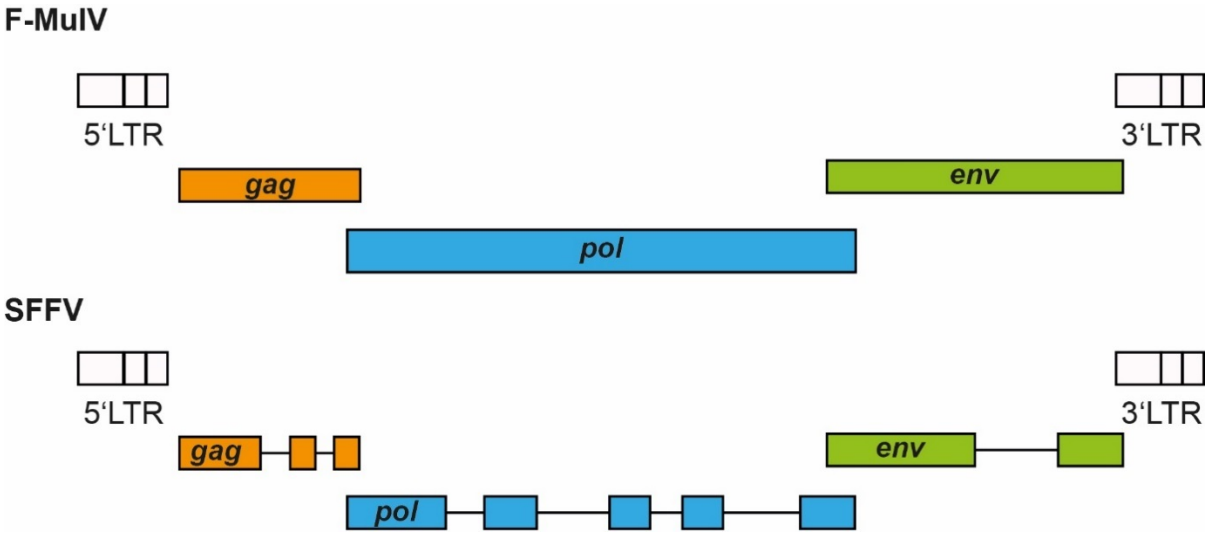

Abbildung 5: Schema der proviralen Genome des F-MuLV und des SFFV

Der FV-Komplex besteht aus den beiden einfachen Retroviren F-MuLV und SFFV. Beide Genome bestehen lediglich aus den Hauptgenen *gag*, *pol* und *env*. Aufgrund des hohen Grades an Deletionen in seinem Genom ist das SFFV bei der Replikation auf das F-MuLV angewiesen.

und ist nicht in der Lage, virale Partikel zu formen [45]. Es bedingt die Pathogenität des Virus. Durch Interaktion mit dem SFFV gp55 werden der Erythropoietin-Rezeptor EpoR, sowie eine verkürzte Form der Stammzell-abgeleiteten Rezeptor-Tyrosin-Kinase Stk (sf-Stk) auf bzw. in erythroiden kernhaltigen Zellen dauerhaft aktiviert [146]. Hieraus resultiert die massive Proliferation und Ausdifferenzierung infizierter erythroider Vorläuferzellen und die krankhafte Vergrößerung der Milz. Des Weiteren kann SFFV erythroide Zellen durch die zufällige Integration des Virus an zwei spezifischen Stellen im Genom transformieren. Erfolgt die Integration des SFFV am Spi1 Locus [173], ist eine gesteigerte Expression des Transkriptionsfaktors PU.1 die Folge. Wird zusätzlich das Tumor-Suppressor-Gen p53 durch Integration oder Mutation inaktiviert, kommt es über den Abbruch der Ausdifferenzierung sowie die gesteigerte Proliferation infizierter Zellen zur Ausbildung maligner Erythroleukämie [178].

Der Verlauf der FV-Infektion (Abb. 6) und Pathogenese variiert stark in Abhängigkeit von dem genetischen Hintergrund des infizierten Mausstammes. Ein Resistenz-vermittelnder Faktor ist hierbei der *major histocompatibility complex* (MHC)-Typ, über welchen virale Antigene spezifischen zytotoxischen T-Zellen präsentiert, sowie die Kinetik der virusspezifischen $CD4^+$ T-Zellantwort gelenkt werden [180]. Mausstämme mit homozygotem MHC-Haplotyp $H\text{-}2^{b/b}$ erholen sich innerhalb weniger Wochen von einer FV-Infektion, während heterozygote $H\text{-}2^{b/d}$-Mäuse oder Mäuse des MHC-Typs $H\text{-}2^{d/d}$ deutlich schlechtere Genesungsraten aufweisen [41]. Es konnten weitere Gene identifiziert werden, von deren Ausprägung die Resistenz gegenüber der FV-induzierten Erkrankung abhängt [168]. Das Genprodukt des RfV-3, mAPOBEC3, unterstützt die Produktion Virus-spezifischer neutralisierender Antikörper [225, 226] während Mutationen in einem internen Promotor des Fv2 Gens die Expression der verkürzten sf-Stk verhindern, welche über Interaktion mit dem SFFV gp55 konstitutiv aktiviert das Fortschreiten der Friend-Erkrankung bewirkt [193]. C57BL/6-Mäuse ($H2^{b/b}$, $Fv2^{r/r}$, $Rfv3^{r/r}$) stellen einen FV-resistenten Mausstamm dar. Auch nach Infektion mit hohen Dosen des FV ist bei ihnen keine pathogene Vergrößerung der Milzen oder Erythroleukämie festzustellen. Allerdings sind resistente C57BL/6-Mäuse nicht in der Lage, das FV vollständig zu eliminieren. Bereits nach 7-14 Tage werden durch die FV-Infektion regulatorische $CD4^+$ T-Zellen (T_{regs}) induziert, welche durch die Hemmung Virus-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen die komplette Eliminierung des Virus unterbinden und somit die Etablierung einer persistierenden Infektion ermöglichen [40].

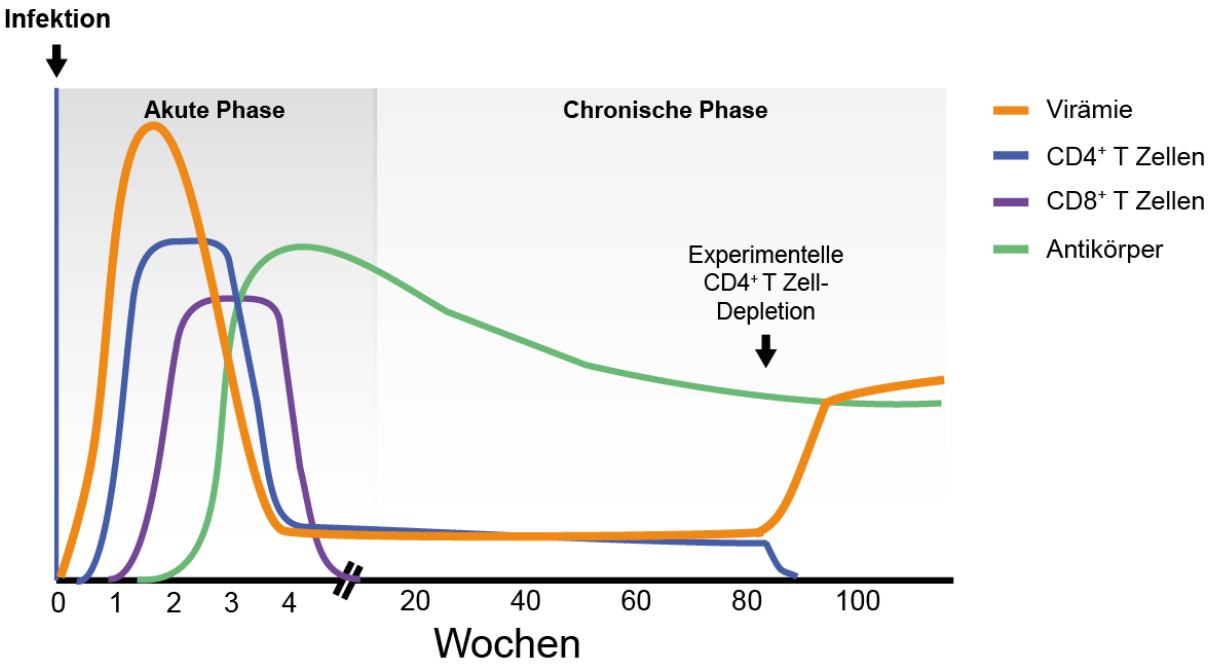

Abbildung 6: Verlauf einer FV-Infektion

FV-resistente Mäuse initiieren direkt nach der Infektion eine potente Immunantwort bestehend aus $CD4^+$ T- und $CD8^+$ T-Zellen, die die FV-Infektion kontrolliert und die Ausbildung von Splenomegalie verhindert. Antikörper tragen ebenfalls zum Immunschutz bei, treten allerdings erst 2 Wochen nach Infektion auf. Nach ca. 10 Tagen werden durch die FV-Infektion regulatorische $CD4^+$ T-Zellen induziert, welche die Aktivität zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen supprimieren. Hierdurch und durch die Bildung viraler Reservoirs kommt es zur Entstehung einer chronischen Infektion mit niedrigen, jedoch persistierenden Virusleveln. Werden chronisch infizierte Mäuse ihrer $CD4^+$ T-Zellen depletiert, führt dies zum Ausbruch der FV-induzierten Erkrankung mit einem Wiederansteigen der Virämie und Auftreten von Splenomegalie. Abbildung nach [120].

Zusätzlich bildet FV früh während der Infektion vor allem in B-Zellen, aber auch in Monozyten und Granulozyten virale Reservoirs aus, welche an der Aufrechterhaltung der Viruslast fortlaufend beteiligt sind [107]. Die höchst suszeptiblen BALB/c-Mäuse ($H2^{d/d}$, $Fv2^{s/s}$, $Rfv3^{s/s}$) hingegen entwickeln bereits nach wenigen Wochen tödlich verlaufende Splenomegalie und Erythroleukämie, da sie nach Infektion mit bereits niedrigen Dosen FV keine ausreichende B-Zell- oder T-Zellantwort ausbilden können. Aus der Kreuzung beider Mausstämme gehen die intermediär suszeptiblen CB6F1 ($H2^{b/d}$, $Fv2^{r/s}$, $Rfv3^{r/s}$) hervor. Das Vorhandensein unterschiedlicher kongener Mausstämme mit verschiedenen genetischen Hintergründen und variierender Suszeptibilität gegenüber der FV-induzierten Erkrankung ist nur einer der Vorteile des Modells bei der Untersuchung retroviraler Infektionen. Des Weiteren können in Mäusen durch Depletionsexperimente und adoptive Transfers von Immunzellen einzelne Zellsubpopulationen und deren Aufgabe in einem definierten Hintergrund direkt betrachtet werden.

1.1.2.1 Immunantworten gegen FV

Die Eliminierung einer akuten FV-Infektion in resistenten Mausstämmen beruht auf einem komplexen Zusammenspiel aus virusspezifischen neutralisierenden Antikörpern, $CD4^+$ T-Helferzellen, sowie zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen [106]). Derzeit ist nur ein FV $CD8^+$ T-Zell-Epitop, das immundominante $GagL_{85–93}$, bekannt [38], gegen das bis zu 15 % der aktivierten $CD8^+$ T-Zellen während einer akuten Infektion gerichtet sind [291]. Die Hauptaufgabe der $CD8^+$ T-Zellen ist die Eliminierung infizierter Zellen während der akuten Infektion. Eine Depletion von $CD8^+$ T-Zellen in akut infizierten Mäusen erhöht die Sterberate der Tiere um mehr als 70 % [213]. Das Abtöten FV-infizierter Zellen erfolgt auf zwei voneinander unabhängigen Signalwegen. Während einer akuten Infektion mit hoher Viruslast agieren $CD8^+$ T-Zellen vorrangig durch Freisetzung zytotoxischer Moleküle wie Perforin, Granzym A und Granzym B, sowie IFNγ. Bei der Kontrolle niedriger Viruslasten, z.B. während der chronischen Phase der FV-Infektion, spielt vor allem der Fas/FasL-Signalweg eine Rolle [290]. Ein Charakteristikum der FV-Infektion in resistenten Mäusen ist die Abnahme der $CD8^+$ T-Zell-vermittelten Tötung FV-infizierter Zellen im Lauf der Infektion. Eine Mutation des $GagL_{85-93}$-Epitopes konnte als Ursache ausgeschlossen werden, da Viren aus chronisch infizierten Mäusen weiterhin Wildtyp $GagL_{85-93}$ exprimierten [61]. Die Verringerung der Zytotoxizität der $CD8^+$ T-Zellen konnte auf die Einwirkung regulatorischer T-Zellen (Tregs) zurückgeführt werden [120].

Hierbei handelt es sich um eine Untergruppe $CD4^+$ T-Zellen, welche konstitutiv die α-Kette des IL2-Rezeptors ($CD25^+$) exprimieren und deren suppressive Aktivität von der Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (forkhead box protein 3) abhängig ist [214]. Ihre eigentliche Aufgabe ist das Verhindern von Immunpathologien durch beispielsweise Allergien, Autoimmunität oder eine Hyperaktivierung des zellulären Arms des Immunsystems während einer Erkrankung. Während der FV-Infektion führt die Induktion von Tregs allerdings unter anderem zum Abbruch der Produktion zytotoxischer Granula in $CD8^+$ T-Zellen und ermöglicht somit die Etablierung einer persistierenden Infektion.

Entgegen den Tregs sind weitere $CD4^+$ T-Helferzellen während der akuten und chronischen Phase der FV-Infektion involviert, welche das Immunsystem immunmodulatorisch bei der Beseitigung des Virus unterstützen. Sie fördern die Entwicklung und Aufrechterhaltung zytotoxischer $CD8^+$-Effektor-T-Zellen, sowie die Ausdifferenzierung und Antikörperproduktion von B-Zellen [252]. $CD4^+$ T-Zell-depletierte Mäuse sind nicht in der Lage, die akute Infektion zu kontrollieren und entwickeln in 64 % der Fälle Splenomegalie [213]. Der Transfer von FV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen oder neutralisierenden Antikörpern verliert in $CD4^+$ T-Zell-depletierten Mäusen seine protektive Wirkung und die Depletion von $CD4^+$ T-Helferzellen in chronisch infizierten Tieren

resultiert im Wiederansteigen der viralen Replikation und dem Ausbruch der FV-Erkrankung [213]. Bislang wurden zehn FV-spezifische, H-2^b-präsentierte $CD4^+$ T-Zell-Epitope beschrieben, davon werden drei in *gag*, eins in *pol* und sechs in *env* kodiert [164]. Neben der Unterstützung von $CD8^+$ T-Zellen und B-Zellen verfügen $CD4^+$ T-Helferzellen auch über eigene antivirale Aktivität und können den Ausfall zytotoxischer $CD8^+$ T-Zellen während der chronischen FV-Infektion kompensieren. Sie hemmen beispielsweise durch die Sekretion von IFNγ die Virusreplikation, oder vermitteln Zell-Kontakt-abhängig bzw. Fas/FasL-abhängig die Lyse infizierter Zellen [152, 154]. Dieser Mechanismus ist vor allem für die Eliminierung infizierter MHC-II^+-Zellen, z.B. B-Zellen, relevant. Aus Transferexperimenten mit FV-neutralisierenden Antikörpern in B-Zell-defizienten Mäusen ging hervor, dass die primäre Aufgabe von B-Zellen während der FV-Infektion die T-Helferzell-abhängige Herstellung spezifischer Antikörper ist [163]. Antikörper können durch Blockade von Bindestellen auf Viruspartikeln oder Virus-infizierten Zellen diese inhibieren, sie für die Zerstörung durch NK-Zellen, Monozyten oder Makrophagen markieren, oder durch die Rekrutierung des Komplementsystems die Lyse infizierter Zellen oder viraler Partikel bewirken. In passiven Immunisierungsexperimenten wurde jedoch gezeigt, dass der Transfer hoher Antikörperkonzentrationen allein die Viruslast infizierter Tiere zwar senken konnte, aber nicht ausreichte, um eine Infektion komplett zu verhindern [60] Die gezielte Ausdifferenzierung spezifischer B-Zellen und die Generierung effektiver Antikörperantworten ist stark $CD4^+$ T-Helferzell-abhängig [252].

1.1.2.2 Das FV-Modell

Das FV-Modell ist eines der best-charakterisiertesten Modelle einer natürlichen, pathogenen Retrovirus-Infektion in adulten, immunkompetenten Mäusen, für das bereits ein breites Spektrum immunologischer Werkzeuge zur Verfügung steht [41, 106, 168]. Derzeit entwickelt unsere Arbeitsgruppe verschiedene, fluoreszenz-markierte FV für die Nachverfolgung und Veranschaulichung von Infektionswegen und involvierten Ziel-Zellpopulationen. Die meisten Retroviren verursachen onkologische oder neurologische Erkrankungen nach der Infektion neugeborener Mäuse, welche sich erst nach mehreren Monaten manifestieren. Das FV hingegen induziert innerhalb weniger Wochen die rapide Entwicklung von Splenomegalie in suszeptiblen adulten Tieren, welche einfach festgestellt und am lebenden Tier überwacht werden kann [168]. Obwohl es sich bei HIV-1 um ein komplexes und bei FV um ein einfaches Retrovirus handelt, existieren einige Parallelen zwischen der Infektion mit HIV-1 und der Infektion mit dem FV. Ähnlich zu HIV-1 besitzt das FV trimerisierte Env-Glykoproteinkomplexe, bestehend aus einer Oberflächeneinheit (gp70) und einer Transmembraneinheit (p15E) auf seiner Partikeloberfläche, welche für die Infektion der Zielzellen relevant sind und immundominante Epitope für neutralisierende

Antikörper beherbergen [33, 80, 164, 295]. Sowohl HIV-1 als auch FV vermehren sich in Organen und Kompartimenten des Immunsystems und bewirken humorale Dysfunktionen wie B-Zellabnormalitäten, Hypergammaglobulinämie oder der verzögerten Entwicklung neutralisierender Antikörper [98]. Beide Viren etablieren während der Infektion Reservoirs, im Fall von HIV hauptsächlich in $CD4^+$ T-Zellen, im Fall von FV hauptsächlich in B-Zellen [76, 107]. Im Lauf der HIV-1-Infektion tritt eine natürliche Depletion infizierter und nicht-infizierter $CD4^+$ T-Zellen auf, welche die Entstehung von AIDS zur Folge hat. In der chronischen FV-Infektion in resistenten Mausstämmen besteht die Möglichkeit durch artifizielle Depletion oder Blockade ausgewählter $CD4^+$ T-Zellpopulationen ein Auftreten der akuten FV-induzierten Erkrankung auszulösen [107]. Schließlich konnte gezeigt werden, dass bei der HIV-1-Infektion im Menschen zwei Cytidin-Deaminasen, APOBEC3F und APOBEC3G, wichtige antivirale Effekte vermitteln und von dem HIV-1-Protein Vif antagonisiert werden [116]. Erst kürzlich konnte ein dominantes murines Resistenzgen gegen FV, *recovery from FV 3* (*rfv3*) [39], welches an der Ausbildung FV-spezifischer neutralisierender Antikörper beteiligt ist, als direktes Äquivalent zu den humanen APOBEC3-Homologen, APOBEC3F und APOBEC3G, zugeordnet werden [225, 226]. Zudem wurde mithilfe des FV Modells zum ersten Mal die Beteiligung regulatorischer $CD4^+$ T-Zellen an infektiösen Erkrankungen gezeigt. Somit eignet sich das FV-Modell sehr gut für die Erforschung und Aufklärung immunologischer Abläufe während einer akuten oder chronischen retroviralen Infektion, sowie zur Entwicklung von prophylaktischen und therapeutischen antiretroviralen Vakzinierungsstrategien.

1.1.2.3 Vakzinierungsstudien im FV-Modell

Im FV-Modell wurde bereits eine Vielzahl von Immunisierungsstrategien gegen das FV untersucht, wie beispielsweise die Immunisierung mit attenuiertem FV oder F-MuLV [58–60], mit inaktiviertem FV [118], mit aggregierten oder aufgereinigten FV Env-Glykoproteinen [117] oder Peptiden [167], mit FV-induzierten Tumorzellen [163], sowie mit DNA-Plasmiden [62] oder rekombinanten viralen Vektoren [68, 105, 166]. Die meisten Ergebnisse dieser Studien lassen sich aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Mausstämme mit unterschiedlicher genetischer Suszeptibilität, sowie teilweise stark variierender FV-Inokulationsdosen nur bedingt miteinander vergleichen.

Der Schutz sowohl höchst suszeptibler Mäuse vor einer akuten FV-Infektion als auch resistenter Mausstämme vor der Ausbildung einer persistierenden Infektion konnte bislang nur durch die Immunisierung mit attenuiertem Virus erreicht werden, welche immer noch als Maßstab für eine erfolgreiche antiretrovirale Schutzimpfung angesehen wird.

Die Ausprägung des Gens *Fv1* beeinflusst die Vermehrung unterschiedlicher FV-Stämme in FV-suszeptiblen Mäusen. N-trope FV-Stämme (FV-N) replizieren in $Fv1^{n/n}$-Mäusen und

B-trope FV-Stämme (FV-B) in *Fv1*$^{b/b}$-Mäusen, während bei Inkompatibilität zwischen Virus- und Mausstamm die Replikation des FV stark beeinträchtigt ist [102, 197]. Die Infektion von *Fv1*$^{b/b}$-Mäusen mit FV-N resultiert daher nicht im Ausbruch der FV-induzierten Erkrankung. Zudem waren *Fv1*$^{b/b}$-Mäuse, welche zuvor mit FV-N infiziert wurden, steril vor einer nachfolgenden Infektion mit FV-B geschützt, sodass auch längerfristig kein persistierendes FV-B in diesen Mäusen nachgewiesen werden konnte [59]. Dasselbe Prinzip konnte ebenfalls bei der Infektion von *Fv1*$^{n/n}$-Mäusen mit FV-B dargelegt werden [97]. Neben der Infektion mit FV-N, resultiert auch die Immunisierung nur mit N-tropem F-MuLV (F-MuLV-N), welches in der Abwesenheit des SFFV zusätzlich attenuiert ist, in sterilen Schutz vor einer FV-Infektion [59]. Nach der Impfung mit FV-N bzw. F-MuLV-N wurden spezifische CD4$^+$- und CD8$^+$ T-Zellen, sowie neutralisierende Antikörper in den geimpften Mäusen nachgewiesen. Daher wurde vermutet, dass für den sterilen Schutz vor einer retroviralen Infektion eine komplexe Immunantwort bestehend aus sowohl zellulären als auch humoralen Komponenten benötigt wird [60]. In Transfer-Experimenten, in denen CD4$^+$-, CD8$^+$-T-Zellen oder CD19$^+$-Zellen aus zuvor mit F-MuLV-N immunisierten Mäusen in naive Mäuse transferiert wurden, konnte steriler Schutz nur nach Co-Transfer aller drei Zellgruppen beobachtet werden, nicht jedoch, wenn eine oder zwei der Gruppen fehlten. Auch der Transfer FV-neutralisierender Antikörper (mAb48) reichte nicht aus, um vor einer FV-Infektion zu schützen [59, 60]. In passiven Immunisierungsexperimenten wurde gezeigt, dass sich der Transfer des FV-neutralisierenden Antikörpers mAb48 positiv auf die Mortalität akut FV-infizierter Mäuse auswirkte und diese von 100 % auf 21 % senkte. Dieser Effekt konnte allerdings nicht in CD4$^+$- oder CD8$^+$ T-Zell-depletierten Mäusen beobachtet werden [104]. Bei Immunisierungsstudien mit einem F-MuLV Env-Fragment-exprimierenden Pockenvektor führte die Depletion von CD4$^+$ T-Zellen zu einer deutlichen Verschlechterung der resultierenden Immunantworten, während die Depletion von CD8$^+$ T-Zellen den Fortschritt der FV-induzierten Erkrankung bis ins Endstadium beschleunigte [105]. Die FV-induzierte Tumorzelllinie FBL-3 trägt eine glykosylierte Form des Gag-Proteins an ihrer Oberfläche, exprimiert Env aber nur intrazellulär [163]. Die Impfung mit FBL-3 Zellen induziert Virus-spezifische CD4$^+$ T-Zell- [120] und CD8$^+$ T-Zellantworten [38], aber keine spezifischen neutralisierenden Antikörper. Geimpfte C57BL/6-Mäuse zeigten keine Virämie im Plasma und eine Reduktion der Viruslast in Milzzellen zwei Wochen nach der Infektion, waren aber nicht in der Lage, das Virus vollständig zu beseitigen. Wurde die Impfung allerdings einen Tag vor oder nach der Infektion mit dem passiven Transfer des FV-neutralisierenden Antikörpers mAb48 kombiniert, waren die Tiere steril geschützt [163]. Somit wurde mehrfach dargelegt, dass zur Induktion von Schutz vor einer FV-Infektion sowohl Virus-spezifische CD4$^+$-, CD8$^+$-T-Zellen und neutralisierende Antikörper benötigt werden.

1.2 Adenoviren

Adenoviren wurden erstmals 1953 aus adenoidem Gewebe von Rowe et al. isoliert [219]. Sie lösen hauptsächlich Erkrankungen der Atemwege, des Gastrointestinaltraktes oder der Bindehaut der Augen aus. Infektionen mit Adenoviren verlaufen häufig asymptomatisch oder äußern sich in milden erkältungsähnlichen Symptomen, begleitet von Erbrechen und Durchfall, welche in immunkompetenten Patienten nach wenigen Wochen von selbst wieder abklingen. In immunsupprimierten Patienten oder Kindern können hingegen persistierende Infektionen mit Durchfällen, Nierenentzündungen bis hin zu schweren Lungenentzündungen ausgelöst werden, die vor allem bei immunsupprimierten Kindern mit einer hohen Mortalität verbunden sind [169, 194]. Adenoviren werden basierend auf ihrem Wirtsspektrum in die vier Genera Aviadenoviren (Vögel), Siadenoviren (Amphibien), Atadenoviren (Reptilien), sowie Mastadenovieren (Säugetiere) eingeteilt. Die humanpathogenen Adenoviren gehören zur Gattung der Mastadenoviren und werden weiter in sieben Gruppen A-G eingeteilt, unter anderem basierend auf ihrer Phylogenie, der Organisation ihres Genoms und dessen GC-Gehalt oder ihrer Fähigkeit zur Hämagglutination [57]. Mittlerweile sind mehr als 70 verschiedene humane Adenovirus-Typen bekannt.

Adenoviren sind unbehüllte Viren, deren ikosaedrische Kapside einen Durchmesser von ca. 80-110 nm haben [243]. Das Viruskapsid besteht hauptsächlich aus Hexon-, Pentonbasis- und Fiberproteinen, mit denen zusätzlich noch weitere, kleinere Proteine, wie beispielsweise pIIIa, pVI, pVIII oder pIX assoziiert sind (Abb. 7). Das Protein IIIa ist im fertigen Kapsid unterhalb der Pentonbasis lokalisiert, während das Protein IX sich auf der Kapsidoberfläche an den Kontaktstellen benachbarter Hexone befindet. Beide Proteine besitzen Kapsid-stabilisierende Funktionen. Die genaue Rolle des pVIII ist noch nicht vollständig geklärt. pVI ist hingegen sowohl beim Eintritt des Virus in die Zelle, als auch am Transport neu-synthetisierter Hexon-Proteine in den Zellkern beteiligt. Die 20 Seitenflächen des Ikosaeders werden von je 12 Hexonproteinen gebildet, welche an den Ecken des Ikosaeders über eine Pentonbasis verbunden sind. Mit dieser Pentonbasis ist jeweils ein homotrimerer Fiberkomplex assoziiert, welcher an seiner Spitze in einem Fiber-Knopf endet [222]. Antigene Komponenten befinden sich hauptsächlich in Hexon und dem Fiber-Knopf und induzieren starke, Adenovirus-spezifische, neutralisierende Antikörperantworten [30].

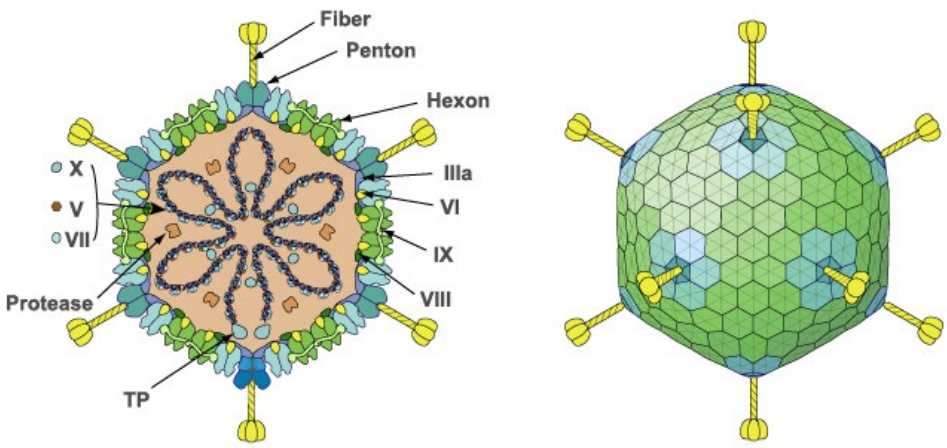

Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Adenoviruspartikels

Der Hauptbestandteil des ikosaedrischen Kapsid sind Hexonproteine, welche die 20 Seitenflächen des Kapsids bilden. An den Kontaktstellen benachbarter Hexone befinden sich die kleinen Proteine IX, welche zur Stabilität des Kapsids beitragen. Die Ecken des Kapsids bilden Pentonbasisproteine, welche die Seitenflächen miteinander verbinden. Innerhalb des Kapsids sind diese mit Proteinen IIIa assoziiert, welche ebenfalls zum Zusammenhalt des Kapsids beitragen. Außen sind die Pentonbasisproteine mit Fiberproteinen assoziiert. Des Weiteren enthält das Kapsid Proteine VI und VIII. [34]

Adenoviren besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom mit einer Länge von ungefähr 36 kb, das von unterschiedlich langen *inverted terminal repeats* eingerahmt wird (Abb. 8). Durch die Wechselwirkung mit terminal gebundenen Proteinen liegt es in einem quasi-zirkulären Zustand vor. Das Genom ist in vier kodierende Bereiche für frühe Gene (*early*: E1-E4), die vor allem in der Anfangsphase der Infektion exprimiert werden, und in fünf kodierende Bereiche der spät-exprimierten Gene (*late*: L1-L5) unterteilt, welche hauptsächlich die viralen Strukturproteine kodieren. Direkt zu Beginn der Infektion werden vor allem Transkriptionsregulatoren aus E1 exprimiert, die nicht nur die Transkription adenoviraler Gene steuern, sondern auch in den Wirtszellzyklus eingreifen und Zellen in der G1/G0 Phase aktivieren. Adenoviren können daher effektiv ruhende Zellen infizieren. In E2-kodierte Proteine, wie die virale DNA-Polymerase, das DNA-bindende Protein (DBP) oder das Vorläuferprotein des terminalen Proteins (TP), erfüllen Aufgaben bei der Transkription der viralen DNA. Die E1- und E2-Genprodukte sind somit maßgeblich an der Initiation der Virusreplikation beteiligt. Im Gegensatz hierzu sind die in E3 kodierten Proteine für den adenoviralen Replikationszyklus nicht essentiell.

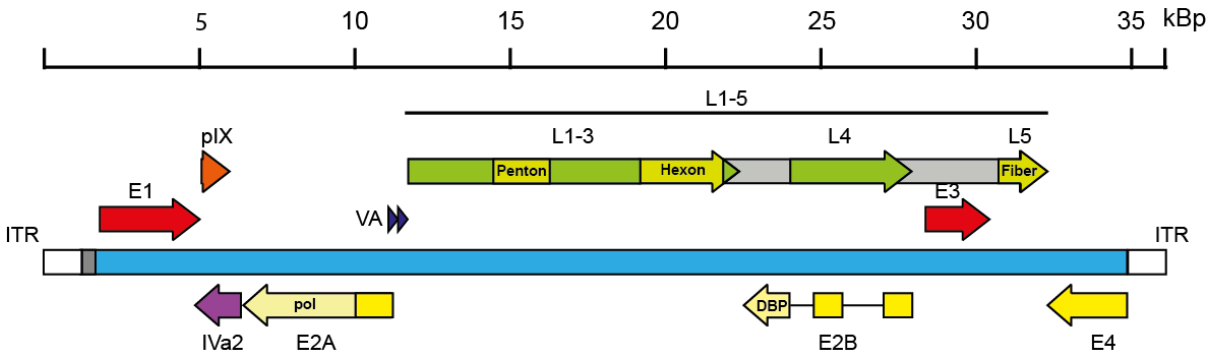

Abbildung 8: Schematische Darstellung des Genoms des humanen Adenovirus 5

Auf das ca. 36 kb lange Genom sind neun Transkriptionseinheiten verteilt, welche diverse regulatorische Proteine, sowie virale Strukturproteine kodieren.

Diese Region des Genoms enthält hauptsächlich akzessorische Proteine, welche z.B. die Konzentration von MHC-I-Proteinen auf der Oberfläche infizierter Zellen reduzieren. Weitere Funktionen von E3-Genprodukten sind die Herabsetzung der Sensibilität infizierter Zellen gegenüber TNFα-vermittelter Zelltoxizität, oder die Vermittlung der Lyse infizierter Zellen und somit der Freisetzung neuer viraler Partikel. Die Produkte der E4-Region vermitteln den Übergang der frühen E1-E3-Genexpression zu den späten L-Genen. Sie stabilisieren neu entstehende Virustranskripte und fördern deren Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma. Des Weiteren beeinflussen sie die Phosphorylierung bestimmter zellulärer und viraler Proteine, die am Spleißen der L-Gen-Transkripte beteiligt sind. Bei der Transkription der L-Region entsteht zunächst ein großes Vorläufertranskript von mehr als 30 kb, aus welchem die mRNA-Moleküle der einzelnen adenoviralen Strukturproteine herausgespleißt werden. Neben den Strukturproteinen kodiert die L-Region zusätzlich Chaperone, welche die Faltung der Kapsid-Proteine unterstützen, sowie die Verpackung der viralen Genome in die neu entstehenden Viruspartikel gewährleisten [222].

Humane Adenoviren können *in vitro* ein großes Spektrum unterschiedlicher Zellen infizieren. Während einer natürlichen Infektion (Abb. 9) dringen sie vor allem in Epithelzellen des respiratorischen und des Verdauungstraktes ein. Hierfür binden Viren der Gruppen A, C, E und F über die Fiber-Knopfstruktur an den Coxsackie- und Adenovirusrezeptor (CAR), während Adenoviren der Gruppe B die Oberflächenproteine CD46, CD80 oder CD86 als Rezeptoren nutzen können. Adenoviren der Gruppe D können zudem durch Interaktion mit Sialylsäureresten Zellen infizieren [24, 49, 84]. Nach Anheftung an die Zielzelle wird, durch Wechselwirkungen der Pentonbasisproteine mit Integrinen auf der Zelloberfläche, die Einstülpung der Zytoplasmamembran an Clathrin-reichen Regionen vermittelt [273].

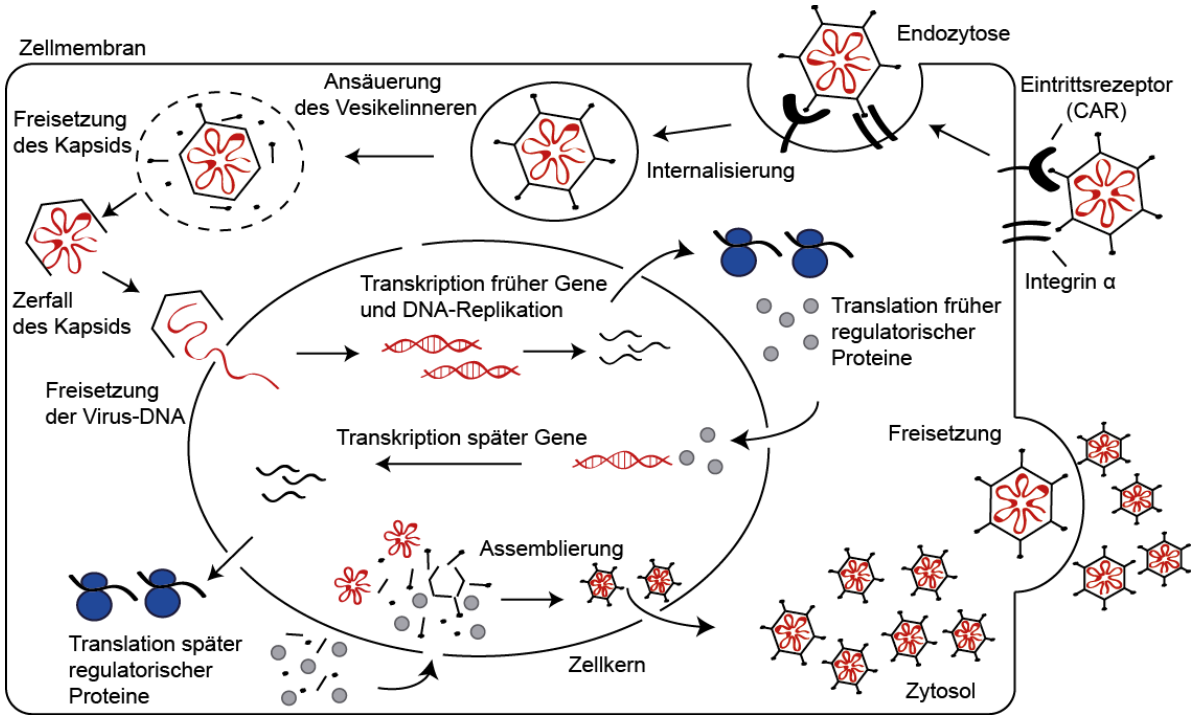

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von Ad5

Als erstes bindet das Adenovirus über das Fiberprotein an den Coxackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), hiernach erfolgt durch Interaktion des Pentonbasisproteins mit Integrinen auf der Zelloberfläche vermittelt die Internalisierung des Viruspartikels. Nach Zerfall des Partikels gelangt die virale DNA in den Zellkern, wo sie zu mRNA transkribiert wird. Die Translation der viralen Proteine erfolgt im Zytosol, anschließend findet der Zusammenbau der Adenoviren im Zellkern statt, bevor die reifen Viruspartikel durch Lyse der Zelle freigesetzt werden Abbildung verändert nach [142] .

Das Virus gelangt in Vesikeln ins Zytoplasma. Durch eine Ansäuerung des intravesikulären Milieus kommt es zur Lyse der Vesikelmembran und zum partiellen Zerfall des viralen Kapsids. Der im Kapsid enthaltene DNA-Proteinkomplex wird daraufhin in den Kern transportiert, wo die Transkription der viralen Gene und die Synthese viraler DNA-Moleküle stattfinden. Das adenovirale Genom integriert hierbei nicht in das Wirtszellgenom, sondern liegt im Zellkern episomal vor. Nach dem Export der viralen mRNA erfolgt im Zytoplasma die Proteinbiosynthese der Strukturproteine Hexon, Pentonbasis und Fiber, sowie der kleinen Proteine pIIIa, pVI, pVIII und pIX. Nach dem Transport der Strukturproteine in den Zellkern findet dort die Assemblierung der viralen Kapside statt. Die Freisetzung der Adenovirus-Partikel geschieht schließlich durch induzierte Apoptose und Lyse der infizierten Zelle.

1.2.1 Adenovirale Vektoren

Einer der bekanntesten Adenovirus-Typen ist das humane Adenovirus 5 (Ad5), das als Vektor in der Gentherapie, bei der Behandlung maligner Krebserkrankungen [19, 191] oder auch als Vakzinierungsvektor eingesetzt wird [50]. Ad5-Vektoren gelten als sehr sicher, da Infektionen mit Adenoviren häufig nur mit milden Symptomen verbunden sind und das adenovirale Genom nicht in das Wirtszellgenom integriert [103]. Sie können in

entsprechenden Zelllinien einfach und in hohen Titern hergestellt und modifiziert werden, wobei je nach Art des Vektors Transgenkapazitäten von bis zu 36 kb möglich sind. Sie eignen sich zudem für die Infektion und Transduktion eines breiten Spektrums sich teilender wie auch ruhender Zellen. Adenoviren sind sehr immunogen. Neben adaptiven Immunantworten aktivieren sie über Pathogen-assoziierte-molekulare-Muster-Rezeptoren zahlreiche Signalwege des angeborenen Immunsystems und initiieren die Produktion proinflammatorischer Zytokine [179]. Über diese werden Immunzellen, wie dendritische Zellen oder Makrophagen, zum Ort der Entzündung rekrutiert und zur Ausschüttung weiterer Zytokine stimuliert. Je nach Dosis kann dies vor allem bei intravenöser Gabe hepatozytotoxische Nebenwirkungen auslösen [125]. Um die Sicherheit bei der Anwendung im Menschen zu verbessern, wurden replikationsdefiziente Ad5-Vektoren generiert. Diese E1- und z.T. E3-deletierten Vektoren besitzen eine Transgenkapazität von ca. 8 kb und können einfach in trans-komplementierenden Zelllinien, wie z.B. in HEK 293 A-Zellen [55] hergestellt werden. E1-deletierte, replikationsdefiziente Vektoren exprimieren weiterhin in geringen Mengen frühe und späte adenovirale Genprodukte (*leaky gene expression*), welche humorale und zelluläre Immunantworten gegen den Vektor auslösen [6, 230, 288]. Die Impfung mit E1/E3-deletierten Vektoren induziert potente Transgen-spezifische $CD8^+$T-Zellantworten, die aber negativ von Vektor-induzierten Immunantworten beeinflusst werden können. Durch die Immundominanz Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zell-Epitope wird die Induktion breit-gefächerter $CD8^+$T-Zellantworten, vor allem gegen subdominante Transgen-Epitope, unterdrückt [230]. Zur Verminderung der *leaky gene expression* wurden Vektoren mit zusätzlichen Deletionen in E2A, E2B und E4 entwickelt, die über eine erhöhte Transgenkapazität von 14 kb verfügen [65]. Die Transgen-bezogene Immunogenität dieser Vektoren war jedoch weiterhin durch *leaky gene expression* beeinträchtigt. Daher wurden *gut-less* Vektoren entwickelt, die keine adenoviralen kodierenden Sequenzen mehr enthalten. Diese Vektoren bestehen nur noch aus dem Verpackungssignal und den adenoviralen ITRs [133], besitzen dadurch eine Transgenkapazität von ungefähr 36 kb, welche die Inkorporation rekombinanter Transgene mit regulatorischen Elementen erlaubt. Im Gegensatz zu E1/E3-deletierten Vektoren induzieren *gut-less*-Vektoren sehr effektiv breit-gefächerte Transgen-spezifische Antikörper- und $CD8^+$ T-Zellantworten, auch gegen subdominante Epitope [135]. Ihre Herstellung in HEK-293-Zellen ist aufwendig und erfordert die Co-Infektion mit einem zusätzlichen, E1-deletierten Helfervirus. Der Mangel von Techniken zur einfachen Produktion in größeren Maßstäben limitiert bisher ihren Einsatz in der klinischen Anwendung.

1.2.2 Adenovirus-basierte Impfstrategien im FV-Modell

Im FV-Modell wurde bereits die Effektivität einiger Immunisierungsstrategien, basierend auf viralen Vektoren, unter anderem auf Ad5-basierenden Vektoren, untersucht. Mit diesen wird versucht eine optimale Vakzine zu entwickeln, die nach Möglichkeit Virus-spezifische $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und neutralisierende Antikörper induziert und vollständigen Schutz vor einer FV-Infektion vermittelt. Bayer et al. untersuchten in C57BL/6 Mäusen die Impfung mit Gag- bzw. Env-exprimierenden Ad5 bzw. chimärischen Ad5F35 Vektoren [21]. Mit diesen konnten mehr als 50 % der Versuchstiere vor der Etablierung einer chronischen Infektion geschützt werden. Durch Verwendung einer heterologen Prime-Boost-Impfstrategie beider Ad-Vektor-Typen wurde das Auftreten von Splenomegalie verzögert, sowie eine erhöhte Induktion FV-spezifischer neutralisierender Antikörper erzielt. In weiteren Experimenten wurden sogenannte Expression-Display-Vektoren konstruiert, in denen unter anderem das FV gp70 an den C-Terminus des adenoviralen Kapsid-Proteins pIX fusioniert und somit nicht nur intrazellulär exprimiert, sondern zusätzlich auf der Virusoberfläche präsentiert wurde [22]. Mithilfe dieser Vektoren konnten die Titer bindender Antikörper vor und neutralisierender Antikörper nach Infektion mit FV weiter erhöht, sowie die Induktion FV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen gesteigert werden. Dies korrelierte mit einem verbesserten Schutz suszeptibler Mäuse vor einer FV-Infektion. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Zugabe von Zytokinen oder Chemokinen als Adjuvantien bei einer Impfung mit Gag- und Env-exprimierenden Ad5-Vektoren die Induktion von $CD4^+$ T-Zellen und Antikörperantworten verstärkt und den Schutz vor einer Infektion erhöht [145, 185]. Der induzierte Schutz hing stärker von der Anwesenheit von $CD4^+$ T-Zellen, als von $CD8^+$ T-Zellen ab. Es gelang zudem, durch die alleinige Induktion $GagL_{85\text{-}93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten starken Schutz suszeptibler Mäuse vor einer FV-Infektion zu vermitteln. Zur Immunisierung wurde hierbei unter anderem ein adenoviraler Vektor verwendet, der lediglich das $GagL_{85\text{-}93}$-Epitop als Fusion mit dem Immunogenitäts-steigernden murinen Zellprotein Thioredoxin exprimierte. Die Immunisierung suszeptibler Mäuse mit Ad5.TxnGagL induzierte potente $GagL_{85\text{-}93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten und resultierte in nicht detektierbaren Viruslasten im Plasma und stark reduzierten Viruslasten in der Milz [93].

In früheren Experimenten wurden häufig F-MuLV Gag- und Env- kodierende Vektoren zur Verbesserung der Immunantwort in einer Impfstrategie kombiniert [21–23]. Aus jüngeren Studien ging aber hervor, dass das F-MuLV Env einen immunsuppressiven Effekt auf die Induktion von $CD8^+$ T-Zellantworten ausübt, der unabhängig von der Induktion regulatorischer T-Zellen ist [130].

Unter Einbezug dieser, sowie weiterer Erkenntnisse der letzten Jahre wurde ein Impfregime zur Induktion F-MuLV-spezifischer $CD4^+$ T-Zell-, $CD8^+$ T-Zell- und Antikörperantworten entwickelt, bei welchem Ad5.TxnGagL und Ad5.Leader-Gag_{C1K} als Prime mit Ad5.pIXgp70 als Boost kombiniert wurden. Dieses wurde im Vergleich mit F-MuLV-N in suszeptiblen CB6F1-Mäusen untersucht. Die Immunisierung mit der Ad5-Vakzine induzierte $CD4^+$ T-Zell-, $CD8^+$ T-Zellantworten, während F-MuLV-bindende, und -neutralisierende Antikörper aber erst nach der Infektion detektiert werden konnten. Trotzdem vermittelte die Immunisierung Schutz vor der FV-induzierten Krankheit mit bis unter die Nachweisgrenze reduzierten Viruslasten im Plasma und stark reduzierten Viruslasten in der Milz. Der induzierte Schutz war vergleichbar mit dem in F-MuLV-N-immunisierten Mäusen, jedoch waren hier die Viruslasten in der Milz stärker reduziert. Interessanterweise führte die Immunisierung mit F-MuLV-N weder zur Induktion spezifischer $CD8^+$T-Zell- noch $CD4^+$T-Zell-Antworten, sondern basierte hauptsächlich auf der Induktion F-MuLV-bindender und neutralisierender Antikörper bereits vor der Infektion.

Während die induzierten Immunantworten beider Impfstrategien qualitativ und quantitativ stark voneinander abwichen, gelang es mit beiden höchst suszeptible CB6F1-Mäuse vor der Infektion mit einer sehr hohen Virusdosis zu schützen. Der unvollständige Schutz nach Immunisierung mit der Ad5-Vakzine ist vermutlich dem Fehlen neutralisierender Antikörper zum Zeitpunkt der Infektion zuzuschreiben.

1.2.3 Ad5-Prä-Immunität

Adenovirus 5 ist ein ubiquitär verbreitetes Erkältungsvirus, gegen das in breiten Teilen der Weltbevölkerung bereits Immunantworten durch wiederholte Exposition mit natürlich vorkommenden Viren existieren. Induzierte Typ-I-IFN-aktivierte NK-Zellen, Ad5-spezifische neutralisierende Antikörper und T-Zellen erkennen neben pathogenen Adenoviren auch deren vektorisierte Derivate und beschränken anteilig die effektive Dosis des applizierten Vektors. Die Seroprävalenz Ad5-neutralisierender Antikörper im Menschen rangiert beispielsweise weltweit von 30 % bis zu 100 % [175]. Ziele neutralisierender Antikörper befinden sich vor allem in den Hypervariablen Regionen der Hexonproteine oder im Fiberprotein-Knopf [85, 195]. Hierbei sind neutralisierende Antikörper aufgrund der hohen Sequenz-Heterogenität ihrer Epitope meist Typ-spezifisch. Nicht-neutralisierende Antikörper hingegen besitzen häufig kreuzreaktive Eigenschaften und können ebenfalls, beispielsweise durch *antibody dependent cellular toxicity*, Komplement-vermittelte Lyse oder Opsonisierung transduzierter Zellen, zur Dämpfung der Transgen-Expression führen [179]. Bei der Untersuchung der Ad5-Prä-Immunität in Mäusen konnte gezeigt werden, dass der Transfer von Serum aus Ad5-prä-immunen

Mäusen oder aufgereinigten Ad5-spezifischen Antikörpern in einer deutlichen Reduktion Transgen-induzierter Immunantworten resultierte [250]. In denselben Experimenten wurde außerdem ein negativer Effekt nach dem Transfer Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen gezeigt. Im Gegensatz zu Antikörper-Epitopen, sind die adenoviralen T-Zell-Epitope hoch konserviert, sodass die induzierten T-Zellen häufig kreuzreaktiv gegen weitere humane Adenovirus-Typen sind [142, 275]. Ad5-spezifische $CD4^+$- und $CD8^+$ T-Zellen sind ähnlich weit verbreitet, wie Ad5-neutralisierende Antikörper [110, 115]. Neben adaptiven Immunmechanismen trägt die Induktion proinflammatorischer Signalwege der angeborenen Immunität, beispielsweise durch Rekrutierung von NK-Zellen und Ad-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen, ebenfalls zur Eliminierung Adenovirus-transduzierter Antigen-präsentierender Zellen bei.

Die Wichtigkeit der Ad5-Prä-Immunität als zusätzlicher Faktor wurde vor allem bei der 2004 begonnene STEP-Studie ersichtlich. Bei dieser handelte es sich um eine Phase-IIb klinische Studie zur Bewertung der Wirksamkeit eines trivalenten Impfstoffs basierend auf Gag-, Pol- und Nef-exprimierenden Ad5-Vektoren, der die Infektionsrate sowie den HIV-1 Viruslast-Grenzwert in den immunisierten Probanden senken sollte. 2007 wurde die Studie aufgrund mangelnder Effektivität beendet [32]. Trotz Induktion transgenspezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten wurden ähnliche HIV-1-Infektionsraten sowohl in immunisierten Studienteilnehmern, als auch in Placebo-Empfängern nachgewiesen [160]. Erstanalysen der erhobenen Daten deuteten auf ein erhöhtes HIV-1-Infektionsrisiko in unbeschnittenen, Ad5-seropositiven Männern hin [32]. Detailliertere Regressionsanalysen der Daten verifizierten aber, dass der Beschneidungsstatus der Studienteilnehmer den signifikanten Risikofaktor darstellte [161]. Auch wenn ein statistischer Zusammenhang zwischen den Ad5-spezifischen neutralisierenden Antikörpern und der Begünstigung einer HIV-1-Infektion in der STEP-Studie widerlegt werden konnte, hatte die vorhandene Ad5-Prä-Immunität dennoch einen negativen Einfluss auf die Effektivität des Vakzins. So wurde gezeigt, dass in Ad5-prä-immunen Probanden als Antwort auf die Immunisierung höhere Level Ad5-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen induziert wurden, die mit einer reduzierten Gesamtheit HIV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen und einer verringerten Breite der HIV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort assoziiert waren [82]. Zudem förderten die induzierten $CD8^+$ T-Zellen die selektive Entstehung von Viren mit Flucht-Mutationen gegen die Immunisierungsepitope [215].

1.2.4 Umgehungsstrategien der Ad5-Prä-Immunität

Die Ergebnisse der STEP-Studie rückten die Ad5-Prä-Immunität in den Fokus der Forschung und resultierten in einem gesteigerten Interesse an den ihr zugrunde liegenden

immunologischen Mechanismen. Aktuell werden viele unterschiedliche Konzepte verfolgt, um eine Restimulation der Vektor-gerichteten Immunantworten bei der Applikation adenoviraler Vektoren zu vermeiden. Eine Möglichkeit bietet die Maskierung oder Veränderung Epitop-haltiger Strukturen, wie beispielsweise der hypervariablen Regionen der Hexon-Proteine [251] oder der Fiber-Knopf-Regionen durch biochemische Modifikationen [36], oder durch direkte Einführung von Punktmutationen [30]. Die Vermeidung Ad5-gerichteter Antikörper kann ebenfalls durch den Austausch immunologisch relevanter Regionen durch solche aus weniger verbreiteten Adenovirus-Typen erreicht werden [210]. Mittlerweile existieren zudem viele Vektorsysteme basierend auf seltenen Adenoviren, wie beispielsweise Ad35, Ad50 (Mastadenoviren Gruppe B), Ad26 oder Ad48 (Mastadenoviren Gruppe D) [1]. In frühen Studien erzielten replikations-defiziente Ad26-, Ad35- und Ad48-Vektoren gute Ergebnisse bei der Induktion polyfunktionaler, reaktivierbarer $CD8^+$ T-Zellen und verfügten über ein hohes Steigerungspotenzial in heterologen Prime-Boost-Kombinationen. Ad26- und Ad35-Vektoren gelten als sicher und gut verträglich und wurden zudem bereits als Impfstoffkandidaten gegen *Plasmodium falciparum*, *Mycobacterium tuberculosis*, HIV und Ebola im Menschen evaluiert [92, 132, 187, 254]. Es wurde aber ebenfalls beschrieben, dass einige der bereits untersuchten seltenen Adenoviren im Vergleich zu Ad5 höhere inflammatorische Vektor-gerichtete Immunantworten auslösen, die zur Beseitigung transduzierter Zellen führen [124, 259]. Gleichzeitig sind viele der seltenen Adenoviren nur schwach immunogen bei der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten, was die wiederholte Applikation hoher Dosen erfordert [48, 254].

Parallel zu den seltenen humanen Adenoviren erfolgte die Etablierung nicht-humaner Adenoviren, welche aus unterschiedlichen Tierfamilien wie Primaten, Rindern, Geflügel oder Hunden isoliert wurden [16]. Neben der geringen Seroprävalenz im Menschen [16, 71] besitzen diese weitere Vorteile. Der nahe Verwandtschaftsgrad zum humanen Ad5 erlaubt die Herstellung replikations-defizienter Vektoren in bereits existierenden Säugerzelllinien [221]. Viele mit Ad5 bereits etablierte Strategien zur Vektormanipulation und -modifikation können für simiane Adenoviren (SAd/ChAd) adaptiert werden. Einige ChAd-Vektoren wurden bereits in klinischen Studien gegen HCV [17], *Plasmodium falciparum* [184] und Influenza [10] eingesetzt, wo sie nachweislich robuste, breite und polyfunktionale Immunantworten induzierten. In diesen zeigten sie, mit Einschränkungen, gute Verträglichkeit und Sicherheit, auch bei der Anwendung in Kindern. Bei einer anderen Studie zum Schutz vor einer kontrollierten Infektion mit *Plasmodium falciparum* konnte keine Wirksamkeit einer ChAd63-MVA Prime-Boost-Impfstrategie gezeigt werden. Die Immunisierung induzierte zwar T-Zellantworten und Antikörper, vermittelte aber keinen

Schutz vor der Infektion [234]. Aufgrund der phylogenetischen Nähe existieren vor allem zwischen humanen und simianen Adenoviren konservierte Sequenzen, unter anderem im C-terminalen Abschnitt des Hexons, welche von Ad-spezifischen, kreuzreaktiven T-Zellen erkannt werden [115]. Bei Immunisierungsexperimenten mit drei ChAd-Vektoren konnte zudem eine Reduktion der Immunisierungseffektivität in Ad5-prä-immunen Mäusen gezeigt werden [209].

1.3 Zielsetzung

Die hohe Immunogenität Adenovirus 5-basierter Vektoren stellt ein zweischneidiges Schwert bei ihrer Verwendung als Vakzinierungsvektoren dar. Ad5-Vektoren sind dafür bekannt, potente Transgen-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten zu induzieren. Jedoch sind die induzierten $CD8^+$ T-Zellantworten auf wenige, meist immundominante Antigene beschränkt. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde beobachtet, dass das immundominante $GagL_{85-93}$-Epitop des murinen Retrovirus-Komplex Friend Virus in einem Ad5-Vektor keine $CD8^+$ T-Zellantwort induziert [93]. In Übereinstimmung mit der Tatsache, dass Vektor-eigene Epitope die Induktion von $CD8^+$ T-Zellen gegen subdominante Epitope supprimieren können, wurde in nachfolgenden Experimenten gezeigt, dass das Vorhandensein der beiden adenoviralen Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ zur Inhibition $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten führte.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher überprüft werden, ob die Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten hauptsächlich von einem der beiden adenoviralen Epitope ($DBP_{418-426}$ oder $Hexon_{486-494}$) vermittelt wurde, oder ob es sich um einen additiven Effekt handelte. Es sollte untersucht werden, welcher Mechanismus der Suppression zugrunde lag. Nach Möglichkeit sollte zu diesem eine Umgehungsstrategie entwickelt werden, deren Anwendbarkeit im Kontext des gesamten Ad5-Vektors verifiziert werden sollte. Zudem sollte das Vorhandensein weiterer $CD8^+$ T-Zell-Epitope im Ad5-Vektor überprüft werden und ein immunologisches Profil des Vektors erstellt werden. Des Weiteren sollten Adenovirale Vektoren mit Transgenen unterschiedlicher, vordefinierter Immunogenität hergestellt werden, mit denen der Einfluss von Epitopen verschiedener Immunogenität im immunologischen Profil des Ad5-Vektors untersucht werden sollte.

Aufgrund ihrer hohen Immunogenität und ihrer weiten Verbreitung existieren in der Weltbevölkerung Immunantworten gegen Ad5, die den Nutzen Ad5-basierter Impfvektoren beschränken. Während Vektor-gerichtete Immunantworten zur Suppression Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten führen, konnte parallel ein steigernder Effekt auf Transgen-spezifische Antikörperantworten in Ad5-prä-immunen Mäusen beobachtet werden [130]. Daher sollten die Grundlagen des ambivalenten Effekts der Ad5-Prä-Immunität geklärt und näher charakterisiert werden.

Eine mögliche Strategie zur Umgehung der Ad5-Prä-Immunität stellen auf seltenen Adenoviren basierende Vektoren dar. Im Zuge dieser Arbeit sollten daher unterschiedliche Vektoren basierend auf den Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 generiert werden. Die immunogenen Eigenschaften dieser Ad48- und Ad50-basierter Vektoren sollten im

Kontext verschiedener Transgene charakterisiert und mit dem jeweiligen Ad5-Vektor verglichen werden. Neben der Betrachtung Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zell-, $CD4^+$ T-Zellantworten sollten Vektor- und Transgen-gerichtete humorale Immunantworten untersucht werden. Es sollte im Weiteren überprüft werden, inwiefern die Effektivität von auf Ad48 und Ad50 basierenden Vektoren durch die Ad5-Prä-Immunität beeinträchtigt wird und somit eine Aussage über die Eignung dieser Vektoren als potenzielle Impfvektoren für die Anwendung im Menschen getroffen werden.

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen der Vektor-induzierten Immunität sowie der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Adenovirus-basierten Vektoren untersucht werden.

2. Material

2.1 Geräte

AID ELISpot Reader	AID	Straßberg, Deutschland
AutoMACS® Pro Separator	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Deutschland
BioPhotometer plus	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Brutschränke und Inkubatoren: CO_2 Inkubator Modell 371 HERACELL 240i CO_2 Inkubator Heraeus Inkubator Typ B6 Inkubationsschüttler MaxQ 6000	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Durchflusszytometer FACS LSR II	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Eismaschine MF 30	Scotsman	Mailand, Italien
Elektrophoresesystem PerfectBlue Mini L	VWR Peqlab	Erlangen, Deutschland
Elektroporator Agile Pulse	BTX	Holliston, MA, USA
Elektroporatornadeln Needle Array 4 x 4 x 5 mm	BTX	Holliston, MA, USA
Elektroporator GenePulser XCell™	BIO-RAD	München, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr	Biberach, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Sanyo	München, Deutschland
Geldokumentationskammer Gene Genius	Syngene	Cambridge, Großbritannien
Kleintiernarkosegerät	UNO	Zevenaar, Niederlande
Kühlschrank UK1720	Liebherr	Biberach, Deutschland
Magnetrührer RH basic	IKA	Staufen, Deutschland
Mikroplattenlesegerät Asys Expert Plus	Biochrom	Berlin, Deutschland
Nanodrop	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Pipetten	Starlab	Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
Präzisionswaage EMB 1000-2	Kern	Balingen-Frommern, Deutschland
Spannungsquelle Standard Power Pack P25	Biometra	Göttingen, Deutschland
ThermalCycler C1000	BIO-RAD	München, Deutschland
Thermoschüttler MHR11	HLC BioTech	Bovenden, Deutschland
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP mit Rotor NVT 90	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Vortex	IKA	Staufen, Deutschland
Waage 440-47 N	Kern	Balingen-Frommern, Deutschland
Wasserbad	Julabo	Seelbach, Deutschland
Zellometer Auto T4	Nexcelom Bioscience LLC	Lawrence, MA, USA
Zentrifuge 5424 mit Rotor FA-45-24-11	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Zentrifuge 5430 R mit Rotor FA-45-30-11 oder A-2-MTP	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 4-16 K mit Rotor 11650 mit Einsatz 13421 oder 13450	Sigma	Osterode am Harz, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-26 XP mit Rotor O7U-762	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

6-, 24-, 96-Loch-Platten	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
96-Loch MaxiSorp Platten	Nunc	Roskilde, Dänemark
Amicon Ultra 2 ml Centrifugal Filters - Aufkonzentrierungsröhrchen	Merck Milipore	Burlington, MA, USA
Bakterienröhrchen 13 ml	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Combitips	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Einwegspritzen (0,3 ml, 0,5 ml)	BD Biosciences	Darmstadt, Deutschland
Filterpapier	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Filterspitzen	Starlab	Hamburg, Deutschland
Fotofilm Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Solingen, Deutschland
Gene Pulser® Cuvette 0,2 cm	BIO-RAD	München, Deutschland
Kanülen BD MicrolanceTM 3	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Kapillaren minicaps, NA-HEP.	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt, Deutschland
MACS SmartStrainers	Miltenyi	Bergisch Gladbach, Deutschland
Mini Protean 3 ® Western Blot Kammer	BIO-RAD	München, Deutschland
Nitrozellulosemembran Protran	Whatman	Maidstone, Großbritannien
Petrischalen	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Petrischalenspatel	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 200 µl, 300 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen 5 ml	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen MµltiFlexRound Tips	Peqlab	Erlangen, Deutschland
Reaktiongefäße (0,2 ml)	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Slide-A-Lyzer Dialyse Kassette	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter	Krefeld, Deutschland
Whatmanpapier	Whatman	Maidstone, Großbritannien
Zellkulturflasche (25 cm², 75 cm², 175 cm²)	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche (300 cm²)	TPP	Trasadingen, Schweiz
Zellometer Zählkammer	Nexcelom Bioscience LLC	Lawrence, MA, USA

2.3 Chemikalien

Acrylamid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Amersham TMB WB Detektionslösung	GE Healthcare	Little Chalfont, UK
3-Amino 4-Ethylcarbazol (AEC)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Agarose	Biozym	Hessisch Oldendorf, Deutschland
Ammoniumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
autoMACS Lauf- und Waschpuffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach, Deutschland
Bacto-Peptone	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA	Pasching, Österreich
Brefeldin A (BFA)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Calciumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dimethylformamid (DMFA)	Merck	Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Di-Natrium-Hydrogenphosphat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Thermo Fischer	Waltham, MA, USA
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
100 % Essigsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol p.a.	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethanol, vergällt 96 %	Alfred Quadflieg	Gelsenkirchen, Deutschland
Ethidiumbromid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N′,N′-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom	Berlin, Deutschland
Glucose	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Glycerin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hefe Extrakt	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Hexadimethrinbromid (Polybren)	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Isofluran	Abbott	Wiesbaden, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat	Merck	Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA
LB-Agar	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem	Darmstadt, Deutschland

Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Meerschweinchen-Komplementserum	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Methanol	VWR Chemicals	Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdeoxycholat	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck	München, Deutschland
Natriumfluorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Natronlauge	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Nonidet P40	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Polyacrylamid	Roth	Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	Thermo Fischer	Waltham, MA, USA
Saccharose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Schwefelsäure	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SOC-Medium	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth	Karlsruhe, Deutschland
TMB+ Substrat	Dako	Hamburg, Deutschland
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Tris-EDTA-Puffer (TE) 100x	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Trinatriumcitratdihydrat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAA	Pasching, Österreich
Tween 20	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Wasser	Braun	Melsungen, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Roth	Karlsruhe, Deutschland

2.4 Enzyme

Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Kinase Ligase DpnI (KLD) Enzyme Mix	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
OneTaq DNA-Polymerase	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Phusion® Hot Start Flex DNA-Polymerase	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (2000 U/ml)	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
RNase	Sigma-Aldrich	München, Deutschland
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland

2.5 Reagenzsysteme

Chemiluminescence Detection Kit	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Mix and Go! Competent Cells Kit	Zymo Research	Freiburg, Deutschland
NucleoBond PC 500	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
NucleoSpin Extract II Gel and PCR Clean up	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
The Original TA Cloning® Kit	Life technologies	Darmstadt, Deutschland
Vivapure® AdenoPACK™ 20	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Vivapure® AdenoPACK™ 100	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland

2.6 Puffer und Standardlösungen

ACK-Lysepuffer	8,28 g/l Ammoniumchlorid 1 g/l Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM EDTA
AEC-Gebrauchslösung	13 ml H_2O 0,325 ml 3 M Natriumacetat 0,624 ml AEC-Stammlösung 7 µl Wasserstoffperoxid 30 %
AEC-Stammlösung	4 mg/ml AEC in DMFA
Bindepuffer Protein A	100 mM NaH_2PO_4 100 mM NaCl 10 mM EDTA pH 7,4
Blocklösung	0,05 % (w/v) Magermilch + 0,1 % Tween-20 in PBS
Boehringer Lysepuffer	5 mM EDTA 5 mM EGTA 150 mM Natriumchlorid 0,1 % (w/v) Natriumdeoxycholat 40 mM Natriumfluorid 1 % (v/v) Nonidet P40 0,1 % SDS 50 mM Tris-HCl pH 7,4
Coatingpuffer	200 mM Natriumcarbonat pH 9,6

DNA-Ladepuffer	1 Spatelspitze Bromphenolblau 30 % Glycerin in 1x TE
Elutionspuffer	100 mM Glycin pH 2,4
FACS-Puffer	0,1 % BSA 0,02 % Na-Azid in PBS
HBS-Puffer (2x)	10 mM Calciumchlorid 12 mM Dextrose-H_2O 1,5 mM Di-Natriumhydrogenphosphat 50 mM HEPES 280 mM Natriumchlorid pH 7,05
Laemmlipuffer	40 % (v/v) Glycerin 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol 0,04 % Pyronin Y 12 % (w/v) SDS 0,5 M Tris-HCl pH 6,8
Laufpuffer (10x)	1,9 M Glycin 0,25 M Tris
Laufpuffer (1x)	10 % 10x Laufpuffer 0,1 % SDS
MACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA in PBS
OD-Lysepuffer pH 7,4	1 M ETDA 0,1 % SDS 10 mM Tris-HCl
P1 Resuspensionspuffer	6,06 g/l Tris(-Base) 3,72 g/l NA_2EDTA 100 mg/l RNase pH 8
P2 Lysepuffer	8 g/l NaOH 10 g/l SDS
P3 Neutralisationspuffer	294,5 g/l Kaliumacetat 150 ml Eisessig

PBBS	0,14 g/l Calciumchlorid 1,0 g/l Glucose 0,32 g/l Kaliumchlorid 0,2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat 1,15 g/l Di-Natriumhydrogenphosphat 7,2 g/l Magnesiumchlorid-Hexahydrat 0,2 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat 1 % Phenolrot
Permeabilisierungspuffer	0,5 % Saponin in PBS
10x Phosphatpuffer	0,17 M Kaliumdihydrogenphosphat 0,72 M di-Kaliumhydrogenphosphat
TBST	50 mM Tris-Cl 150 mM NaCl 0,1 % Tween 20 pH 7,5
1x TE	0,5 ml 100x TE 45 ml H_2O
Transferpuffer	20 % Ethanol, vergällt 96 % 10 % 10x Laufpuffer 0,05 % SDS
Waschpuffer (αF-MuLV ELISA)	0,5 % Tween20 in PBS
Waschpuffer (αAdV ELISA)	0,1 % Tween20 in PBS

2.7 Medien

2.7.1 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

DMEM +++	10 % hitzeinaktiviertes FCS 1 % Ciprofloxacin 0,1 % 50 mg/ml Gentamycin in DMEM
RPMI +++	10 % hitzeinaktiviertes FCS 1 % Cipro 0,1 % 50 mg/ml Gentamycin in RPMI 1640
RPMI ++	10 % hitzeinaktiviertes FCS 100 U/ml Penicillin/Streptavidin in RPMI 1640

R10	10 % FCS 100 U/ml Penicillin/Streptavidin 100 µg/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES in RPMI 1640
Hybridoma Medium + FCS	15 % hitzeinaktiviertes FCS 2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat 50 µg/ml Gentamycin 10 U/ml Penicillin/Streptavidin in RPMI 1640
Hybridoma Medium -FCS	2 mM L-Glutamin 20 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat 50 µg/ml Gentamycin 10 U/ml Penicillin/Streptavidin in RPMI 1640
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS

2.7.2 Medien für die Bakterienkultur (*Escherichia coli*)

LB	1 % Hefeextrakt 1 % Bacto-Pepton 0,5 % NaCl (+ 2 % Agar für Festmedium)
SOC	2 % Bacto-Pepton 1 % Hefeextrakt 0,1 % NaCl 20 mM Glucose
TB	1,2 % Bacto-Pepton 2,4 % Hefeextrakt 0,4 % Glycerol 0,17 mM KH_2PO_4 0,72 mM K_2HPO_4

2.8 Antibiotika

Carbenicillin	Roth	Karlsruhe,Deutschland
Ciprofloxacin	Fresenius Kabi	Bad Homburg, Deutschland
Gentamycin	Roth	Karlsruhe,Deutschland
Kanamycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA	Pasching/Österreich

2.9 Plasmide

pcDNA-GagL.DBP.Hexon	kodiert das F-MuLV-abgeleitete $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$, sowie die adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{415-429}$ und $Hexon_{483-497}$ mit jeweils drei flankierenden Aminosäuren (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pcDNA-GagL.ΔDBP.ΔHexon	kodiert das F-MuLV-abgeleitete $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$, sowie Alanin-modifizierte Varianten der adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{415-429}$ und $Hexon_{483-497}$ mit jeweils drei flankierenden Aminosäuren (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pcDNA-GagL.ΔDBP.Hexon	kodiert das F-MuLV-abgeleitete $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$, sowie eine Alanin-modifizierte Variante des adenoviralen Epitops $DBP_{415-429}$ zusammen mit dem adenoviralen Epitop $Hexon_{483-497}$ mit jeweils drei flankierenden Aminosäuren (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pcDNA-GagL.DBP.ΔHexon	kodiert das F-MuLV-abgeleitete $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$, das adenovirale $CD8^+$ T-Zell-Epitop $DBP_{415-429}$ zusammen mit einer Alanin-modifizierten Variante des adenoviralen Epitops $Hexon_{483-497}$ mit jeweils drei flankierenden Aminosäuren (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pAdEasy-1	Rekombinationsplasmid mit Genom des Adenovirus Typ 5 mit Deletionen der Regionen E1 und E3; rekombinante Adenoviren werden erhalten durch homologe Rekombinationen mit pShuttle (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [111]
pAdTrack-mIL2	kodiert murines IL2 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [21]
pAdTrack-mIL15	kodiert murines IL15 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [21]
pAdTrack-mIL21	kodiert murines IL21 (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [21]
pShuttleIL23	kodiert murines IL23 (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pCG-env	kodiert F-MuLV Env (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [27]
pCG-Leader-Gag	kodiert F-MuLV Gag (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [93]
pCG-Leader-Gag_{C1K}	kodiert F-MuLV Gag mit einer Aminosäurensubstitution (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [93]
pShuttle-CMV	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren im AdEasy-System, Transgen unter Kontrolle eines CMV-Promotors (erhalten von Dr. Wibke Bayer) [111]

pShuttleOVA	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren, Ovalbumin-Transgen unter Kontrolle eines CMV-Promotors (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pGem-env	kodiert F-MuLV env (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pGemT-CMV-eGFP-SV40	kodiert GFP (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pHSVPrPucLuc	kodiert Luciferase (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pShuttlegagYzK	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren, kodiert das F-MuLV leader-gag mit einer Aminosäurenmodifikation (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pShuttleTxnGageOLLAS	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren, kodiert das F-MuLV GagL Epitop als Fusion an murines Thioredoxin mit OLLAS tag (erhalten von Dr. Wibke Bayer)
pFRT-Z-Cre	kodiert die Cre Rekombinase (erhalten von Dr. Khan Lee Trilling)
pAdApt48	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren des Typs 48, enthält nt 1-462 und nt 3362-5910 des Ad48-Genoms sowie eine MCS zum Einfügen von Transgenen, (erhalten von Dan Barouch, Harvard Medical School, Boston, MA) [1]
pWe.Ad48.pIX-rIT	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren des Typs 48, enthält nt 3362-35206 des Ad48-Genoms (erhalten von Dan Barouch, Harvard Medical School, Boston, MA) [1]
pAdApt50	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren des Typs 50, enthält nt 1-464 und nt 32217-5273 des Ad50-Genoms sowie eine MCS zum Einfügen von Transgenen, (erhalten von Dan Barouch, Harvard Medical School, Boston, MA) [1]
pBr.Ad50.pIX-NheI	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren des Typs 50, enthält nt 3383-19354 des Ad50-Genoms (erhalten von Dan Barouch, Harvard Medical School, Boston, MA) [1]
pBr.Ad50.Sfi-rIT	Klonierungsvektor zur Herstellung rekombinanter Adenoviren des Typs 50, enthält nt 17145-35383 des Ad50-Genoms (erhalten von Dan Barouch, Harvard Medical School, Boston, MA) [1]

2.10 Oligonukleotide

Linker A Ad48/50	AGC TCG ATA TCG GAT CCG GTA CCG AAT TCG CTA GCG TCG ACG CGG CCG CCT CGA GAA GCT TGT GCA CGT TAA CA
Linker B Ad48	GAT CTG TTA ACG TGC ACA AGC TTC TCG AGG CGG CCG CGT CGA CGC TAG CGA ATT CGG TAC CGG ATC CGA TAT CG
Linker Ad50 B	CTA GTG TTA ACG TGC ACA AGC TTC TCG AGG CGG CCG CGT CGA CGC TAG CGA ATT CGG TAC CGG ATC CGA TAT CG

ovaYQTVreverse	TAT ACT CTC AAG CTG CTC AAG GCC
ovaY3sense	TAC AAC TTT GAA AAA CTG ACT GAA TGG ACC
ovaQ4sense	ATC CAG TTT GAA AAA CTG ACT GAA TGG ACC
ovaT4sense	ATC ACC TTT GAA AAA CTG ACT GAA TGG ACC
ovaV4sense	ATC GTG TTT GAA AAA CTG ACT GAA TGG ACC

2.11 Größenstandards

GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas	St. Leon-Rot, Deutschland
Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color	BIO-RAD	München, Deutschland

2.12 Peptide

2.12.1 Einzelpeptide

F-MuLV $GagL_{85-93}$ H-$2D^b$ (GagL)	AbuAbuLAbuLTVFL (CTL-Epitop aus der leader-Region des Gag-Proteins) [228]	Peptides&elephants, Henningsdorf, Deutschland
$DBP_{418-426}$ H-$2D^b$ (DBP)	FALSNAEDL	Peptides&elephants, Henningsdorf, Deutschland
$Hexon_{486-494}$ H-$2D^d$ (Hexon)	KYSPSNVKI	Peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland
$OVA_{257-264}$ H-$2K^b$ (OT-I)	SIINFEKL	Peptides&elephants, Hennigsdorf, Deutschland

2.12.2 Adenovirus 5 Peptid-Pools

Pool	Peptid	Sequenz	IEDB score
Hexon H-$2D^b$	$Hexon_{567-575}$	FAIKNLLLL	0,84
	$Hexon_{418-426}$	GGVINTETL	-0,05
	$Hexon_{318-327}$	QSMPNRPNYI	-0,91
Hexon H-$2K^b$	$Hexon_{790-798}$	RMYSFFRNF	1,58
	$Hexon_{676-683}$	RGWAFTRL	0,66
	$Hexon_{673-683}$	AAFRGWAFTRL	0,37
	$Hexon_{78-86}$	YSYKARFTL	0,36
	$Hexon_{938-945}$	TVYLRTPF	0,33
	$Hexon_{840-850}$	QAYPANFPYPL	-0,71
	$Hexon_{699-708}$	YTYSGSIPYL	-0,96

Penton H-2D^b	Penton$_{455-463}$	RQISNFPVV	-0,06
	Penton$_{137-148}$	FMFTNKFKARVM	-1,27
Penton H-2K^b	Penton$_{53-60}$	NSIRYSEL	0,42
	Penton$_{485-492}$	LIRQFTSL	0,21
	Penton$_{398-408}$	STFTQYRSWYL	0,16
Fiber H-2D^b	Fiber$_{568-578}$	FATSSYTFSYI	-1,93
	Fiber$_{117-129}$	AAPLMVAGNTLTM	-2,32
Fiber H-2K^b	Fiber$_{571-578}$	SSYTFSYI	0,94
	Fiber$_{272-282}$	VSYPFDAQNQL	0,85
	Fiber$_{301-309}$	INYNKGLYL	0,65

Der IEDB score verbindet die Vorhersagen für den proteasomalen Verdau, TAP Transport und das Binden an MHC; ein höherer Score bedeutet höhere Effizienz.

2.13 Antikörper

Maus-α-F-MuLV env (AK720)		Antikörper (Zellkulturüberstand) der Hybridomazelllinie H720 [212]
α-mouse CD4 Micro Beads	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
α-mouse CD8 Micro Beads	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
α-mouse IgG1 HRP	BD	Heidelberg, Deutschland
Ziege α-mouse HRP	Dako	Hamburg, Deutschland

2.14 Fluoreszenzmarkierte Antikörper

Alle in dieser Arbeit verwendeten fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden von den Firmen BioLegend (Koblenz, Deutschland), BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) oder eBioscience (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Die verwendeten Tetramere bzw. Dextramere stammten von Biozol (Eching, Deutschland) bzw. von Immudex (Kopenhagen, Dänemark).

Allophycocyanin (APC)	APC-MHCI H-2K^b mit OTI Peptid (SIINFEKL)
eFluor 450 (eF450)	α-CD8
eFluor780 (eF780)	Fixable Viability Dye (messbar im APC-Cy7-Kanal)
Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	α-IFNγ
Peridin-Chlorophyll-Proteinkomplex (PerCP)	α-CD43
Phycoerythrin (PE)	α-IL2 PE-MHCI H-2D^b mit FV GagL Peptid (AbuAbuLAbuLTVFL)
Phycoerythrin-Cyanin7 (PE-Cy7)	α-CD62L αTNFα
Alexa Fluor 700 (AF700)	α-CD4, α-CD44

2.15 Bakterien

Escherichia coli BJ5183	*end*A1 *sbc*BC *rec*BC *gal*K *met thi*-1 *bio*T *hsd*R (Str^R)	Life Technologies	Darmstadt, Deutschland
Escherichia coli NEB5-α	*supE*44 Δ*lac*U169 (Φ80*lacZ*ΔM15) *hsd*R17 *recA*1 *endA*1 *gyrA*96 *thi*-1 *relA*1	New England Biolabs	Frankfurt a.M., Deutschland
Escherichia coli stbl2	F– *mcr*A Δ(*mcr*BC-*hsd*RMS-*mrr*) *rec*A1 *end*A1 *lon gyr*A96 *thi sup*E44 *rel*A1 λ– Δ(*lac-pro*AB)	Thermo Fisher	Waltham, MA, USA

2.16 Zelllinien

H720	Hybridoma-Zelllinie; produziert einen Antikörper gegen F-MuLV Env [212]
HEK 293A (ATCC® CRL-1573TM)	Humane embryonale Nierenepithelzellen, die die Ad5 E1-Genregion exprimieren (Invitrogen, Carlsbad, Deutschland)
HEK 293T (ATCC® CRL-3216TM)	Humane embryonale Nierenepithelzellen, die die Ad5 E1-Genregion und das große T-Antigen des Simian Virus 40 exprimieren
A549	Humane Lungentumorzelllinie, gewonnen aus einem Adenokarzinom der Lunge
27F11(TC31-27F11.C2)	Hybridoma Zelllinie zur Herstellung Ad5-spezifischer, bindender Antikörper [274]
9C12 (TC31.9C12.C9)	Hybridoma Zelllinie zur Herstellung Ad5-spezifischer, neutralisierender Antikörper [274]
Mus dunni (ATCC CRL-2017)	Murine Fibroblastenzelllinie [138]

2.17 Viren

Ad5.Empty	Rekombinantes Ad5 ohne Transgen [130]
Ad5.Env	Rekombinantes Ad5, das das Oberflächenprotein Env des F-MuLV kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [21]
Ad5.IL2	Rekombinantes Ad5, das das murine IL2 kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [21]
Ad5.IL23	Rekombinantes Ad5, das das murine IL23 kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [185]
Ad5.Luc3	Rekombinantes Ad5, das die Luciferase aus *Photinus pyralis* kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.Leader-Gag	Rekombinantes Ad5, das das leader-gag des F-MuLV kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [21]
Ad5.Leader-Gag_{C1K}	Rekombinantes Ad5, das das leader-gag des F-MuLV mit einem Aminosäureaustausch kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [93]

Ad5.GFP	Rekombinantes Ad5, das GFP kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [174]
Ad5.OVA	Rekombinantes Ad5, das Ovalbumin kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer)
Ad5.TxnGagL	Rekombinantes Ad5, das das GagL-Epitop aus F-MuLV als Fusionsprotein mit murinem Thioredoxin kodiert (erhalten von Dr. W. Bayer) [93]
FV	Komplex aus F-MuLV und dem *spleen focus forming virus* (SFFV) (erhalten von Dr. Wibke Bayer) in 10 %igem Milzhomogenat

2.18 Versuchstiere

Es wurden weibliche Mäuse verwendet, welche zu Beginn der Experimente mindestens 8 Wochen alt waren.

C57BL/6 ($H2^{b/b}$ $Fv1^{b/b}$ $Fv2^{r/r}$ $Rfv3^{r/r}$)	Harlan Laboratories	Rossdorf, Deutschland
CB6F1 ($H2^{b/d}$ $Fv1^{b/b}$ $Fv2^{r/s}$ $Rfv3^{r/s}$)	Charles River Laboratories Harlan Laboratories	Sulzfeld, Deutschland Rossdorf, Deutschland

2.19 Datenbanken

National Center for Biotechnology Information http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
Immune Epitope Database https://www.iedb.org

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.1.1 Erstellung eigener Oligonukleotide

Zur Amplifikation bestimmter Gene oder DNA-Fragmente zu Klonierungszwecken wurden anwendungsindividuelle Oligonukleotide erstellt. Hierfür wurde zunächst die DNA-Sequenz von Interesse in Vector NTI analysiert und potentielle Abschnitte ausgewählt. Die Oligonukleotide wurden nach Möglichkeit so gewählt, dass sie 20-30 bp lang waren und einen Guanin/Cytosin-Gehalt von 40-60 % besaßen. Zudem sollten die Oligonukleotide spezifisch und ausschließlich an die ausgewählte Zielsequenz binden. Für ein erfolgreiches Annealing wurden Schmelztemperaturen zwischen 50-80 °C gewählt, welche bei Oligonukleotidpaaren nicht zu stark voneinander abweichen sollten. Die Synthese der Oligonukleotide wurde von der Firma Biomers durchgeführt.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente ausgehend von einigen wenigen Kopien ursprünglicher Matrizen-DNA [176, 177]. Reaktionsansätze von je 50 µl wurden wie folgt pipettiert:

Tabelle 1:PCR Ansatz

Komponente		Menge/Volumen
5x PCR-Puffer		10 µl
Vorwärts-Primer	(1 pmol/µl)	10 µl
Rückwärts-Primer	(1 pmol/µl)	10 µl
dNTPs	(10 mM)	1 µl
Polymerase	(5 U/µl)	0,5 µl
Template-DNA		50 ng
A. dest		ad 50 µl

Zu Beginn der PCR wurde die Template-DNA bei 98 °C aufgeschmolzen. Hiernach wurden drei nachfolgende Phasen aus dem Aufschmelzen der DNA, dem Annealing, bei welchem eine Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge stattfand, sowie der Elongation, bei welcher das DNA-Molekül repliziert wurde, zyklisch wiederholt. Nach 30-40 Zyklen wurde die PCR durch eine abschließende Elongationsphase beendet und die PCR-Ansätze bei 4 °C gelagert. Die Dauer der einzelnen Schritte sowie die jeweilige

Temperatur waren von der verwendeten Polymerase und der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes abhängig und wurden individuell angepasst.

3.1.3 Direkte Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „NucleoSpin® Extracts II“ Kit (Macherey&Nagel) nach Angaben des Herstellers.

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte nach Zusatz von 6x DNA-Probenpuffer in horizontalen Gelelektrophoresekammern in 0,8-2 % (w/v) Agarosegelen. Hierfür wurde die Agarose durch Erhitzen in 1x TAE-Puffer gelöst. Beim anschließenden Abkühlen entsteht so ein Polymergeflecht mit unterschiedlicher Porengröße, welches die Auftrennung von Fragmenten verschiedener Größer ermöglicht. Zum Anfärben der Proben wurde dem Gel 1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die Gelelekrophorese wurde bei 5 V/cm in TAE-Puffer durchgeführt, die Laufdauer betrug im Durchschnitt 45 min und wurde der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst. Für sehr große (>10.000 kb) bzw. normal große (500-10.000 bp) Fragmente wurden 0,8 % (w/v) Gele verwendet. Die genauere Auftrennung sehr kleiner DNA-Fragmente (<800 bp) wurde in 2 % (w/v) Agarosegelen mit dem entsprechenden Größenstandard durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit einer Gel-Dokumentationsanlage unter UV-Licht ausgewertet und gewünschte DNA-Fragmente gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten.

3.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem „NucleoSpin® Extracts II“ Kit (Macherey & Nagel) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.6 Restriktionsendonukleasenverdau von DNA-Fragmenten

Zur zielgerichteten Klonierung von Fragmenten oder auch zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung wurden Verdaue von DNA-Fragmenten mithilfe von Restriktionsendonukleasen Typ II durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Restriktionendonukleasen der Firma New England Biolabs mit dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffersystem und nach den angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Bei analytischen Verdauen wurde eine Menge DNA mit 10 IU Enzym für 1-2 h bei 37 °C, verdaut während bei Restriktionen für präparative Anwendungen 10 µg DNA mit 10-20 IU über Nacht durchgeführt wurden.

3.1.7 DNA-Präzipitation (NaAc Fällung)

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5,2 und dem Dreifachen des Gesamtvolumens an eiskaltem 100 % EtOH versetzt und gevortext. Hiernach wurden die Ansätze >30 min bei maximaler Geschwindigkeit (ca. 10.000 g) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die ausgefallene DNA nachfolgend mit 200 µl 70 % EtOH für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit gewaschen. Nach Abnahme des Überstandes wurden die DNA daraufhin 10-15 min bei RT getrocknet und in RNAse/DNAse-freiem Wasser resuspendiert.

3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation zweier DNA-Fragmente wurden das einzufügende Fragment mit dem zuvor linearisierten Empfänger-Vektorrückgrat im Verhältnis 3:1 zusammen mit dem zugehörigen Puffer und der T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers in einem Ansatz von insgesamt 20 µL vermischt. Die Reaktion wurde für mehrere Stunden bei RT oder im Cycler über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.1.9 *Site-directed* Mutagenese über Kinase-Ligase-und *Dpn*I-(KLD) Reaktion

Die Zirkularisierung ganzer, über PCR amplifizierter, linearer Plasmidmoleküle geschah mit dem KLD Enzyme Mix Kit von NEB nach Angaben des Herstellers.

3.1.10 Kultur von Bakterien

Die Anzucht von *E. coli* DH5α oder stble2 erfolgte über Nacht bei 37 °C auf LB-Festmedium oder in LB-Schüttelkulturen bei 37 °C bzw. bei 30 °C und 300 rpm. Zur Selektion wurde dem Medium Carbenicillin oder Kanamycin (100 µg/ml) beigefügt.

3.1.11 Transformation von Bakterien

3.1.11.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien geschah mit dem Mix and Go! Competent Cells Kit von Zymo Research. 2x 50 ml Antibiotikum-freies Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 geschüttelt. Anschließend wurde das Wachstum der Bakterien durch 10-minütige Inkubation auf Eis gestoppt, bevor die Bakterien bei 2.500 g und 4 °C 10 min zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien anschließend vorsichtig in 10 ml 1x Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Die Bakterien wurden nachfolgend in 10 ml 1x Kompetent-Puffer resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C gelagert.

3.1.11.2 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

50 µl chemisch-kompetenter Bakterien (DH5α oder stbl2) wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 µl Ligationsansatz (oder bei Retransformationen mit 100-200 ng Plasmid-DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Die Inkubation wurde durch einen Hitzeschock für 30 s bei 42 °C beendet. Anschließend wurden die Bakterien in 250 µl warmem SOC-Medium aufgenommen und je nach Bakterienstamm bei 30 °C bzw. 37 °C auf dem Schüttler bei 250 rpm für 1 h regeneriert, bevor sie auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen wurden.

3.1.11.3 Herstellung elektrokompetenter Zellen

300 ml Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,8 angezogen. Das Wachstum der Bakteriensuspension wurde sodann durch 10-60 min Inkubation auf Eis angehalten und die Bakterien anschließend durch Zentrifugation bei 2.500 g und 4 °C für 10 min pelletiert. Das Bakterienpellet wurde nach Abgießen des Überstandes mit 50 ml eiskaltem Wasser + 15 % Glycerin gewaschen und nachfolgend für 30 min bei 2.500 g und 4 °C pelletiert. Dieser Waschvorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskaltem Wasser + 15 % Glycerin aufgenommen, in ein 50 ml Falcon überführt und erneut abzentrifugiert (2.500 g 10 min 4 °C). Final wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem Wasser + 15 % Glycerin resuspendiert, in 50 µl Aliquots portioniert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Benutzung bei -80 °C aufbewahrt.

3.1.11.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Nach dem Auftauen des Bakterien-Aliquots auf Eis wurden 10 µl der zu transformierenden DNA-Präparation hinzugegeben und vorsichtig mit den Bakterien vermischt. Der Bakterien-DNA-Mix wurde sodann in eine vorgekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt und mit dem Elektroporator bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω gepulst. Nach kurzer Zwischenlagerung auf Eis wurden die Bakterien mit 200 µl vorgewärmtem SOC-Medium aus der Küvette gespült und 1 h bei 30 °C und 250 rpm auf dem Schüttler regeneriert. Die Bakterien wurden anschließend auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausgestrichen und über Nacht kultiviert.

3.1.12 Plasmidisolation im analytischen Maßstab (Mini-Präp)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach Picken und Anzucht von Einzelkulturen in 3 ml LB-Medium mit zugesetztem Antibiotikum über Nacht. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation pelletiert und nachfolgend mit dem

NucleoSpin® Plasmid QuickPure von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

3.1.13 Plasmidisolation im präparativen Maßstab (Maxi-Präp)

Zur Aufreinigung größerer DNA-Mengen wurden 250 ml LB-Medium mit 250 µl aus einer Übernachtkultur angeimpft und über Nacht im Schüttler kultiviert. Die DNA wurde anschließend mit dem NucleoBond PC 500-Kit von Macherey und Nagel nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

3.1.14 Plasmidisolation im präparativen Maßstab (Cäsium-Präp)

Für eine größtmögliche DNA-Ausbeute wurden 2x 250 µl TB Medium mit jeweils 200 µl einer Über-Nacht-Vorkultur angeimpft und erneut über Nacht im Schüttler kultiviert. Die Bakterien wurden am nächsten Tag bei 6.000 g und 4 °C für 10 min pelletiert und nachfolgend in 10 ml P1 Puffer mit RNAse resuspendiert. Zunächst wurden 20 ml P2 Lyse-Puffer hinzugefügt, durch vorsichtiges mehrmaliges Invertieren gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse der Zellen wurde durch Hinzugabe von 30 ml P3 Neutralisationspuffer und anschließendes mehrmaliges Invertieren abgestoppt. Zur Entfernung von Zelldebris wurden die Proben bei 12.500 g 4 °C 15 min zentrifugiert und der Überstand anschließend durch Passage über einen angefeuchteten Faltenfilter in 2x 50 ml Falcons überführt. Zu den Proben wurde das 0,7x Volumen Isopropanol gegeben und die Proben hiernach mind. 30 min bei 12.500 g und 4 °C gefällt. Die Überstände wurden gründlich entfernt und die DNA-Pellets beider Falcons in insgesamt 4 ml P1 Puffer resuspendiert, mit 4,6 g Cäsiumchlorid und 40 µl Ethidiumbromid versetzt und in Ultrazentrifugenröhrchen transferiert. Die Proben wurden sodann für 4 h bei 80.000 g und 20 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Bei der Zentrifugation entstand eine mit Ethidiumbromid intensiv gefärbte Bande im Röhrchen, welche nachfolgend mit einer Kanüle vorsichtig abgesaugt und in ein 15 ml Falcon überführt wurde. Die Proben wurden auf ca. 4 ml mit 1x TE-Puffer aufgefüllt und zur Entfernung des Ethidiumbromids mehrmals mit 4 ml 2-Butanol + 10 % TE ausgeschüttelt, wodurch sich zwei Phasen voneinander absetzten. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die untere, DNA-haltige Phase komplett entfärbt war. Hiernach wurde das Probenvolumen mit 1x TE-Puffer auf 5 ml eingestellt und mit dem 0,7x Volumen an Isopropanol versetzt. Die Proben wurden 30 min bei 12.500 g und 20 °C gefällt und anschließend mit 5 ml 70 % EtOH bei 12.500 g, 4 °C 10 min gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurden die DNA-Pellets bei RT getrocknet und anschließend in 1x TE-Puffer, PBS oder H_2O aufgenommen.

3.1.15 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösung wurde mithilfe des Nanodrop durchgeführt. Hierfür wurde zunächst durch Verwendung des jeweiligen Lösungsmittels der Messhintergrund abgezogen und anschließend die OD_{260nm} der Probe bestimmt und von der Nandrop-Software mit $1 \cdot OD_{260nm} \triangleq 50$ µg/ml dsDNA umgerechnet.

3.1.16 Sequenzierung

Sequenzierungen von DNA-Fragmenten wurden von der Firma LGC Genomics (Berlin, Deutschland) durchgeführt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen

Zur Analyse der Protein-Expression wurden Zellen aus der Vertiefung einer 6-well-Platte mit 100-200 µl Böhringer-Lysepuffer inkubiert. Hiernach wurden 20 µl der zu analysierenden Probe vor dem Auftragen mit 5 µl 5x SDS-Probenpuffer vermischt und 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach der Denaturierung und Maskierung der Protein-eigenen Ladung durch das SDS wurden die Proben durch Vortexen gemischt und kurz abzentrifugiert. Die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde nach [137] durchgeführt. Als Größenstandard wurde der Precision Plus Protein Dual Color Standard von BioRad verwendet. Die verwendeten Gele wurden nach folgender Anleitung hergestellt, die Mengenangaben sind jeweils für zwei Gele ausreichend.

Tabelle 2: Gel-Zusammensetzung bei der SDS-PAGE

	Trenngel 10 %	Sammelgel
2 M Tris pH 8,8	6 ml	
0,5 M Tris pH 6,8		2 ml
Acrylamidlösung (30 %)	4 ml	560 µl
H_2O	1,8 ml	1,4 ml
SDS 10 %	120 µl	40 µl
APS	120 µl	40 µl
TEMED	10 µl	6 µl

Die Auftrennung erfolgte in Gelkammern bei 140 V für 1,5 h in Laufpuffer. Nach erfolgreicher Auftrennung wurden die Proteine mittels Western Blot zur Detektion auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen.

3.2.2 Western Blot

Der elektrophoretische Transfer der Proteine aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte nach [265] in Mini Protean 3®- Systemen von Biorad in Transferpuffer. Die Dauer des Transfers betrug 1 h bei 100 V.

3.2.3 Immunodetektion

Nach Beendigung des Transfers wurden unspezifische Bindestellen der Nitrozellulosemembran mindestens 30 min bei RT mit Blockierungspuffer (PBS-T mit 5 % Magermilchpulver) abgesättigt, ehe über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei RT der Erstantikörper, in einer 5 % Magermilchlösung in PBS-T, appliziert wurde. Am nächsten Tag erfolgten zunächst Waschschritte (5x 5 min PBS-T), bevor die Membranen mit den jeweiligen sekundären Antikörpern inkubiert wurden. Anschließend wurden die Membranen erneut 5x 5 min mit PBS-T gewaschen. Zum Nachweis wurde das ECL ChemiGlow System von Alpha Innotech/Biozym nach Angaben des Herstellers verwendet und die Chemilumineszenz mithilfe von Röntgenfilmen detektiert.

3.2.4 Antikörper-Aufreinigung aus Hybridoma-Überständen

Die Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen von Hybridoma-Zellen geschah mithilfe von Protein A/G-Agarose-Chromatographiekolumnen. Die Chromatographiesäule wurde zunächst mit 30 ml Bindepuffer äquilibriert, bevor der aufzureinigende Überstand auf die Säule gegeben wurde. Nach Durchlaufen des kompletten Überstandes wurde die Säule mit 30 ml Bindepuffer gewaschen und nachfolgend mit 10 ml Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde hierbei in 10 Fraktionen aufgefangen und jeweils mit 200 µl Neutralisationspuffer vermischt, bevor der Proteingehalt photometrisch am Nanodrop bestimmt wurde. Der aufgereinigte Antikörper wurde vor der Verwendung über Nacht in Dialysekammern gegen 1-2 l PBS entsalzt. Nach Bedarf wurde eine Aufkonzentration mit entsprechenden Aufkonzentrierungsröhrchen der Firma Milipore durchgeführt.

3.2.5 Entfernen von Antikörpern aus Serum mittels Protein G-Sepharose-Beads

Vor der Verwendung wurden die Protein G-Sepharose-Beads 1 min bei 2.500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Beads im selben Volumen PBS aufgenommen, gevortext und erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt 5x durchgeführt. Hiernach wurden die Beads im ursprünglichen Volumen PBS aufgenommen. 200 µl Serum wurden durch Vortexen mit 50 µl Beads vermischt und anschießend 3 h oder über Nacht bei 4 °C auf dem Rollinkubator inkubiert. Nach der

Inkubation wurde das Serum 1 min bei 2.500 g herunterzentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und erneut mit frischen Protein G-Sepharose-Beads inkubiert. Dieser Vorgang wurde 5x wiederholt.

3.3 Zytologische Methoden

3.3.1 Kultivierung von adhärenten Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte abhängig vom Zelltyp in unterschiedlichen Nährmedien. Zur Vermehrung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Passage der Zellen erfolgte im Abstand von zwei bis drei Tagen. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, dann mit 1x Trypsin/EDTA behandelt, um die Zellen vom Flaschenboden und voneinander zu lösen und anschließend im jeweiligen Medium resuspendiert. Für eine präzise Aussaat wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium ausgesät.

3.3.2 Kultivierung von Suspensionszelllen und Antikörperherstellung (Hybridomazellen)

Die Kultivierung der Hybridomazelllinien erfolgte in Hybridoma-Medium mit FCS. Zur Vermehrung wurden die Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 bei 90 % relativer Luftfeuchtigkeit bis zu einer Zelldichte von $5 \cdot 10^5$-$1 \cdot 10^6$ Zellen/ml inkubiert. Bei ausreichender Zelldichte wurde das Volumen der Zellkultur durch Zugabe von frischem Medium bis zu einem Endvolumen von 100 ml verdoppelt. Hiernach wurden die Zellen zentrifugiert (1.000 g, 6 min) und in insgesamt 200 ml FCS-freiem Hybridoma-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 300 cm^2 Zellkulturflaschenüberführt und bis zur Gelbfärbung des Mediums kultiviert. Hiernach wurde der Zellüberstand durch Zentrifugation geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.3.3 Zellen einfrieren und auftauen

Zum Erstellen von Gefrierkulturen wurden Zellen bis zu einer Konfluenz von ungefähr 80 % angezogen. Der Überstand wurde abgeschüttet und Medienrückstände durch Waschen mit PBS entfernt. Dann wurden die Zellen zum Ablösen vom Boden der Zellkulturflasche und voneinander mit 1x Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Nachfolgend wurden die Zellen in FCS resuspendiert, in Cryo-Gefäße aliquotiert, mit 10 % DMSO versetzt und über Nacht in einem Isolationsbehälter bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen zur längerfristigen Lagerung in einen Stickstofftank überführt und dort bei -193 °C gelagert.

Nach raschem Wiederauftauen wurden die Zellen in warmes Medium überführt, 1x bei 1000 g für 10 min bei 25 °C zentrifugiert und nachfolgend in warmen Medium wiederaufgenommen und kultiviert.

3.3.4 DNA Transfektion von Zellen mittels Calcium-Phosphat-Methode

Die zu transfizierende DNA wurde in 219 µl Wasser aufgenommen. Hierzu wurden 31 µl 2 M Calciumchlorid gegeben und die Mischung gevortext. Im Anschluss wurden tropfenweise 250 µl 2x HEPES-gepufferter Saline (HBS) hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde ein kompletter Transfektionsansatz auf vorbereitete Zellen mit einer Konfluenz von ungefähr 70 % in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche gegeben. Nach 4 h-6 h Inkubation wurde das Medium gegen frisches Medium ausgewechselt.

3.3.5 DNA Transfektion von Zellen mittels Polyethylenimin (PEI)

Die zu transfizierende DNA wurde in 125 µl Medium ohne Zusätze aufgenommen. In einem weiteren Eppendorfgefäß wurden 125 µl Medium ohne Zusätze mit 15 µl Polyethylenimin (PEI) pipettiert. Die Inhalte beider Gefäße wurden hiernach zueinander gegeben und durch 10 s Vortexen gut vermischt. Während der 20 min Inkubationsdauer wurden Zellen in 25 cm^2 Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und in Medium mit 1,5 % FCS, aber ohne sonstige Zusätze aufgenommen. Nach Ablaufen der Inkubationszeit wurden die Transfektionsansätze auf die Zellen gegeben und das Medium am nächsten Morgen gegen frisches Vollmedium ausgewechselt.

3.3.6 Anzucht von Adenoviren

Für die Anzucht adenoviraler Vektoren wurden HEK-293 A-Zellen mit 10 µg der entsprechenden DNA in 25 cm^2 Flaschen transfiziert. Hierfür wurde die DNA zuvor über Nacht verdaut, gefällt und anschließend über PEI-Transfektion in die Zellen eingebracht. Bei Rekonstitutionen mehrerer Plasmide in HEK-293 A-Zellen wurden die Zellen nach 3 Tagen auf eine 75 cm^2 Zellkulturflasche passagiert. Nach Einsetzen eines vollständigen zytopathischen Effekts wurde der gesamte Inhalt der Flaschen abgenommen, in 50 ml Falcongefäße überführt und 8 min bei 1.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml abgenommen und die Zellen in diesem Restvolumen resuspendiert. Durch 3x Frieren in flüssigem Stickstoff mit direktem Wiederauftauen wurde Virus durch die Zerstörung noch intakter Zellen befreit. Die Zelltrümmer wurden durch erneute Zentrifugation entfernt. Die Virusüberstände wurden hiernach entweder eingefroren oder zur Infektion des nächst größeren Zellkulturvolumens verwendet. Für eine kleine Virusaufreinigung wurden die Viren auf 2x 300 cm^2 Zellkulturflaschen expandiert. Für große Aufreinigungen wurde Virus auf 10x 300 cm^2 Zellkulturflaschen angezogen.

3.3.7 Aufreinigung von Adenoviren

Für die Aufreinigung von adenoviralen Vektoren aus Zellkulturüberständen wurde das Vivapure® AdenoPACK™20 für kleine Virusaufreinigungen, bzw. das AdenoPACK™100 für große Virusaufreinigungen nach Herstellerangaben verwendet.

3.3.8 Titerbestimmung mittels $TCID_{50}$

Der $TCID_{50}$ dient zur Bestimmung der vorhandenen infektiösen Partikel einer Virusaufreinigung [165]. Zunächst wurden $1 \cdot 10^4$ HEK-293 A-Zellen pro Vertiefung in 100 µl Medium auf einer 96-Loch-Flachbodenplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurden Verdünnungen einer Virusaufreinigung hergestellt. Hierfür wurden 118,8 µl Medium in jede Vertiefung der ersten Reihe der Platte pipettiert und 108 µl in jede nachfolgende. In jedes erste Loch wurden 1,2 µl der Virusaufreinigung pipettiert. Nach sorgfältigem Vermischen wurden hiervon jeweils 12 µl sukzessiv in die nächste Vertiefung überführt und so weiterverdünnt. 100 µl jeder Verdünnung wurden anschließend in jeder Vertiefung der vorbereiteten 96-Loch Flachbodenplatte überführt. Nach fünf Tagen wurde der zytopathische Effekt in jeder Vertiefung beurteilt und mit dem Quotienten jeder Verdünnung die $TCID_{50}$ nach der folgenden Formel berechnet:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)}$$

Hierbei ist d der $\log_{10}$ der Verdünnung und S die Summe der Quotienten.

3.3.9 Titerbestimmung über die optische Dichte

Zur Bestimmung der Partikelzahl in einer Virusaufreinigung wurden 8 µl der Aufreinigung mit 72 µl OD-Lysepuffer vermischt und 20 min bei 56 °C unter Schütteln erhitzt, wodurch die viralen Kapside zerstört wurden. Die hierbei freigesetzte DNA kann durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm gemessen werden und zur Bestimmung der Partikeleinheiten nach der folgenden Formel verwendet werden Dichte [165].

$$virale\ Partikel/ml = OD_{260} \cdot Verdünnungsfaktor \cdot 1,1 \cdot 10^{12}$$

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Vakzinierungen

3.4.1.1 DNA-Vakzinierung

Bei der Immunisierung mit DNA-Plasmiden wurden die Mäuse zunächst durch Gabe einer 1,5 % Ketamin/0,1 % Xylazin-Mischung narkotisiert. 25 µg Plasmid-DNA wurden in 30 µl PBS verdünnt und in den *M. gastrocnemius* injiziert. Anschließend wurde der Muskel elektroporiert, um die Aufnahme der DNA durch die Muskelzellen zu verbessern. Die Immunisierung wurde einmalig, oder als Prime-Boost Immunisierungsschema im Abstand von 3 Wochen durchgeführt.

Tabelle 3: Elektroporationsprotokoll

Gruppe	Impuls-Amplitude	Impuls-Breite	Impuls-Intervall	Gruppen-Intervall	Impuls-Anzahl
1	450 V (1125 V/cm)	0,05 ms	0,2 ms	50 ms	2
2	110 V (275 V/cm)	10 ms	20 ms	50 ms	8

Protokoll modifiziert nach [217]

3.4.1.2 Adenovirus-Vakzinierung

Bei der Immunisierung von Mäusen mit adenoviralen Vektoren wurden $1 \cdot 10^9$ virale Partikel (vp) in 30 µl PBS in den *M. gastrocnemius* injiziert. Die Immunisierung erfolgte entweder als einfache Immunisierung, oder als Prime-Boost im Abstand von 3 Wochen.

3.4.2 Belastungsinfektion

Suszeptible CB6F1 Mäuse wurden mit 2.500 SFFU (spleen focus forming units) FV in einem intravenös injizierten Volumen von 100 µl infiziert. Nach Immunisierung mit Env-kodierenden adenoviralen Vektoren wurde eine Inokulationsdosis von 500 SFFU FV verwendet.

3.4.3 Kontrolle des Infektionsverlaufs

3.4.3.1 Palpation der Milz

Zur Kontrolle des Krankheitsverlaufs wurde zweimal wöchentlich die Größe der Milz durch Palpation bestimmt. Hierfür wurden die Mäuse zunächst durch Inhalation mit Isofluran betäubt und die Größe der Milz am entspannten Tier abgetastet. Die Milzgrößen wurden

Kategorien von 1 (nicht vergrößert) bis zu 4 (sehr stark vergrößert) zugewiesen. Die folgende Tabelle gibt zu jeder Kategorie das entsprechende Milzgewicht an:

Tabelle 4: Korrelation zwischen Palpationskategorie und Milzgewicht

Kategorie	1	2	3	4
Milzgewicht	< 0,5 g	0,6 – 1,2 g	1,2 – 1,7 g	> 1,7 g

3.4.3.2 Retroorbitale Blutentnahme

Durch Inhalation mit Isofluran betäubten Mäusen wurden 6-8 Tropfen Blut aus dem Aderngeflecht hinter dem Augapfel entnommen. Das Blut wurde zur Gerinnungshemmung mit 2,5 U Heparin versetzt. Anschließend wurde das Blut 8 min bei 1.500 g und 4 °C zentrifugiert, das Plasma abgenommen und für Antikörper-Untersuchungen bei -20 °C bzw. zur Untersuchung der Virämie bei -80 °C gelagert.

3.4.4 Bestimmung der Viruslast

3.4.4.1 Bestimmung der Plasma-Virämie (Virämie-Assay)

In einer 96-Loch Platte wurden Plasmaverdünnungen der zu untersuchenden Proben hergestellt. Hierfür wurden 100 µl PBS in die erste Vertiefung und jeweils 80 µl in die nachfolgenden Vertiefungen pipettiert. In die erste Vertiefung wurden nun jeweils 10 µl Plasma gegeben und gemischt. Anschließend wurden jeweils 40 µl seriell in das nächste Loch überführt und gemischt. Am Tag zuvor wurden 24-Loch Platten mit 7.500 *Mus dunni* Zellen pro Vertiefung ausplattiert. In jede Vertiefung wurden nun 25 µl Polybren (80 µg/ml) gegeben und für mindestens 1 h inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 50 µl jeder Plasma-Verdünnung auf die 24-Loch-Platten übertragen und die Platten 3-4 Tage kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 96 % Ethanol fixiert, anschließend zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 200 µl AK720 inkubiert. Die Platten wurden erneut zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und danach mit je 200 µl/Vertiefung des HRP-gekoppelten αMaus-Sekundärantikörpers (1:400 in PBS verdünnt) für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.
Anschließend wurden die Platten einmal mit PBS + 0,1 % BSA und einmal mit reinem PBS gewaschen, bevor sie durch Zugabe von 500 µl AEC-Gebrauchslösung entwickelt wurden. Die Färbung der Platten wurde durch ausgiebiges Waschen mit Wasser nach der Bildung deutlicher, roter Punkte angehalten.

3.4.4.2 Immunzytochemische Bestimmung der Viruslast in der Milz (*Infectious Center* (IC)-Assay)

Für jedes zu untersuchende Tier wurde eine 6-Loch Platte mit $2 \cdot 10^4$ *Mus dunni* Zellen pro Vertiefung am Vortag ausgesät. 21 dpi wurden mit FV-infizierte Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Milzen entnommen. Die Milzen wurden anschließend gewogen, zerrieben und in 10 ml PBBS aufgenommen. Mithilfe eines Zellzählers wurde die Zellzahl bestimmt und auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Von den eingestellten Milzzellsuspensionen wurden Verdünnungen in RPMI-Medium angefertigt. Hierfür wurden 200 µl in 1,8 ml verdünnt, gemischt und dann jeweils konsekutiv 1:10 weiterverdünnt. Jeweils 1 ml jeder Verdünnung wurde auf die vorbereitete 6-Loch-Platte aufgetragen und die Platten bis zur Konfluenz 3-4 Tage kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit 96 % Ethanol fixiert, anschließend zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 800 µl AK720 inkubiert. Die Platten wurden erneut zweimal mit PBS + 0,1 % BSA gewaschen und danach mit je 800 µl/Vertiefung des HRP-gekoppelten αMaus-Sekundärantikörpers (1:400 in PBS verdünnt) für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert.
Anschließend wurden die Platten einmal mit PBS + 0,1 % BSA und einmal mit reinem PBS gewaschen, bevor sie durch Zugabe von 2 ml AEC-Gebrauchslösung entwickelt wurden. Die Färbung der Platten wurde durch ausgiebiges Waschen mit Wasser nach der Bildung deutlicher, roter Punkte angehalten.

3.4.5 Bestimmung der humoralen Immunantwort

3.4.5.1 αAd-/ αOVA-*Enzyme-Linked Immunosorbent* Assay (ELISA)

Zum Nachweis bindender Antikörper wurde eine Maxisorp 96 Loch Platte mit in Coating Puffer gelöstem Antigen ($3{,}9 \cdot 10^{10}$ vp Ad5.Empty pro Platte bzw. 10 µg/ml Ovalbumin pro Platte in 10 ml Coating-Puffer; davon 100µl/well) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte 5x mit PBS + 0,1 % Tween gewaschen und anschließend mit 300 µl PBS + 10 % FCS pro Vertiefung zunächst 20 min bei RT, danach mind. 10 min bei 4 °C geblockt. Jede Probe wurde mehrfach in Zehnerschritten in PBS + 10 % FCS verdünnt. Von den Verdünnungen wurden je 100 µl pro Vertiefung auf die geblockte und ausgeklopfte ELISA-Platte gegeben und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte erneut 5x mit PBS + 0,1 % Tween gewaschen und ausgeklopft. Abhängig vom verwendeten Serum wurde ein αMaus-IgG-Peroxidase-Zweitantikörper 1:15.000 bzw. mit ein αMensch-IgG-Peroxidase-Zweitantikörper 1:10.000 in PBS + 10 % FCS verdünnt und zu 100 µl/Vertiefung auf die ELISA-Platte aufgetragen. Die Platte wurde anschließend für 1 h bei RT inkubiert. Hiernach wurde die ELISA-Platte erneut 5x mit

PBS + 0,1 % Tween gewaschen, ausgeklopft und nach Zugabe von 100 µl TMB(+)-Substrat pro Vertiefung im Dunkeln entwickelt. Nach Auftreten einer distinkten Blaufärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N H_2SO_4 in jede Vertiefung abgestoppt und die Absorption der Proben bei 450 nm/620 nm gemessen. Für die Auswertung der ELISA-Platten wurden die Mittelwerte der niedrigsten Verdünnungen der Negativkontrollen ermittelt und mit 2 bzw. 3 multipliziert. Hieraus ergab sich der 2x bzw. 3x Cut-off, mit welchem positive Proben von Messhintergrund unterschieden wurden.

3.4.5.2 In vitro Neutralisationstest

Am Vortag wurden zunächst $1 \cdot 10^4$ A549 Zellen in jeder Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte in 100 µl Medium ausgesät. Die zu überprüfenden Plasmaproben wurden in einer 96-Loch-Rundbodenplatte in Medium 6x konsekutiv 1:5 verdünnt. In einer weiteren 96-Loch-Rundbodenplatte wurden sodann 10 µl der Plasmaverdünnungen mit 20 µl verdünntem Überstand eines GFP-exprimierenden Adenovirus vermischt. Die Viren wurden so verdünnt, dass die nicht neutralisierte Infektion in einer Vertiefung in 100-200 grünen Zellen resultierte. Hierfür wurden 20 µl Virusüberstand mit 10 µl Medium vermischt. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden zu jedem Neutralisationsansatz 20 µl frisches Medium gegeben. Nach Entfernen des kompletten Mediums von den vorbereiteten A549 Zellen wurden die 50 µl Neutralisationsansatz auf diese gegeben und für eine weitere Stunde bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Hiernach wurden den Zellen weitere 150 µl Medium gegeben und die Platten 2-3 Tage inkubiert, bevor sie am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet wurden.

3.4.5.3 F-MuLV *Enzyme-Linked Immunosorbent* Assay (ELISA)

Zur Bestimmung bindender Antikörper im Plasma wurden Maxisorp 96-Loch Platten mit 0,5 µg F-MuLV Antigen in 100 µl pro Vertiefung bei 4 °C über Nacht beschichtet. Anschließend wurden die Platten 5x mit PBS + 0,5 % Tween gewaschen und nachfolgend mit 10 % FCS in PBS blockiert. Die zu untersuchenden Proben wurden jeweils konsekutiv 1:5x verdünnt und 100 µl der Verdünnungen auf der Platte für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden erneut gewaschen und mit dem αMaus IgG-HRP in einer 1:15.000 Verdünnung 100 µl pro Vertiefung inkubiert. Nach Zugabe von TMB(+) Substrat wurden die Platten für 15 min oder bis zu einer intensiven Blaufärbung im Dunkeln entwickelt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 1 N H_2SO_4 pro Vertiefung angehalten und im Anschluss wurde mit einem Plattenlesegerät die Absorption bei 450 nm gemessen. Zur Bestimmung der positiven Proben wurde aus den Negativ-Kontrollen der Hintergrund mittels 2x bzw. 3x Cut-off ermittelt.

3.4.5.4 F-MuLV Neutralisationstest

Der Nachweis neutralisierender Antikörper wurde sowohl mit vor der Infektion gewonnenem, als auch mit Plasma aus infizierten Mäusen (10 dpi) durchgeführt. Durch Erhitzen der Proben für 30 min bei 56 °C wurde potenziell enthaltenes Virus zunächst abgetötet. Plasmaverdünnungen wurden in einer 96-Loch-Platte in der ersten Vertiefung 1:4 und nachfolgend konsekutiv 1:2 in PBS angelegt. In einer weiteren 96-Loch-Platte wurden jeweils 15 µl der Plasmaverdünnungen mit 15 µl verdünntem F-MuLV und 10 µl 1:3 verdünntem Meerschweinchen-Komplement gemischt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die F-MuLV Verdünnung sollte 80-100 Foci in der antikörperfreien Negativkontrolle ergeben. Als Positivkontrolle wurden 15 µl des AK48 verwenden. Am Vortag wurden 24-Loch-Platten mit jeweils 7500 *Mus dunni* Zellen pro Vertiefung ausgesät, welche nun nach Zugabe von 25 µl Polybren (80 µg/ml) für mind. 1 h inkubiert wurden. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die F-MuLV-Plasma-Komplement-Ansätze auf die Platten gegeben und die Platten drei Tage bis zur Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Platten, wie beim Virämie-Assay bereits beschrieben, entwickelt. Eine Reduktion der Anzahl der Foci um mind. 75 % galt als Neutralisation.

3.4.6 Bestimmung der zellulären Immunantwort

3.4.6.1 Probenvorbereitung

Bei den durchflusszytometrischen Analysen wurden sowohl Milzzellen, als auch Blutzellen immunologisch gefärbt. Hierfür wurden Milzen wie bereits unter 3.4.4.2 beschrieben homogenisiert und die resultierende Einzelzellsuspensionen verwendet. Für die Verwendung von Blutzellen wurden im Blut enthaltene Erythrozyten durch die Behandlung mit 5 ml ACK-Lysepuffer bei RT aufgelöst. Nach 10-15 min wurde die Lyse durch Zugabe von 10 ml PBS angehalten und die Proben anschließend 8 min bei 1500 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem kleinen Restvolumen resuspendiert und für anschließende Färbungen bzw. Stimulationen auf 96-Loch-Platten aufgeteilt.

3.4.6.2 Peptidstimulation

Zellen wurden in 200 µl R10 Medium in Anwesenheit von 2 µg/ml BFA mit 1 µg/ml Peptid für 6 h im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO_2 stimuliert.

3.4.6.3 Oberflächenfärbung

Zur Anfärbung von Oberflächenproteinen für anschließende Messungen mit dem Durchflusszytometer wurden Zellen in 96-Loch-Platten 3 min bei 450 g ungekühlt abzentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Zellen wurden durch Beklopfen der

Platten gelockert. In FACS-Puffer wurden Färbemixe unterschiedlicher Antikörper gegen Oberflächenmarker in den üblichen Verdünnungen hergestellt und 50 µl davon wurden auf die Zellen gegeben. Die Oberflächenfärbung wurde für 10-20 min bei RT im Dunkeln durchgeführt. Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe von 150 µl FACS-Puffer abgestoppt und die Platten abzentrifugiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Platten erneut mit 200 µl FACS-Puffer pro Vertiefung gewaschen, erneut abzentrifugiert und entsprechend der weiteren Verwendung aufgenommen. Nach der ersten Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die Platten lichtgeschützt behandelt.

3.4.6.4 Intrazelluläre Färbung

Vor der Färbung intrazellulärer Moleküle wurden die Zellen zunächst 3 min bei 450 g abzentrifugiert und in 200 µl 2 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert. Der Paraformaldehyd wurde durch Zentrifugation entfernt und die Zellen nachfolgend durch Zugabe von 50 µl in Permeabilisierungs-(Perm-)Puffer verdünnten Antikörpern gefärbt. Die Färbung erfolgte für 30 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C im Dunkeln und wurde durch Zugabe von 150 µl Perm-Puffer beendet. Die Zellen wurden erneut mit 200 µl Perm-Puffer gewaschen und in FACS-Puffer aufgenommen. Die Antikörpersignale wurden anschließend am Durchflusszytometer gemessen.

3.4.6.5 Multimerfärbung (Tetramer/Dextramer)

Zur Anfärbung antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wurden MHC-I-$GagL_{85-93}$-Tetramere (PE-MHC-I-AbuAbuLAbuLTVFL bzw. MHC-I-OT-I-Dextramere (APC-MHC-I-SIINFEKL) verwendet. Die Multimere basieren auf einem Streptavidin- bzw. einem Dextran-Rückgrat, an welches mehrere MHC-I-Antigen-Komplexe, sowie Fluorochrome gebunden sind. Im Gegensatz zu monomeren MHC-I-Molekülen erhöht sich bei der Verwendung von Multimeren die Avidität zwischen den Färb-Molekülen und den T-Zellen, da mehrere MHC-I-Antigen-Komplexe gleichzeitig binden können. Hierdurch wird die Färbungseffizienz verbessert.

Die MHC-I-Multimerfärbung wurde an Blutzellen durchgeführt. Das $GagL_{85-93}$-MHC-I-Tetramer wurde hierfür 1:100 verdünnt, das OTI-MHC-I-Dextramer wurde 1:25 verdünnt eingesetzt. Die Färbung erfolgte für mind. 30 min im Dunkeln und konnte mit anderen Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle kombiniert werden.

3.4.6.6 IFNγ-*Enzyme-Linked Immunosorbent Spot* Assay (ELISpot)

Der ELISpot bietet neben der durchflusszytometrischen Analyse eine sehr sensitive Alternative zur Detektion und Quantifikation IFNγ-produzierender Zellen. Hierfür werden die ELISpot-Platten zunächst 4x mit PBS gewaschen und anschließend mindestens

30 min mit R10 Medium (+10 % FCS) konditioniert. Anschließend wurden $1 \cdot 10^6$ homogenisierte Milzzellen in 100 µl R10 Medium mit 100 µl 2x Stimulationsmix in den Vertiefungen vermischt und nachfolgend bei 37 °C und 5 % CO_2 für 42 h stimuliert. Hierbei war es wichtig, dass die Platten während der Stimulation nicht bewegt wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen verworfen und die Platten 5x mit jeweils 200 µl PBS gewaschen. Der Detektionsantikörper R4-6A2-Biotin wurde auf eine Konzentration von 1 µg/ml in PBS mit 0,5 % verdünnt. 100 µl davon wurden in jede Vertiefung einer Platte pipettiert und die Platten anschließend 2 h bei RT inkubiert. Hiernach wurden die Platten erneut 5x mit PBS gewaschen. HRP-gekoppeltes Streptavidin wurde sodann 1:1000 in PBS mit 0,5 % FCS verdünnt und zu je 100 µl in jeder Vertiefung jeder Platte pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Ungebundenes Streptavidin wurde durch 5x Waschen mit PBS entfernt und die Platte durch Hinzugeben von TMB(+) Substrat bis zur Bildung deutlicher blauer Punkte entwickelt. Die Blaufärbung wurde durch Waschen mit vollentsalztem Wasser beendet und die Platten nach dem Trocknen an einem entsprechenden ELISpot-Lesegerät ausgewertet.

3.4.6.7 Zellisolation mit der MACS-Technologie

Die Isolation unterschiedlicher Zellpopulationen geschah aus homogenisierten Einzelzellsuspensionen der Milz (in 10 ml PBBBS) oder der poplitealen, inguinalen, brachialen, axillaren sowie zervikalen Lymphknoten (in 5 ml PBBS). Nach Zentrifugation für 10 min bei 300 g und 4 °C wurden die Überstände verworfen und die Zellen in 900 µl MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert und mit 100 µl der entsprechenden Micro Beads vermischt. Nach einer 15 minütigen Inkubation bei 4 °C wurden 10 ml MACS-Puffer zu den Zellen gegeben und dann erneut 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 5 ml MACS-Puffer pro $1 \cdot 10^8$ Zellen aufgenommen. Zellklumpen wurden durch Filtration durch ein Zellsieb entfernt. Die Isolation geschah mit dem AutoMACS Pro nach Angaben des Herstellers.

3.4.6.8 Zell-Transfer

Nach erfolgter Zellisolation wurden die Effizienz der Isolation, der Zustand der Zellen am Durchflusszytometer und am Mikroskop, sowie die Zellzahl überprüft. Die Zellen wurden 10 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert und nachfolgend mit PBS mit Heparin (1000 U/ml) auf $1 \cdot 10^7$ eingestellt

3.4.6.9 Statistische Analysen

Statische Analysen erfolgten mit der GraphPad Prism 6 Software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Die Analyse statistischer Unterscheide zwischen zwei Gruppen wurden mit dem t-Test durchgeführt. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde eine

einfaktorielle Varianzanalyse (one way ANOVA) mit dem Kruskal-Wallis Test und dem Dunn-Mehrfachvergleichsverfahren verwendet. Die Signifikanz der Daten wurde über den p-Wert ermittelt (für * $P < 0{,}05$, ** $P < 0{,}01$, *** $P < 0{,}001$ und **** $P < 0{,}0001$).

4. Ergebnisse

Adenovirus 5 (Ad5) -basierte Vektoren sind bekannt für ihr Potenzial, starke Transgen-spezifische CD8⁺ T-Zellantworten zu induzieren. Durch den Vektor induzierte Immunantworten können aber die Breite Transgen-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten limitieren und gegen Transgen-kodierte, subdominante CD8⁺ T-Zell-Epitope gerichtete Antworten supprimieren. Im Folgenden sollte daher der Einfluss der Vektor-induzierten Immunität auf die Immunisierung mit dem Friend Virus (FV) $GagL_{85-93}$-Epitop untersucht werden.

4.1 Konkurrenz adenoviraler Epitope mit Transgen-kodierten Epitopen in der Ad5-basierten Immunisierung

4.1.1 Vorarbeiten: Immundominanz adenoviraler Epitope über das FV $GagL_{85-93}$-Epitop

Die Daten des folgenden Abschnittes entstammen den medizinischen Doktorarbeiten von Herrn Dr. Philipp Gödel und Herrn Dr. Dominik Schöne.

Für das FV wurde bisher nur das $GagL_{85-93}$-CD8⁺ T-Zell-Epitop beschrieben, gegen das während einer akuten Infektion ca. 30 % der aktivierten CD8⁺ T-Zellen gerichtet sind [291]. Dieses Epitop ist in der Leader-Region des FV Gag-Proteins lokalisiert, die bei der Verwendung eines dem *gag*-Gen vorgelagerten, alternativen Start-Codons transkribiert

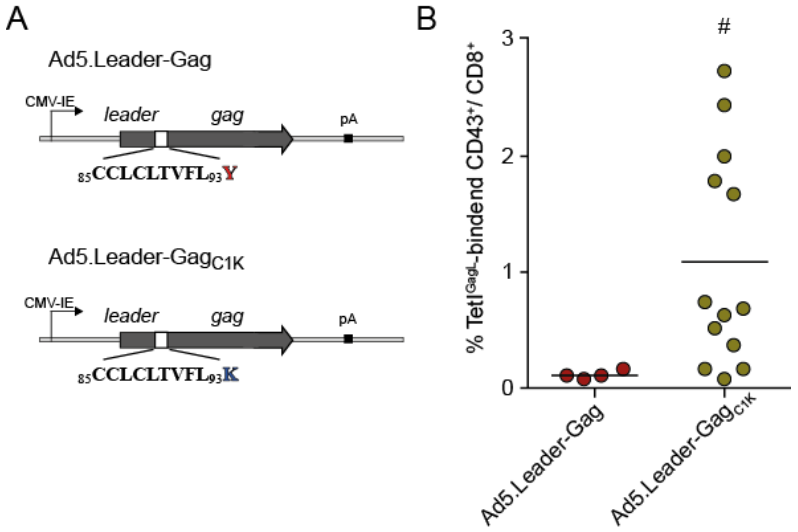

Abbildung 10: Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten nach Impfung mit den adenoviralen Vektoren Ad5.Leader-Gag oder Ad5.Leader-Gag_{C1K}

CB6F1-Mäuse wurden entweder mit Ad5.Leader-Gag geimpft, das für das native Leader-Gag-Protein kodiert, oder mit Ad5.Leader-Gag_{C1K}, bei dem das C-terminal an das $GagL_{85-93}$-Epitop angrenzende Tyrosin gegen ein Lysin ausgetauscht wurde (A). Nach zweifacher Immunisierung mit dem jeweiligen Vektor wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung überprüft (B). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber den Ad5.Leader-Gag-immunisierten Mäusen sind mit # ($P < 0{,}05$) gekennzeichnet. Abbildung aus [1]

wird. Die Immunisierung mit einem Leader-Gag-Protein-kodierenden Ad5-Vektor (Ad5.Leader-Gag) führte nicht wie erwartet zur Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten. In der Arbeit von Herrn Dr. Philipp Gödel wurde bei Experimenten zur Steigerung der Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitopes, unter anderem, der Vektor Ad5.Leader-Gag_{C1K} entwickelt [93]. In diesem wurde ein das Epitop C-terminal flankierendes Tyrosins gegen ein Lysin ausgetauscht (Abb. 10A), wodurch über den proteasomalen Abbau des $GagL_{85-93}$-Peptids auch dessen Immunogenität verbessert wurde. Die Immunisierung FV suszeptibler CB6F1-Mäuse mit Ad5.Leader-Gag_{C1K} führte zur Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zell-antworten (Abb. 10B) und resultierte im Schutz der immunisierten Tiere vor einer nachfolgenden FV-Infektion. Wurden die Mäuse hingegen mit Ad5.Leader-Gag immunisiert, konnten keine $CD8^+$ T-Zellantworten detektiert werden. Die Ad5.Leader-Gag-immunisierten Mäuse wiesen ähnlich hohe Viruslasten im Plasma und in der Milz auf, wie die unvakzinierten Mäuse (Schutzdaten nicht dargestellt, [93]). Zur Untersuchung der Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops wurden DNA-Immunisierungsexperimente durchgeführt. Bei diesen wurden naive CB6F1-Mäuse mit den Expressionsplasmiden pCG.Leader-Gag oder pCG.Leader-Gag_{C1K} (Abb. 11A) geimpft, die für die native bzw. für die C1K-modifizierte Leader-Gag-Sequenz kodieren. Die Immunisierung mit beiden Plasmiden resultierte in einer signifikanten Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen (Abb. 11B). Auch nach Infektion mit einer hohen

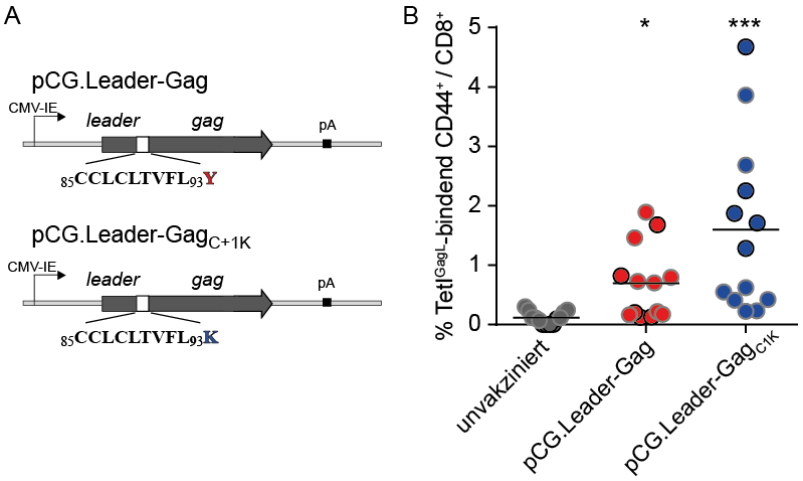

Abbildung 11: Impfung mit DNA-Plasmiden pCG.Leader-Gag bzw. pCG.Leader-Gag_{C1K}

CB6F1-Mäuse wurden einmalig mit DNA-Plasmiden, die entweder für das native FV Leader-Gag-Protein (pCG.Leader-Gag), oder für die modifizierte Variante des Leader-Gags (pCG.Leader-Gag_{C1K}) kodieren, immunisiert (A). Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung überprüft. (B). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je vier Tieren pro Gruppe, bzw. aus einem Experiment mit fünf Tieren pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die Daten, deren Punkte schwarz umrandet sind, stammen aus der Doktorarbeit von Dominik Schöne. Grau umrandete Punkte stammen aus einem eigenen Wiederholungsexperiment. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) und *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet. Abbildung verändert nach [4].

Virusdosis waren die Mäuse beider Gruppen weitgehend vor einer Infektion und der FV-induzierten Erkrankung geschützt. Diese Resultate zeigten, dass das Leader-Gag-Protein über ausreichende Immunogenität verfügt, die im Ad5-Vektor-Kontext allerdings stark beeinträchtigt wird. Daher wurde der konkrete Einfluss von zwei adenoviralen CD8⁺ T-Zell-Epitopen auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mithilfe von Epitopketten-kodierenden DNA-Plasmiden untersucht. Die Epitopketten bestanden aus dem FV $GagL_{85-93}$-Epitop, sowie den beiden adenoviralen CD8⁺ T-Zell-Epitopen $Hexon_{486-494}$ und $DBP_{418-426}$ (DNA-bindendes Protein), die beidseitig von jeweils drei Aminosäuren ihrer Originalsequenz flankiert wurden. Es wurden zwei Plasmide verwendet, in denen entweder alle Epitope in ihrer natürlichen Sequenz vorlagen (GagL.DBP.Hexon, Abb. 12A), oder aber die Aminosäuren der adenoviralen Epitope in den Ankerpositionen 5 und 9 gegen Alanine ausgetauscht waren (GagL.ΔDBP.ΔHexon, Abb. 12A). Diese Alanin-Modifikation verhindert das Binden der resultierenden Peptide an MHC-I-Moleküle. GagL.DBP.Hexon-immunisierte Mäuse bildeten, wie auch die unvakzinierten Mäuse, keine $GagL_{85-93}$-spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten aus (Abb. 12B). In Mäusen, die mit der Alanin-modifizierten Epitopkette (GagL.ΔDBP.ΔHexon) geimpft wurden, konnten

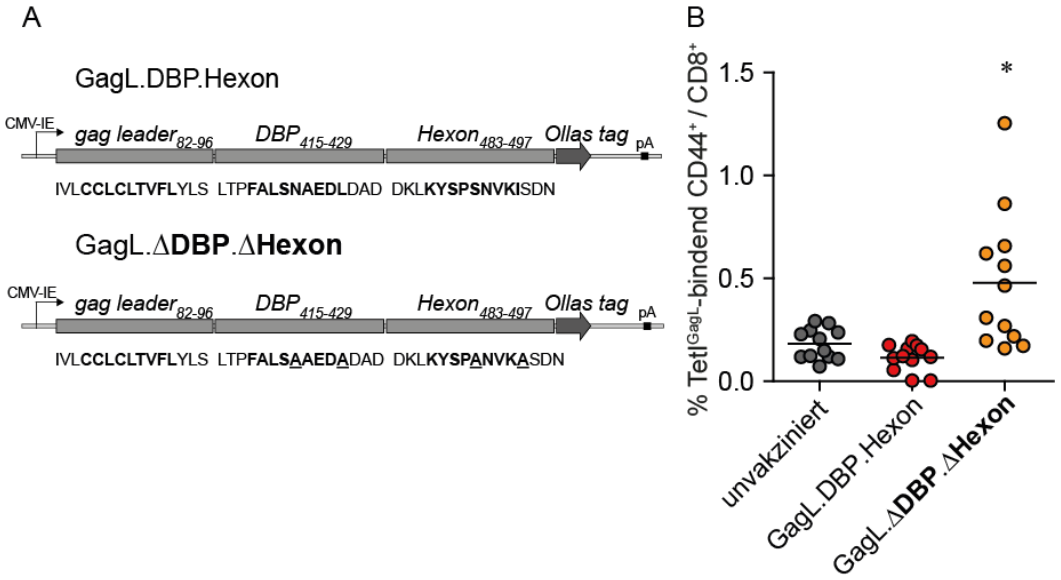

Abbildung 12: Einfluss DNA-Plasmid-kodierter, adenoviraler Epitope auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten

CB6F1-Mäuse wurden einmalig mit je einem von zwei verschiedenen DNA-Plasmiden immunisiert, die für eine Abfolge von CD8⁺ T-Zell-Epitopen bestehend aus dem FV $GagL_{85-93}$-Epitop, sowie zwei Ad5-Epitopen aus dem DNA-bindenden-Protein (DBP) und dem Hexon-Protein kodieren. Die erste Variante enthielt hierbei alle CD8⁺ T-Zell-Epitope in ihrer natürlichen Sequenz (GagL.DBP.Hexon), während bei der zweiten Variante die adenoviralen Epitope Alanin-modifiziert waren (GagL.ΔDBP.ΔHexon) (A). Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung überprüft (B). Die Daten stammen aus drei Experimenten mit vier Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar (B). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) gekennzeichnet. Abbildung aus [4].

signifikante $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten nachgewiesen werden. Zudem war die virale Belastung in GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten Mäusen im Gegensatz zu GagL.DBP.Hexon-immunisierten Tieren und der unvakzinierten Kontrollgruppe nach Infektion mit dem FV deutlich reduziert. Dies legt einen negativen Einfluss der adenoviralen Epitope $Hexon_{486-494}$ und $DBP_{418-426}$ auf die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops nahe.

Dieser negative Einfluss sollte in der vorliegenden Doktorarbeit näher untersucht werden.

4.1.2 Einfluss der Ad5-$CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ auf die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops

In den vorangegangenen Experimenten konnte ein negativer Einfluss der adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ auf die Immunogenität des FV $CD8^+$ T-Zell-Epitops $GagL_{85-93}$ demonstriert werden. Daher sollte näher untersucht werden, welchen Einfluss diese beiden adenoviralen Epitope im Einzelnen auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen ausüben. Hierfür wurden Immunisierungsexperimente mit Epitopketten-kodierenden DNA-Plasmiden in FV-suszeptiblen CB6F1-Mäusen durchgeführt. Das DNA-Plasmid GagL.ΔDBP.ΔHexon kodiert für das natürliche $GagL_{85-93}$-Epitop in Kombination mit den beiden Alanin-modifizierten Versionen der Ad5-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$. GagL.ΔDBP.Hexon enthält die Alanin-modifizierte Variante des $DBP_{418-426}$-Epitops in Kombination mit der natürlichen Hexon-Sequenz, während in GagL.DBP.ΔHexon das $Hexon_{486-494}$-Epitop Alanin-modifiziert ist und mit der natürlichen $DBP_{418-426}$-Sequenz kombiniert wurde (Abb. 14A). CB6F1-Mäuse wurden einmal durch intramuskuläre Injektion mit 25 µg des jeweiligen DNA-Plasmids immunisiert. Der Muskel wurde anschließend zur verbesserten

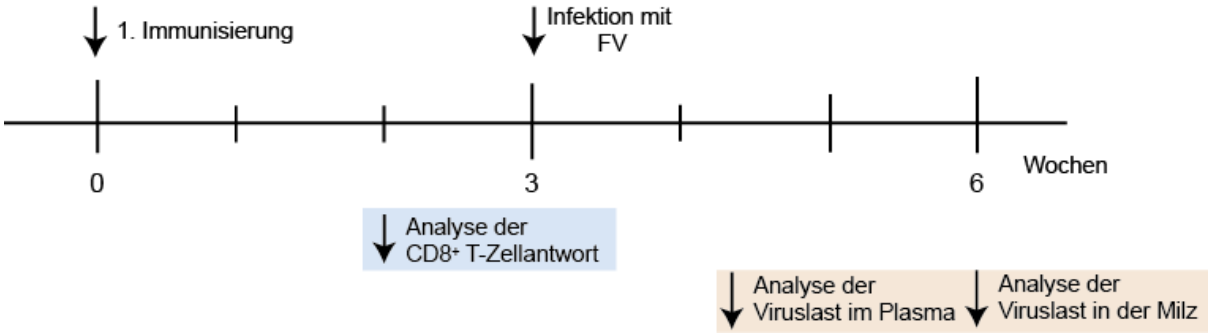

Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung zur Untersuchung der Immundominanz adenoviraler Epitope

CB6F1-Mäuse wurden einmal mit 25 µg des jeweiligen DNA-Plasmids intramuskulär in Kombination mit Elektroporation immunisiert. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die $CD8^+$ T-Zellantwort mittels spezifischer Tetramerfärbung, sowie ICS überprüft. Drei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere analysiert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in der Milz untersucht.

Aufnahme der Plasmid-DNA elektroporiert. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung analysiert (Abb. 13). Neben der Induktion Antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wurde auch die Funktionalität dieser Zellen anhand der Produktion von IFNγ und TNFα überprüft. Hierfür wurden Lymphozyten aus dem Blut der Mäuse für sechs Stunden mit GagL-Peptid restimuliert, mittels intrazellulärer Zytokinfärbung (*intracellular cytokine staining*, ICS) gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer untersucht. Da die TNFα-Produktion in allen durchgeführten Experimenten der IFNγ-Produktion entsprach und aus der zusätzlichen Darstellung der TNFα-Daten kein Mehrgewinn an Informationen resultierte, werden im Folgenden nur die Daten der IFNγ-Produktion gezeigt.

Wie zuvor beobachtet induzierte die Immunisierung mit GagL.ΔDBP.ΔHexon $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten, die verglichen zu der unvakzinierten Gruppe signifikant erhöht waren (Abb. 14B). Die Immunisierung mit GagL.DBP.ΔHexon führte ebenfalls zur Induktion signifikanter $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zell-antworten, während nach der Immunisierung mit GagL.ΔDBP.Hexon keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden konnten. Nach Restimulation mit GagL-Peptid produzierten sowohl $CD8^+$ T-Zellen der GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten Mäuse als auch der GagL.DBP.ΔHexon-immunisierten Mäuse IFNγ. In GagL.ΔDBP.Hexon-immunisierten Mäusen wurden hingegen keine $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen (Abb. 14C). Zur Überprüfung des vermittelten Impfschutzes wurden die Mäuse drei Wochen nach der Immunisierung intravenös mit 5000 SFFU FV infiziert. Zunächst wurde 10 Tage nach der Infektion die Virämie im Plasma bestimmt. Alle unvakzinierten Mäuse hatten hohe Viruslasten im Plasma, wohingegen die Viruslasten aller immunisierten Gruppen eine deutliche Streuung aufwiesen. In der Gruppe der GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten Mäuse war die Viruslast im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe am stärksten reduziert. Bei 7 von insgesamt 17 Mäusen dieser Gruppe konnte kein Virus im Plasma nachgewiesen werden (Abb. 14D). Die Viruslasten im Plasma der GagL.ΔDBP.Hexon-geimpften Mäuse waren im Vergleich zu den unvakzinierten Mäusen nur marginal verringert. Bei den GagL.DBP.ΔHexon-immunisierten Mäusen hingegen waren die Viruslasten im Plasma bei einem Teil der Mäuse, verglichen mit den unvakzinierten Mäusen, reduziert und lagen bei einigen Mäusen unter dem Detektionslimit. Drei Wochen nach der FV-Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast darin mittels *infectious center* (IC)-Assay analysiert. Die Milzgewichte und Viruslasten aller untersuchten Gruppen besaßen eine deutliche Varianz.

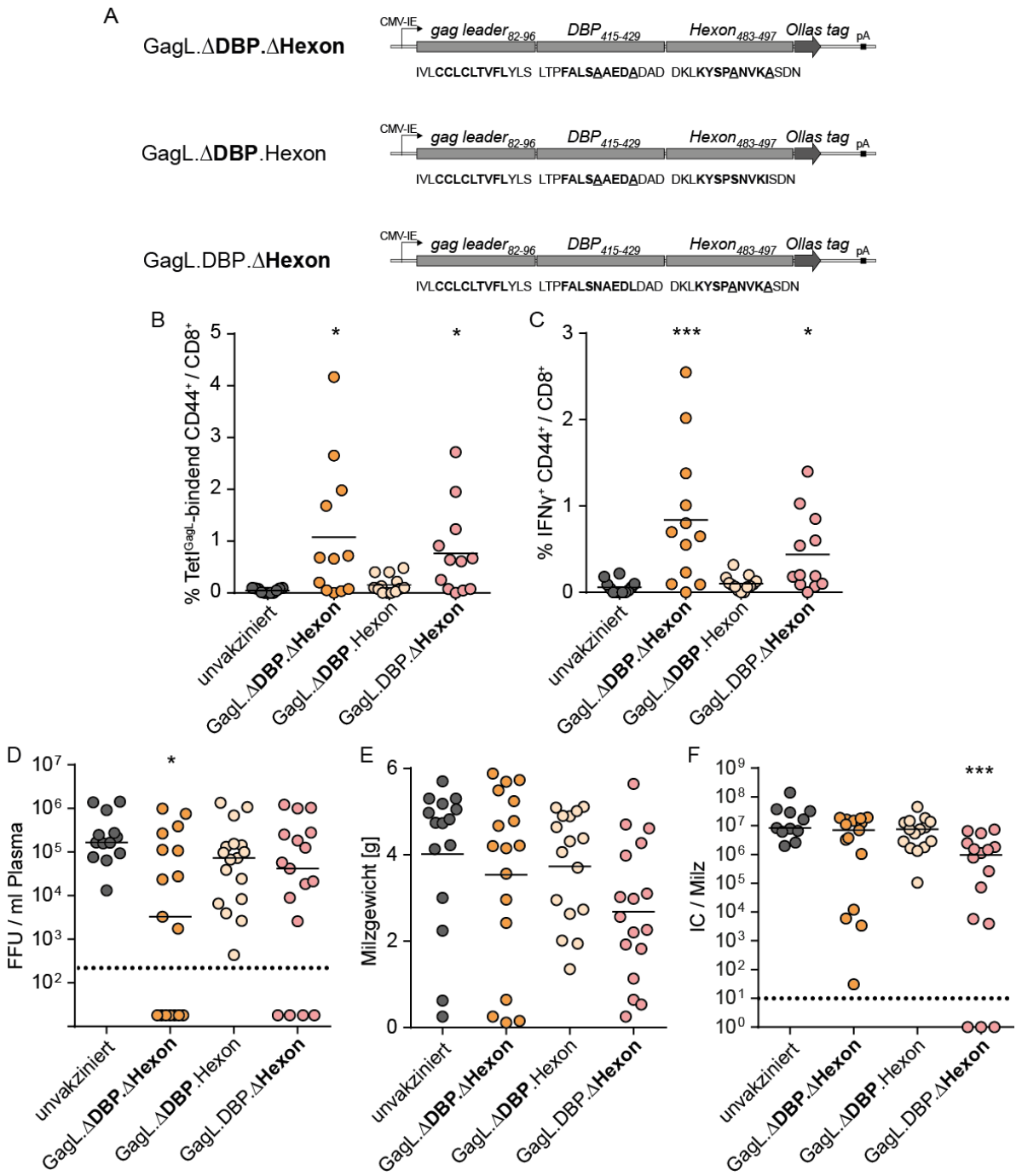

Abbildung 14: Einfluss der adenoviralen Epitope DBP$_{418-426}$ und Hexon$_{486-494}$ auf die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten

CB6F1-Mäuse wurden einmalig mit DNA-Plasmiden immunisiert, die für eine Abfolge von CD8$^+$ T-Zell-Epitopen bestehend aus dem FV GagL$_{85-93}$-Epitop, sowie zwei Ad5-Epitopen aus dem DBP und dem Hexon-Protein kodieren. Es wurden drei unterschiedliche Versionen der Epitopketten verwendet, bei denen entweder beide Ad5-Epitope, oder jeweils eines davon Alanin-modifiziert waren (A). Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (B) und deren Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (C). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (D). Drei Wochen nach der Infektion wurden das Gewicht der Milz (E), sowie die Viruslast in der Milz untersucht (F). Die Daten stammen aus vier Experimenten mit vier Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (B, C, E) bzw. den Median (D, F). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) bzw. mit *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

Die Mäuse der unvakzinierten Kontrollgruppe hatten deutlich vergrößerte Milzen. Die Milzen der GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten und der GagL.ΔDBP.Hexon-immunisierten Mäuse waren im Vergleich dazu ähnlich stark vergrößert (Abb. 14E). Nach Immunisierung mit GagL.DBP.ΔHexon hingegen waren die Milzgewichte im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe leicht reduziert. Bei der Analyse der viralen Belastung in der Milz besaßen die unvakzinierten Mäuse hohe Viruslasten (Abb. 14F). Die Viruslasten in den Milzen der GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten Mäuse sowie der GagL.ΔDBP.Hexon-immunisierten Mäuse waren vergleichbar hoch wie die Viruslasten in den Milzen der unvakzinierten Mäuse, wenn auch in der GagL.ΔDBP.ΔHexon-immunisierten Gruppe vereinzelt Mäuse mit reduzierten Viruslasten auftraten. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Reduktion der Viruslast in der Milz durch Impfung mit GagL.DBP.ΔHexon erreicht werden.

Während die Immunisierung mit GagL.ΔDBP.ΔHexon oder mit GagL.DBP.ΔHexon, in denen das $Hexon_{486-494}$-Epitop Alanin-modifiziert vorlag, $GagL_{85-93}$ spezifische, $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen induzierte, konnten selbige nicht nach der Immunisierung mit GagL.ΔDBP.Hexon nachgewiesen werden. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die Anwesenheit des adenoviralen $Hexon_{486-494}$-Epitopes sich inhibitorisch auf die Induktion FV $GagL_{85-93}$ spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten auswirkt, während das adenovirale $DBP_{418-426}$-Epitop auf diese keinen prägenden Einfluss hatte.

4.1.3 Analyse der Immunantworten nach Impfung mit GagL.ΔDBP.Hexon in H-2D$^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen

Die Präsenz des adenoviralen $Hexon_{486-494}$-Epitopes wirkt sich negativ auf die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitopes aus, während das $DBP_{418-426}$-Epitop keinen nachweislichen Einfluss auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen besitzt. Die Epitope $GagL_{85-93}$ und $DBP_{418-426}$ werden auf MHC-I-(H-2D^b)-Molekülen präsentiert, während das $Hexon_{486-494}$-Epitop auf MHC-I-(H-2D^d)-Moleküle restringiert ist. Hieraus resultiert keine direkte Konkurrenz um das Binden von MHC-I-Molekülen zwischen $GagL_{85-93}$ und $Hexon_{486-494}$. Zur näheren Untersuchung möglicher Interferenz zwischen $Hexon_{486-494}$ und $GagL_{85-93}$ sollten daher die Immunisierungsexperimente in C57BL/6-Mäusen wiederholt werden. Im Gegensatz zu CB6F1-Mäusen sind C57BL/6- Mäuse in ihrem MHC-I-Lokus homozygot und exprimieren nur MHC-I-Moleküle des b-Haplotyps. Daher kann in diesen Mäusen Konkurrenz zwischen $Hexon_{486-494}$ und $GagL_{85-93}$ nur auf der Peptid-Ebene stattfinden, z. B. beim proteasomalen Abbau, der Prozessierung oder beim intrazellulären Transport der Peptide. Es sollte daher überprüft werden, ob sich in C57BL/6-Mäusen das Vorhandensein des $Hexon_{486-494}$-Epitopes bei

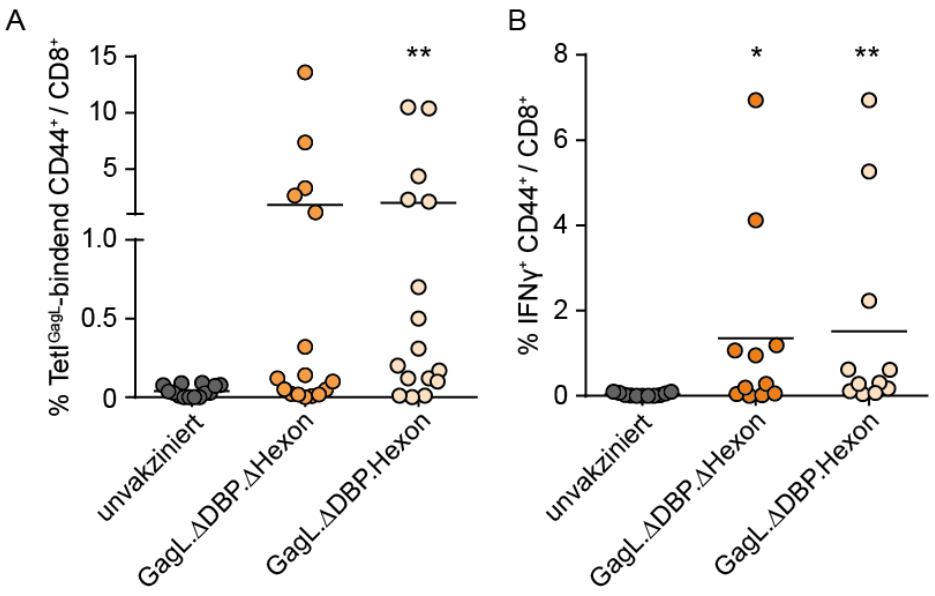

Abbildung 15: DNA-Immunisierungsexperimente zur Immundominanz des adenoviralen Hexon$_{486-494}$-Epitopes in H-2D$^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen

C57BL/6-Mäuse wurden einmalig mit DNA-Plasmiden, die für eine Abfolge von CD8$^+$ T-Zell-Epitopen bestehend aus dem FV GagL$_{85-93}$-Epitop, sowie zwei Ad5-Epitopen aus dem DBP und dem Hexon-Protein kodieren, immunisiert. Es wurden zwei Versionen der Epitopketten verwendet, bei denen entweder beide Ad5-Epitope, oder nur das DBP$_{418-426}$-Epitop Alanin-modifiziert waren. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je vier Mäusen pro Gruppe (A, B). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) bzw. mit **($P < 0{,}01$) gekennzeichnet.

Immunisierungsexperimenten mit Epitopketten-kodierenden DNA-Plasmiden negativ auf die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen auswirkt.

C57BL/6-Mäuse-wurden mit 25 µg der DNA-Plasmide GagL.ΔDBP.Hexon oder GagL.ΔDBP.ΔHexon durch intramuskuläre Injektion in Kombination mit Elektroporation immunisiert. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung und die IFNγ-Produktion der CD8$^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS untersucht. Sowohl mit GagL.ΔDBP.Hexon, als auch mit GagL.ΔDBP.ΔHexon immunisierte C57BL/6-Mäuse induzierten GagL$_{85-93}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellantworten (Abb. 15A). Nach Restimulation mit GagL-Peptid wurden in beiden Gruppen ebenfalls ähnliche Anteile IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen, die verglichen mit der unvakzinierten Kontrollgruppe signifikant erhöht waren (Abb. 15B). Dies zeigt, dass das Hexon$_{486-494}$-Epitop in C57BL/6-Mäusen seinen inhibitorischen Einfluss über das GagL$_{85-93}$-Epitop verliert, wenn es nicht auf MHC-I-Molekülen präsentiert wird. Zudem lässt dies vermuten, dass die

immunologische Dominanz des Hexon$_{486-494}$-Epitops über das GagL$_{85-93}$-Epitop auf der Ebene Epitop-spezifischer, aktivierter CD8$^+$ T-Zellen stattfindet.

4.1.4 Analyse der Immunantworten nach Impfung mit Ad5.Leader-Gag in H-2D$^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen

In den bisherigen Experimenten konnte kein negativer Einfluss des DBP$_{418-426}$-Epitopes auf die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen belegt werden. Zudem wurde gezeigt, dass das Hexon$_{486-494}$-Epitop seine Immundominanz über das GagL$_{85-93}$-Epitop verliert, wenn es in C57BL/6-Mäusen nicht auf MHC-I-Molekülen präsentiert wird. Daher sollte überprüft werden, ob die Impfung von C57BL/6-Mäusen mit dem adenoviralen Vektor Ad5.Leader-Gag, der für das FV Leader-Gag kodiert, zur Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten führen würde.

C57BL/6-Mäuse wurden einmalig intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag immunisiert. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe Mäuse mit dem bereits beschriebenen Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ geimpft. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung und die IFNγ-Produktion der CD8$^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS untersucht. Die Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit Ad5.Leader-Gag induzierte keine GagL$_{85-93}$ spezifischen, IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen (Abb. 16A+B). Nach der

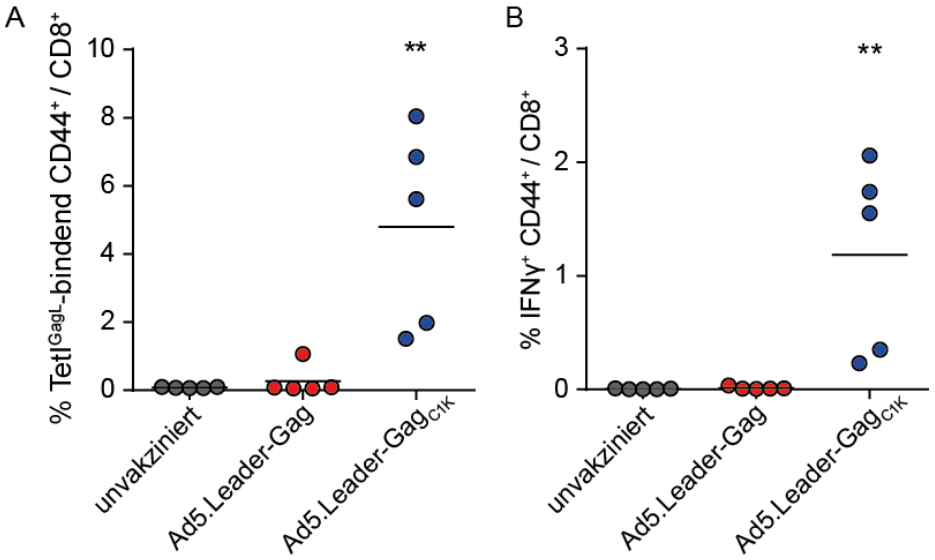

Abbildung 16: Immunisierungsexperimente zur Immundominanz des adenoviralen Hexon$_{486-494}$-Epitopes in H-2D$^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen mit Ad5-Vektoren

C57BL/6-Mäuse wurden einmalig intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag bzw. mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisiert. Zwei Wochen später wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Die Daten stammen aus einem Experiment mit je fünf Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) bzw. mit **($P < 0{,}01$) gekennzeichnet.

Immunisierung mit Ad5.Leader-Gag_{C1K} konnten hingegen $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden (Abb. 16A), die nach Restimulation mit GagL-Peptid IFNγ produzierten (Abb. 16B). Diese Ergebnisse legen nahe, dass weitere Epitope im Ad5-Vektor vorkommen, die das native FV $GagL_{85-93}$-Epitop immunologisch dominieren.

4.1.5 Einfluss der Co-Applikation von Interleukinen auf die $Hexon_{486-494}$-vermittelte Immundominanz gegenüber $GagL_{85-93}$

Das adenovirale $Hexon_{486-494}$-Epitop dominiert das FV $GagL_{85-93}$-Epitop und supprimiert die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten. Dieser Effekt wurde nicht in H-$2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen beobachtet, deren Zellen das $GagL_{85-93}$-Epitop (H-$2D^b$), aber nicht das $Hexon_{486-494}$-Epitop (H-$2D^d$) auf ihren MHC-I-Molekülen präsentieren können. Eine direkte Konkurrenz um das Binden an MHC-I-Moleküle wurde daher als Grundlage der $Hexon_{486-494}$-abhängigen Immundominanz ausgeschlossen. Es wurde vermutet, dass der dominierende Einfluss des $Hexon_{486-494}$-Epitops auf der Ebene Epitop-spezifischer, aktivierter $CD8^+$ T-Zellen stattfindet und z. B. auf der Konkurrenz um Proliferations-fördernden und für das Überleben von $CD8^+$ T-Zellen benötigten Zytokinen basiert. Daher sollte in den nachfolgenden Experimenten überprüft werden, ob die Dominanz des $Hexon_{486-494}$-Epitops über $GagL_{85-93}$ durch eine Co-Applikation von GagL.DBP.Hexon mit verschiedenen, Interleukin(IL)-kodierenden DNA-Plasmiden moduliert werden kann. Potentielle Kandidaten stellten hierbei IL2, IL15, IL21 und IL23 dar, welche direkt und indirekt an der Differenzierung, der Proliferation und dem Überleben antiviraler $CD8^+$ T-Zellen beteiligt sind [52, 114].

CB6F1-Mäuse wurden einmal mit DNA-Plasmiden durch intramuskuläre Injektion in Kombination mit Elektroporation immunisiert. Eine Gruppe Mäuse wurde nur mit 25 µg GagL.DBP.Hexon immunisiert, während vier weitere Gruppen zusätzlich jeweils 25 µg eines IL-kodierenden DNA-Plasmides erhielten, das entweder für IL2, IL15, IL21 oder IL23 kodierte. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung, sowie die Produktion von IFNγ nach Restimulation der $CD8^+$ T-Zellen mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft. Weder in den unvakzinierten Mäusen, noch in der GagL.DBP.Hexon-immunisierten Gruppe konnten $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden. Durch zusätzliche Immunisierung mit verschiedenen IL-kodierenden DNA-Plasmiden konnte die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach der Impfung mit GagL.DBP.Hexon ebenfalls nicht verbessert werden. Zwar wurden nach der Co-Applikation von IL2- oder IL23-exprimierenden DNA-Plasmiden in einzelnen Mäusen $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen (Abb. 17A), der Anteil der Mäuse war aber nicht signifikant.

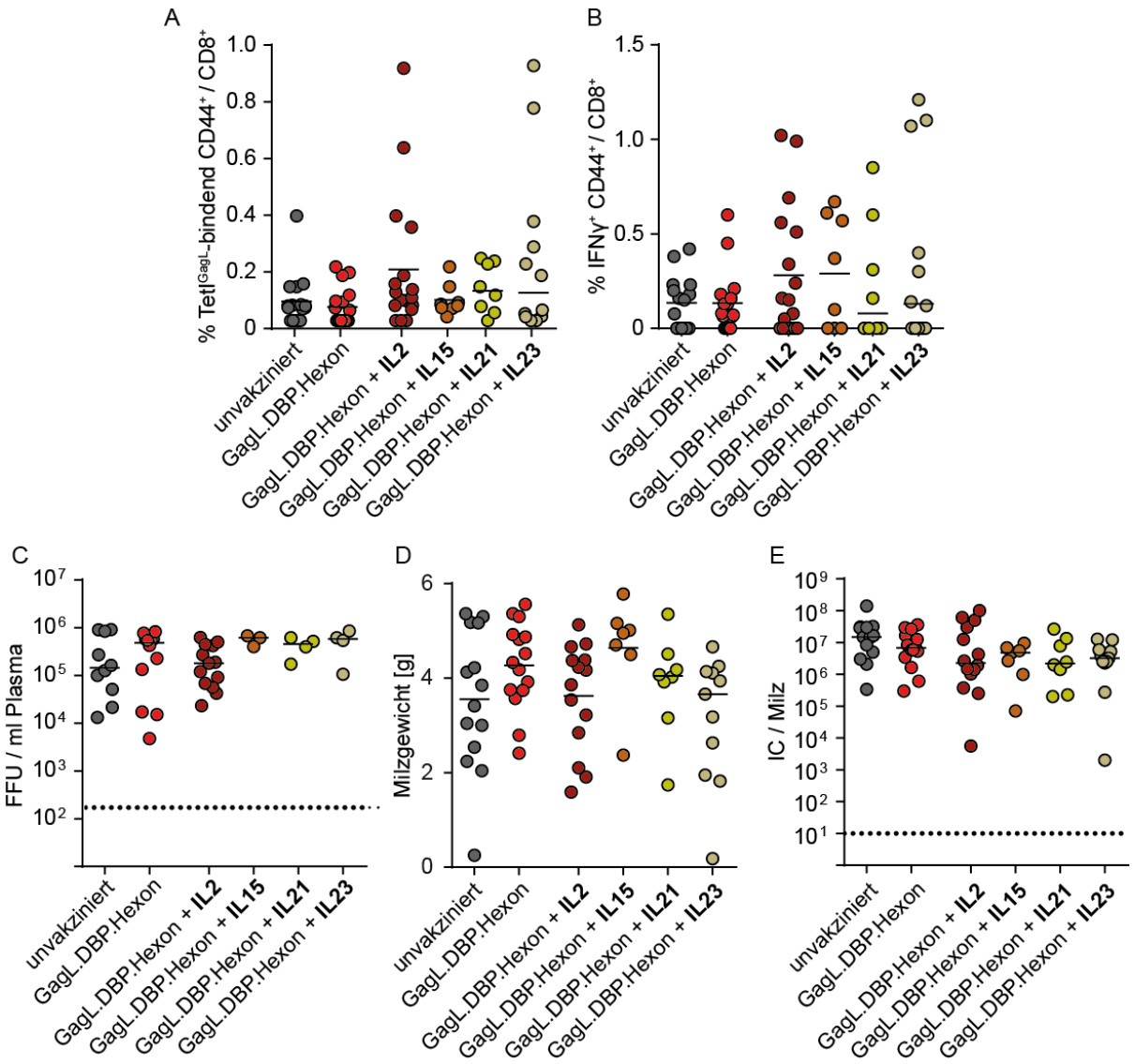

Abbildung 17: Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden DNA-Plasmiden

CB6F1-Mäuse wurden einmalig entweder nur mit dem DNA-Plasmid GagL.DBP.Hexon, das für das FV $GagL_{85-93}$-Epitop, sowie für die beiden Ad5-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ kodiert, oder in Kombination mit einem Interleukin-kodierenden DNA-Plasmid immunisiert. Hierbei wurden IL2-, IL15-, IL21- oder IL23-kodierende DNA-Plasmide zur Co-Administration ausgewählt. Die Immunisierung erfolgte mit jeweils 25 µg Plasmid-DNA intramuskulär kombiniert mit Elektroporation. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A), sowie deren Produktion von IFNγ (B) analysiert. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus insgesamt vier Experimenten mit vier Mäusen pro Gruppe für IL2, bzw. aus zwei Experimenten mit je vier Mäusen für die restlichen Interleukine. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Die Unterschiede der Daten aus den verschiedenen Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

Die Restimulation mit GagL-Peptid induzierte in allen Gruppen nur geringe Anteile $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen, die in einzelnen Mäusen der IL2- bzw. der IL23-co-immunisierten Gruppen am höchsten waren (Abb. 17B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden

die Mäuse intravenös mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Viruslast im Plasma untersucht. In keiner der immunisierten Gruppen ergab sich hieraus eine Reduktion der Virämie (Abb. 17C). Auch bei der Untersuchung der Milzgewichte und der Viruslast in der Milz drei Wochen nach der Infektion konnte in keiner der immunisierten Gruppen eine Reduktion der Milzgewichte, oder der Viruslasten nachgewiesen werden (Abb. 17D, E). Die Co-Immunisierung mit IL-kodierenden DNA-Plasmiden war somit nicht ausreichend, um den Schutz vor einer FV-Infektion signifikant zu verbessern.

4.1.6 Einfluss der kombinierten Co-Applikation von IL2 und IL23 auf die Hexon$_{486-494}$-vermittelte Immundominanz gegenüber GagL$_{85-93}$

Für die Differenzierung, die Proliferation und das Überleben von CD8$^+$ T-Zellen spielen verschiedene Interleukine wichtige Rollen. Die Ausprägung einer zellulären Immunantwort wird aber nicht durch einzelne Zytokine, sondern durch ein komplexes Zusammenspiel aus mehreren Komponenten vermittelt. In einem Folge-Experiment sollte daher überprüft werden, ob die Kombination von zwei Interleukinen zu einer verbesserten Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen in der Anwesenheit des Hexon$_{486-494}$-Epitops führen würde. Hierfür wurden IL2 und IL23 ausgewählt, da diese Interleukine im vorigen Experiment, bezogen auf einzelne Tiere, den größten Einfluss auf die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen gezeigt hatten. CB6F1-Mäuse wurden mit 25 µg des DNA-Plasmides GagL.DBP.Hexon durch intramuskuläre Injektion kombiniert mit Elektroporation immunisiert. Eine weitere Gruppe erhielt zusätzlich zu den 25 µg GagL.DBP.Hexon jeweils 25 µg eines IL2- und eines IL23-kodierenden DNA-Plasmids als Impfzusatz. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung, sowie die IFNγ-Produktion von CD8$^+$ T-Zellen nach der Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft. Während in den nur mit GagL.DBP.Hexon immunisierten Mäusen die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen marginal höher war, als in den unvakzinierten Mäusen, verbesserte der Zusatz von IL2- und IL23-kodierenden DNA-Plasmiden die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten in 2 von 7 Mäusen (Abb. 18A). Nach der Restimulation mit GagL-Peptid wurden in unvakzinierten oder nur mit GagL.DBP.Hexon immunisierten Mäusen geringe Anteile IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen detektiert, während verglichen dazu die Anteile IFNγ-produzierender CD8$^+$ T-Zellen in einigen der mit IL2 und IL23 immunisierten Mäusen erhöht waren (Abb. 18B).

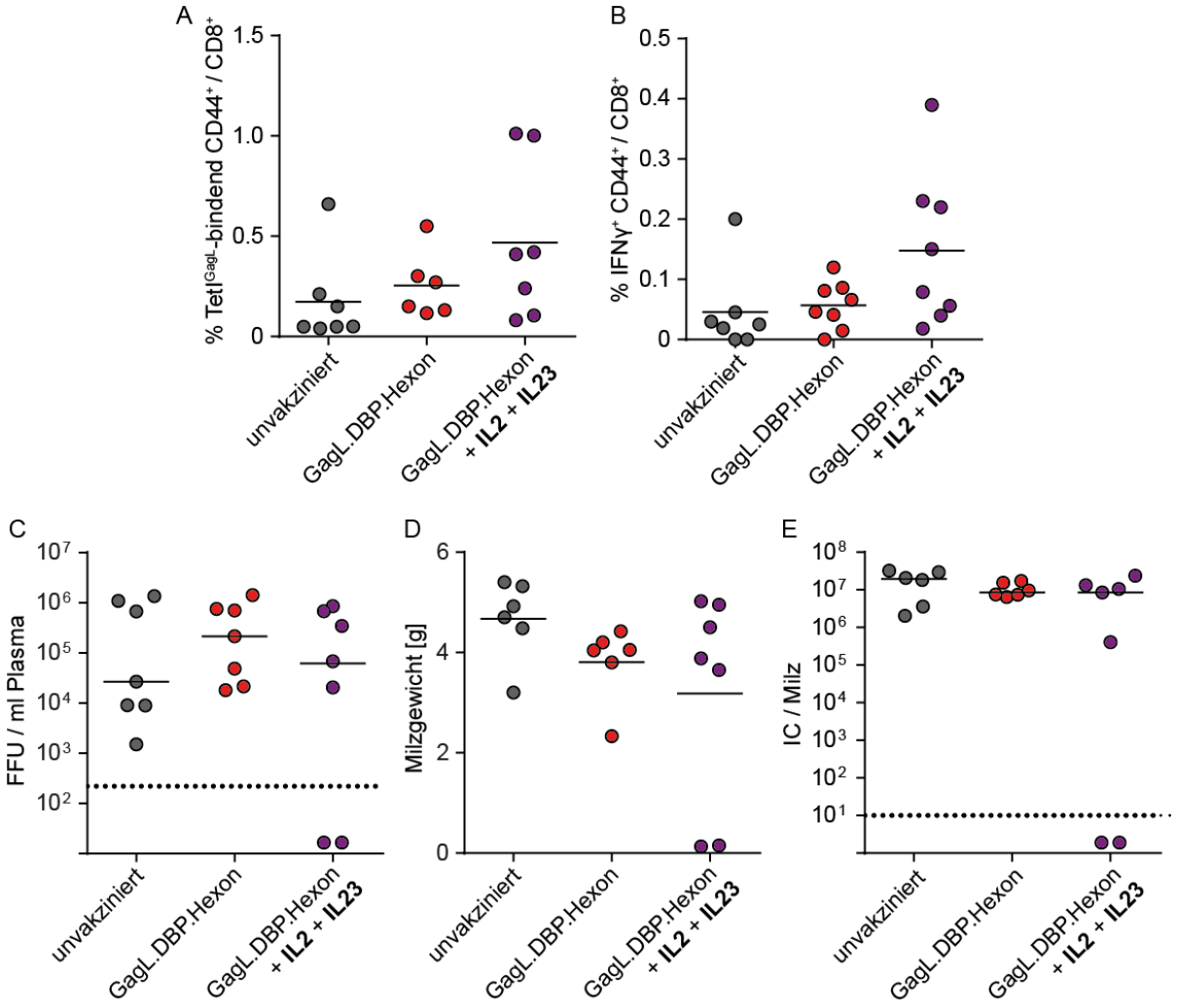

Abbildung 18: Co-Immunisierung von GagL.DBP.Hexon mit IL2- und IL23-kodierenden DNA-Plasmiden

CB6F1-Mäuse wurden einmalig entweder nur mit dem DNA-Plasmid GagL.DBP.Hexon, das für das FV GagL$_{85-93}$-Epitop, sowie die beiden Ad5-Epitope DBP$_{418-426}$ und Hexon$_{486-494}$ kodiert, oder zusammen einem IL2- und einem IL23-kodierenden DNA-Plasmid immunisiert. Die Immunisierung erfolgte intramuskulär mit 25 µg DNA jedes Plasmids kombiniert mit Elektroporation. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A), sowie die Produktion von IFNγ überprüft (B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus insgesamt zwei Experimenten mit drei und vier Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Die Unterschiede der Daten aus den verschiedenen Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

Drei Wochen nach der Immunisierung wurden alle Mäuse mit 5000 SFFU FV infiziert. Nach 10 Tagen wurde die Virämie im Plasma überprüft. In beiden immunisierten Gruppen wurden Viruslasten im Plasma detektiert, die vergleichbar hoch wie in der unvakzinierten Kontrollgruppe waren (Abb. 18C). Eine Ausnahme bildeten die beiden Mäuse aus der IL-2-/IL23-Gruppe, bei denen zuvor GagL$_{85-93}$-spezifische CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen

wurden. In diesen Mäusen konnte kein Virus im Plasma nachgewiesen werden. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslasten in den Milzen bestimmt. Die Milzen beider immunisierter Gruppen waren ähnlich stark vergrößert wie in der unvakzinierten Kontrollgruppe (Abb. 18D). Die Milzen der 2 Mäuse aus der IL2-/IL23-supplementierten Gruppe waren hingegen nicht vergrößert. Bei der Überprüfung der Viruslast in der Milz wiesen mit GagL.DBP.Hexon geimpfte Mäuse ähnlich hohe Viruslasten wie die unvakzinierten Mäuse auf (Abb. 18E). In den Milzen von 5 der 7 zusätzlich mit IL2-/IL23-geimpften Mäuse wurden dazu vergleichbare Viruslasten detektiert, während in den Milzen der bereits hervorgehobenen beiden Mäuse kein FV nachgewiesen wurde. Dies deutet darauf hin, dass Co-Immunisierung mit IL2- und IL23-kodierenden DNA-Plasmiden in der Lage war, die Immundominanz des $Hexon_{486-494}$-Epitops gegenüber dem $GagL_{85-93}$-Epitop zumindest in einigen der Versuchstiere zu überwinden. Eine Modulation durch lokale Zugabe von Zytokinen deutet daraufhin, dass $Hexon_{486-494}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen mit $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen um proliferations- und überlebensfördernde Zytokine konkurrieren und dadurch $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen supprimieren.

Die Co-Immunisierung mit für IL2 und IL23 kodierenden Plasmiden konnte die $Hexon_{486-494}$-vermittelte Suppression des $GagL_{85-93}$-Epitops partiell aufheben.

4.1.7 Einfluss der Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden Ad5-Vektoren auf die Immunisierung mit Ad5-Leader-Gag

In vorherigen Experimenten war die Co-Applikation einzelner, IL-kodierender DNA-Plasmide als Strategie gegen die Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten durch das adenovirale $Hexon_{486-494}$ untersucht worden. Während die Co-Immunisierung mit IL15- oder IL21-kodierenden DNA-Plasmiden keinen Effekt auf die Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten hatte, verbesserte die Co-Immunisierung mit IL2- oder IL23-kodierenden DNA-Plasmiden in einzelnen Mäusen die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen in Anwesenheit des $Hexon_{486-494}$-Epitopes. Daher sollte überprüft werden, ob die Co-Applikation von IL2 oder IL23 ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen im Kontext eines Ad5-Vektors haben würde. CB6F1-Mäuse wurden intramuskulär entweder nur mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag, oder zusätzlich mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp eines IL2- oder IL23-kodierenden Ad5-Vektors (Ad5.Leader-Gag + Ad5.IL2, bzw. Ad5.Leader-Gag + Ad5.IL23) immunisiert. Zwei Wochen später wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung, sowie die IFNγ-Produktion von $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft. Weder nach der

Immunisierung mit Ad5.Leader-Gag allein, noch nach der Co-Immunisierung mit Ad5.IL2 bzw. Ad5.IL23 konnten $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden (Abb. 19A). In allen drei Gruppen konnten nach der Restimulation mit GagL-Peptid ebenfalls keine $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 19B).

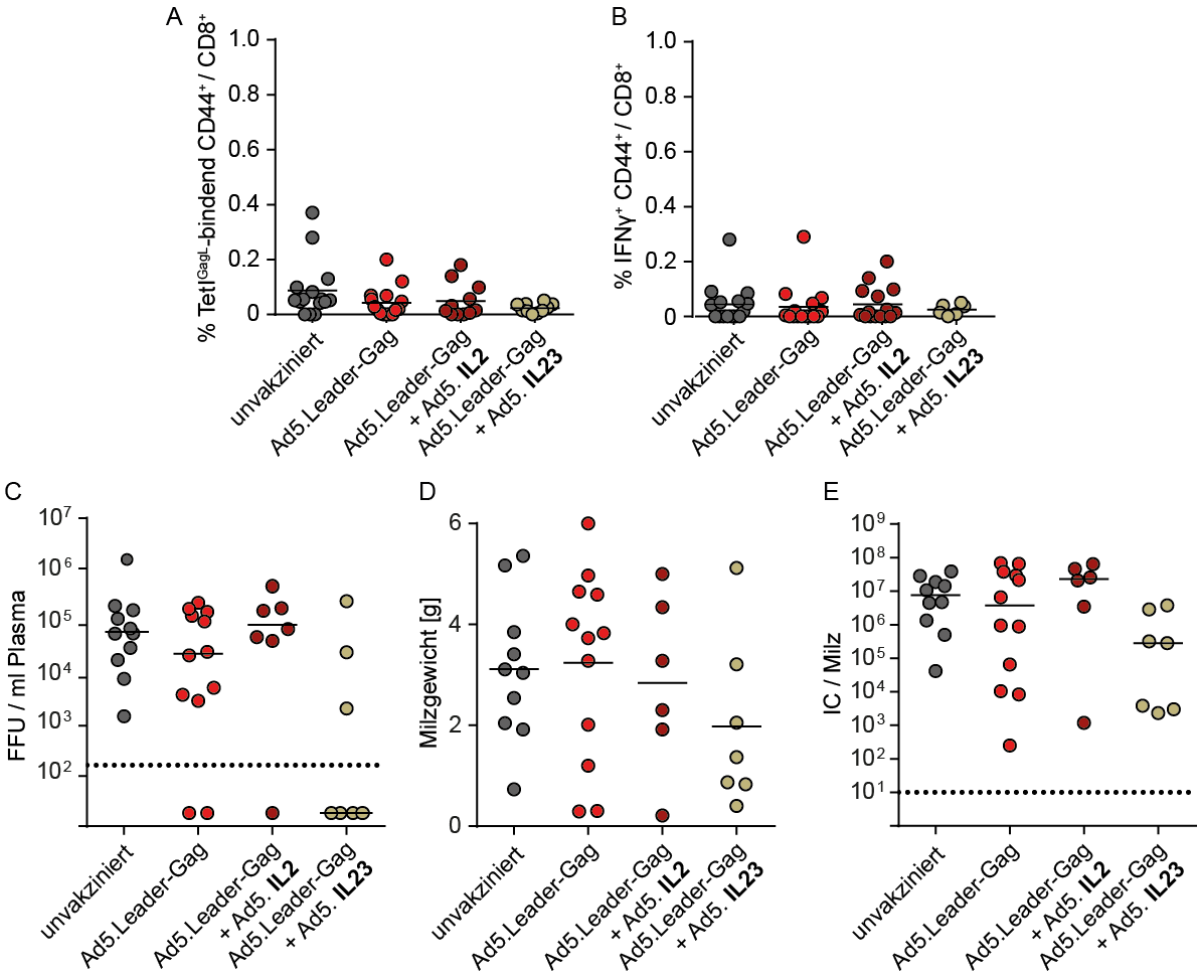

Abbildung 19: Co-Immunisierung mit Interleukin-kodierenden Ad5-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden einmalig entweder nur mit Ad5.Leader-Gag, der für das FV Leader-GagL Protein kodiert, oder in Kombination mit einem IL2- oder einem IL23-exprimierenden Ad5-Vektor (Ad5.IL2 bzw. Ad5.IL23) immunisiert. Die Immunisierung geschah durch intramuskuläre Injektion von $1 \cdot 10^9$ vp jedes Vektors. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus drei Experimenten mit je vier Mäusen pro Gruppe für Ad5.IL2, während die Co-Immunisierungen mit Ad5.IL23 in zwei Experimenten mit je vier Mäusen pro Gruppe durchgeführt wurden. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Die Unterschiede der Daten aus den verschiedenen Gruppen waren statistisch nicht signifikant.

Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU intravenös injiziertem FV infiziert. 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma bestimmt. Die unvakzinierten Mäuse wiesen hohe Viruslasten im Plasma vor. Bei 2 der Ad5.Leader-Gag-immunisierten Mäuse konnte kein Virus im Plasma detektiert werden. In den übrigen, mit Ad5.Leader-Gag immunisierten Mäusen, sowie in den mit Ad5.IL2 co-immunisierten Mäusen wurden hingegen vergleichbar hohe Viruslasten detektiert, wie in der unvakzinierten Kontrollgruppe (Abb. 19C). Bei den Ad5.IL23-immunisierten Mäusen waren die Viruslasten im Plasma, verglichen dazu, reduziert. Bei 4 von 7 der mit Ad5.IL23 immunisierten Mäuse konnte kein Virus im Plasma nachgewiesen werden.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Mäuse getötet, die Milzen gewogen und die virale Belastung in den Milzen bestimmt. Die unvakzinierten Mäuse hatten stark vergrößerte Milzen (Abb. 19D). Die Milzen der mit Ad5.Leader-Gag geimpften Mäuse, sowie der mit Ad5.IL2 co-immunisierten Mäuse waren mit denen der unvakzinierten Mäuse vergleichbar. Eine leichte Reduktion der Milzgewichte wurde bei den mit Ad5.IL23-immunisierten Mäusen festgestellt. Die virale Belastung in der Milz der Ad5.Leader-Gag-immunisierten Mäuse, sowie der mit Ad5.IL2 co-immunisierten Mäuse war ähnlich hoch wie in den unvakzinierten Mäusen (Abb. 19E). In den Ad5.IL23-co-immunisierten Mäusen war die Viruslast in den Milzen leicht reduziert.

Weder die Co-Immunisierung mit Ad5.IL2 noch mit Ad5.IL23 führte zur Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen in Gegenwart des adenoviralen $Hexon_{486-494}$-Epitopes. Mit Ad5.IL23-co-immunisierte Mäuse konnten eine Infektion mit dem FV dennoch besser kontrollieren als mit Ad5.IL2-co-immunisierte oder nur mit Ad5.Leader-Gag-immunisierte Mäuse.

4.1.8 Analyse Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit Ad5

In zuvor durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass das adenovirale $Hexon_{486-494}$-Epitop einen inhibierenden Einfluss auf die Immunogenität des FV $CD8^+$ T-Zell-Epitops $GagL_{85-93}$ ausübt. Dieser Effekt wurde nicht in $H\text{-}2D^{b/b}$ homozygoten C57BL/6-Mäusen beobachtet, die $Hexon_{486-494}$ ($H\text{-}2D^d$) nicht auf ihren MHC-I-Molekülen präsentieren können. Dennoch induzierte die Immunisierung von C57BL/6-Mäusen mit Ad5.Leader-Gag keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Die jeweilige Co-Applikation der IL2- oder IL23-kodierenden Ad5-Vektoren Ad5.IL2 bzw. Ad5.IL23 zu Ad5.Leader-Gag verbesserte die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$T-Zellen ebenfalls nicht. Dies lässt auf das Vorhandensein weiterer $CD8^+$ T-Zell-Epitope im Ad5-Vektor schließen, welche die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten supprimieren. Zur Untersuchung

dieser Hypothese wurden IFNγ-ELISpot-Analysen durchgeführt, bei denen die IFNγ-Produktion von CD8⁺ T-Zellen aus Milzsuspensionen Ad5-prä-immuner Mäuse nach der Restimulation mit verschiedenen Ad5-Peptiden untersucht werden sollte. Neben den bereits bekannten CD8⁺ T-Zell-Epitopen $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ wurden 20 weitere H-2D^b- oder H-2K^b-restringierte Peptide als potentielle Epitop-Kandidaten überprüft. Diese Peptide hatten bei der Vorhersage mit der *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) jeweils die beste Bewertung in den Kriterien Peptid-Prozessierung, TAP-Transport und MHC-I-Bindung erzielt. Die Einteilung in Peptidpools erfolgte anhand des Ursprungs (Hexon, Penton, Fiber) sowie der MHC-I-Restriktion der Peptide (H-2D^b bzw. H-2K^b). Aus der ELISpot-Analyse ging hervor, dass CD8⁺ T-Zellen Ad5-immunisierter Mäuse nicht nur auf die Restimulation mit $DBP_{418-426}$ oder $Hexon_{486-494}$ reagierten, sondern auch nach Restimulation mit weiteren adenoviralen Peptiden IFNγ produzierten (Abb. 20). Die Restimulation mit Peptiden des Hexon D^b-Pools, des Penton K^b-Pools oder des Penton D^b-Pools führte zur Induktion IFNγ-produzierender CD8⁺ T-Zellen. Die Restimulation mit Peptiden des Hexon D^b-Pools resultierte teilweise in höheren Anteilen IFNγ-produzierender CD8⁺ T-Zellen als die Restimulation mit DBP-Peptid.

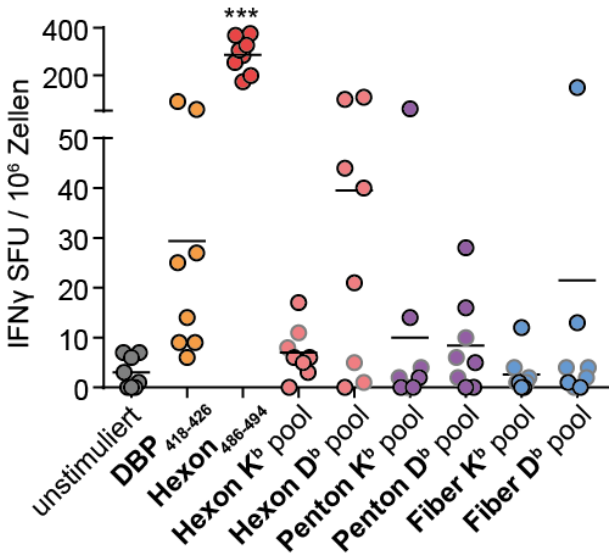

Abbildung 20: CD8⁺ T-Zellantworten gegen adenovirale CD8⁺T-Zell-Epitope

CB6F1-Mäuse wurden zweimal durch intramuskuläre Injektion mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5 immunisiert. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die IFNγ-Produktion von CD8⁺ T-Zellen aus den Milzzellsuspensionen mittels IFNγ-ELISpot-Assay überprüft. Die CD8⁺ T-Zellen wurden hierfür mit den Ad5-Peptiden $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$, bzw. mit Pools aus Hexon-, Penton- oder Fiber-Peptiden stimuliert. Letztere wurden mit der *Immune Epitope Database and Analysis Resource* (IEDB) erstellt und anhand ihrer vorhergesagten MHC-I-Restriktion zusammengefasst. Die Daten stammen von acht Mäusen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Datenpunkte, deren Werte den 2fach Cut-Off der unstimulierten Kontrolle unterschritten, wurden grau umrandet. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unstimulierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass in Ad5-Vektoren eine Vielzahl von Epitopen vorkommen, gegen welche bei der Immunisierung mit Ad5-Vektoren eine breite $CD8^+$ T-Zellantwort induziert wird, in deren immunologische Hierarchie das Transgen eingeordnet wird.

4.1.9 Herstellung OT-I-Peptid-Varianten-kodierender rekombinanter Ad5.Vektoren

Die vorherigen Versuche zeigten, dass natürlich in Ad5-Vektoren vorkommende $CD8^+$ T-Zell-Epitope mit Transgen-kodierten Epitopen konkurrieren und die Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten negativ beeinflussen können. Ovalbumin ist ein etabliertes Modell-Antigen, gegen dessen $CD8^+$ T-Zell-Epitop $OVA_{257-264}$ starke $CD8^+$ T-Zellantworten induziert werden können. Zehn und Kollegen generierten und untersuchten fünf Varianten des $OVA_{257-264}$-Epitops. Diese OT-I-Peptid-Varianten besaßen vergleichbare Bindungseigenschaften an H-$2K^b$-MHC-I-Moleküle wie das ursprüngliche OT-I-Peptid (SIINFEKL), unterschieden sich aber in ihrer Immunogenität [289]. Mithilfe einiger dieser OT-I-Peptid-Varianten sollte untersucht werden, wie sich weniger immunogene Epitope in der immunologischen Hierarchie Ad-spezifischer Epitope einordnen und inwiefern Immunantworten gegen Epitope einer definierten Immunogenität durch Ad5-spezifische Epitope beeinflusst werden.

Es wurden daher Ad5-Vektoren mithilfe des AdEasy-Systems (Abb. 21) generiert, welche für die drei OT-I-Peptid-Varianten OVA-Y3 (SIYNFEKL), OVA-Q4 (SIIQFEKL) und OVA-T4 (SIITFEKL) kodierten (Abb. 23F). Für die Herstellung der OT-I-Peptid-Varianten wurden zunächst Primer generiert, mit denen die entsprechenden Aminosäureaustausche über PCR in die Peptidsequenz eingebracht wurden. Hierbei wurde das gesamte Trägerplasmid als lineares Molekül amplifiziert und anschließend über eine Kinase-Ligase-*Dpn*I (KLD)-Reaktion zirkularisiert. Die erfolgreiche Mutation der SIINFEKL-Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Die Überführung der Transgene in pAdEasy-1 geschah in *E. coli* BJ5183 Bakterien durch homologe Rekombination. Das resultierende rekombinante pAdEasy mit Transgen wurde sodann in HEK-293 A-Zellen transfiziert, in welchen die Viruspartikel produziert wurden. Nach der Aufreinigung wurde die Transgen-Expression der Viren mittels Western Blot bestätigt.

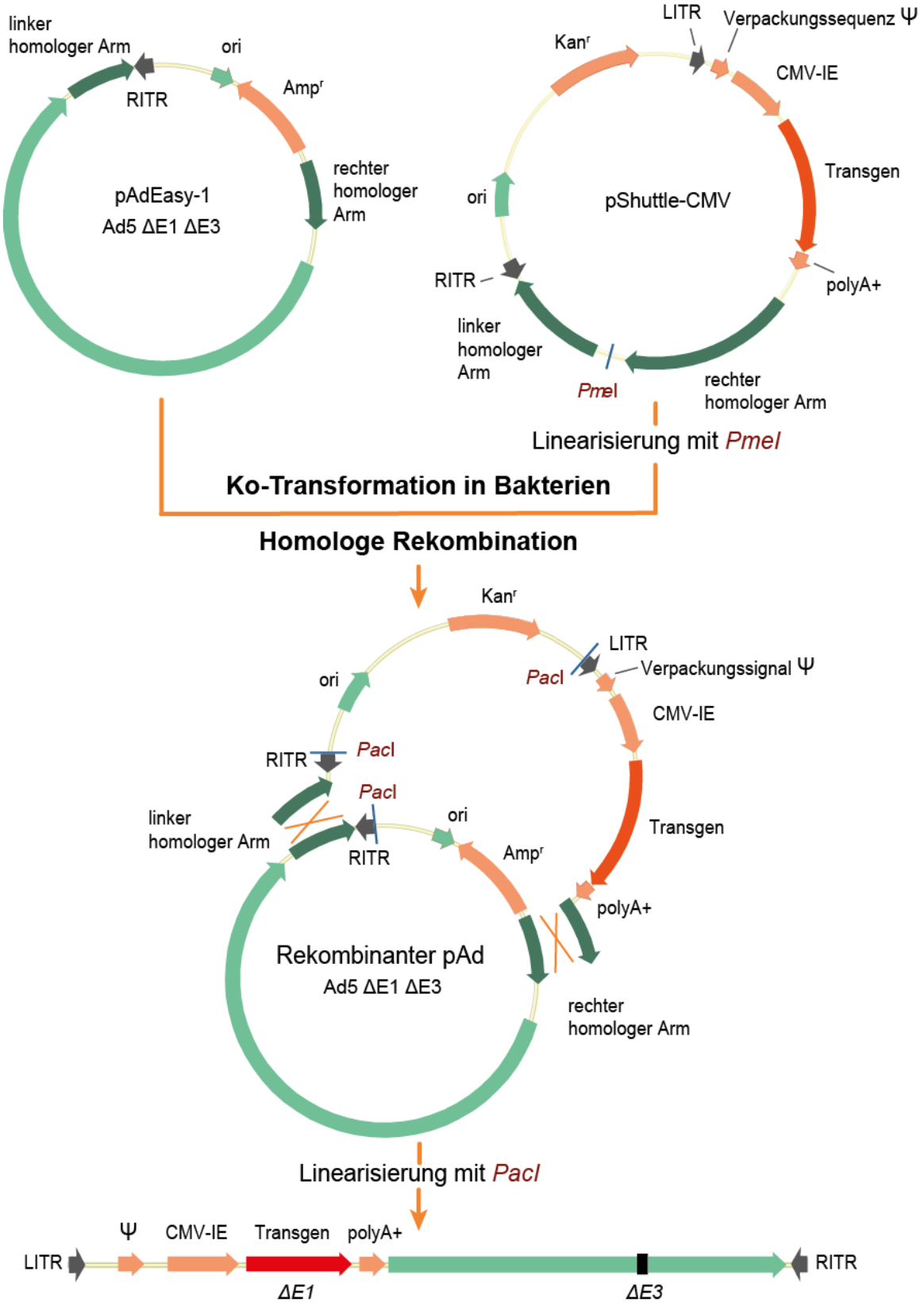

Abbildung 21: AdEasy-System

Nach der Klonierung des jeweiligen Transgens in das Trägerplasmid pShuttle wurde dieses linearisiert und in mit pAdEasy vortransformierte E. coli BJ5138 eingebracht. Durch homologe Rekombination wird das Transgen hier in das pAdEasy-Plasmid transferiert, welches das AdV-Genom (ΔE1, ΔE3) enthält. Nach erfolgreicher Rekombination wird das neu entstandene rekombinante pAd erneut linearisiert und in HEK-293A-Zellen transfiziert, in denen die Virus-Produktion stattfindet.

4.1.10 Immunisierungsexperimente mit für OT-I-Peptid-Varianten kodierenden Ad5-Impfvektoren

Die Immunogenität der OT-I-Peptid-Varianten wurde in der Publikation von Zehn und Kollegen [289] über die Peptidmenge definiert, die bei der Restimulation OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen benötigt wird, um eine vergleichbare halbmaximale IFNγ-Antwort zu induzieren, wie die Restimulation dieser Zellen mit OT-I-Peptid. Anhand dieser Definition war OVA-Y3 4,1x, OVA-Q4 18,3x und OVA-T4 70,7x weniger immunogen als das natürliche OT-I (Abb. 23F).

Als erstes sollte daher überprüft werden, ob die Immunogenität der verschiedenen OT-I-Peptid-Varianten bezogen auf durch Immunisierung in naiven CB6F1-Mäusen induzierte $CD8^+$ T-Zellen vergleichbar ist. Die Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp des jeweiligen Ad5-Vektors immunisiert (Abb. 22). Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde die Induktion OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Dextramerfärbung untersucht. Zudem wurde die Produktion von IFNγ nach Restimulation mit OT-I-Peptid, oder nach Restimulation mit den Ad5-Peptiden DBP_{418-26} oder $Hexon_{486-494}$ mittels ICS analysiert. Die Immunisierung mit Ad5.OVA führte, verglichen mit der unvakzinierten Kontrollgruppe, zur Induktion signifikant höherer, OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten (Abb. 23A). Die Induktion OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen war im Vergleich dazu in Ad5.OVA-Y3-immunisierten Mäusen deutlich niedriger. Nach Immunisierung mit Ad5.OVA-Q4 und Ad5.OVA-T4 detektierte OT-I-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten waren, verglichen mit der Ad5.OVA-immunisierten Gruppe, reduziert. Den Ergebnissen der Dextramerfärbung entsprechend wurde ein hoher Anteil $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen nachgewiesen (Abb. 23B). Verglichen dazu waren die Anteile $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen Ad5.OVA-Y3-, Ad5.OVA-Q4- oder Ad5.OVA-T4-immunisierter Mäuse deutlich niedriger.

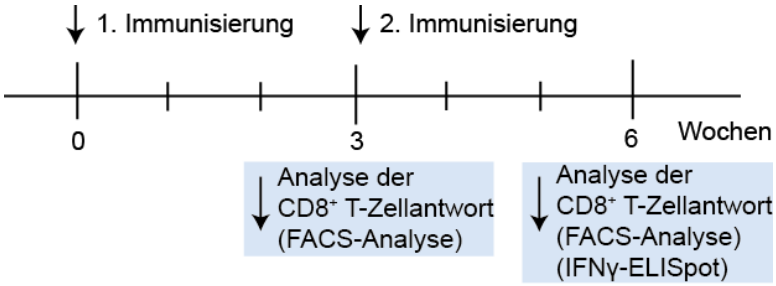

Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit OT-I-Peptidvarianten-kodierenden Ad5-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal mit je $1 \cdot 10^9$ vp des jeweiligen Ad5-Vektors immunisiert. Jeweils zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die $CD8^+$ T-Zellantwort mittels spezifischer Tetramerfärbung, sowie ICS, bzw. zwei Wochen nach dem Boost mithilfe der IFNγ-ELISpot-Analyse überprüft.

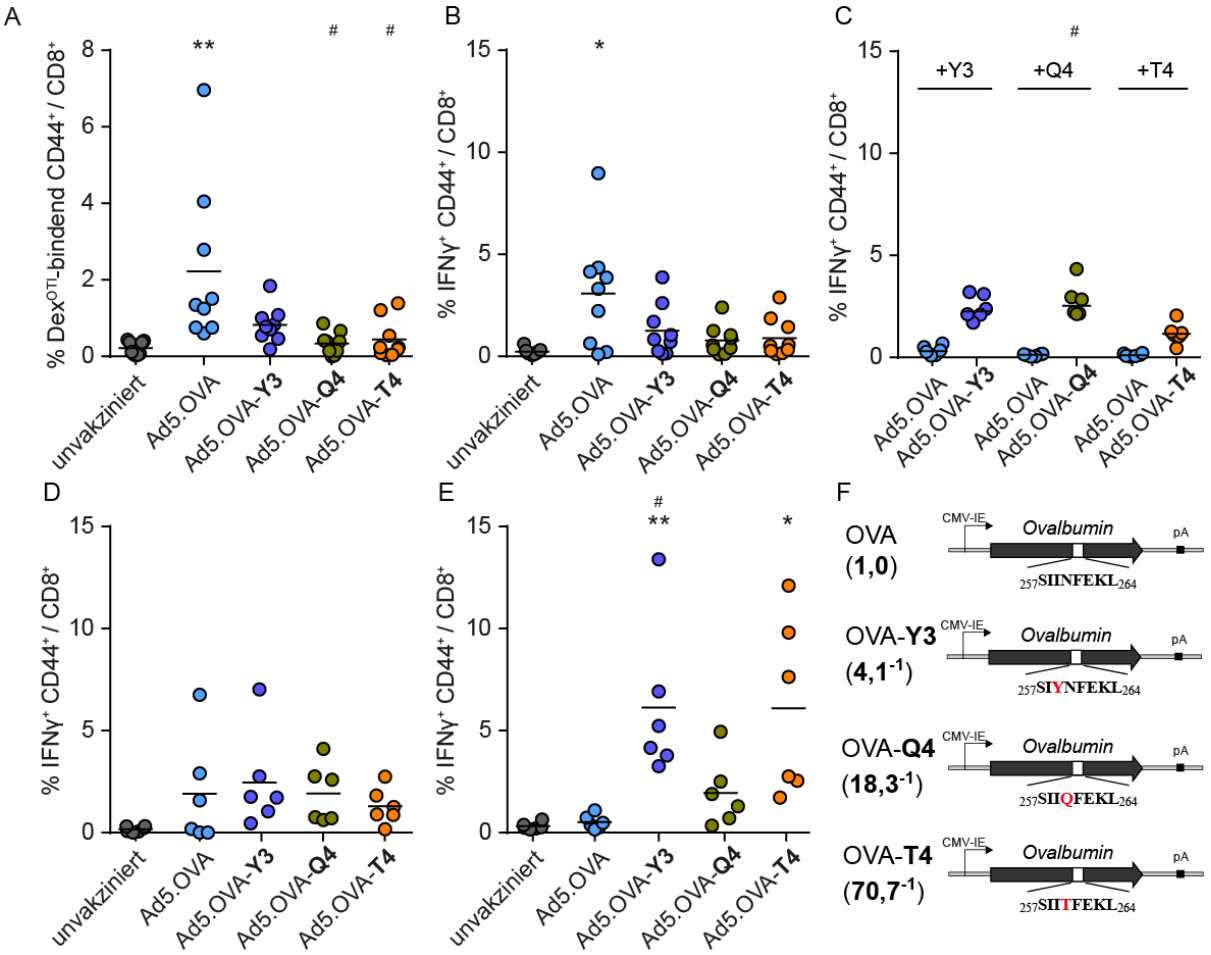

Abbildung 23: Untersuchung Transgen- und Ad5-Vektor-spezifischer CD8⁺T Zellantworten nach Immunisierung mit Transgenen unterschiedlicher Immunogenität

CB6F1-Mäuse wurden zweimal durch intramuskuläre Injektion mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5-Vektoren immunisiert. Für diese Experimente wurden Vektoren gewählt, die für Varianten des Ovalbumins (OVA) als Transgen kodieren. Neben Ad5.OVA, der für die natürliche Ovalbumin-Sequenz kodiert, wurden drei weitere Ad5-Vektoren verwendet, in denen das OVA-CD8⁺ T-Zell-Epitop SIINFEKL durch jeweils einen Aminosäureaustausch an Position 3 (Y3) bzw. 4 (Q4, T4) verändert wurde. Die OT-I Varianten sind absteigend nach ihrer Immunogenität (angegeben als Quotient zu der Menge OT-I-Peptid, die eine vergleichbare, halbmaximale IFNγ-Antwort stimulieren würde) angeordnet (F). Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde die Induktion $OVA_{257-264}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-I-Dextramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS nach Restimulation mit OTI-Peptid (B), oder mit den jeweiligen OT-I-Peptidvarianten (C) bzw. mit den Ad5-Peptiden DBP_{418-26} (D) oder $Hexon_{486-494}$ (E) überprüft. Da sich die Ergebnisse nach der ersten und zweiten Immunisierung nicht maßgeblich unterschieden, sind die Daten vom Zeitpunkt nach der ersten Immunisierung exemplarisch dargestellt. Die Daten stammen aus drei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe (B, C) bzw. aus zwei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe (D, E, F). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit * ($P < 0{,}05$) bzw. mit ** ($P < 0{,}01$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber Ad5.OVA sind mit # ($P < 0{,}05$) gekennzeichnet.

Als Ergänzung wurde die IFNγ-Produktion der induzierten CD8⁺ T-Zellen nach der Restimulation mit der entsprechenden OT-I-Peptid-Variante überprüft. Dafür wurden periphere CD8⁺ T-Zellen aus den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen sowie aus

Ad5.OVA-Y3-, Ad5.OVA-Q4- oder Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen mit der jeweiligen OT-I-Peptid-Variante restimuliert. Die Produktion von IFNγ wurde mittels ICS überprüft. In Ad5.OVA-immunisierten Mäusen wurden nach Restimulation mit allen OT-I-Peptid-Varianten keine IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen detektiert (Abb. 23C). CD8$^+$ T-Zellen aus Ad5.OVA-Y3-, Ad5.OVA-Q4- oder Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen reagierten hingegen auf ihr jeweiliges Peptid. Die Restimulation OVA-Y3-spezifischer und OVA-Q4-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mit den eigenen Peptiden resultiere in höheren Anteilen IFNγ$^+$CD8$^+$ T-Zellen als die Restimulation mit OT-I. Verglichen mit der OT-I-Restimulation der OT-I-spezifischen CD8$^+$ T-Zellen aus Ad5.OVA-immunisierten Mäusen, wurden in beiden Gruppen aber geringere Anteile IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen induziert. In Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen wurden sowohl nach der Restimulation mit OVA-T4-Peptid, als auch nach der Restimulation mit OT-I-Peptid vergleichbar geringe Anteile IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen.

Zur Überprüfung Vektor-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten wurde die IFNγ-Produktion der induzierten CD8$^+$ T-Zellen nach Restimulation mit den Ad5-Peptiden DBP$_{418-26}$ und Hexon$_{486-494}$ analysiert. Die Restimulation mit DBP$_{418-26}$-Peptid resultierte bei allen immunisierten Gruppen in ähnlichen Anteilen IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen (Abb. 23D). Die CD8$^+$ T-Zellen Ad5.OVA-geimpfter Mäuse reagierten schwach auf die Restimulation mit Hexon$_{486-494}$-Peptid. Im Gegensatz dazu konnten in Ad5.OVA-Y3- oder Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen durch Restimulation mit Hexon$_{486-494}$-Peptid IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23E). In Ad5.OVA-Q4-immunisierten Mäusen waren die Anteile IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen nach der Restimulation mit Hexon$_{486-494}$-Peptid höher als in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen, aber niedriger als in Ad5.OVA-Y3- oder Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen.

In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass durch die Immunisierung mit Ad5-Vektoren, die für schwächere Antigene kodierten, (Ad5.OVA>Ad5.OVA-Y3> Ad5.OVA-Q4>Ad5.OVA-T4) höhere Anteile Ad5-reaktiver CD8$^+$ T-Zellen induziert wurden. Die Verwendung schwächerer Antigene resultierte nicht in einer weiteren Zunahme Vektor-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten.

4.1.11 ELISpot-Analyse Vektor- und Transgen-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit OT-I-Peptid-Varianten-kodierenden Ad5-Vektoren

In den vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass adenovirale CD8$^+$ T-Zell-Epitope mit Transgen-kodierten Epitopen um die Induktion Transgen-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten konkurrieren. Zudem konnte in dem vorangegangenen Versuch

gezeigt werden, dass die erfolgreiche Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten durch Ad5-Vektoren eine Mindest-Immunogenität des Antigens erfordert und dass das Herabsetzen dieser Immunogenität in stärkeren Vektor-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten resultiert. Daher sollte mithilfe des IFNγ-ELISpot-Assays überprüft werden, ob sich bei absteigender Immunogenität des Antigens die Breite der induzierten Vektor-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort verändert. $CD8^+$ T-Zellen aus den mit Ad5.OVA, sowie mit den verschiedenen OT-I-Peptid-Varianten immunisierten Mäusen wurden hierfür mit den unter 4.1.8 Analyse Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach der Immunisierung mit Ad5 bereits beschriebenen Ad5-Peptiden restimuliert und auf die Produktion von IFNγ hin untersucht.

Der höchste Anteil IFNγ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen wurde nach Restimulation mit OT-I-Peptid in der Ad5.OVA-immunisierten Gruppe detektiert (Abb. 24). $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5.OVA-Y3-immunisierten Mäusen reagierten im Vergleich dazu schwächer auf die Restimulation mit OT-I. In Ad5.OVA-Q4- und Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen war der Anteil $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen, verglichen mit den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen, ebenfalls reduziert. Nach Restimulation mit DBP-Peptid konnten vergleichbare Anteile IFNγ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen, sowie in den OT-I-Peptid-Varianten-immunisierten Mäusen detektiert werden. Auch auf die Restimulation mit Hexon-Peptid reagierten die $CD8^+$ T-Zellen aller Gruppen vergleichsweise stark. Der Anteil IFNγ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen in den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen war hier aber niedriger, als in den mit OT-I-Peptid-Varianten immunisierten Gruppen.

Neben OT-I-, DBP- und Hexon-Peptid wurden außerdem die bereits beschriebenen Ad5-Peptid-Pools zur Restimulation verwendet. Interessanterweise reagierten $CD8^+$ T-Zellen aus den mit Ad5.OVA-immunisierten Mäusen nur schwach auf alle der sechs Ad5-Peptidpools. Im Vergleich zu den $CD8^+$ T-Zellen der Ad5.OVA-immunisierten Mäuse produzierten $CD8^+$ T-Zellen der meisten Mäuse aus den OT-I-Peptid-Varianten-Gruppen deutlich höhere Mengen IFNγ nach der Restimulation mit dem Hexon-K^b-, dem Penton K^b-, sowie dem Penton D^b-Peptidpool. In jeder Gruppe der OT-I-Peptid-Varianten-immunisierten Mäuse existierten aber auch Tiere, deren $CD8^+$ T-Zellen nicht oder nur schwach auf die verschiedenen Restimulationen reagierten. Die Restimulation mit Fiber-Peptiden induzierte hingegen nur eine marginale Produktion von IFNγ, welches sich nur in wenigen Mäusen aus den verschiedenen Gruppen vom Hintergrund der unstimulierten Kontrolle abhob.

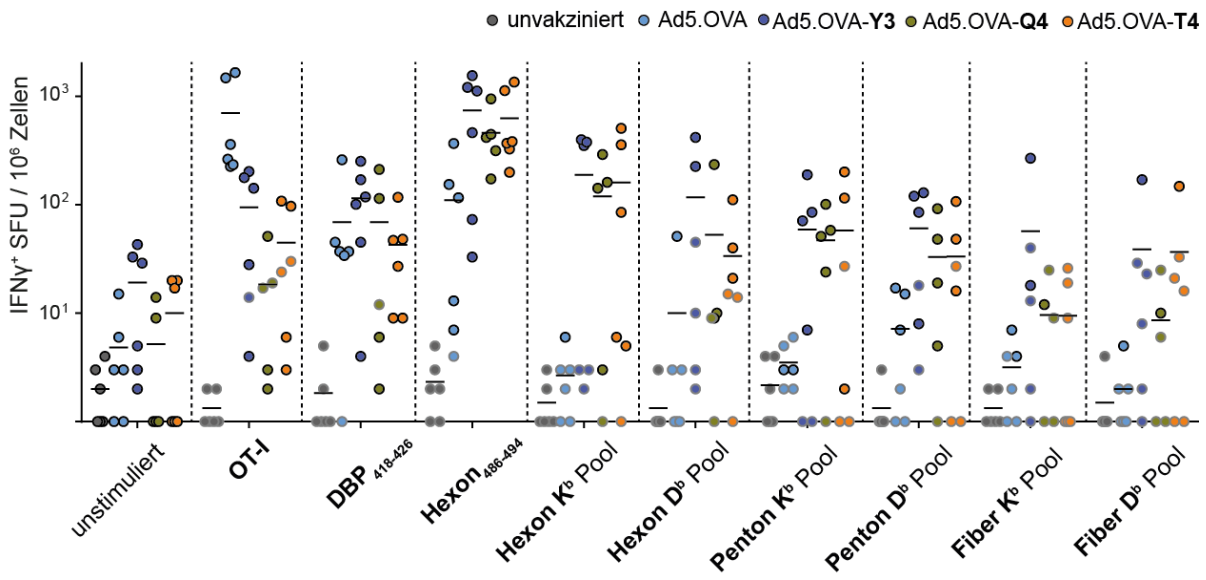

Abbildung 24: CD8⁺ T-Zellantworten nach Stimulation mit verschiedenen CD8⁺ T-Zellpeptiden

CB6F1-Mäuse wurden zweimal durch intramuskuläre Injektion mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.OVA-kodierenden Vektoren immunisiert. Neben Ad5.OVA wurden drei weitere Ad5-Vektoren verwendet, in denen das OVA-CD8⁺ T-Zell-Epitop SIINFEKL durch jeweils einen Aminosäureaustausch an Position 3 (**Y_3**) bzw. 4 (**Q_4**, **T_4**) verändert wurde. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Produktion von IFNγ durch CD8⁺ T-Zellen aus den Milzzellsuspensionen mittels ELISpot-Assay überprüft. Die CD8⁺ T-Zellen wurden hierfür mit OT-I-Peptid, mit den Ad5-Peptiden $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$, bzw. mit Pools aus Hexon-, Penton- oder Fiber-Peptiden stimuliert. Letztere wurden mithilfe der IEDB erstellt und anhand ihrer vorhergesagten MHC-I-Restriktion in Peptidpools zusammengefasst. Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Datenpunkte, deren Werte den zweifach Cut-Off der unstimulierten Kontrole unterschritten wurden grau umrandet. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert dar.

In Gegenwart des natürlichen OVA-Antigens (Ad5.OVA) werden hauptsächlich CD8⁺ T-Zellantworten gegen die beiden stärksten adenoviralen CD8⁺ T-Zell-Epitope DBP_{418-26} und $Hexon_{486-494}$ induziert, während nur geringfügige CD8⁺ T-Zellantworten gegen schwächere adenovirale Epitope ausgelöst werden. Wurde das OT-I-Antigen graduell abgeschwächt reagierten Ad5-erfahrene CD8⁺ T-Zellen auf die Restimulation mit verschiedenen Ad5-Peptidpools. Die Induktion Ad5-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten wurde jedoch nicht weiter mit abnehmender Immunogenität des Transgens (Ad5.OVA-Y3>Ad5.OVA-Q4>Ad5.OVA-T4) erhöht. Zudem resultierte die Immunisierung mit den verschieden immunogenen OT-I-Peptid-Varianten nicht in verschiedenen Reaktionsmustern gegen adenovirale Peptide.

4.1.12 Analyse der Antikörperantwort nach der Immunisierung mit OT-I-Peptid-Varianten-kodierenden Ad5-Vektoren

Neben der Untersuchung der $CD8^+$ T-Zellantwort sollte die Induktion OVA- und Ad5-bindender, sowie Ad5-neutralisierender Antikörper nach Impfung mit Ad5.OVA bzw. den jeweiligen OT-I-Peptid-Varianten überprüft werden. Hierzu wurde Plasma, welches zwei Wochen nach der ersten bzw. der zweiten Immunisierung gewonnen wurde, mittels ELISA und *in vitro* Neutralisationstest untersucht.

Nach der ersten Immunisierung konnten im Plasma von Ad5.OVA-immunisierten Mäusen keine OVA-bindenden Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 25A). Im Gegensatz dazu besaßen mit Ad5.OVA-Y3-, Ad5.OVA-Q4- und Ad5.OVA-T4-immunisierte Mäuse nach der ersten Immunisierung moderate Titer OVA-bindender Antikörper, welche etwas stärker in den Ad5.OVA-T4-immunisierten Mäusen ausgeprägt waren als in den anderen beiden Gruppen. Nach der zweiten Immunisierung waren die OVA-bindenden Antikörpertiter in den Ad5.OVA-immunisieren Mäusen weiterhin niedrig und lagen im Median unter der Nachweisgrenze (Abb. 25B). Verglichen zu den mit Ad5.OVA-immunisierten und den unvakzinierten Mäusen konnten signifikant höhere OVA-bindende Antikörpertiter in allen mit OT-I-Peptid-Varianten immunisierten Mäusen detektiert werden. Weder nach der ersten noch nach der zweiten Immunisierung konnten in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen Ad5-bindende Antikörpertiter nachgewiesen werden (Abb. 25C+D). In den mit den OT-I-Peptid-Varianten-immunisierten Mäusen wurden hingegen höhere Titer Ad5-bindender Antikörper als in den Ad5.OVA-immunisierten oder den unvakzinierten Mäusen ermittelt. Die höchsten Ad5-bindenden Antikörpertiter wurden nach der zweiten Immunisierung in Ad5.OVA-Y3-immunisierten Mäusen detektiert. Ad5-neutralisierende Antikörper wurden nach der Immunisierung mit Ad5.OVA nur in einigen Mäusen in geringen Titern nachgewiesen (Abb. 25E). Auch in der Ad5.OVA-Y3-immunisierten Gruppen konnten nur geringe Mengen Ad5-neutralisierender Antikörper festgestellt werden und dies nur in einem Teil der Mäuse. In den mit Ad5.OVA-Q4 oder Ad5.OVA-T4 wurden hingegen, im Vergleich zur unvakzinierten Kontrollgruppe, Ad5-neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse zeigten, dass nach der Immunisierung mit den schwächer immunogenen OT-I-Peptid-Varianten höhere OVA-bindende (Abb. 25A+B) und höhere Ad5-bindende Antikörpertiter (Abb. 25C+D) sowie geringfügig höhere Ad5-neutralisierende Antikörpertiter (Abb. 25E) induziert werden konnten, als nach Immunisierung mit Ad5.OVA. Im Gegensatz hierzu waren Peptid-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten der OT-I-Peptid-Varianten-immunisierten Mäuse im Vergleich zu den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen reduziert, während auch hier höhere Ad5-

spezifische CD8⁺ T-Zellantworten in den mit OT-I-Peptid-Varianten immunisierten Mäusen als in den mit Ad5.OVA immunisierten Mäusen detektiert werden konnten. Somit war die Induktion OVA-spezifischer bindender Antikörper unabhängig von der Induktion OT-I-spezifischer CD8⁺ T-Zellen und wurde nicht durch die abnehmende Immunogenität des OT-I-Epitops beeinflusst.

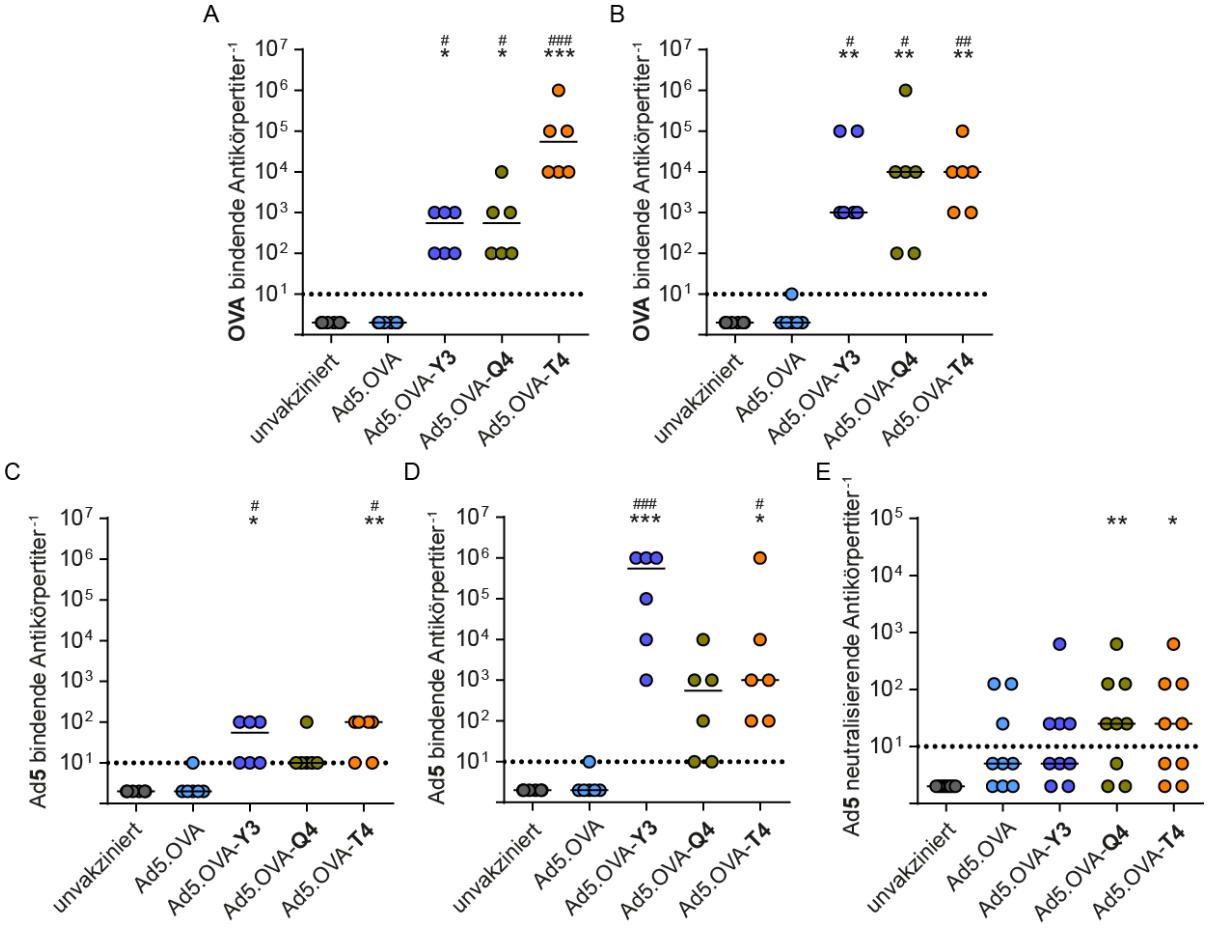

Abbildung 25: Induktion Transgen- und Vektor-spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit Ad5-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal durch intramuskuläre Injektion mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5-Vektoren immunisiert, die Varianten des Ovalbumins (OVA) als Transgen exprimieren. Neben Ad5.OVA, der für die natürliche Ovalbumin-Sequenz kodiert, wurden drei weitere Ad5-Vektoren verwendet, in denen das OVA CD8⁺ T-Zell-Epitop SIINFEKL durch jeweils einen Aminosäureaustausch an Position 3 (**Y_3**) bzw. 4 (**Q_4**, **T_4**) verändert wurde. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurden Plasmaproben der Mäuse genommen und auf Titer OVA-bindender (A, B), sowie Ad5-bindende (C, D) bzw. neutralisierende Antikörper (E) untersucht. Die Ergebnisse nach der ersten Immunisierung sind in A und C, jene nach der zweiten Immunisierung in B, D und E dargestellt. Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die gestrichelten Linien markieren de untere Nachweisgrenze. Waagerechte Linien stellen den Median dar. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), *** ($P < 0{,}001$) bzw. mit **** ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet. Statistische Signifikanzen gegenüber Ad5.OVA sind mit # ($P < 0{,}05$) bzw. mit ### ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

4.2 Ad5-Prä-Immunität

Die globale Verbreitung des Adenovirus Typ 5 ist mit einer häufigen Exposition des Menschen und daraus entstehender Prä-Immunität gegen Ad5 verbunden. Die Ad5-Prä-Immunität stellt eine Einschränkung bei der Verwendung Ad5-basierter Vektoren für die Gentherapie oder zur Immunisierung dar. Neben Vektor-spezifischen Antikörpern werden auch zelluläre Komponenten des Immunsystems induziert, die zusammen zur raschen Neutralisation des Vektors und somit zum Abbruch der Transgen-Expression führen könnten. In unserer Arbeitsgruppe wurde jedoch im Vorfeld dieser Arbeit mehrfach beobachtet, dass in Ad5-prä-immunen Mäusen nach Impfung mit einem Ad5-basierten Vektor deutlich höhere Transgen-bindende Antikörpertiter induziert wurden, als in einer naiven Vergleichsgruppe. Diese Observation widerspricht einer vollständigen Neutralisation des Ad5-Vektors in einem Ad5-prä-immunen Milieu. Daher sollte in diesem Teil der hier vorliegenden Doktorarbeit die Ad5-spezifische Prä-Immunität näher untersucht werden.

Der Ad5-Vektor Ad5.TxnGagL kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus dem FV $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$ und murinem Thioredoxin (Txn). Txn ist ein in vielen Organismen vorkommendes, nicht-toxisches Protein mit Immunogenitäts-steigernder Wirkung, das sich sehr gut als Scaffold-Protein vor allem für Epitope geringerer Immunogenität eignet. Immunisierungen naiver CB6F1-Mäuse mit Ad5.TxnGagL resultieren in potenten $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten und vermitteln einen nahezu sterilen Schutz auch bei nachfolgender Infektion mit hohen Dosen FV [93]. In vorangegangenen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach Impfung mit Ad5.TxnGagL in Ad5-prä-immunen CB6F1-Mäusen komplett unterdrückt wird.

4.2.1 Einfluss von zellulären und humoralen Immunantworten in der Ad5-Prä-Immunität

Zunächst sollte die Rolle unterschiedlicher immunologisch-relevanter Zell-populationen, sowie Ad5-spezifischer Antikörper in der Ad5-Prä-Immunität näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden CB6F1-Mäuse jeweils zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty, welcher für kein Transgen kodiert, immunisiert (Abb. 26). Der Grad der Vorimmunisierung wurde mittels αAd5-ELISA über die Bestimmung Ad5-bindender Antikörpertiter überprüft. Aus prä-immunen Mäusen wurden die Antikörper in Form von Plasma, sowie $CD4^+$- und $CD8^+$ T-Zellen aus den Milzen und Lymphknoten isoliert. Die isolierten Zellen sowie das Plasma wurden jeweils in eine Gruppe naiver CB6F1-Mäuse transferiert. Einen Tag nach dem Transfer wurden die

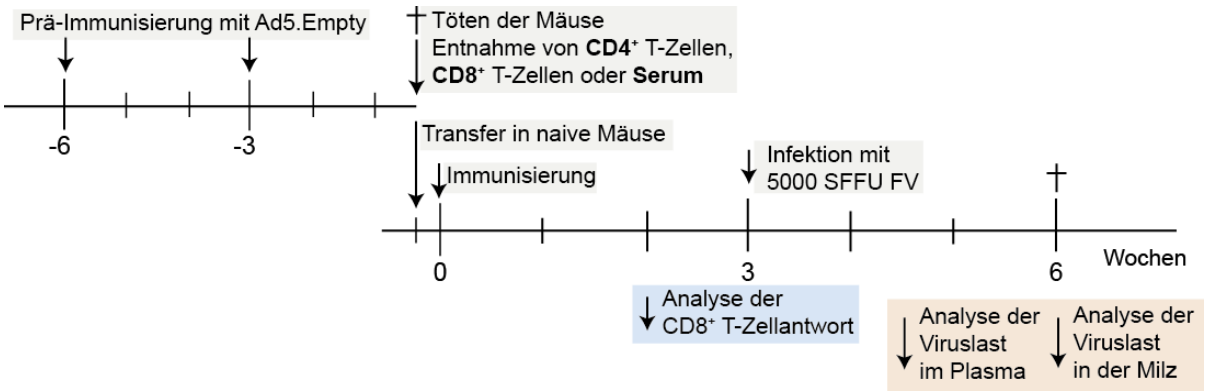

Abbildung 26:Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus der Immunisierungsexperimente zur Untersuchung der Ad5-Prä-Immunität

CB6F1-Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal mit je $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty prä-immuisiert. Nach drei Wochen wurden die Mäuse getötet, $CD4^+$-, $CD8^+$ T-Zellen, sowie Plasma isoliert und in naive CB6F1-Mäuse transferiert, die einen Tag später mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL immunisiert wurden. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die $CD8^+$ T-Zellantwort mittels spezifischer Tetramerfärbung, sowie ICS überprüft. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere analysiert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in der Milz untersucht.

Mäuse mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL immunisiert. Naive, nur mit Ad5.TxnGagL immunisierte Tiere, sowie zuvor prä-immunisierte Mäuse, die ebenfalls mit Ad5.TxnGagL immunisiert wurden, dienten als experimentelle Kontrollen. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung und die Produktion von IFNγ in $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft.

Die Immunisierung naiver CB6F1-Mäuse mit Ad5.TxnGagL führte zur Induktion signifikanter $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten, die in Ad5-prä-immunen Mäusen vollständig unterbunden wurden (Abb. 27A+B). Wurden naiven Mäusen vor der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL $CD4^+$ T-Zellen oder $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5-prä-immunen Tieren injiziert, hatte dies nur einen moderaten inhibitorischen Einfluss auf die induzierte $CD8^+$ T-Zellantwort (Abb. 27A). In Mäusen, denen Plasma aus Ad5-prä-immunen Tieren transferiert worden war, wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten hingegen vollständig inhibiert. Ein signifikanter Anteil der $CD8^+$ T-Zellen aus nur mit Ad5.TxnGagL immunisierten Mäusen produzierte nach der Restimulation mit GagL-Peptid IFNγ (Abb. 27B). Vergleichbare Anteile $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen konnten nach Transfer von $CD4^+$ T-Zell- oder $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden. Bei Plasma-transferierten Mäusen, sowie bei Ad5-prä-immunen Mäusen konnten hingegen keine $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid nachgewiesen werden. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse aller Gruppen zur Überprüfung des Impfschutzes intravenös mit 5000 SFFU FV infiziert.

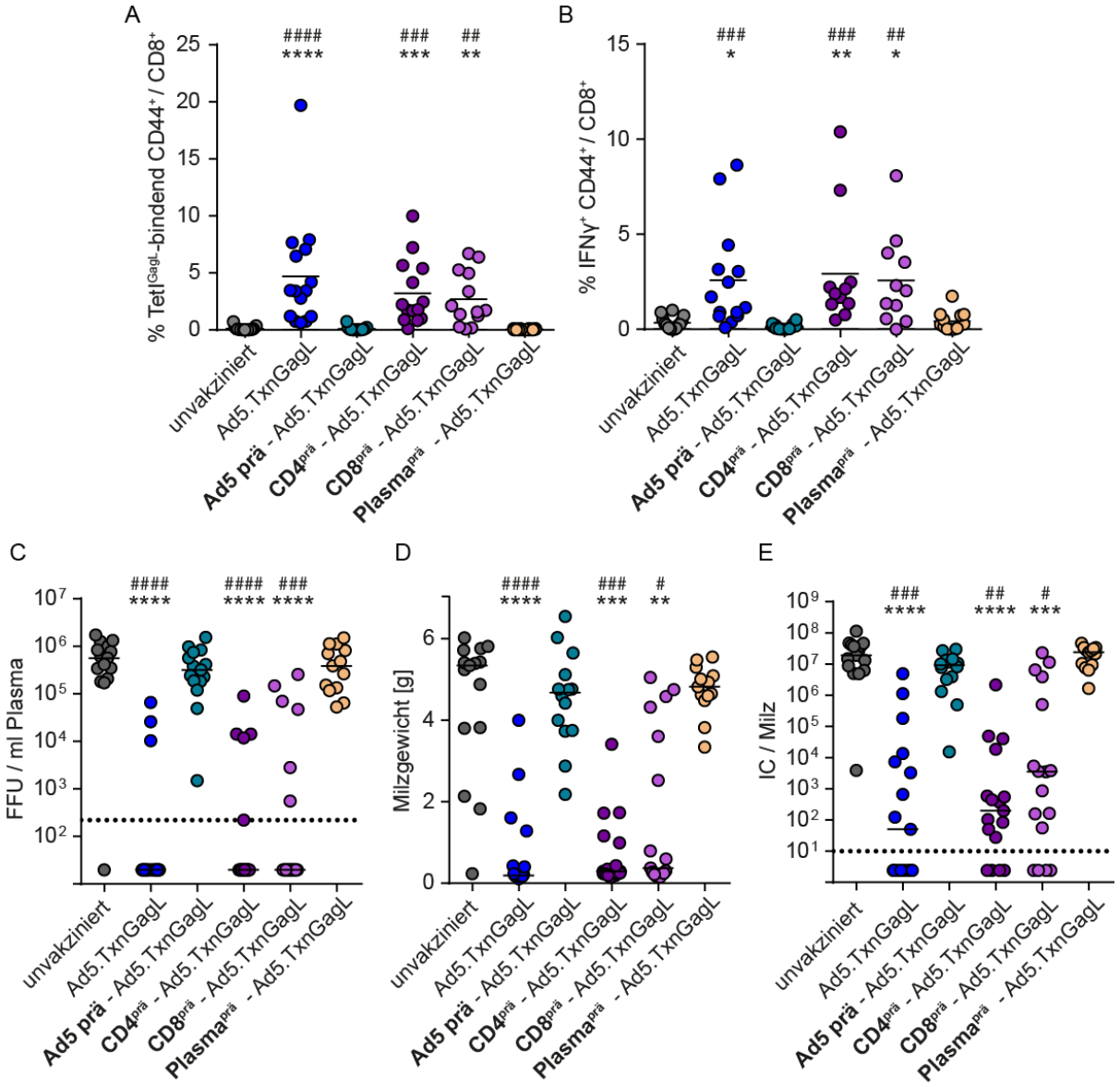

Abbildung 27: Auswirkung des Transfers von CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen oder Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen auf die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL

CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty vorimmunisiert. Hiernach wurden CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, sowie Plasma aus diesen prä-immunen Mäusen isoliert und in jeweils eine Gruppe naiver Mäuse transferiert. Die Transfer-Mäuse wurden einen Tag nach dem Transfer mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL immunisiert. Eine Gruppe naiver, sowie zuvor prä-immunisierter Mäuse wurde ebenfalls mit Ad5.TxnGagL immunisiert. Diese Gruppen dienen als experimentelle Kontrollen. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (D). Die Daten stammen aus vier (A, B) bzw. fünf Experimenten (C-E) mit dreimal drei und zweimal vier Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), *** ($P < 0{,}001$), bzw. mit **** ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Ad5-prä-immunen Gruppe sind mit # ($P < 0{,}05$), ## ($P < 0{,}01$), ### ($P < 0{,}001$), bzw. mit #### ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet.

In den nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen war die Virämie im Plasma 10 Tage nach der Infektion bis unter die Nachweisgrenze reduziert, während in den unvakzinierten Mäusen und in den Ad5-prä-immunen Mäusen hohe Viruslasten detektiert wurden (Abb. 27C). Im Gegensatz zu den unvakzinierten und den Ad5-prä-immunen Mäusen besaßen sowohl die $CD4^+$ T-Zell- als auch die $CD8^+$ T-Zell-transferierten Mäuse signifikant bis unter die Nachweisgrenze verringerte Viruslasten im Plasma. Die Virämie der Plasma-transferierten Mäuse war hingegen vergleichbar hoch wie die der unvakzinierten Mäusen bzw. den Ad5-prä-immunen Mäusen.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in den Milzen mittels IC-Assay bestimmt. Die Milzen der Ad5-prä-immunen Mäuse waren ähnlich vergrößert, wie in den unvakzinierten Mäusen, während die Milzgewichte der Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäuse, sowie der $CD4^+$ T-Zell-, als auch der $CD8^+$ T-Zell-transferierten Mäuse im Vergleich dazu signifikant niedriger waren (Abb. 27D). Die Milzen der Plasma-transferierten Mäuse waren hingegen ähnlich vergrößert, wie die der Ad5-prä-immunen Tiere. Durch Immunisierung naiver Mäuse mit Ad5.TxnGagL konnte die Viruslast in den Milzen, verglichen zu den unvakzinierten Mäusen, um mehr als 5 log-Stufen reduziert werden und lag bei 8 von 17 Tieren unter der Nachweisgrenze (Abb. 27E). Die Viruslast in den Milzen Ad5-prä-immuner Mäuse war hingegen vergleichbar hoch wie in den unvakzinierten Mäusen. Die Viruslasten in den Milzen der $CD4^+$ - und der $CD8^+$ T-Zell-transferierten Mäuse waren deutlich verringert und vergleichbar mit den nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen. Hierbei wurden in den $CD8^+$ T-Zell-transferierten Mäusen leicht höhere Viruslasten detektiert, als bei den $CD4^+$ T-Zell-transferierten Mäusen. Im Gegensatz dazu waren die Viruslasten in den Milzen der Plasma-transferierten Mäuse nicht reduziert und entsprachen denen der unvakzinierten bzw. der Ad5-prä-immunen Kontrollgruppen.

Die Resultate dieser Experimente zeigen, dass der Transfer von $CD4^+$ T-Zellen oder $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5-prä-immunen Mäusen in naive Mäuse nur einen schwachen Effekt auf die nachfolgende Impfung mit einem Ad5-basierten Vektor hat. Ein starker Effekt wurde hingegen nach dem Plasmatransfer Ad5-prä-immuner Mäuse beobachtet und führte zur vollständigen Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zell-antworten, sowie damit verbundenem reduziertem Schutz vor einer FV Infektion.

4.2.2 Einfluss Ad5-spezifischer Immunglobuline G in der Ad5-Prä-Immunität

Das vorherige Experiment zeigte, dass der Transfer von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen durch Impfung mit Ad5.TxnGagL vollständig unterbindet. Daher sollte nun überprüft werden, ob der

beobachtete Effekt durch im Plasma vorhandene Immunglobin G (IgG) -Antikörper vermittelt wird, oder auf andere im Plasma enthaltene Faktoren zurückzuführen ist.

Protein G ist ein aus der Zellwand von Streptokokken gewonnenes Protein, das mit hoher Affinität die Fc-Region von Immunglobulinen des Typs G bindet. Plasma Ad5-prä-immuner Mäuse wurde mehrfach mit Protein G-gekoppelter Sepharose behandelt, um darin vorhandene IgG-Antikörper vollständig zu entfernen. Die Reinigungseffizienz wurde mittels αAd5-ELISA überprüft. Anschließend wurde naiven CB6F1-Mäusen einen Tag vor der intramuskulären Impfung mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL entweder unbehandeltes Plasma von Ad5-prä-immunen Mäusen ($Plasma^{prä}$) oder das Protein G-behandelte Plasma ($Plasma^{clear}$) intravenös injiziert. Als experimentelle Kontrollgruppen dienten unvakzinierte Mäuse, naive, nur mit Ad5.TxnGagL immunisierte Mäuse, sowie Ad5-prä-immune, mit Ad5.TxnGagL geimpfte Mäuse. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung und deren Produktion von IFNγ nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft.

Naive, nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierte Mäuse induzierten potente $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zell-antworten, die in Ad5-prä-immunen Mäusen vollständig inhibiert wurden (Abb. 28A). Der Transfer von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen, einen Tag vor der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL, resultierte ebenfalls in der vollständigen Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten. Wurde das Plasma aus prä-immunen Mäusen vor dem Transfer mit Protein G-Sepharose behandelt ($Plasma^{clear}$), konnten nach der Impfung mit Ad5.TxnGagL $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$T-Zellantworten detektiert werden. In Übereinstimmung hierzu wurden nach der Restimulation mit GagL-Peptid $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen in Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen, sowie in $Plasma^{clear}$-transferierten Mäusen nachgewiesen, während in Ad5-prä-immunen oder $Plasma^{prä}$-transferierten Mäusen keine IFNγ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen detektiert wurden (Abb. 28B).

Drei Wochen nach der Ad5.TxnGagL-Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma überprüft. Die Virämie der nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäuse war im Gegensatz zu der unvakzinierten und der Ad5-prä-immunen Kontrollgruppe signifikant reduziert und lag bei allen Mäusen unter der Nachweisgrenze (Abb. 28C). Ad5-prä-immune Mäuse wiesen im Plasma ähnliche Viruslasten auf, wie die unvakzinierte Kontrollgruppe.

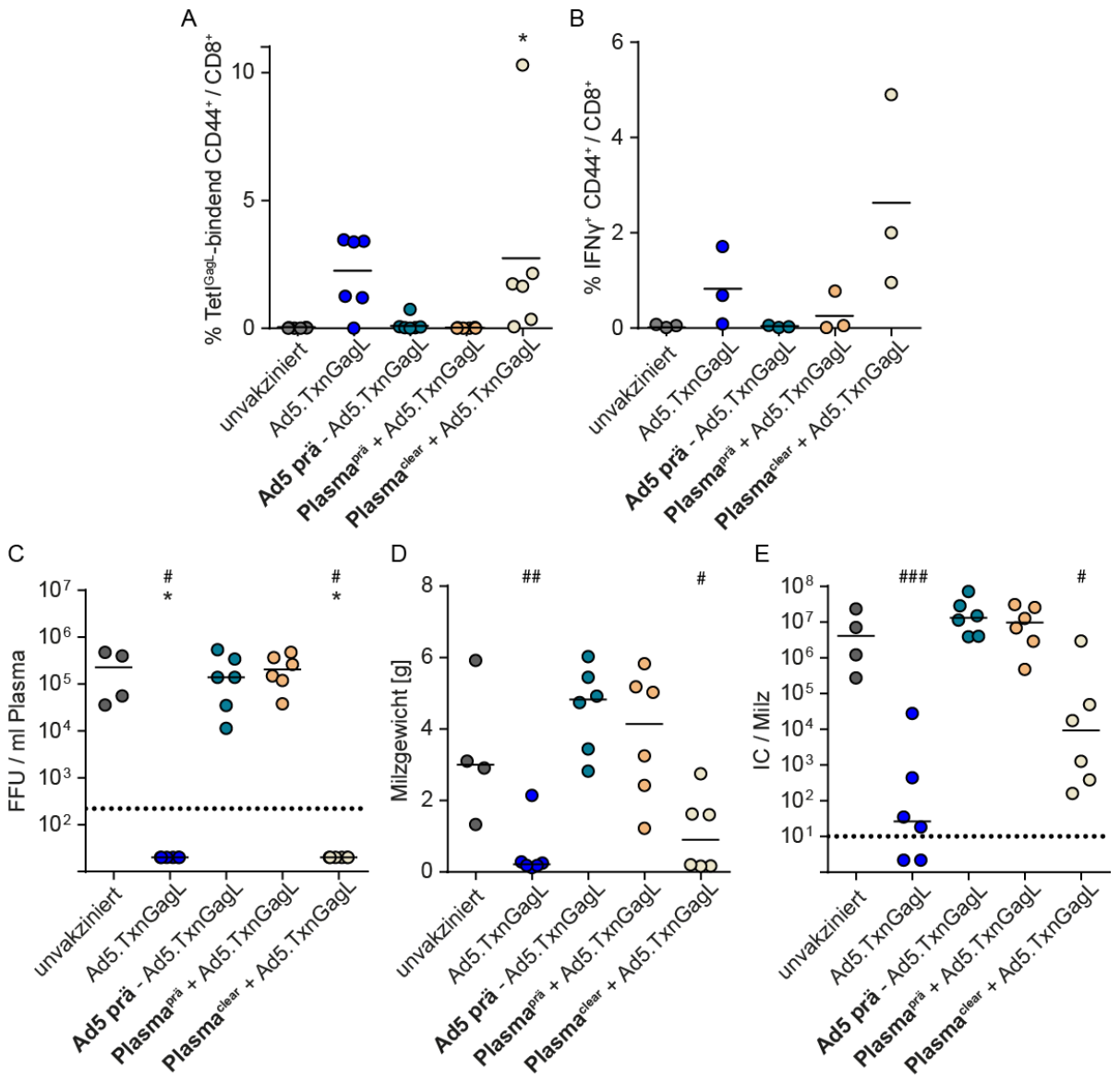

Abbildung 28: Auswirkung des Transfers von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen vor und nach Behandlung mit Protein G

Plasma aus zweimal mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty vorimmunisierten CB6F1-Mäusen wurde isoliert und entweder direkt in naive Mäuse transferiert (Plasma^{prä}), oder zuvor mit Protein G-Sepharose-Beads behandelt (Plasma^{clear}). Einen Tag nach dem Transfer wurden die Mäuse mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL immunisiert. Eine Gruppe naiver, sowie zuvor prä-immunisierter Mäuse wurden ebenfalls mit Ad5.TxnGagL immunisiert und dienten als experimentelle Kontrollgruppen. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (D). Die Daten stammen aus einem (B) bzw. aus zwei Experimenten (A, C-E) mit je drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit * ($P < 0{,}05$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Ad5-prä-immunen Gruppe sind mit # ($P < 0{,}05$), ## ($P < 0{,}01$), bzw. mit ### ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

Ein vergleichbares Ergebnis wurde für die Plasma^{prä}-transferierten Mäuse festgestellt. Im Gegensatz dazu war die Virämie im Plasma der Plasma^{clear}-transferierten Mäuse signifikant im Vergleich zur unvakzinierten und zur Ad5-prä-immunen Gruppe reduziert und lag bei allen Tieren unter dem Detektionslimit. Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen gewogen und die Viruslast darin mittels IC Assay bestimmt. Die Ad5-prä-immunen Mäuse besaßen ähnlich vergrößerte Milzen, wie die unvakzinierten Mäuse, während die Milzen der Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäuse nicht vergrößert waren (Abb. 28D). Die Mäuse der Plasma^{prä}-Gruppe hatten ebenfalls stark vergrößerte Milzen, wohingegen die Milzen aus Mäusen der Plasma^{clear}-Gruppe nur gering vergrößert waren. Bei der Betrachtung der viralen Belastung in den Milzen wurden in Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen deutlich niedrigere Viruslasten detektiert als bei den Ad5-prä-immunen Mäusen (Abb. 28E). Wurde den Mäusen vor der Immunisierung mit Ad5.Txn Plasma aus prä-immunen Tieren injiziert, so waren diese nicht vor der FV-induzierten Erkrankung geschützt. In den Milzen dieser Mäuse wurden hohe Viruslasten detektiert. Die Viruslasten in den Plasma^{clear}-transferierten Mäusen waren höher, als in den Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen, aber verglichen mit den Viruslasten in den Ad5-prä-immunen Mäusen verringert.

Die durchgeführten Experimente zeigen einen starken Einfluss Ad5-spezifischer IgG-Antikörper auf das Resultat einer Impfung mit dem in naiven Mäusen potenten Ad5.TxnGagL. Der Transfer von mit Protein G-behandeltem Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen hatte keinen starken Einfluss auf die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8^{+} T-Zellen, beeinträchtigte aber den schützenden Effekt der Immunisierung bezüglich der FV-induzierten Erkrankung. Die Gewichte der Milzen und die darin detektierten Viruslasten bei Mäusen der Plasma^{clear}-Gruppe waren im Vergleich zu den Ad5-prä-immunen Mäusen signifikant reduziert. Verglichen mit der Ad5.TxnGagL-immunisierten Gruppe hatten die Plasma^{clear}-Mäuse aber sowohl größere Milzen als auch höhere Viruslasten.

4.2.3 Einfluss Ad5-bindender und –neutralisierender Antikörper in der Ad5-Prä-Immunität

In den bisherigen Experimenten zur Ad5-Prä-Immunität konnte gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit Ad5.TxnGagL hervorgerufene GagL$_{85-93}$-spezifische CD8^{+} T-Zellantworten durch den Transfer von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen inhibiert werden. Antikörper besitzen unterschiedliche Qualitäten und Wirkmechanismen, durch welche sie Pathogene inaktivieren. Im nachfolgenden Versuch sollte daher die

Auswirkung des Transfers Ad5-bindender bzw. Ad5-neutralisierender Antikörper auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten untersucht werden.

Hierfür wurden bindende und neutralisierende Antikörper gegen das humane Ad5 aus den Zellkulturüberständen von zwei Hybridomazelllinien aufgereinigt. Die Antikörper wurden den Mäusen einen Tag vor der Immunisierung mit Ad5.TxnGagL intravenös injiziert. Die Menge der Antikörper wurde so gewählt, dass sie der Gesamtmenge Antikörper im Blut einer Ad5-prä-immunen Maus entsprach. Als Referenzen dienten eine Gruppe nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierter Mäuse, sowie eine Gruppe unvakzinierter Mäuse. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung und die Produktion von IFNγ in $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS untersucht. Die mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäuse induzierten eindeutige $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten (Abb. 29A). Wurden den Mäusen zuvor Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert, konnten in diesen keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden in Mäuse, denen vor der Immunisierung Ad5-bindende Antikörper injiziert wurden, signifikante $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten detektiert, die geringfügig im Vergleich zu den Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen reduziert waren. In Ad5.TxnGagL immunisierten Mäusen, sowie in Mäusen, denen Ad5-bindende Antikörper injiziert wurden, wurden nach Restimulation mit GagL-Peptid signifikante Anteile $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen. In Mäusen, denen Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert wurden, konnten hingegen keine IFNγ-produzierenden $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden (Abb. 29B).

Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV intravenös infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma überprüft. Unvakzinierte Mäuse und Mäuse, denen Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert worden waren, hatten vergleichbar hohe Viruslasten im Plasma (Abb. 29C). Weder in nur mit Ad5.TxnGagL immunisierten Mäusen, noch in Mäusen, denen Ad5-bindende Antikörper injiziert wurden, konnte hingegen Virus im Plasma detektiert werden. Die unvakzinierten Mäuse, sowie Mäuse, denen Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert wurden, hatten deutlich vergrößerte Milzen. Im Gegensatz dazu waren die Milzen der nur mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Tiere und der Mäuse, denen Ad5-bindende Antikörper injiziert wurden, kaum vergrößert (Abb. 29D). In den Milzen unvakzinierter Mäuse wurden drei Wochen nach der Infektion hohe Viruslasten detektiert (Abb. 29E). In mit Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen konnte kein Virus in den Milzen nachgewiesen werden. Mäuse, denen Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert wurden, wiesen ähnlich hohe Viruslasten in den Milzen auf wie die unvakzinierte Kontrollgruppe. In den Milzen einiger der Mäuse,

denen Ad5-neutralisierende Antikörper injiziert wurden, konnte Virus detektiert werden. Bei 8 von 13 Mäusen dieser Gruppe befand sich die Viruslast in der Milz jedoch unter dem Detektionslimit.

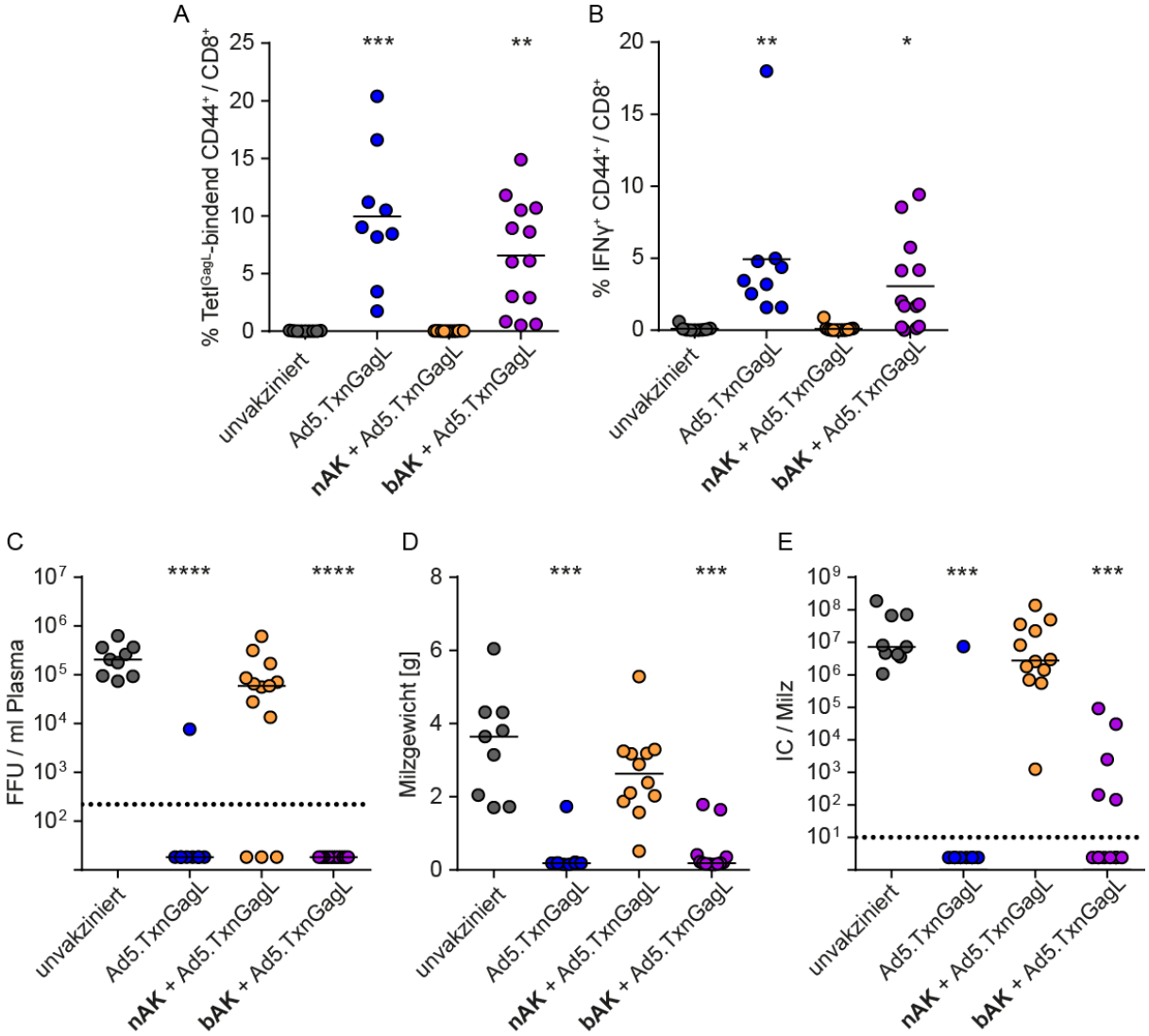

Abbildung 29: Transfer von Ad5-bindenden und Ad5-neutralisierenden Antikörpern aus Hybridoma-Zellüberständen

CB6F1-Mäusen wurden aus Hybridoma-Zellüberständen aufgereinigte Ad5-bindende (bAK) oder Ad5-neutralisierende Antikörper (nAK) transferiert. Hierbei wurde die Antikörperkonzentration so gewählt, dass sie dem αAd5-IgG Titer einer prä-immunisierten Maus entsprach. Einen Tag nach dem Transfer wurden die Mäuse mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL immunisiert. Als Positivkontrolle diente eine Gruppe naiver Mäuse, die nur mit Ad5.TxnGagL immunisiert wurde. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 5000 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus drei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe (unvakziniert, Ad5.TxnGagL) bzw. einmal drei und zweimal fünf Mäusen pro Gruppe (nAK + Ad5.TxnGagL, bAK + Ad5.TxnGagL). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und mit Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), *** ($P < 0{,}001$), bzw. mit **** ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten vor allem durch Ad5-neutralisierende Antikörper inhibiert. Nach dem Transfer von Ad5-bindenden Antikörpern wurde nur ein geringer Effekt auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten festgestellt.

4.3 Seltene Adenovirus-Typen

Die in der Bevölkerung weit verbreitete Prä-Immunität gegen Ad5 stellt ein Problem für den Einsatz Ad5-basierter Vektoren bei der Gentherapie oder zur Immunisierung dar. Gegen den Vektor gerichtete Immunantworten können sich negativ auf dessen Transgenexpression auswirken und die Effektivität induzierter Immunantworten einschränken. Neben den grundlegenden Mechanismen der Ad5-Prä-Immunität werden parallel verschiedene Strategien zur Umgehung der Ad5-spezifischer Immunantworten etabliert. Neben Ad5 sind heute mehr als 80 weitere humane Adenovirus-Typen, sowie eine vergleichbare Anzahl nicht-humaner Adenovirus-Typen bekannt, die in den vergangenen Jahren zunehmend als virale Vektoren erschlossen wurden. Viele dieser nicht-humanen, oder auf seltenen humanen Adenovirus-Typen-basierenden Vektoren werden bereits als potenzielle Impfvektor-Kandidaten in klinischen Studien gegen HCV, Influenza oder Ebola untersucht [17, 51, 72]. Die Immunogenität vieler alternativer Adenoviren, ihre Seroprävalenz in der Bevölkerung, sowie mögliche Kreuz-Reaktivität durch alternative Adenoviren induzierter Antikörper, $CD4^+$ T-Zellen oder $CD8^+$ T-Zellen wurden noch nicht hinreichend charakterisiert [170, 189, 190]. Im Laufe dieser Arbeit sollten daher zwei Ad-Vektoren basierend auf den seltenen humanen Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 als Impfvektoren in Immunisierungsstudien im FV-Modell untersucht werden.

4.3.1 Herstellung von Impfvektoren basierend auf den Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50

Für Vakzinierungsexperimente wurden rekombinante, replikations-defekte Vektoren basierend auf den seltenen humanen Adenovirus-Typen 48 (Ad48) und 50 (Ad50) hergestellt. Eine schematische Darstellung der Rekonstitution der Vektoren ist für Ad48 in Abb. 30 und für Ad50 in Abb. 31 dargestellt.

Zunächst wurden die gewählten Transgene in die Transferplasmide pAdApt48 bzw. pAdApt50 kloniert (siehe Tabelle 5). Für die Rekonstitution der Ad48-Vektoren wurden das Transgen-kodierende AdApt48-Plasmid, sowie das Plasmid pWE.Ad48.pIX-rIT, das für den Großteil des Ad48-Genoms kodiert, verwendet. Beide Plasmide wurden mit *Pac*I

linearisiert und in HEK-293 A-Zellen co-transfiziert, in denen die Rekonstitution der Plasmide zu Ad48-Vektoren stattfand.

Tabelle 5: Transgen-kodierenden pAdApt-Plasmide zur Herstellung der unterschiedlichen Ad48- und Ad50-Vektoren

Plasmide	**Klonierungsstrategie**
pAdApt48.Linker	Synthetischer Linker in pAdApt48
pAdApt50.Linker	Synthetischer Linker in pAdApt50
pAdApt48.Linker.GFP	GFP aus pmaxGFP mit *Not*I in pAdApt48Linker
pAdApt50.Linker.GFP	GFP aus pAdApt48LinkerGFP mit *Eco*RI und *Hind*III
pAdApt48.Linker.Leader-Gag_{C1K}	Leader-Gag_{C1K} aus pShuttlegagYzK mit *Not*I und *Hind*III
pAdApt50.Linker.Leader-Gag_{C1K}	Leader-Gag_{C1K} aus pShuttlegagYzK mit *Not*I und *Hind*III
pAdApt48.Linker.TxnGagL	TxnGagL-OLLAS Fusionspeptid aus pShuttleTxnGageOllas mit *Sal*I und *Not*I in pAdApt48Linker
pAdApt50.Linker.TxnGagL	TxnGagL-OLLAS Fusionspeptid aus pShuttleTxnGageOllas mit *Sal*I und *Not*I in pAdApt50Linker
pAdApt48.Env	Env aus pShuttle.env mit *Nhe*I und *Hind*III in pAdApt48
pAdApt50.Env	Env aus pShuttle.env mit *Eco*RI und *Hind*III in pAdApt50
pAdApt48.OVA	Ovalbumin aus pShuttle.OVA mit *Hind*III und *Bam*HI in AdApt48
pAdApt50.OVA	Ovalbumin aus pShuttle.OVA mit *Hind*III und *Bam*HI in AdApt50

Für die Rekonstitution der Ad50-Vektoren wurden neben dem Transgen-kodierenden pAdApt50-Plasmid noch zwei weitere Plasmide in HEK-293 A-Zellen co-transfiziert, da das Ad50-Genom auf die Plasmide pBr.Ad50.Sfi-rIT und pBr.Ad50.pIX-NheI verteilt war. Die Plasmide wurden mit *Pac*I, bzw. im Fall von pBr.Ad50.Sfi-rIT mit *Not*I linearisiert, bevor schließlich alle drei Plasmide zusammen in HEK-293 A-Zellen co-transfiziert wurden. In diesen Zellen erfolgte daraufhin die Rekonstitution zu Ad50-Vektoren.

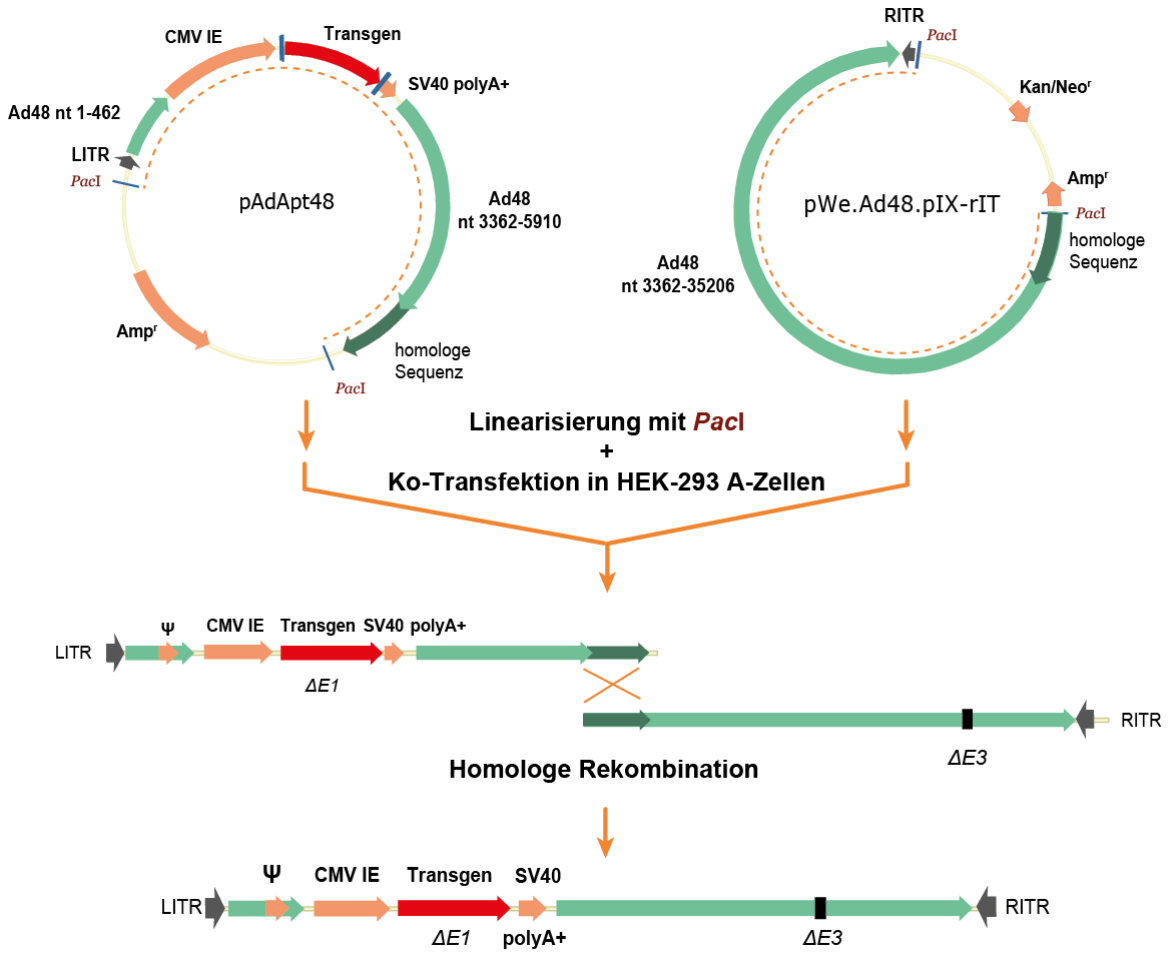

Abbildung 30: Herstellung von Ad48-Impfvektoren

Nach der Klonierung des gewünschten Transgens in das Plasmid pAdApt48, wurde dieses linearisiert und mit dem ebenfalls linearisierten Plasmid pWe.Ad48.pIX-rIT zusammen in HEK-239 A-Zellen transfiziert, in denen das adenovirale Genom rekonstituiert wurde und die Virus-Produktion erfolgte.

Für Vakzinierungsversuche wurden insgesamt jeweils fünf rekombinante Ad48 und Ad50 mit verschiedenen Transgenen hergestellt (siehe Tabelle 5). Die Transgenexpression aller Vektoren wurde mittels Western Blot oder im Fall der GFP-kodierenden Vektoren mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestätigt. Zudem wurde die Infektiosität der entstandenen viralen Partikel nach der Aufreinigung überprüft. Neben den verschiedenen Transgen-kodierenden Ad48- und Ad50-Vektoren wurden ebenfalls die beiden Transgen-freien Vektoren Ad48.Empty und Ad50.Empty hergestellt.

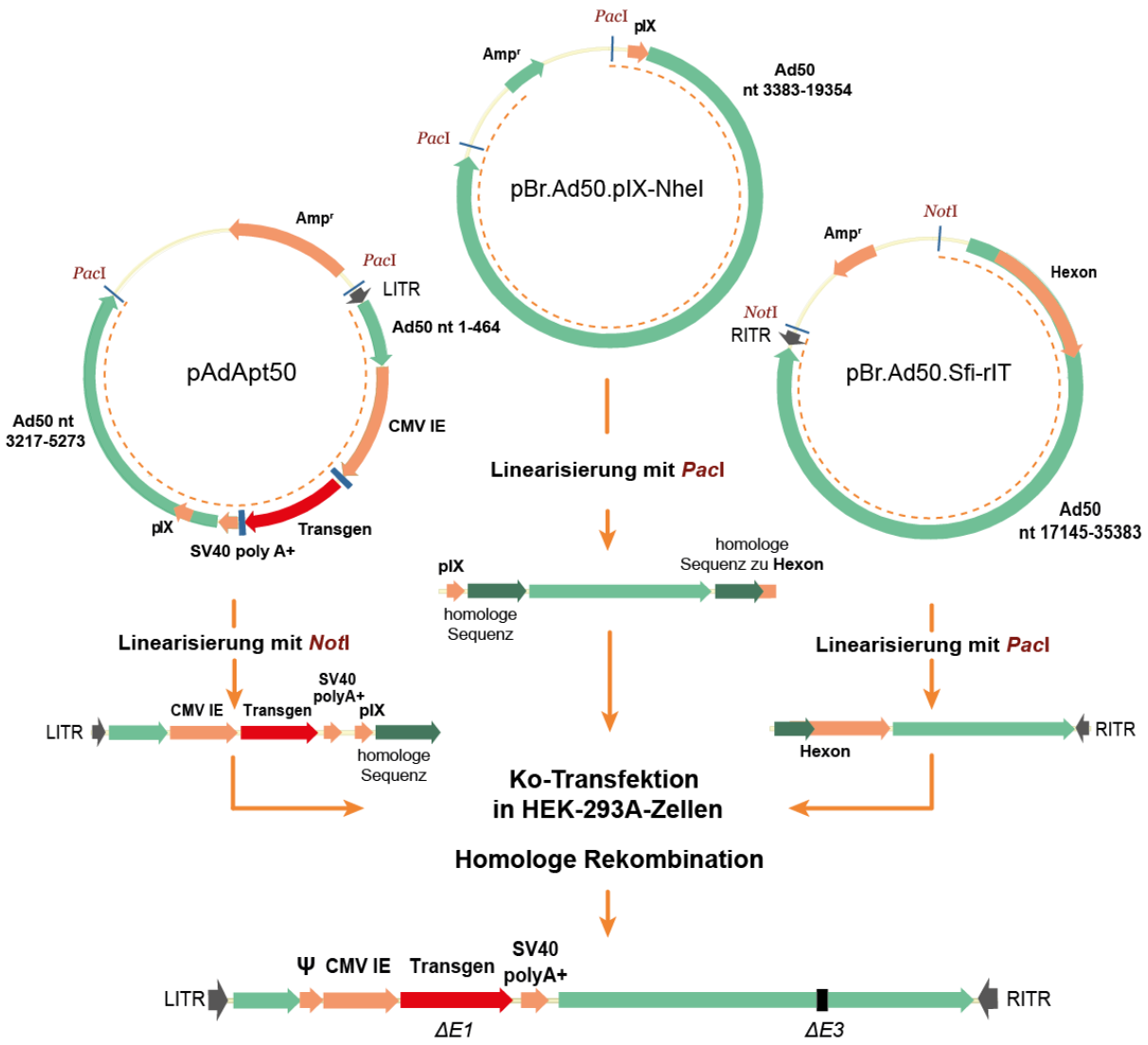

Abbildung 31: Herstellung von Ad50 Impfvektoren

Zunächst wurde das entsprechende Transgen in das Plasmid pAdApt50 bzw. pAdApt50Linker kloniert. Für die Rekonstitution von Ad50-Vektoren wurden die drei Plasmide pAdApt50 bzw. pAdApt50Linker mit Transgen, pBR.Ad50Sfi-rIT, sowie pBR.Ad50.pIX-NheI linearisiert und zusammen in HEK-239 A-Zellen co-transfiziert, in denen die Rekonstitution und Virusproduktion erfolgte.

4.3.2 Charakterisierung der seltenen Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 in Immunisierungsexperimenten

4.3.2.1 Immunisierungsstudien mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ und Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$

In diesem Teil der Arbeit sollten als erstes Ad48- und Ad50-basierte Vektoren, welche für das Leader-Gag$_{C1K}$ kodieren, in Immunisierungsexperimenten charakterisiert und im Vergleich mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ evaluiert werden. Zunächst sollte daher die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten nach Immunisierung suszeptibler CB6F1-Mäuse mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ oder Ad50.Leader-Gag$_{C1K,}$ sowie der durch die Immunisierung vermittelte Schutz vor einer nachfolgenden FV-Infektion überprüft werden. Ein zeitlicher Verlauf des Versuchs ist in Abbildung 32 dargestellt.

CB6F1-Mäuse wurden einer Prime-Boost-Vakzinierungsstrategie folgend zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit je $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$, Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ oder Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisiert. Jeweils zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung und die IFNγ-Produktion der CD8$^+$ T-Zellen nach Stimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft. Da die Boost-Immunisierung keinen steigernden Effekt auf die induzierten CD8$^+$ T-Zellantworten hatte, sind ausschließlich die Daten nach der ersten Immunisierung dargestellt. Die Impfung von CB6F1-Mäusen mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ resultierte nur in einer moderaten Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen, welche verglichen mit der unvakzinierten Kontrollgruppe nicht signifikant waren (Abb. 33A). Nach der Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ oder Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$ konnten keine GagL$_{85-93}$-spezifischen CD8$^+$ T-Zellantworten, mit

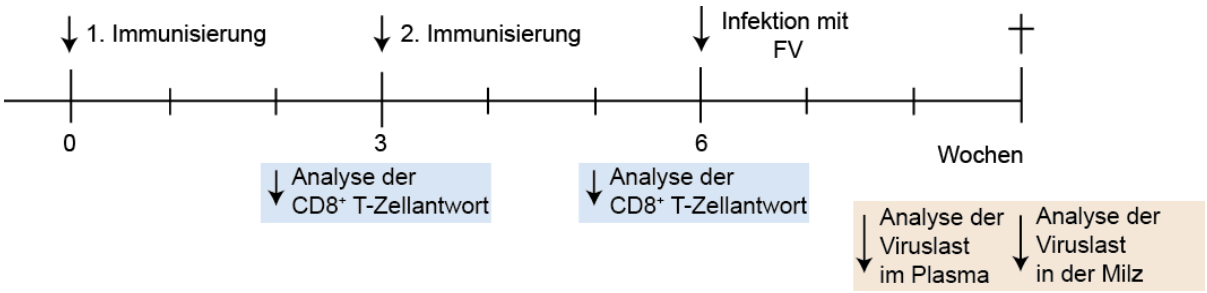

Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit Ad48- und Ad50-basierenden Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal mit je $1 \cdot 10^9$ vp des entsprechenden Vektors immunisiert. Jeweils zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die CD8$^+$ T-Zellantwort mittels spezifischer Tetramerfärbung, sowie ICS überprüft. Drei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere analysiert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in der Milz untersucht.

Ausnahme bei einer mit Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Maus, detektiert werden. Nach der Restimulation mit GagL-Peptid wurden in den Ad5.Leader-GagC1K- und Ad48.Leader-GagC1K-immunisierten Tieren nur marginale Level IFNγ$^+$ CD8$^+$ T-Zellen detektiert (Abb. 33B). CD8$^+$ T-Zellen aus den Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Mäusen reagierten nicht auf die Restimulation mit GagL-Peptid.

Die Infektionsdosis von 500 SFFU FV ist ausreichend, um in den hoch-suszeptiblen CB6F1-Mäusen Splenomegalie und Erythroleukämie auszulösen, vereinfacht aber die Feststellung eines Schutzeffektes bei Immunisierung mit möglicherweise weniger immunogenen Vektoren. Daher wurden die Mäuse drei Wochen nach der Boost-Immunisierung intravenös mit 500 SFFU FV infiziert und 10 Tage nach der Infektion wurde die Virämie im Plasma überprüft. Bei den mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Mäusen lag die Viruslast im Plasma unterhalb des Detektionslimits (Abb. 33C). Nach der Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ konnte bei 4 von 6 Mäusen ebenfalls kein Virus im Plasma nachgewiesen werden. In 3 von 5 der Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Mäuse konnte, verglichen mit der unvakzinierten Kontrollgruppe, keine signifikante Reduktion der Virämie im Plasma gezeigt werden.

Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast darin überprüft. Die Milzgewichte der mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ und der meistem der mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisierten Mäuse waren deutlich geringer, als die der unvakzinierten Kontrollgruppe (Abb. 33D). Im Gegensatz hierzu hatten die Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Mäuse vergrößerte Milzen. Obwohl die Immunisierung von Mäusen mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$ nur moderate CD8$^+$ T-Zellanworten induzierte (Abb. 33A+B), vermittelte sie Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung. Bei allen der Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$-immunisierten Tieren war die Viruslast in der Milz deutlich reduziert (Abb. 33E). Bei mehr als der Hälfte der mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisierten Mäuse war die Viruslast in den Milzen, verglichen mit der unvakzinierten Kontrollgruppe, ebenfalls reduziert und lag bei 2 von 6 Tieren unter der Nachweisgrenze. Im Gegensatz dazu hatten fast alle der mit Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisierten Mäuse ähnlich hohe Viruslasten in den Milzen wie die unvakzinierten Mäuse.

Somit war es möglich, durch die Impfung mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$, aber nicht durch die Impfung mit Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$ partiellen, mit Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$-vergleichbaren Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung in CB6F1-Mäusen zu vermittteln.

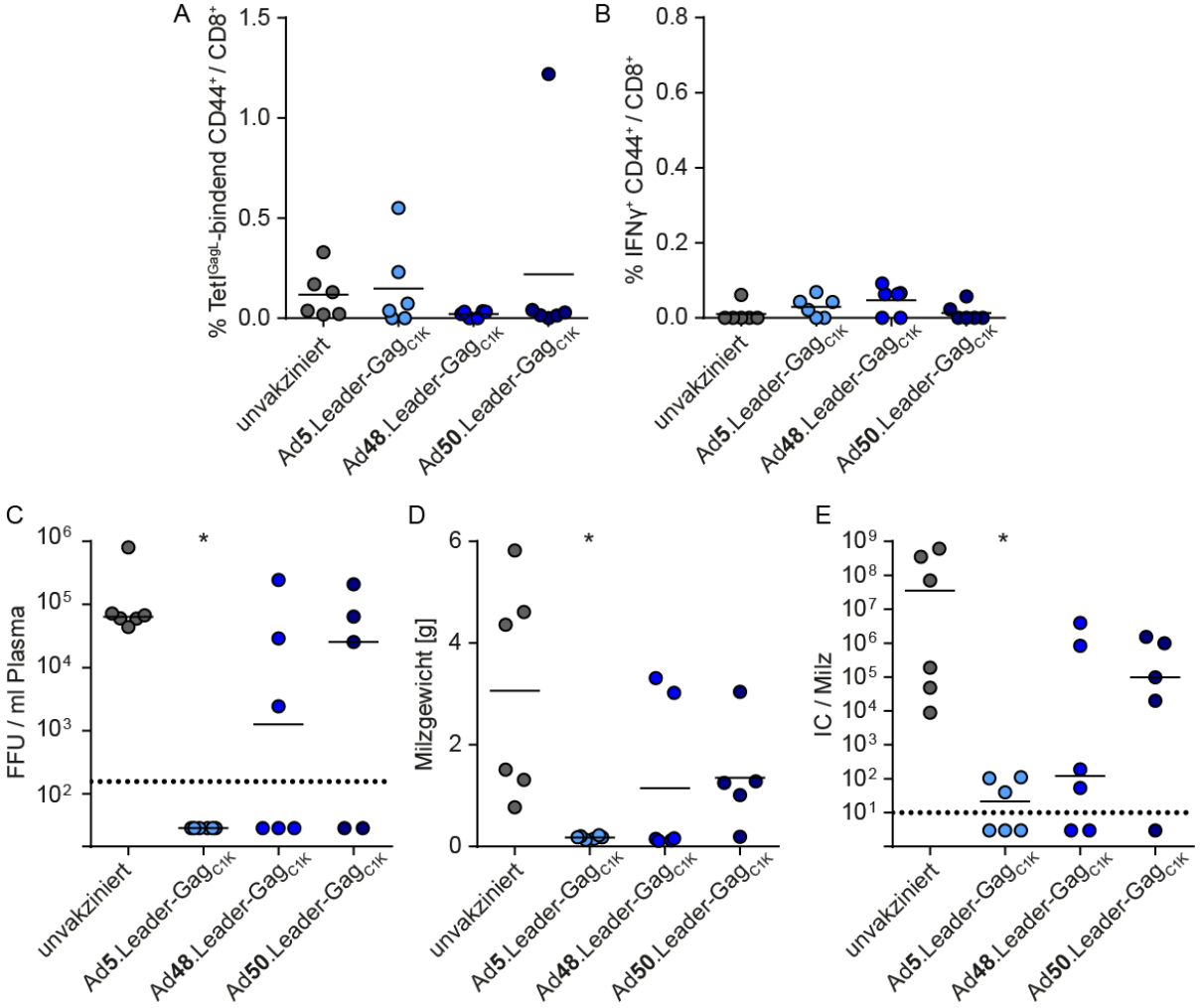

Abbildung 33: Immunisierung mit FV Leader-Gag$_{C1K}$-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag$_{C1K}$, Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$, oder Ad50.Leader-Gag$_{C1K}$ immunisiert. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion GagL$_{85-93}$-spezifischer CD8$^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Dargestellt sind die Ergebnisse nach der ersten Immunisierung. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit drei und vier Mäusen pro Gruppe (A, B) bzw. aus zwei Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe (C, D, E). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$) gekennzeichnet.

4.3.2.2 Immunisierungsstudien mit Ad48.TxnGagL und Ad50.TxnGagL

In den zuvor dargestellten Experimenten wurden durch Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} bzw. mit Ad50.Leader-Gag_{C1K} nur mäßige $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten induziert. Das Leader-Gag_{C1K}-Transgen kodiert für das gesamte FV Leader-Gag-Protein. Das TxnGagL-Transgen hingegen kodiert für ein Fusionsprotein aus murinem Thioredoxin und dem FV $GagL_{85-93}$-$CD8^+$ T-Zell-Epitop. Im Gegensatz zur Immunisierung mit Ad5.Leader-Gag_{C1K} induziert die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL potente $CD8^+$ T-Zellantworten, die starken Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung vermitteln können [93]. In den folgenden Experimenten sollte daher das Potenzial Ad48- und Ad50-basierten Vektoren zur Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten im Kontext des TxnGagL-Transgens untersucht werden.

Demselben Versuchsaufbau (Abb. 32) folgend wurden CB6F1-Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL, Ad48.TxnGagL oder Ad50.TxnGagL immunisiert. Zwei Wochen nach den Immunisierungen wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten mittels MHC-I-Tetramerfärbung, sowie die Produktion von IFNγ der $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit GagL-Peptid mittels ICS überprüft. Da die zweite Immunisierung nicht in einer Veränderung der $CD8^+$ T-Zellantworten resultierte, werden nur die Ergebnisse nach der ersten Immunisierung dargestellt. Die Immunisierung naiver CB6F1-Mäuse mit Ad5.TxnGagL führte zur Induktion signifikanter Anteile $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen, die in fast allen Ad48.TxnGagL- und allen Ad50.TxnGagL-immunisierten Mäusen nicht detektiert werden konnten (Abb. 34A). Nach der Restimulation mit GagL-Peptid wurden in Ad5.TxnGagL-immunisierten Mäusen IFNγ-produzierende $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen (Abb. 34B). In den Ad48.TxnGagL- und Ad50.TxnGagL-immunisierten Mäusen wurden hingegen keine $IFN\gamma^+$ $CD8^+$ T-Zellen detektiert. Drei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 500 SFFU FV infiziert und 10 Tage hiernach wurde die Viruslast im Plasma überprüft. Im Gegensatz zu den unvakzinierten Mäusen, war die Viruslast im Plasma der mit Ad5.TxnGagL immunisierten Mäusen bis unter die Nachweisgrenze reduziert (Abb. 34C). Trotz der schwachen Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach der Immunisierung mit Ad48.TxnGagL und Ad50.TxnGagL gab es in beiden Gruppen jeweils eine Maus, in der kein Virus im Plasma detektiert werden konnte. Die übrigen Mäuse besaßen ähnlich hohe Viruslasten im Plasma, wie die unvakzinierte Kontrollgruppe.

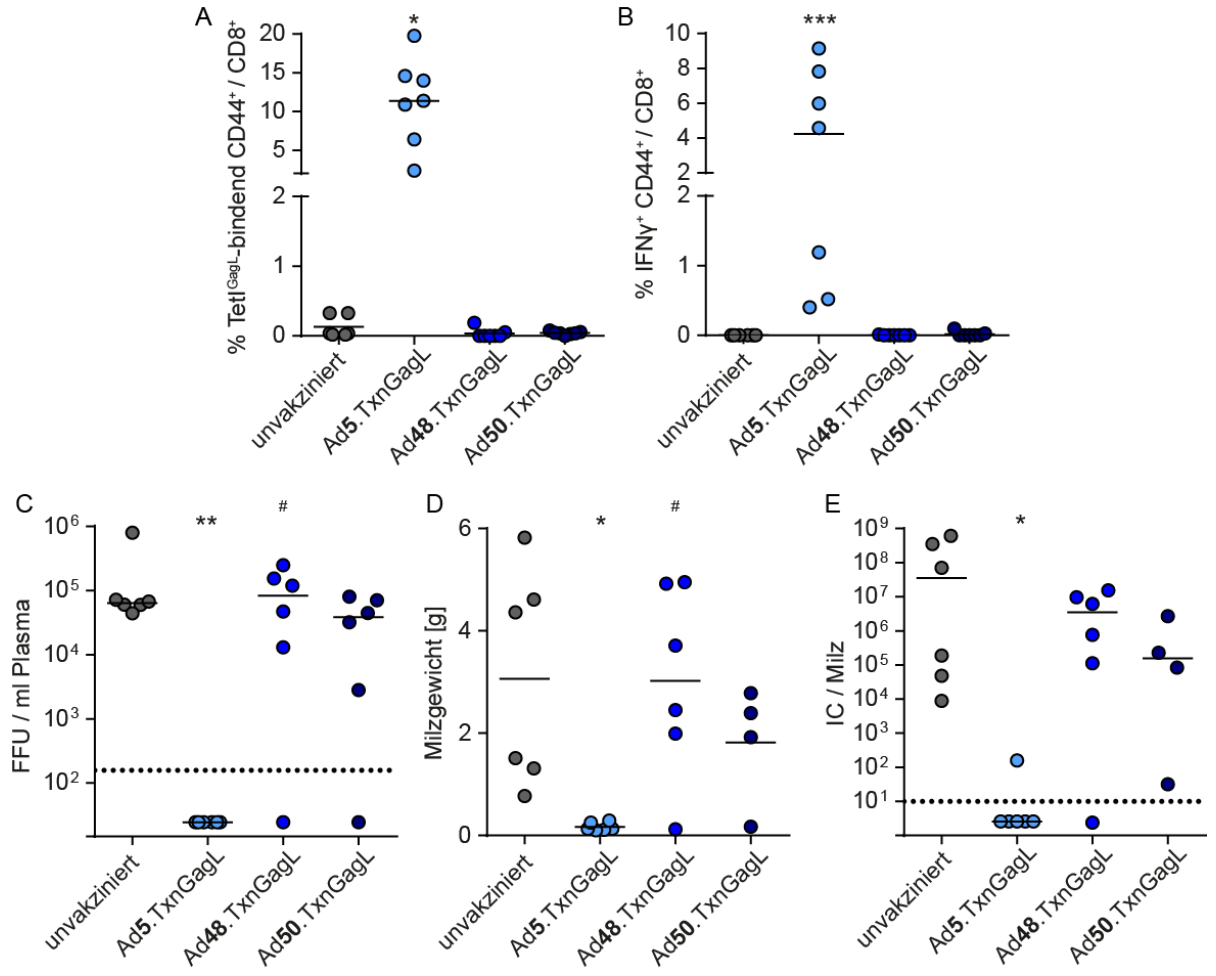

Abbildung 34: Immunisierung mit Txn.GagL-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL, Ad48.TxnGagL, oder Ad50.TxnGagL immunisiert. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Tetramerfärbung (A) und die Produktion von IFNγ mittels ICS überprüft (B). Dargestellt sind die Ergebnisse nach der ersten Immunisierung. Drei Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurde die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (C). Drei Wochen nach der Infektion wurde das Gewicht der Milz (D), sowie die Viruslast in der Milz der Tiere analysiert (E). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit einmal drei und einmal vier Mäusen pro Gruppe (A, B) bzw. aus zwei Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe (C, D, E). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Mittelwert (A, B, D) bzw. den Median (C, E). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), bzw. *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der Ad5.TxnGagL-immunisierten Gruppe sind mit # ($P < 0{,}05$) bzw. ## ($P < 0{,}01$) gekennzeichnet.

Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen der Mäuse gewogen und die Viruslast darin mittles IC-Assay bestimmt. Mit Ad5.TxnGagL immunisierte Mäuse hatten nicht vergrößerte Milzen, in denen kein FV detektiert werden konnte (Abb. 34D+E). Bis auf jeweils eine Maus hatten die Ad48.TxnGagL-immunisierten Mäuse, sowie die Ad50.TxnGagL-immunisierten Mäuse, hingegen vergrößerte Milzen mit ähnlich hohen Viruslasten wie die unvakzinierte Kontrollgruppe.

In dem vorangegangenen Experiment war es gelungen, einen partiellen Schutz vor der Ausprägung der FV-induzierten Erkrankung durch Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$, zu vermitteln. In den hier dargelegten Experimenten resultierte die Immunisierung mit Ad48.TxnGagL und Ad50Txn.GagL im Schutz jeweils eines Tieres vor der FV-induzierten Erkrankung, während die übrigen Ad48.TxnGagL- und Ad50.TxnGagL-immunisierten Mäuse nicht geschützt war. Die Immunisierung mit Ad48.TxnGagL war somit weniger effektiv, als die Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag$_{C1K}$. Die Immunisierung mit Ad50.TxnGagL vermittelte keinen Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung. Ad50-Vektoren zeigten somit weder mit dem Leader-Gag$_{C1K}$-Transgen, noch mit dem TxnGagL-Transgen Effektivität bei der Immunisierung.

4.3.2.3 Analyse Vektor-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48- und Ad50-basierten Vektoren

Eine der Ursachen für das gesteigerte Interesse an seltenen, humanen Ad-Vektoren oder nicht-humanen Ad-Vektoren stellt das Vorhandensein Ad5-spezifischer Antikörper in der Weltbevölkerung dar, welche die Effektivität Ad5-basierter Vektoren bei der Induktion Transgen-spezifischer Immunantworten einschränken können. Abhängig vom Grad der phylogenetischen Verwandtschaft unterschiedlicher Adenoviren können Sequenzhomologien in immunologisch relevanten Strukturen existieren. Daraus kann eine Kreuzreaktivität Vektor-induzierter Antikörper gegen andere Adenovirus-Typen resultieren. Aus diesem Grund sollte die Induktion Vektor-spezifischer bindender und neutralisierender Antikörper nach der Immunisierung mit Ad5-, Ad48- oder Ad50-basierten Impfvektoren, sowie die Reaktivität dieser Antikörper gegen diese drei Adenovirus-Typen untersucht werden. Das Plasma der mit den Leader-Gag$_{C1K}$- oder TxnGagL-kodierenden Ad5-, Ad48- oder Ad50-Vektoren immunisierten CB6F1-Mäuse wurde daher auf Ad-bindende, bzw. Ad-neutralisiernde Antikörper überprüft. Im Plasma Ad5-immunisierter Mäuse wurden hohe Titer Ad5-bindender Antikörper nachgewiesen (Abb. 35A), welche in einigen mit Ad48- und Ad50-Vektoren immunisierten Mäusen ebenfalls in deutlich geringeren Titren detektiert werden konnten. Ad5-neutralisierende Antikörper wurden hingegen ausschließlich in Plasma aus Ad5-immunisierten Mäusen nachgewiesen (Abb. 35D). Ad48-bindende Antikörper wurden nur in geringen Titern im Plasma Ad48-immunisierter Mäuse detektiert (Abb. 35B). Das Plasma einiger Ad5- oder Ad50-immunisierter Mäuse enthielt ebenfalls geringe Titer Ad48-bindender Antikörper. Ad48-neutralisierende Antikörper wurden durch die Immunisierung mit Ad48- und mit Ad50-Vektoren induziert (Abb. 35E), während Plasma aus Ad5-immunisierten Mäusen keine Ad48-neutralisierenden Antikörper enthielt. Ad50-bindende Antikörpertiter waren im Plasma Ad50-immunisierter Mäuse am höchsten, wurden aber auch im Plasma Ad5- und

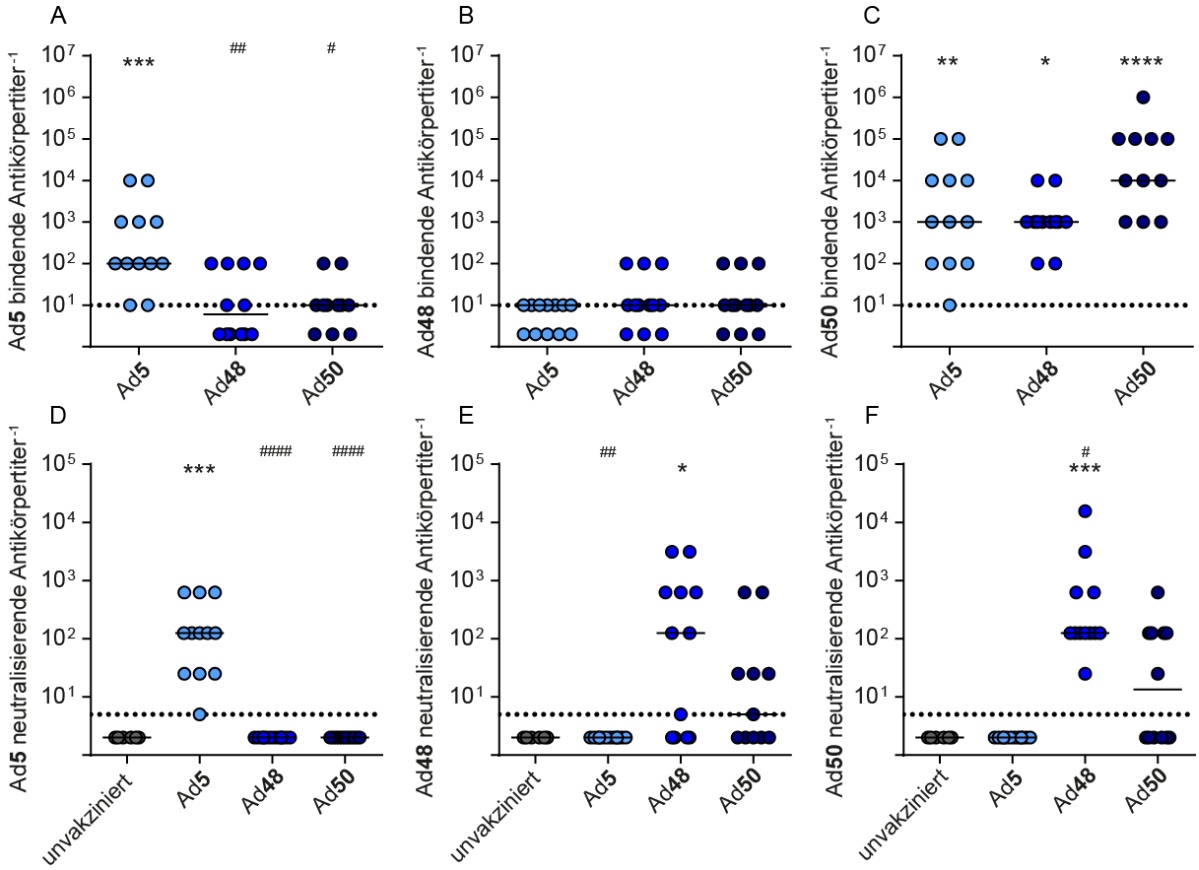

Abbildung 35: Induktion bindender und neutralisierender Antikörper nach Impfung mit verschiedenen Ad-Typen

CB6F1-Mäuse wurden zweimal in Abständen von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Leader-Gag_{C1K}, Ad48.Leader-Gag_{C1K} , oder Ad50.Leader-Gag_{C1K}, bzw. mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.TxnGagL, Ad48.TxnGagL, oder Ad50.TxnGagL immunisiert. Zwei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurde den Tieren Blut abgenommen und das Plasma mittels αAdV ELISA auf bindende (A: αAd5, B: αAd48, C: αAd50) bzw. mittels *in vitro* Neutralisationstest auf AdV-neutralisierende Antikörper (D: αAd5, E: αAd48, F: αAd50) untersucht. In den Gruppen sind die Daten von insgesamt 12 Tieren pro Gruppe dargestellt, die mit dem jeweiligen Adenovirus-Typ immunisiert worden sind. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die gestrichelten Linien markieren die untere Nachweisgrenze der Experimente, die waagerechten Linien stellen den Median dar. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe mit * ($P < 0{,}05$), *** ($P < 0{,}001$), bzw. **** ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen Referenzgruppe (A, D: Ad5; B, E: Ad48; C, F: Ad50) sind mit # ($P < 0{,}05$), ## ($P < 0{,}01$), ### ($P < 0{,}001$), bzw. #### ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet.

Ad48-immunisierter Mäuse detektiert. (Abb. 35C) Ad50-neutralisierenden Antikörper konnten nicht in Plasma Ad5-immunisierter Mäuse, aber im Plasma Ad48- und Ad50-immunisierter Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 35F).

Die vorliegenden Experimente zeigen, dass die Immunisierung mit Ad5 zur Induktion von Antikörpern mit bindenden Eigenschaften gegen Ad5 und Ad50, sowie schwach bindenden Eigenschaften gegen Ad48 führte. Die induzierten neutralisierenden Antikörper waren jedoch Typ-spezifisch und zeigten keine Kreuzreaktivität gegen Ad48 oder Ad50.

Die durch Immunisierung mit Ad48 oder Ad50 induzierten Antikörper besaßen jeweils nur schwache Bindungseigenschaften gegen Ad5 und Ad48. In beiden Gruppen konnte jedoch deutliche Kreuzreaktivität sowohl bindender, als auch neutralisierender Antikörper gegen Ad50- bzw. Ad48-basierte Vektoren nachgewiesen werden.

4.3.2.4 Immunisierungsexperimente mit OVA-kodierenden Ad48- und Ad50-Vektoren

In den vorangegangenen Experimenten führte die Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} oder Ad48.TxnGagL nur in eingen Mäusen zur Induktion schwacher $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten, während nach der Immunisierung mit den entsprechenden Ad50-Vektoren keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen induziert werden konnten. Daher sollte in den folgenden Versuchen die Immunogenität von Ad48- und Ad50-basierten Vektoren bei Immunisierungsstudien gegen das Modell-Antigen Ovalbumin addressiert werden. Ovalbumin enthält neben einem potenten $CD8^+$ T-Zell-Epitop (OT-$I_{257-264}$) weitere $CD4^+$ T-Zell-, sowie B-Zell-Epitope [13]. Somit sollte im Folgenden überprüft werden, ob sich Vektoren basierend auf Ad48 oder Ad50 zur Induktion komplexer Immunantworten gegen ein starkes Antigen eignen. CB6F1-Mäuse wurden zweimal intramuskulär mit je $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.OVA, Ad48.OVA oder Ad50.OVA immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde die Induktion OVA-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mittels MHC-I-Dextramerfärbung bestimmt. Des Weiteren wurde die Produktion von IFNγ in $CD8^+$ T-Zellen nach Restimulation mit OT-I-Peptid mittels ICS, sowie die Induktion OVA-spezifischer bindender Antikörper im Plasma mittels αOVA-ELISA untersucht. Bereits nach der ersten Immunisierung konnten starke, OVA-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen detektiert werden, während die $CD8^+$ T-Zellantworten Ad48.OVA- bzw. Ad50.OVA-immunisierter Mäuse im Vergleich dazu signifikant verringert waren (Abb. 36A). Nach der Restimulation mit OT-I-Peptid konnten in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen signifikante Anteile $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 36B). In Ad48.OVA-immunisierten Mäusen wurden nach Restimulation mit OT-I-Peptid ebenfalls $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen detektiert. In der mit Ad50.OVA-immunisierten Gruppe konnten hingegen keine $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen werden.

Die zweite Immunisierung mit Ad5.OVA verbesserte die Induktion OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen, während nach Immunisierung mit Ad48.OVA bzw. Ad50.OVA weiterhin nur wenige OT-I-spezifische $CD8^+$ T-Zellen in den Mäusen nachgewiesen wurden (Abb. 36D). Nach der zweiten Immunisierung waren die Anteile $IFNγ^+$ $CD8^+$ T-Zellen in den mit Ad5.OVA immunisierten Mäusen verglichen mit den unvakzinierten Mäusen signifikant erhöht (Abb. 36E). Auch in Ad48.OVA-immunisierten Mäusen konnte nach Restimulation mit OT-I-Peptid ein signifikanter Anteil IFNγ-produzierender $CD8^+$ T-Zellen nachgewiesen

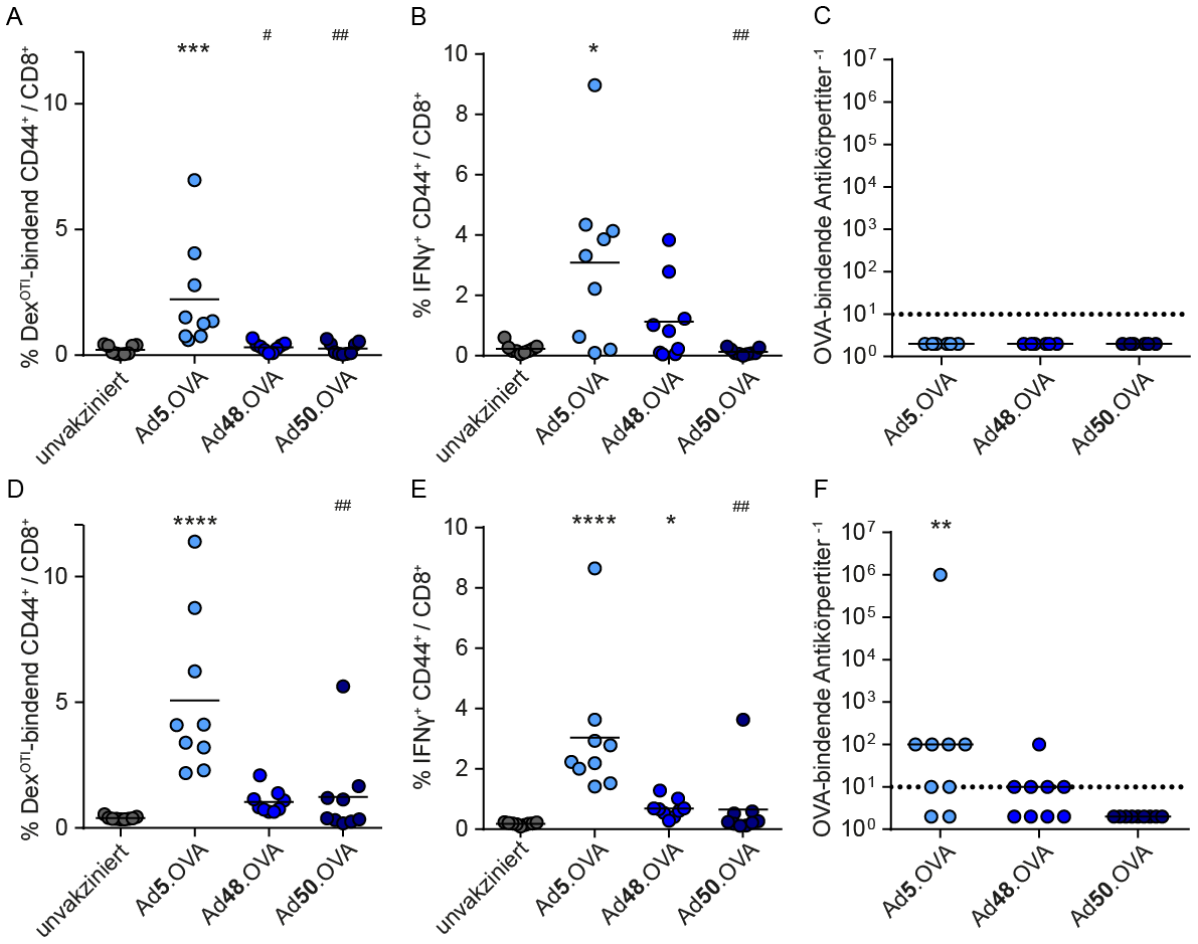

Abbildung 36: Immunisierung mit OVA-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-basierten Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal in Abständen von drei Wochen intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.OVA, Ad48.OVA oder Ad50.OVA immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde die Induktion OT-$I_{257-264}$-spezifischer CD8+ T-Zellen mittels MHC-I-Dextramerfärbung (Prime: A, Boost: D) und die Produktion von IFNγ mittels ICS nach Restimulation mit OT-I Peptid (Prime: B, Boost: E) analysiert. Die Plasmaproben wurden zudem nach dem Prime (C) und nach dem Boost (F) auf Titer OVA-spezifischer, bindender Antikörper untersucht. Dargestellt sind die Daten aus drei Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die gestrichelten Linien markieren de untere Nachweisgrenze. Waagerechte Linien stellen den Mittelwert (A, B) bzw. den Median (C, D) dar. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), bzw. mit *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

werden. Dieser war jedoch verglichen zu den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen deutlich nieriger. Bis auf eine Ausnahme produzierten $CD8^+$ T-Zellen aus Ad50.OVA-immunisierten Mäusen auch nach der zweiten Immunisierung kein IFNγ nach Restimulation mit OT-I-Peptid.

Nach der ersten Immunisierung konnten in keiner der drei immunisierten Gruppen OVA-bindende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 36C). Nach der zweiten Immunisierung konnten im Plasma Ad5.OVA-immunisierter Mäuse signifikante Titer OVA-bindender

Antikörper detektiert werden (Abb. 36F). Auch im Plasma einiger Ad48.OVA-immunisierter Mäuse konnten geringe Mengen OVA-bindender Antikörper nachgewiesen werden. Das Plasma Ad50.OVA-immunisierter Mäuse enthielt hingegen auch nach der zweiten Immunisierung keine OVA-bindenden Antikörper.

Es war somit möglich, $CD8^+$ T-Zellantworten und OVA-bindende Antikörper durch Immunisierung mit Ad48.OVA zu induzieren. Die induzierten Immunantworten waren, verglichen mit den nach der Immunisierung mit Ad5.OVA induzierten Antworten, jedoch schwächer ausgeprägt. Durch Immunisierung mit Ad50.OVA wurden hingegen nur marginale OVA-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten und keine OVA-bindenden Antikörper induziert.

4.3.2.5 Analyse Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.OVA und Ad50.OVA

Neben OVA-bindenden Antikörpern wurde zudem nach beiden Immunisierungen mit Ad5.OVA, Ad48.OVA oder Ad50.OVA die Induktion Ad-bindender Antikörper mittels αAd-ELISA, sowie die Induktion Ad-neutralisierender Antikörper nach der zweiten Immunisierung mittels *in vitro* Neutralisationstest untersucht.

Nach der ersten Immunisierung konnten in einer Ad5.OVA-immunisierten Maus, sowie in einigen Ad48.OVA- oder Ad50.OVA-immunisierten Mäusen Ad5-bindende Antikörper detektiert werden (Abb. 37A). Nach der zweiten Immunisierung waren die Ad5-bindenden Antikörpertiter im Plasma der Mäuse aus allen drei Gruppen, vor allem aber in den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen erhöht (Abb. 37B). Neutralisierende Ad5-spezifische Antikörper wurden nach der zweiten Immunisierung ausschließlich in Ad5.OVA-immunisierten Mäusen festgestellt (Abb. 37C). Ad48-bindende Antikörper wurden nach der ersten Immunisierung nur in wenigen Mäusen aller drei Gruppen nachgewiesen (Abb. 37D). Nach der zweiten Immunisierung wurden Ad48-bindende Antikörper vor allem im Plasma Ad48.OVA-immunisierter Mäuse detektiert, während nur einzelne Ad5.OVA- oder Ad50.OVA-immunisierte Mäuse Ad48-bindender Antikörper im Plasma vorwiesen (Abb. 37E). Ad48-neutralisierende Antikörper wurden ausschließlich im Plasma Ad48.OVA-immunisierter Mäuse detektiert (Abb. 37F). Bereits nach der ersten Immunisierung wurden Ad50-bindende Antikörper in Plasma Ad48.OVA- und Ad50.OVA-immunisierter Mäuse nachgewiesen, während Plasma aus Ad5.OVA-immunisierten Mäusen keine Ad50-bindenden Antikörper enthielt (Abb. 37G).

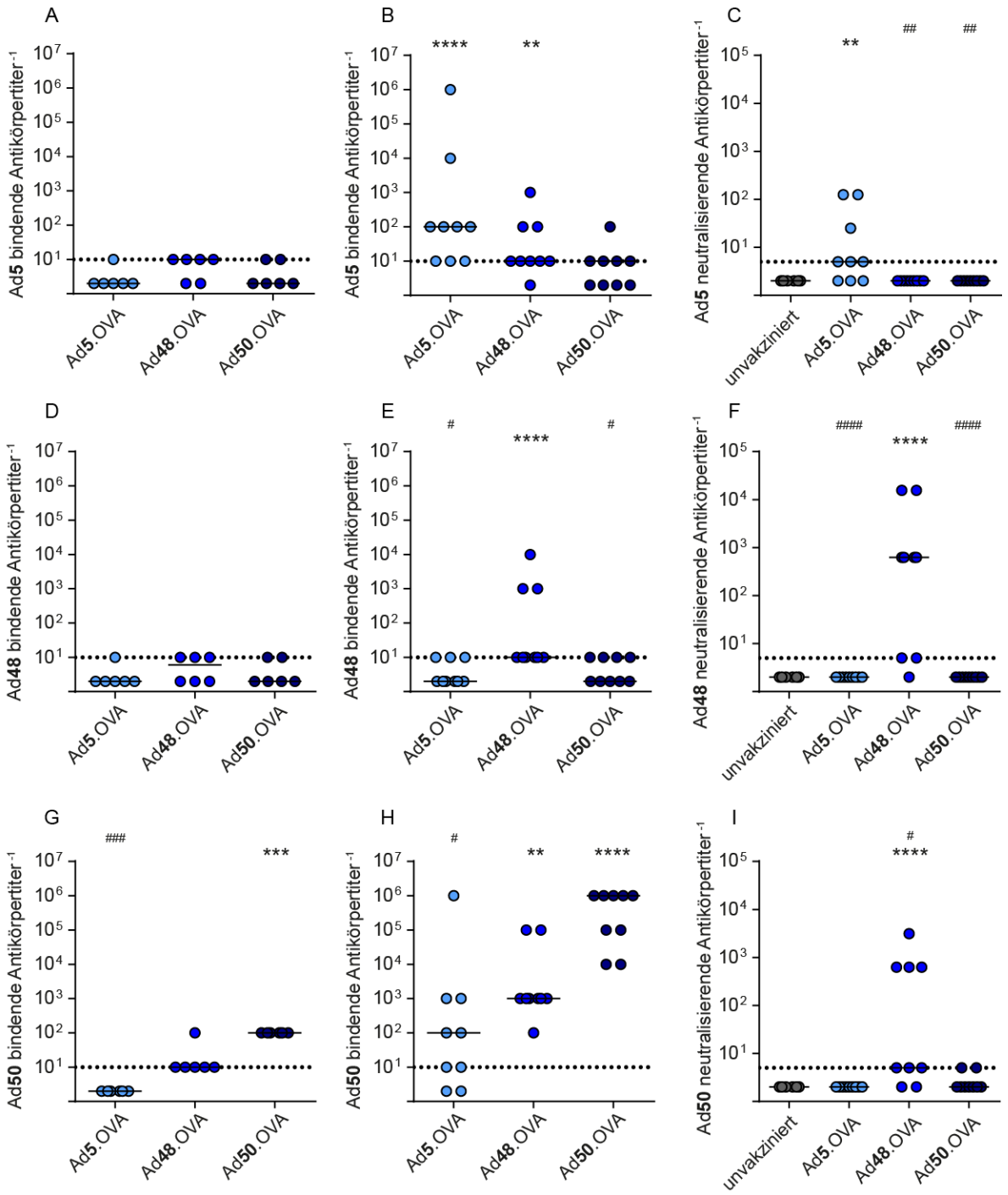

Abbildung 37: Induktion Ad Typ-spezifischer und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit OVA-kodierenden Ad-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal in Abständen von drei Wochen intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.OVA, Ad48.OVA oder Ad50.OVA immunisiert. Zwei Wochen nach beiden Immunisierungen wurde das Plasma mittels αAdV ELISA auf bindende Antikörper untersucht. Dargestellt sind jeweils die AdV-spezifischen Antikörper nach Prime (A, D, G) und nach Boost (B, E, H). Des Weiteren wurden die Plasmaproben mittels *in vitro* Neutralisationstest auf AdV-neutralisierende Antikörper (C: αAd5, F: αAd48, I: αAd50) untersucht. Die Daten stammen aus zwei Versuchen mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die gestrichelten Linien markieren die untere Nachweisgrenze der Experimente, die waagerechten Linien stellen den Median dar. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe mit ** ($P < 0{,}01$), *** ($P < 0{,}001$), bzw. mit **** ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen Referenzgruppe sind mit # ($P < 0{,}05$), ## ($P < 0{,}01$), ### ($P < 0{,}001$), bzw. mit #### ($P < 0{,}0001$) gekennzeichnet.

Die zweite Immunisierung steigerte die Ad50-bindenden Antikörpertiter in allen drei Gruppen, vor allem im Plasma Ad50.OVA-immunisierter Mäuse (Abb. 37H). Ad50-neutralisiernde Antikörper wurden nur in zwei der Ad50.OVA-immunisierten Mäuse, dafür hingegen vermehrt im Plasma Ad48.OVA-immunisierter Mäuse nachgewiesen (Abb. 37I).

Wie bereits zuvor beobachtet, induzierte die Immunisierung mit Ad5.OVA Antikörper mit Ad5- und Ad50-bindenden Eigenschaften. Ad5-induzierte neutralisierende Antikörper waren jedoch Typ-spezifisch. Die nach Immunisierung mit Ad48-induzierten bindenden und neutralisierenden Antikörper waren hingegen kreuzreaktiv gegen Ad50. Im Gegensatz zu vorherigen Ergebnissen führte die Immunisierung mit Ad50.OVA ausschließlich zur Bildung Ad50-bindender, jedoch nicht zur Bildung (Ad50-)neutralisierender Antikörper. Im vorherigen Versuch konnten zudem durch Immunisierung mit Ad5.OVA und mit Ad48.OVA OVA-bindende Antikörper induziert werden. Die Induktion Transgen-spezifischer Antikörper war somit nicht von der Induktion Ad-spezifischer Antikörper abhängig.

4.3.2.6 Immunisierungsexperimente mit Env-kodierenden Ad48- und Ad50-Vektoren

Das F-MuLV Envelope-Protein gp70 (F-MuLV Env) enthält mehrere $CD4^+$ T-Zell- und B-Zell-Epitope [106] und konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich in verschiedenen Immunisierungsstudien eingesetzt werden. Die Impfung mit Ad5.Env, welcher für das F-MuLV Env kodiert, vermittelte Schutz vor einer FV-Infektion basierend auf der Induktion spezifischer $CD4^+$ T-Helferzellen und F-MuLV-bindender bzw. -neutralisierender Antikörper [21, 22, 68].

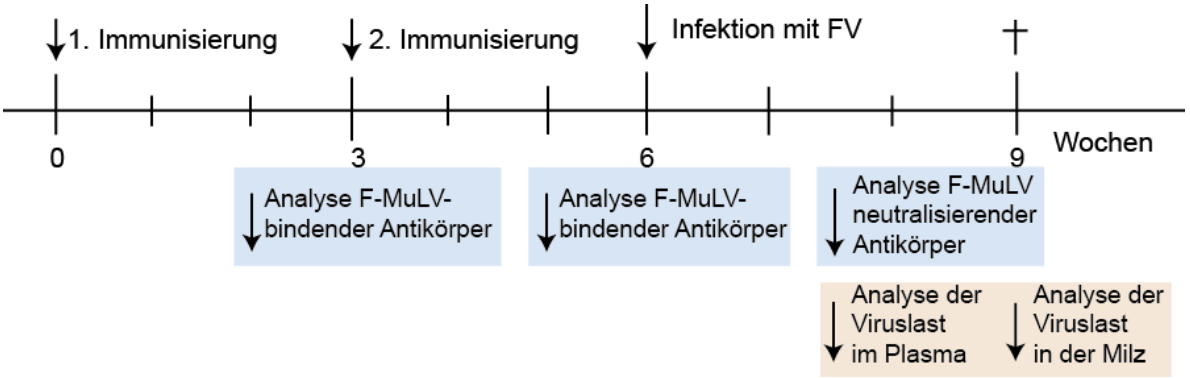

Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus bei der Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env

CB6F1-Mäuse wurden im Abstand von drei Wochen zweimal mit je $1 \cdot 10^9$ vp des entsprechenden Vektors immunisiert. Jeweils zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion F-MuLV-bindender Antikörper mittels ELISA überprüft. Drei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper, sowie die Virämie im Plasma der Tiere analysiert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in der Milz untersucht.

In den bisherigen Experimenten wurde hauptsächlich die Induktion von $CD8^+$ T-Zellantworten nach Immunisierung mit Ad48- und Ad50-Vektoren adressiert. In dem hier vorliegenden Experiment sollte die Effizienz Ad48- und Ad50-basierter Vektoren bei der Induktion schützender Antikörperantworten untersucht werden. Daher wurden Immunisierungsexperimente mit Ad48.Env und Ad50.Env im Vergleich zu Ad5.Env durchgeführt. Der zeitliche Ablauf des Versuchs ist in der Abbildung 38 dargestellt.

CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp eines Env-kodierenden Ad5-, Ad48- oder Ad50-Vektors immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde das Plasma auf F-MuLV-spezifische Antikörper untersucht. Nach der ersten Immunisierung konnten nur in einzelnen Tieren aller drei Gruppen F-MuLV-bindende Antikörper nachgewiesen werden (Abb. 39A). Nach der zweiten Immunisierung wurden signifikante Titer F-MuLV-bindender Antikörper im Plasma Ad5.Env-immunisierter Mäuse detektiert (Abb. 39B). Im Plasma der Ad48.Env-immunisierten Mäuse konnten keine F-MuLV-bindenden Antikörper nachgewiesen werden, während das Plasma einiger Ad50.Env-immunisierter Mäuse F-MuLV-bindende Antikörper enthielt. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 500 SFFU FV infiziert. Nach 10 Tagen wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper, sowie die Virämie im Plasma bestimmt. Ad5.Env-immunisierte Mäuse verfügten, verglichen mit den unvakzinierten Mäusen, über signifikante Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper im Plasma (Abb. 39C). Einige der Ad48.Env-immunisierten Mäuse hatten ebenfalls hohe Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper im Plasma, während in Ad50.Env-immunisierten Mäusen nur geringe Mengen F-MuLV-neutralisierender Antikörper detektiert wurden.

Die Viruslast aller Ad5.Env-immunisierten Mäuse befand sich unterhalb des Detektionslimits (Abb. 39D). Bis auf 2 Tiere, in deren Plasma kein Virus detektiert werden konnte, waren die Viruslasten der übrigen Ad48.Env-immunisierten Mäuse, sowie der Ad50.Env-immunisierten Mäuse ähnlich hoch, wie bei der unvakzinierten Kontrollgruppe. Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen gewogen und die virale Belastung darin mittels IC-Assay überprüft. Die Ad5.Env-immunisierten Mäuse hatten im Gegensatz zu den unvakzinierten Mäusen signifikant kleinere Milzen (Abb. 39E), in denen kein FV detektiert werden konnte (Abb. 39F). Die Verteilung der Ad48.Env-immunisierten Mäuse war bimodal. 2 Mäuse hatten kaum vergrößerte Milzen, in denen kein Virus nachgewiesen werden konnte. Die Milzen der übrigen Ad48.Env-immunisierten Mäuse, sowie der Ad50.Env-immunisierten Mäuse waren hingegen ähnlich vergrößert, wie die der unvakzinierten Mäuse und wiesen zu dieser Gruppe vergleichbare Viruslasten auf.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche geht hervor, dass durch die Immunisierung mit Ad48.Env tendenziell Schutz vor einer FV-Infektion, wahrscheinlich durch die Induktion F-MuLV-neutralisierender Antikörper, erreicht werden konnte. Verglichen mit Ad5.Env war die Immunisierung mit Ad48.Env deutlich ineffektiver. Die Immunisierung mit Ad50.Env vermittelte in diesen Experimenten hingegen keinen Schutz vor einer FV-Infektion.

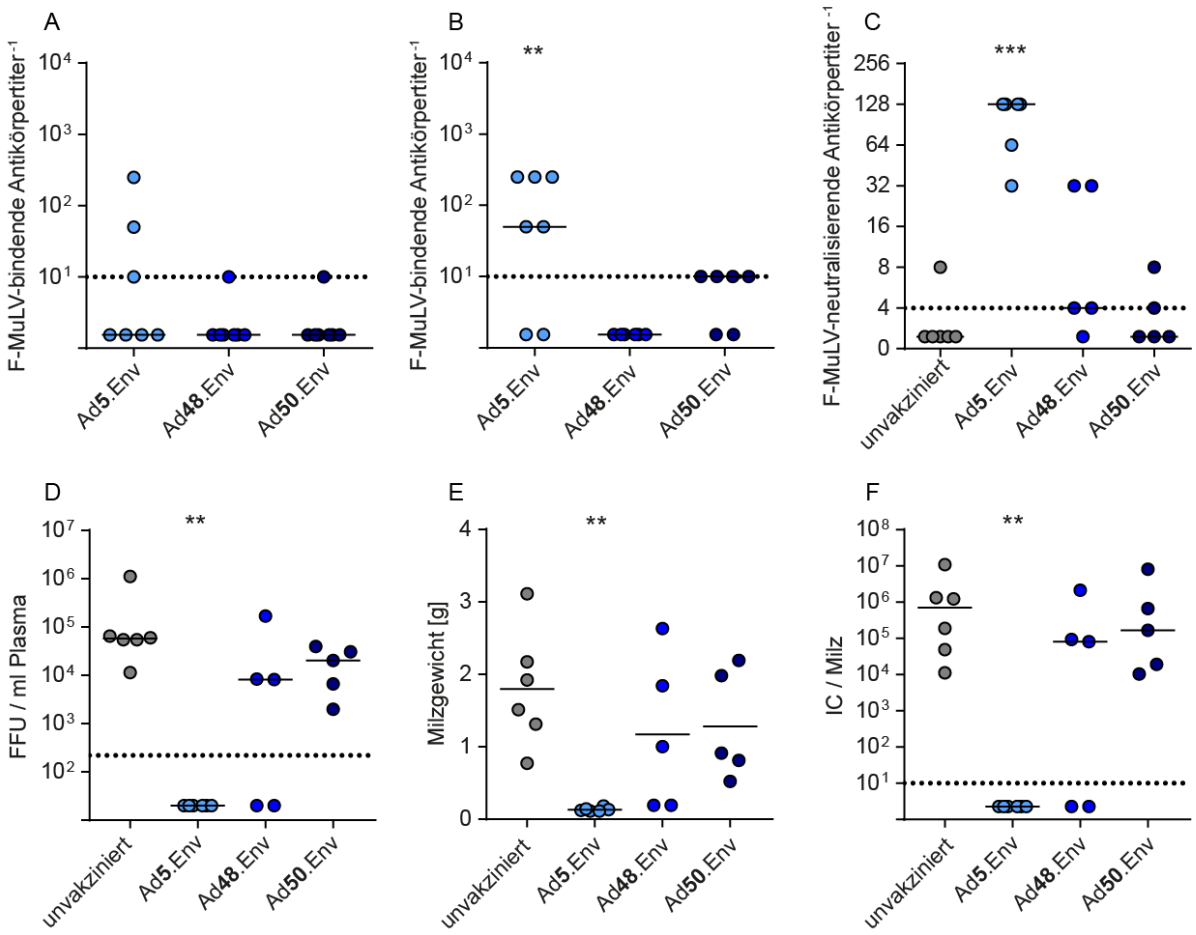

Abbildung 39: Immunisierung mit FV Env-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Env, Ad48.Env, oder Ad50.Env immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurden Plasmaproben der Mäuse genommen und mittels ELISA auf F-MuLV-spezifische, bindende Antikörper untersucht (A, B). A zeigt die Titer F-MuLV-bindender Antikörper nach der ersten Immunisierung, B nach der zweiten Immunisierung. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper (C) und die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (D). Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzgewichte, sowie die Viruslast in den Milzen der Tiere analysiert (E, F). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit einmal vier und einmal drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die untere Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Median (A, B, C, D, F) bzw. Mittelwert (E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), bzw. mit *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

4.3.2.7 Analyse Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env

Neben der Induktion F-MuLV-spezifischer Antikörper wurde die Induktion Ad-bindender und -neutralisierender Antikörper jeweils zwei Wochen nach der ersten bzw. nach der zweiten Immunisierung der Mäuse mittels αAd-ELISA bzw. mittels *in vitro* Neutralisationstest nach der zweiten Immunisierung überprüft. Nach der ersten Immunisierung konnten niedrige Ad5-bindende Antikörpertiter im Plasma Ad5.Env-immunisierter Mäuse, sowie in einigen der Ad48.Env- und Ad50.Env-immunisierten Tiere nachgewiesen werden (Abb. 40A). Nach der zweiten Immunisierung waren die Ad5-bindenden Antikörpertiter in allen drei Gruppen, vor allem aber in den Ad5.Env-immunisierten Mäusen erhöht (Abb. 40B). Ad5-neutralisierende Antikörper konnten hingegen nur in Ad5-immunisierten Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 40C). Nach der ersten Immunisierung wurden Ad48-bindende Antikörper in einzelnen Mäusen aller Gruppen (Abb. 40D), nach der zweiten Immunisierung in beinah allen Tieren aller drei Gruppen nachgewiesen (Abb. 40E). Ad48-neutralisierende Antikörpertiter wurden hingegen ausschließlich im Plasma Ad48.Env-immunisierter Mäuse detektiert (Abb. 40F). Ad50-bindende Antikörpertiter konnten bereits nach der ersten Immunisierung in allen drei Gruppen nachgewiesen werden (Abb. 40G) und waren nach der zweiten Immunisierung in allen Gruppen deutlich erhöht. (Abb. 40H). In Ad50.Env-immunisierten Mäusen konnten keine Ad50-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden, während im Plasma einiger der Ad48.Env-immunisierten Mäuse Ad50-kreuzreaktive neutralisierende Antikörper detektiert wurden (Abb. 40I).

Wie bereits zuvor beobachtet führte auch in diesen Experimenten die Immunisierung mit Ad5.Env zur Induktion von Antikörpern mit bindenden Eigenschaften gegen Vektoren des Typs Ad5 und Ad50. Induzierte neutralisiernden Antikörper waren hingegen spezifisch gegen Ad5. Die Immunsierung mit Ad48.Env induzierte nur geringe Titer Ad48-bindender Antikörper, aber signifikante Titer Ad48-neutralisierender Antikörper in den Plasma Ad48-immunisierter Mäuse. Sowohl bindende als auch neutralisierende Antikörper zeigten allerdings Kreuzreaktivität gegen Vektoren des Typs Ad50. Die erste Immunisierung mit Ad50.Env induzierte bereits deutliche Titer Ad50-bindender Antikörper, die nach dem Boost weiter gesteigert wurden. Nach der Immunisierung mit Ad50.Env konnten hingegen keine Ad50-neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden.

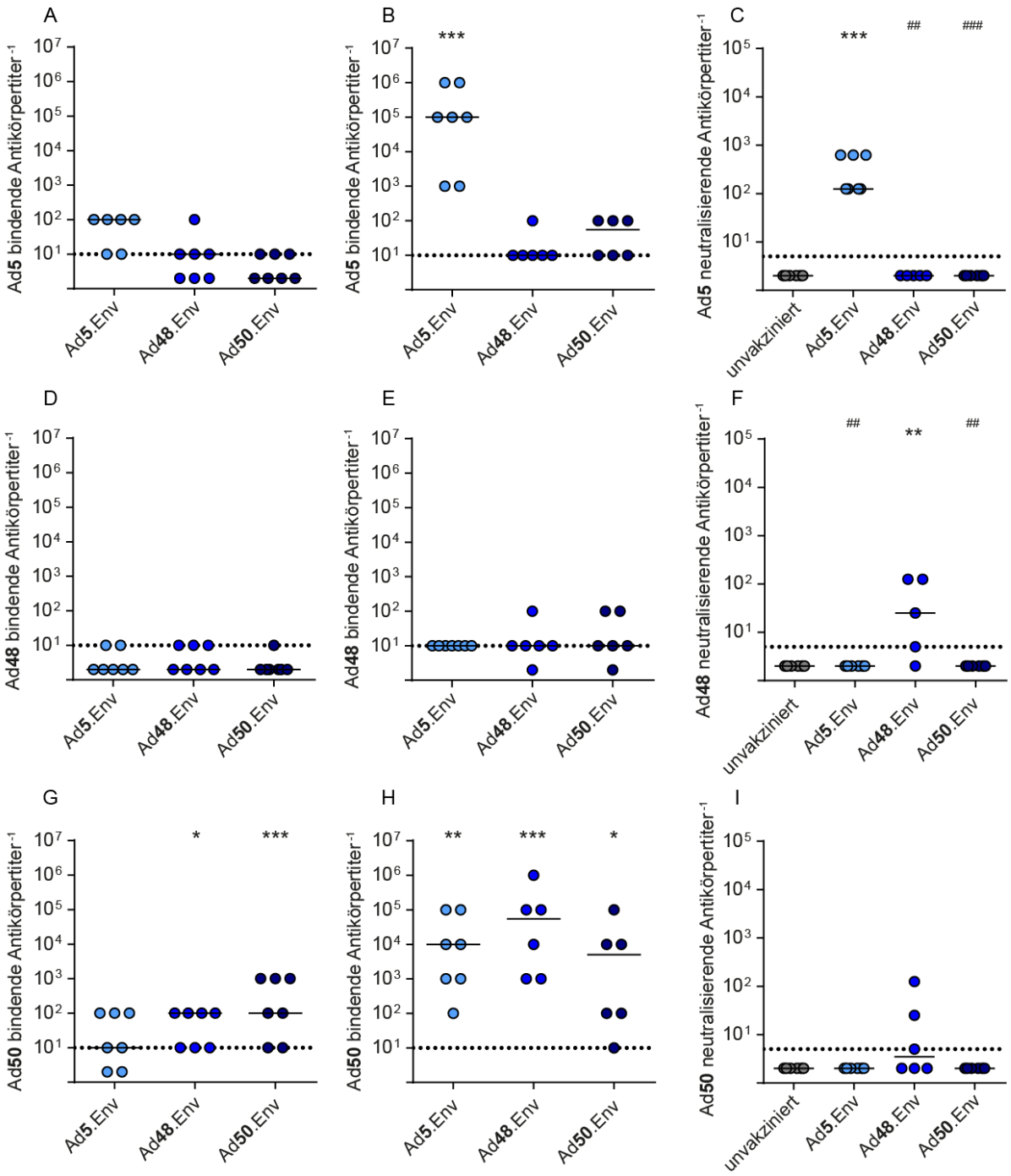

Abbildung 40: Induktion Ad-Typ-spezifischer bindender und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden AdV

CB6F1-Mäuse wurden zweimal in Abständen von drei Wochen intramuskulär mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Env, Ad48.Env oder Ad50.Env immunisiert. Zwei Wochen nach beiden Immunisierungen wurde das Plasma mittels αAdV ELISA auf bindende Antikörper untersucht. Dargestellt sind Ad5-spezifische Antikörper nach Prime (A) und nach Boost (B), Ad48-spezifische Antikörper nach Prime (D) und Boost (E), sowie Ad50-spezifische Antikörper nach Prime (G) und Boost (H). Des Weiteren wurden die Plasmaproben mittels *in vitro* Neutralisationstest auf AdV-neutralisierende Antikörper (C: αAd5, F: αAd48, I: αAd50) untersucht. Die Daten stammen aus zwei Versuchen mit einmal drei und einmal vier Tieren. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Die gestrichelten Linien markieren die untere Nachweisgrenze der Experimente, die waagerechten Linien stellen den Median dar. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe sind mit ** ($P < 0{,}01$), bzw. *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen Referenzgruppe (Ad5 C, Ad48 F) sind mit ## ($P < 0{,}01$), bzw. mit ### ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet.

4.3.2.8 Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad5.Env, Ad48.Env und Ad50.Env

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde in unserer Arbeitsgruppe die Beobachtung gemacht, dass die Induktion F-MuLV-bindender Antikörper nach der Impfung mit Ad5.Env in zuvor Ad5-prä-immunisierten Mäusen stärker war, als in einer vor der Immunisierung naiven Vergleichsgruppe [2]. Die Beobachtung stand im Widerspruch zu der Annahme, dass Ad5-Vektoren in Ad5-prä-immunen Individuen durch die vorhandenen Titer Ad5-bindender bzw. Ad5-neutralisierender Antikörper inaktiviert werden und somit die Transgenexpression der Ad5-Vektoren unterbunden wird.

Während der Transfer Ad5-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen oder Ad5-bindender Antikörper jeweils nur in einer geringen Suppression der schützenden $CD8^+$ T-Zellantwort resultierte, war diese nach dem Transfer Ad5-neutralisierender Antikörper oder nach dem Transfer von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen vollständig inhibiert. In den nachfolgenden Experimenten sollte daher der Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad5.Env, Ad48.Env und Ad50.Env untersucht werden. Des Weiteren sollte der Einfluss der Ad5-Prä-Immunisierung auf die Induktion Ad-spezifischer Antikörper nach Impfung mit Ad5.Env, Ad48.Env und Ad50.Env überprüft werden. Ein Schema des zeitlichen Ablaufs des Versuchs zeigt die Abbildung 41. Naive oder zuvor zweimal mit $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty prä-immunisierte CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp eines Env-

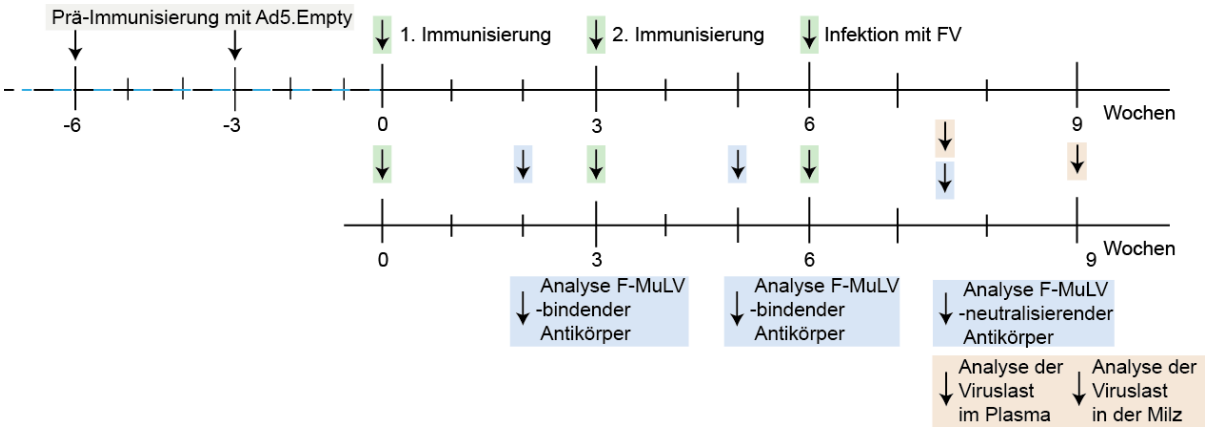

Abbildung 41: Zeitlicher Verlauf des Versuchsaufbaus zur Untersuchung des Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env

CB6F1-Mäuse wurden zunächst im Abstand von drei Wochen zweimal mit je $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty prä-immunisiert. Drei Wochen später wurden sowohl Ad5-prä-immune, als auch naive CB6F1-Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit je $1 \cdot 10^9$ vp des entsprechenden Vektors immunisiert. Jeweils zwei Wochen nach der Immunisierung wurde die Induktion F-MuLV-bindender Antikörper mittels ELISA überprüft. Drei Wochen nach der Boost-Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV infiziert und 10 Tage später wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper, sowie die Virämie im Plasma der Tiere analysiert. Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzen gewogen und die Viruslast in der Milz untersucht.

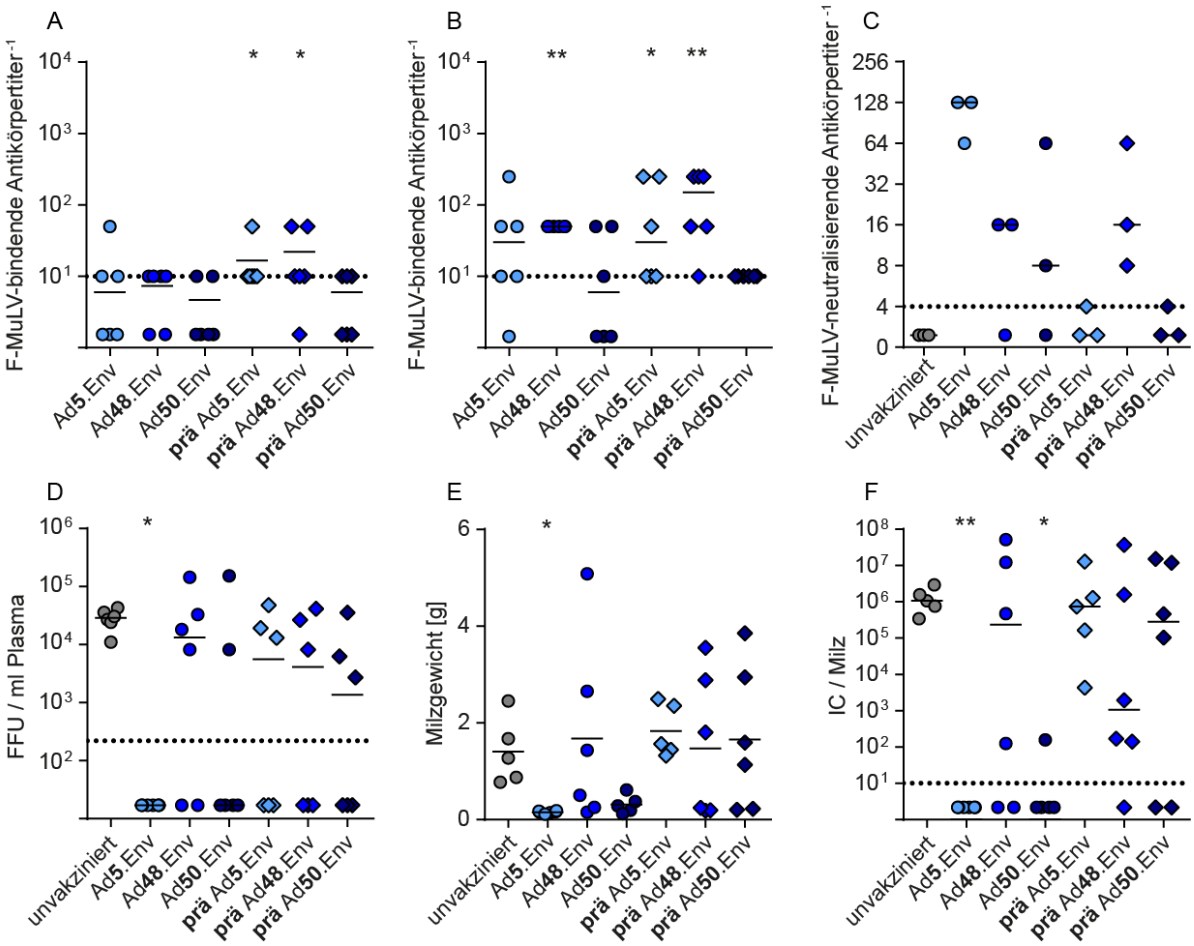

Abbildung 42: Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden Ad5-, Ad48- und Ad50-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty vorimmunisiert. Jeweils eine Gruppe naiver und eine Gruppe Ad5-prä-immuner Mäuse wurden sodann zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Env, Ad48.Env, oder Ad50.Env immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurden Plasmaproben der Mäuse genommen und mittels ELISA auf F-MuLV-spezifische, bindende Antikörper untersucht (A, B). A zeigt die Titer F-MuLV-bindender Antikörper nach der ersten Immunisierung, B nach der zweiten Immunisierung. Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse mit 500 SFFU FV durch intravenöse Injektion infiziert und 10 Tage später wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper (C) und die Virämie im Plasma der Tiere überprüft (D). Drei Wochen nach der Infektion wurden die Milzgewichte, sowie die Viruslast in den Milzen der Tiere analysiert (E, F). Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe (A, B, D-F), bzw. aus einem Experiment mit drei Tieren pro Gruppe (C). Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die untere Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Median (A, B, C, D, F) bzw. Mittelwert (E). Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind mit * ($P < 0{,}05$), bzw. mit ** ($P < 0{,}01$) gekennzeichnet.

kodierenden Ad5-, Ad48- oder Ad50-Vektors immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurde das Plasma auf F-MuLV-spezifische Antikörper untersucht.

Nach der ersten Immunisierung konnten in einigen Mäusen aller zuvor naiven Gruppen geringe Mengen F-MuLV-bindender Antikörper detektiert werden (Abb. 42A). In Ad5-prä-immunisierten Mäusen waren die detektierten F-MuLV-bindenden Antikörper, vor allem

nach Immunisierung mit Ad5.Env oder Ad48.Env, signifikant erhöht. In der Ad50.Env-immunisierten Gruppe wurden hingegen auch nach Prä-Immunisierung mit Ad5 nur in einigen Mäusen niedrige F-MuLV-bindende Antikörpertiter nachgewiesen. Die zweite Immunisierung steigerte die F-MuLV-bindenden Antikörpertiter in allen untersuchten Gruppen (Abb. 42B). Bei den zuvor naiven Mäusen konnten erhöhte F-MuLV-bindende Antikörpertiter nach Immunisierung mit Ad5.Env oder Ad48.Env festgestellt werden, die in den Ad48.Env-immunisierten Mäusen signifikant waren. In der Ad50.Env-immunisierten Gruppe konnten nur in drei Mäusen geringfügige F-MuLV-bindende Antikörpertiter detektiert werden. In Ad5-prä-immunen Mäusen wurden insgesamt höhere Titer F-MuLV bindender Antikörper nachgewiesen, als in den zuvor naiven Gruppen. Die Unterschiede zwischen naiv und Ad5-prä-immun waren jedoch statistisch nicht signifikant. In Ad5.Env- und Ad48.Env-immunisierten Ad5-prä-immunen Mäusen konnten gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe signifikante Titer F-MuLV-bindender Antikörper nachgewiesen werden. Nach der Immunisierung mit Ad50.Env wurden hingegen nur niedrige Titer F-MuLV-bindender Antikörper in Ad5.prä-immunen Mäusen detektiert.

Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wurden die Mäuse intravenös mit 500 SFFU FV infiziert. Nach 10 Tagen wurden die Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper, sowie die Virämie im Plasma der Tiere bestimmt. Im Plasma Ad5.Env-immunisierter Mäuse wurden hohe Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper nachgewiesen (Abb. 42C). Auch im Plasma von 2 der 3 Ad48.Env-immunisierten Mäuse konnten F-MuLV-neutralisierende Antikörper detektiert werden. Die Ergebnisse in der Gruppe der Ad50.Env-immunisierten Mäuse waren stark gestreut. Eine Maus besaß sehr hohe Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper, eine weitere Maus moderate Titer, während in der dritten Maus keine F-MuLV-neutralisierenden Antikörper detektiert werden konnten. Im Plasma Ad5-prä-immuner Mäuse konnten nach der Immunisierung mit Ad5.Env oder nach der Immunisierung mit Ad50.Env jeweils nur bei einem Tier pro Gruppe geringfügige Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper nachgewiesen werden. In den prä-Ad48.Env-immunisierten Mäusen wurden hingegen ähnlich niedrige Titer F-MuLV-neutralisierender Antikörper nachgewiesen, wie in der unvakzinierten Vergleichsgruppe.

Bei der Untersuchung der Virämie im Plasma der Tiere besaßen die unvakzinierten Mäuse hohe Viruslasten (Abb. 42D). Im Gegensatz dazu lag die virale Belastung im Plasma der Ad5.Env-immunisierten Mäuse unter der Nachweisgrenze. Bei zwei Mäusen der Ad48.Env-immunisierten Gruppe konnte kein Virus im Plasma detektiert werden. Die Viruslasten im Plasma der übrigen Ad48.Env-immunisierten Mäuse waren vergleichbar hoch, wie in der unvakzinierten Kontrollgruppe. Die Virämie im Plasma der Ad50.Env-immunisierten Gruppe war hingegen, mit Ausnahme von zwei Mäusen, stark reduziert und

lag bei den meisten Mäusen unterhalb des Detektionslimits. Die Verteilung der Virämie in den Ad5-prä-immunen Gruppen war bimodal. So war die Viruslast im Plasma bei der Hälfte der Mäuse aller Gruppen verglichen zu den unvakzinierten Mäusen nur geringfügig reduziert, während in den übrigen Mäusen aller Gruppen kein Virus im Plasma detektiert werden konnte. Drei Wochen nach der Infektion mit FV wurden die Milzen gewogen und die virale Belastung der Milzen mittels IC-Assay überprüft. Die mit Ad5.Env-immunisierten Mäuse besaßen kleine Milzen, in denen kein FV detektiert werden konnte (Abb. 42E+F). Die Milzen der Ad50.Env-immunisierten Mäuse waren kaum vergrößert und bis auf eine Ausnahme frei von Virus. Die Verteilung der Milzgrößen in der Gruppe der Ad48.Env immunisierten Mäuse war bimodal. Diese Gruppe enthielt sowohl Mäuse mit kaum vergrößerten Milzen, in denen kein Virus detektiert wurde, als auch Mäuse mit deutlich vergrößerten Milzen und darin nachgewiesenen hohen Viruslasten. Die prä-immunen Ad5.Env-immunisieren Mäuse hatten ähnlich stark vergrößerte Milzen, wie die unvakzinierten Mäuse und damit verbunden ähnlich hohe Viruslasten. In der prä-immunen Ad48.Env-immunisierten Gruppe waren die Ergebnisse ähnlich gestreut, wie in der naiven Vergleichsgruppe. Die Milzen der prä-immunen Ad50.Env-immunisierten Mäuse waren deutlich vergrößert und enthielten mit den unvakzinierten Mäusen vergleichbar hohe Viruslasten.

Während in den vorherigen Experimenten die Immunisierung mit Ad50-basierten Vektoren nicht erfolgreich darin war, $CD8^+$ T-Zellantworten zu induzieren und zu einer Kontrolle der FV-Infektion zu führen, konnten in den vorliegenden Experimenten suszeptible CB6F1-Mäuse durch Immunisierung mit Ad50.Env ähnlich gut vor der Infektion mit dem FV geschützt werden, wie die Ad5.Env-immunisierten Mäuse. Die unterschiedlichen Resultate der Immunisierung mit Ad50.Env in diesem und dem vorherigen Experiment 4.3.2.6 werden darauf zurückgeführt, dass in den späteren Experimenten ein neu aufgereinigter Ad50.Env verwendet wurde, der über eine bessere Infektiosität verfügte, als der zuvor verwendete Vektor. Durch Immunisierung mit Ad48.Env konnte hingegen, ähnlich wie in den vorherigen Experimenten mit Ad48.Leader-Gag_{C1K}, nur in einem Teil der Mäuse Schutz vor der FV-Infektion vermittelt werden. Des Weiteren konnte in diesem Experiment erneut ein positiver Effekt der Ad5-Prä-Immunität auf die Induktion Env-spezifischer, bindender Antikörper gezeigt werden, der auch nach der Immunisierung mit Ad48.Env oder Ad50.Env eintrat. Dennoch war in zuvor Ad5-prä-immunen Mäusen sowohl nach Immunisierung mit Ad5.Env, als auch mit Ad50.Env der resultierende Schutz vor einer FV-Infektion verringert. Auf die Immunisierung mit Ad48.Env konnte kein negativer Einfluss festgestellt werden.

4.3.2.9 Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Induktion Ad-spezifischer Antikörperantworten nach Immunisierung mit Ad48.Env und Ad50.Env

In dem vorherigen Experiment konnte ein positiver Effekt auf die Induktion Env-spezifischer bindender Antikörper, aber auch ein negativer Einfluss auf den schützenden Effekt der Immunisierung mit Ad5.Env und Ad50.Env in Ad5-prä-immunen Mäusen dargelegt werden. Eine naheliegende Erklärung der beeinträchtigten Immunisierungseffizienz stellt das Vorhandensein Ad5-spezifischer Antikörper mit kreuzreaktiven Eigenschaften gegen Ad50 dar. Diese können die Transduktionseffizienz beider Vektoren limitieren und somit zur Reduktion Env-spezifischer Immunantworten, mit Ausnahme der bindenden Antikörper, führen. In früheren Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Ad5 zur Induktion bindender Antikörper mit kreuzreaktiven Eigenschaften gegen Ad50 führt. Diese Beobachtung sollte daher im Kontext des aktuellen Versuches bestätigt werden. Daher wurde Plasma, das den Mäusen jeweils zwei Wochen nach der ersten bzw. nach der zweiten Immunisierung entnommen wurde, mittels αAd-ELISA bzw. mittels *in vitro* Neutralisationstest nach der Boost-Immunisierung auf Ad-bindende und -neutralisierende Antikörpertiter überprüft.

Nach der ersten Immunisierung wurden Ad5-bindende Antikörper in Ad5.Env- und Ad50.Env-immunisierten Mäusen, aber vor allem in den Ad5-prä-immunen Gruppen detektiert (Abb 43A). Nach der zweiten Immunisierung waren die Ad5-bindenden Antikörper in allen zuvor naiven Gruppen erhöht und erreichten in den Ad5.Env-immunisierten Mäusen bereits vergleichbar hohe Titer, wie in den Ad5-prä-immunen Gruppen (Abb 43B). Ad5-neutralisierende Antikörper wurden in zuvor naiven, Ad5.Env-immunisierten, sowie in der prä-Ad5-Env-Gruppe nachgewiesen und wurden nur in einzelnen Mäusen der prä-Ad48.Env- und prä-Ad50.Env-Gruppen detektiert (Abb. 43C). Nach der ersten Immunisierung wurden Ad48-bindende Antikörper hauptsächlich in einigen Mäusen der Ad48.Env-immunisierten Gruppe, sowie in den Ad5-prä-immunen Gruppen detektiert (Abb. 43D). Die zweite Immunisierung erhöhte die Ad48-bindenden Antikörper in allen Mausgruppen (Abb. 43E). In den zuvor Ad5-prä-immunisierten Gruppen waren die Titer Ad48-bindender Antikörper nach der zweiten Immunisierung höher als in den zuvor naiven Gruppen. Ad48-neutralisierende Antikörper wurden ausschließlich in den beiden Ad48.Env-immunisierten Gruppen detektiert und waren in den Ad5-prä-immunen Mäusen geringfügig höher als in zuvor naiven Tieren (Abb. 43F).

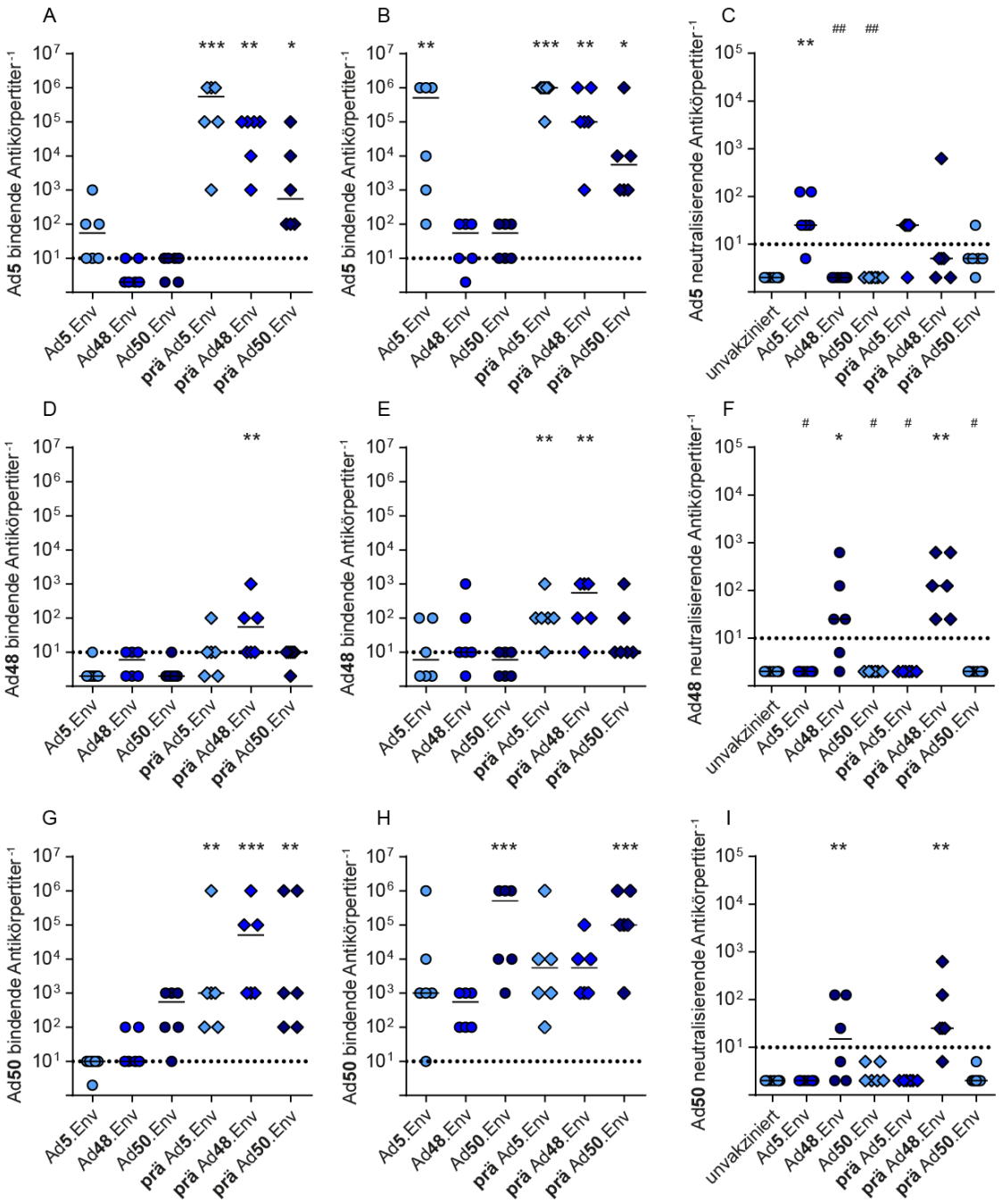

Abbildung 43: Einfluss der Ad5-Prä-Immunität auf die Induktion Ad-Typ-spezifischer bindender und neutralisierender Antikörper nach Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden Ad-Vektoren

CB6F1-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Empty vorimmunisiert. Jeweils eine Gruppe naiver und eine Gruppe Ad5-prä-immuner Mäuse wurden sodann zweimal im Abstand von drei Wochen intramuskulär mit jeweils $1 \cdot 10^9$ vp Ad5.Env, Ad48.Env, oder Ad50.Env immunisiert. Zwei Wochen nach jeder Immunisierung wurden Plasmaproben der Mäuse genommen und mittels ELISA auf Ad-spezifische bindende bzw. neutralisierende Antikörper untersucht . A, D und G zeigen die Titer Ad-bindender Antikörper nach der ersten Immunisierung, B, E und H nach der zweiten Immunisierung. Die Titer neutralisierender Antikörper sind in C, F und I dargestellt. Die Daten stammen aus zwei Experimenten mit je drei Mäusen pro Gruppe. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Gestrichelte Linien stellen die untere Nachweisgrenze dar, waagerechte Linien den Median. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem Kruskal-Wallis Test und Dunns mehrfachem Vergleichstest analysiert und sind gegenüber der unvakzinierten Kontrollgruppe mit * ($P < 0{,}05$), ** ($P < 0{,}01$), bzw. mit *** ($P < 0{,}001$) gekennzeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen Referenzgruppe sind mit # ($P < 0{,}05$), bzw. mit ## ($P < 0{,}01$) gekennzeichnet.

Nach der ersten Immunisierung konnten Ad50-bindende Antikörper im Plasma aller drei zuvor naiven Mausgruppen, sowie in höheren Titern ebenfalls in den drei Ad5-prä-immunen Mausgruppen nachgewiesen werden (Abb. 43G). Nach der zweiten Immunisierung waren die Titer Ad50-bindender Antikörper in allen immunisierten Gruppen, aber vor allem in den Ad50.Env-immunisierten und in den Ad5-prä-immunen Ad50.Env-immunisierten Mäusen, erhöht (Abb. 43H). Wie bereits zuvor konnte in diesem Experiment beobachtet werden, dass die Immunisierung mit Ad50.Env, weder in naiven, noch in Ad5-prä-immunen Mäusen, zur Bildung Ad50-neutralisierender Antikörper führte (Abb. 43I). Ad50-neutralisierende Antikörper konnten ausschließlich nur im Plasma Ad48.Env-immunisierter Mäuse, bzw. prä-Ad48.Env-immunisierter Mäuse nachgewiesen werden.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung mit einem Ad5-Vektor hauptsächlich zur Induktion Ad5-bindender und -neutralisierender, aber auch Ad50-bindender Antikörper führte. Die durch Immunisierung mit Ad48 induzierten Antikörper zeigten in ähnlichen Maße Ad5-, Ad48- und Ad50-bindende Eigenschaften und waren zudem kreuz-neutralisierend gegen Ad50. Die Immunisierung mit Ad50 selbst induzierte hingegen lediglich Ad50-bindende Antikörper. Die Prä-Immunisierung mit Ad5 hatte nicht nur einen steigernden Effekt auf die Induktion Transgen-bindender, sondern auch generell auf Ad-bindende Antikörper. Dieser war unabhängig davon, mit welchem Vektor die Mäuse immunisiert wurden. Ad-neutralisierende Antikörper hingegen wurden durch den Ad5-prä-immunen Status nicht beeinflusst.

5. Diskussion

Virale Impfvektoren, die zum Transport Vektor-fremder Antigene genutzt werden können, bieten eine Möglichkeit zur Induktion potenter Antigen-spezifischer zellulärer und humoraler Immunantworten gegen Pathogene, die selbst aufgrund eines zu hohen Sicherheitsrisikos nicht als lebend-attenuierte Vakzine verwendet werden können. Replikations-defiziente Ad5-Vektoren zählen zu den bestcharakterisierten viralen Vektoren. Sie transduzieren ein breites Spektrum sich teilender und nicht teilender Zellen, induzieren langanhaltende $CD8^+$ T-Zell- sowie Antikörperantworten und wurden bereits als Impfvektoren in Tierversuchen und klinischen Studien gegen eine Vielzahl von Pathogenen, unter anderem HIV, evaluiert [43, 64, 95, 258]. Da in der Bevölkerung weit verbreitete Immunantworten gegen Ad5 existieren, ist dessen Einsetzbarkeit limitiert. Dies wurde vor allem bei der STEP-Studie evident. Hierbei handelte es sich um eine klinische Phase-IIb Studie zur Bewertung der Wirksamkeit eines Ad5-basierten HIV-Impfstoffes, die aufgrund einer erhöhten HIV-1-Infektionsrate in der Gruppe der Geimpften frühzeitig beendet wurde. Obwohl bereits frühe Analysen keine statistische Korrelation zwischen dem Ad5-Serostatus der Probanden und dem erhöhten Infektionsrisiko belegten [245], wird seitdem die Bedeutung der vorherrschenden Ad5-Prä-Immunität auf die Immunisierung mit Ad5-Vektoren untersucht. Neben der Ad5-Prä-Immunität werden aber auch Vektor-induzierte Immunantworten und deren Einfluss auf Transgen-spezifische Immunantworten analysiert. So sind einige virale Pathogene wie HIV und HCV durch hohe Mutationsraten und daraus resultierende Polymorphismen immunogener Strukturen gekennzeichnet. Daher wird bei der Entwicklung von Immunisierungsstrategien gegen diese Pathogene die Induktion möglichst breiter $CD8^+$ T-Zellantworten, vor allem gegen subdominante, stärker konservierte Epitope, angestrebt. In einer Studie mit verschiedenen *Plasmodium*-Antigenen konnte nach der einmaligen Immunisierung mit einem Ad5-Vektor zunächst eine breit-gefächerte $CD8^+$ T-Zellantwort auch gegen subdominante Epitope induziert werden. Der Schwerpunkt der $CD8^+$ T-Zellantwort verschob sich jedoch nach wiederholter Immunisierung mit demselben Vektor zugunsten dominanter *Plasmodium*-, sowie dominanter Ad5-Epitope [216]. In einer anderen Studie wurden hingegen bereits nach der ersten Immunisierung mit einem HBsAg-kodierenden Ad5-Vektor nur $CD8^+$ T-Zellantworten gegen das dominante S_{20-28}-Epitop induziert [230].

In der hier vorliegenden Arbeit wurde, neben der Ad5-Prä-Immunität, der Einfluss Vektor-induzierter Immunität auf die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten im FV-Modell analysiert. Bei diesem Modell handelt es sich um einen murinen, retroviralen Komplex, der die Untersuchung verschiedener anti-retroviraler Immunisierungsstrategien

in Mäusen ermöglicht. Für das FV wurde bisher nur ein $CD8^+$ T-Zell-Epitop, das immundominante $GagL_{85-93}$-Epitop, beschrieben. Dieses Epitop wird in der *leader*-Region des Gag-Proteins kodiert und induziert während einer akuten FV Infektion ca. 30 % der aktivierten $CD8^+$ T-Zellen [291]. Die Immunisierung mit einem Leader-Gag-kodierenden Ad5-Vektor führte jedoch nicht zur Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen [93]. Durch den Austausch einer das $GagL_{85-93}$-Epitop C-terminal flankierenden Aminosäure wurde der proteasomale Abbau und somit die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops gesteigert. Eine Impfung mit dem resultierenden Vektor Ad5.Leader-Gag_{C1K} resultierte in der Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten [93]. Hieraus entstand die Fragestellung, ob eine erfolgreiche Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen von weiteren Komponenten des FV abhängig ist, oder negativ von Bestandteilen des adenoviralen Vektors beeinflusst wird. Auf DNA-Plasmiden basierte Immunisierungsstudien zeigten jedoch eine vergleichbare Immunogenität der natürlichen Leader-Gag-Sequenz und der modifizierten Leader-Gag_{C1K}-Sequenz [232]. Daraufhin wurden Immunisierungsexperimente mit Epitopketten-kodierenden DNA-Plasmiden durchgeführt, die für das $GagL_{85-93}$-Epitop, sowie für die beiden adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ kodierten. Um den Mechanismus der Immundominanz zu untersuchen, wurden entweder jeweils ein oder beide adenoviralen Epitope in den Immunisierungs-Plasmiden durch Austausch der jeweiligen Aminosäuren in den Ankerpositionen 5 und 9 gegen Alanine an der Bindung von MHC-I-Molekülen gehindert. Diese Experimente zeigten einen inhibierenden Einfluss der beiden adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ auf die Immunogenität des $GagL_{85-93}$-Epitops. Interessanterweise dominierte vor allem das H-$2K^d$-restringierte $Hexon_{486-494}$- und nicht das H-$2D^b$-restringierte $DBP_{418-426}$-Epitop die Induktion $GagL_{85-93}$-H-$2D^b$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen.

Während einer Infektion kommt es in der Zelle abhängig vom Haplotyp zur Co-Expression von drei bis zu sechs verschiedenen MHC-I-Molekülen, sowie einer Vielzahl unterschiedlicher viraler Peptid-Antigene, die prozessiert, auf die MHC-I-Moleküle geladen und anschließend auf der Zelloberfläche $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden [5]. Die resultierende Immunantwort ist jedoch nur gegen einige dieser Antigene gerichtet. Die selektive Induktion von Immunantworten gegen dominante Epitope und Suppression von Antworten gegen subdominante Epitope wird als Immundominanz bezeichnet. Immundominanz kann intrazellulär auf einer unterschiedlichen Effizienz bei der proteasomalen Degradation, der Peptidprozessierung, variierender Affinität zum *transporter associated with presentation* (TAP) oder zu dem zu beladenden MHC-I-Molekül resultieren. Extrazellulär sind unter anderem die Stabilität der

resultierenden MHC-I-Peptidkomplexe auf der Zelloberfläche, die Affinität der MHC-I-Peptidkomplexe zu den jeweiligen T-Zell-Rezeptoren, sowie zur Avidität der korrespondierenden T-Zellen beitragende Faktoren [86, 131, 229, 269, 281]. In den dargestellten Experimenten führte das Verhindern der MHC-I-Bindung [113] durch eine Alanin-Modifikation der Ankerpositionen im $Hexon_{486-494}$-Epitop zur Wiederherstellung $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten. Dies schränkt eine Interferenz zwischen $Hexon_{486-494}$ und $GagL_{85-93}$ auf der Peptid-Ebene stark ein. Aufgrund der Restriktion beider Epitope auf jeweils unterschiedliche MHC-I-Allele ist Konkurrenz um die Bindung an MHC-I-Moleküle zudem nicht möglich. Die Immunisierung MHC-I-homozygoter C57BL/6-Mäuse mit $GagL_{85-93}$- und $Hexon_{486-494}$-kodierenden DNA-Plasmiden belegte außerdem keinen inhibierenden Einfluss des $Hexon_{486-494}$ in Abwesenheit der entsprechenden MHC-I-Moleküle. Der $Hexon_{486-494}$-vermittelte Suppressions-Mechanismus konnte somit auf die Ebene reaktiver $CD8^+$ T-Zellen beschränkt werden.

$CD8^+$ T-Zellen sind bei der Ausbildung und Ausführung ihrer immunologischen Aktivität auf Signale in Form unterschiedlicher Zytokine angewiesen. Über diese Signale werden den Zellen Informationen über die Anwesenheit und Beschaffenheit eingedrungener Pathogene vermittelt und in Relation dazu die weitere Differenzierung der korrespondierenden $CD8^+$ T-Zellen beeinflusst. So wurden vor allem für IL2, IL15 und IL21 essentielle Rollen bei der Differenzierung, Proliferation, dem Überleben, sowie der Aufrechterhaltung der Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen in verschiedenen Stadien der Immunantwort beschrieben [26, 52, 127, 231]. IL23 ist hauptsächlich als proinflammatorisches Zytokin bekannt [114]. Bei der Verifizierung der Hypothese, dass $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen mit $Hexon_{486-494}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen um Zytokine konkurrieren, konnte in DNA-Immunisierungsexperimenten die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten in Anwesenheit des $Hexon_{486-494}$-Epitopes vor allem durch die Co-Applikation von IL2 oder IL23 partiell in einzelnen Tieren wiederhergestellt werden. Die Kombination beider Zytokine führte zudem in einzelnen Tieren zu einer ausreichenden Immunantwort, um Schutz vor einer nachfolgenden FV-Infektion zu vermitteln. Dies legt nahe, dass die Konkurrenz um Zytokine als möglicher Mechanismus an der Immundominanz des $Hexon_{486-494}$ über $GagL_{85-93}$ beteiligt ist. Das insgesamt moderate Immunisierungsergebnis kann darauf zurückgeführt werden, dass bei den Experimenten dieser Versuchsreihe höchst suszeptible CB6F1-Mäuse nur einmalig mit DNA-Plasmiden, die nur ein immunogenes $CD8^+$ T-Zell-Epitop kodierten, geimpft worden waren. Für den Schutz vor einer FV-Infektion werden hingegen komplexe zelluläre und humorale Immunantworten benötigt [3].

Während die Co-Immunisierung mit einem IL2-kodierenden Plasmid bei den DNA-Immunisierungsexperimenten die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen verbesserte, hatte die Co-Immunisierung mit einem IL2-kodierenden Ad5-Vektor keinen Effekt auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen. Nach der Co-Immunisierung mit Ad5.IL23 wurden ebenfalls keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten induziert. Interessanterweise resultierte die Co-Immunisierung mit Ad5.IL23 dennoch in einem verbesserten Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung. Für IL23 wurde bisher keine direkte Wirkung auf $CD8^+$ Effektor-T-Zellen beschrieben. Vielmehr beeinflusst IL23 das lokale Zytokin-Milieu, unter anderem durch die Regulation von $CD4^+$ T_H1-Zellen sowie $CD4^+$ T_H17-Zellen und fördert die Langzeit-Immunogenität von $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen [109, 114, 148]. Harrington *et al.* beschrieben, dass die Behandlung nicht-differenzierter $CD4^+$ T-Zellen mit IL23 $CD4^+$ T_H1-ähnliche, IFNγ-produzierende Zellen hervorbrachte [101]. Diese könnten zu einer verbesserten Kontrolle der Infektion beigetragen haben. Zytokine wirken in komplexen Netzwerken, wodurch die genaue Auswirkung eines Zytokins abhängig von dessen Konzentration ist und zu unterschiedlichen Zeitpunkten variieren kann [129]. Welche Zytokine konkret an der Hexon-vermittelten Immundominanz beteiligt sind, ist weiterhin unklar. Der mangelnde Effekt der Co-Immunisierung mit IL2- oder IL23-kodierenden Ad5-Vektoren wurde dem Vorhandensein weiterer unbekannter Ad5-Epitope zugeschrieben. Diese Annahme wurde weiter durch die Ergebnisse der Immunisierung homozygoter C57BL/6 (u.a. $H\text{-}2D^{b/b}$) mit Ad5.Gag bestätigt. Hier konnten ebenfalls keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen induziert werden, obwohl ein Einfluss des $Hexon_{486-494}$-Epitops ($H\text{-}2D^d$) aufgrund des genetischen Hintergrunds der Mäuse ausgeschlossen werden konnte. Wie erwartet konnte durch Restimulation von $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5-prä-immunen Mäusen mit Ad5 Hexon-, Penton- und Fiber-abgeleiteten Peptiden das Vorhandensein zahlreicher weiterer $H\text{-}2D^b$- und $H\text{-}2K^b$-restringierter Epitope im Ad5-Vektor belegt werden. Dies deutet auf eine hohe Dichte von Epitopen mit variierender Immunogenität in Ad5-Vektoren hin. In unserem Modell war das $Hexon_{486-494}$-Epitop immundominant. Es ist aber nicht auszuschließen, dass im Ad5-Vektor weitere, noch unbekannte Epitope existieren, die Transgen-kodierte Epitope in anderen Modellen anhand unterschiedlicher Mechanismen dominieren könnten [142, 230]. Aufgrund der hohen Epitop-Dichte in Ad5-Vektoren sind Strategien zur Umgehung der Immunogenität einzelner Epitope nicht anwendbar. Die Auswahl und Optimierung eines geeigneten Antigens, z. B. durch die Fusion an ein Immunogenitäts-steigerndes Trägerprotein oder die Modifikation der Aminosäuresequenz zur Verbesserung des proteasomalen Abbaus [93], stellen daher bessere Möglichkeiten zur Entwicklung erfolgreicher Ad5-basierter Impfvektoren dar.

Das Phänomen der Immundominanz ist nicht ausschließlich auf adenovirale Vektoren beschränkt [223, 269]. Während durch die Immunisierung mit F-MuLV Env-kodierenden Vaccinia-Vektoren Schutz vor einer FV-Infektion vermittelt werden konnte, führte die Immunisierung mit Leader-Gag-kodierenden Vaccinia-Vektoren zu vergleichsweise niedrigen Immunantworten und galt als zweite Wahl. Die induzierten Immunantworten konnten später auf ein $CD4^+$ T-Zell-Epitop im F-MuLV p15gag Matrix-Protein zurückgeführt werden [248]. Antworten gegen das $GagL_{85-93}$-Epitop wurden damals noch nicht untersucht. Da durch eine Immunisierung mit Gag-kodierenden Vaccinia-Vektoren keine Schutz-vermittelnden Immunantworten induziert werden konnten [166], ist anzunehmen, dass immundominante Epitope des Vaccinia-Vektors $GagL_{85-93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten supprimierten.

Wie sich einzelne Epitope mit definierter, unterschiedlicher Immunogenität in eine bestehende Hierarchie einfügen, sollte genauer bei Immunisierungsexperimenten mit den zuvor beschriebenen OT-I-Peptidvarianten Y3, Q4 und T4 überprüft werden [289]. Diese besitzen vergleichbare Bindungseigenschaften an H-$2K^b$-MHC-I-Moleküle, unterscheiden sich jedoch vom ursprünglichen OVA-Epitop und voneinander durch ihre konsekutiv abnehmende Immunogenität (OVA>Y3>Q4>T4) bezogen auf ihre Affinität zum OT-I-spezifischen T-Zell-Rezeptor auf $CD8^+$ T-Zellen. Basierend auf dieser Immunogenität führte die OT-I-Restimulation von $CD8^+$ T-Zellen aus Y3-, Q4- oder T4-immunisierten Mäusen zu deutlich geringeren $CD8^+$ T-Zellantworten als bei $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5.OVA-immunisierten Mäusen. In unseren Experimenten wurde nicht die Aktivierung OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen, sondern die Restimulation Y3-, Q4- oder T4-induzierter, zuvor naiver $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Daher wurde zusätzlich die Reaktivität der jeweiligen $CD8^+$ T-Zellen auf Restimulation mit dem jeweils eigenen Peptid untersucht, um etwaige Abweichungen in der Immunogenität der OT-I-Peptidvarianten mit einzubeziehen. Auf die Stimulation mit dem jeweils eigenen Peptid reagierten die $CD8^+$ T-Zellen aller OT-I-Peptidvarianten-Gruppen schwächer als die $CD8^+$ T-Zellen Ad5.OVA-immunsierter Mäuse auf die Restimulation mit OT-I. Somit konnte eine schwächere Immunogenität im Vergleich zur natürlichen OVA-Sequenz belegt werden. Durch Q4 induzierte $CD8^+$ T-Zellen reagierten allerdings stärker auf die Restimulation mit dem eigenen Peptid als die durch Y3 induzierte $CD8^+$ T-Zellen. Daher wird angenommen, dass unter den hier untersuchten Bedingungen die OT-I-Peptidvariante Q4 immunogener war als Y3 (OVA>Q4>Y3>T4). Während in der Arbeit von Zehn und Kollegen [289] zudem OT-I-T-Zell-Rezeptor-spezifische $CD8^+$ T-Zellen durch Stimulation mit verschiedenen OT-I-Peptidvarianten aktiviert werden konnten, reagierten $CD8^+$ T-Zellen aus Ad5.OVA-immunisierten Mäusen nicht auf die Restimulation mit allen OT-I-Peptidvarianten. Es wurde beschrieben, dass

$CD8^+$ T-Zellen eine Aktivierungsschwelle haben, die nach der Primärstimulation hochgesetzt wird, sodass nachfolgende Expansionen nur durch die Restimulation mit stark affinen bzw. immunogenen Liganden ausgelöst werden können [112, 182], was hier der Fall gewesen sein könnte. Die Immunisierung mit Ad5.OVA induzierte starke OVA-spezifische und verringerte Vektor-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten. Nach Immunisierung mit allen drei OT-I-Peptidvarianten konnten hingegen im Vergleich zu Ad5.OVA verringerte Peptid-spezifische $CD8^+$ T-Zellantworten und erhöhte Vektor-gerichtete $CD8^+$ T-Zellantworten nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass bereits die Abschwächung der natürlichen Sequenz zu Q4 ausreichte, um das zuvor dominante OVA-Epitop subdominant gegenüber dem adenoviralen Vektorhintergrund werden zu lassen. Mit der weiteren Abschwächung des Epitops zu Y3 konnte auch eine weitere Zunahme der Ad5-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten gezeigt werden.

Das Ovalbumin-Protein enthält neben dem OT-I-$CD8^+$ T-Zell-Epitop zahlreiche $CD4^+$ T- und B-Zell-Epitope [285]. Während die Induktion OT-I-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nach der Impfung mit den weniger immunogenen OT-I-Peptidvarianten reduziert war, konnten in allen drei Gruppen höhere Titer OVA-bindender Antikörper detektiert werden als in den Ad5.OVA-immunisierten Mäusen. In Ad5-prä-immunen Mäusen wird ebenfalls eine erhöhte Induktion Transgen-bindender Antikörperantworten beobachtet [130]. Daher wird vermutet, dass bereits nach einer Immunisierung mit einem Ad5-Vektor T_H2-$CD4^+$ T-Helferzellantworten induziert werden, die einen fördernden Einfluss auf die Entwicklung Vektor-spezifischer, sowie Transgen-spezifischer B-Zellantworten haben könnten. Das würde die erhöhten OVA-bindenden Antikörpertiter in OT-I-Peptidvarianten-immunisierten Mäusen erklären. Ob es sich bei dem hier beobachteten Effekt um einen Ad5-spezifischen Effekt zur Steigerung von Antikörper-Antworten, oder um ein Versuchs-spezifisches Phänomen handelt, ist bisher unklar.

Ein großes Hindernis bei der Verwendung Ad5-basierter Vektoren stellt die globale Prä-Immunität gegen Ad5 dar. Aufgrund ihrer weiten Verbreitung sind natürliche Infektionen mit unterschiedlichen Adenovirus-Typen, vor allem im Kindesalter, häufig. Die wiederholte Exposition führt zur Ausbildung Ad-spezifischer zellulärer und humoraler Immunantworten, welche die Transduktion Antigen-präsentierender Zellen verhindern, oder durch Eliminierung der Ad5-transduzierter Zellen die Transgen-Expression und nachfolgende Immunantworten unterbinden [74]. In Übereinstimmung dazu wurde in den hier dargestellten Experimenten gezeigt, dass die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL in Ad5-prä-immunen Mäusen vollständig inhibiert wurde. Separat dazu wurde beobachtet, dass nach der Immunisierung mit Ad5.Env in Ad5-prä-immunen Mäusen höhere Titer F-MuLV

Env-bindender Antikörper induziert wurden als in naiven Ad5.Env-immunisierten Mäusen [130]. Dies erscheint zunächst widersprüchlich. Zur Ergründung möglicher Ursachen dieser Diskrepanz wurden Transferexperimente durchgeführt, in denen $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen, oder Ad5-spezifische Antikörper in Form von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen in naive Tiere übertragen wurden. In diesen Experimenten konnte kein Einfluss der transferierten $CD4^+$ T- oder $CD8^+$ T-Zellen auf die Induktion nachfolgender Immunantworten nachgewiesen werden. Nur durch den Transfer von Ad5-prä-immunem Plasma konnte eine vollständige Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten erreicht werden. Um auszuschließen, dass im Plasma enthaltene Faktoren, wie beispielsweise Zytokine oder Koagulationsfaktoren an der Beeinträchtigung der $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten beteiligt waren, wurde in einem weiteren Experiment Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen verwendet, aus dem IgG zuvor durch Behandlung mit Protein G entfernt wurden. Nach dem Transfer von Protein G-behandeltem Plasma konnte kein supprimierender Effekt auf die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen festgestellt werden. Dieselben Mäuse kontrollierten eine nachfolgende FV-Infektion dennoch schlechter als Ad5.TxnGagL-immunisierte Mäuse. Mögliche Erklärungen hierfür könnten im Plasma verbliebene Ig anderer Klassen oder enthaltene Faktoren, wie beispielsweise Faktor X aus der Blutgerinnungskaskade oder der Komplementfaktor C3 sein, die an Adenovirus-Partikel binden und die Induktion von angeborenen Immunantworten, z. B. über die Aktivierung NF-κB-abhängiger Signalwege, gegen den Vektor auslösen [66]. Die dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass in der Ad5-Prä-Immunität vor allem Ad5-spezifische IgG-Antikörper den Ausgang nachfolgender Ad5-Immunisierungen modulierten [251].

Die Komponenten des adenoviralen Kapsids enthalten mehrere B-Zell-Epitope, gegen die Antikörper unterschiedlicher Qualitäten induziert werden [20, 220]. Vor allem gegen den Hauptbestandteil des adenoviralen Kapsids, das Hexon-Protein, werden sehr potente neutralisierende Antikörper induziert, deren Epitope in den hypervariablen Regionen des Proteins liegen [195, 251, 287]. Die beiden Kapsidproteine Fiber und Penton sind essentiell für die Adsorption und Internalisierung des Viruspartikels [282]. Gegen das Fiber-Protein werden vor allem Antikörper gegen trimere Strukturen im Knopf-Teil des Proteins induziert. Fiber-spezifische Antikörper allein gelten als schwach neutralisierend. Die Kombination dieser Antikörper mit Penton-spezifischen Antikörpern resultiert in einem synergistischen neutralisierenden Effekt, bei dem vermutlich für den Zelleintritt des Virus relevanten Strukturen an Penton und Fiber-Knopf blockiert werden und somit die Transduktion von Zellen verhindert wird [85]. Um zu überprüfen, ob die Suppression Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten in unseren Experimenten nur von

neutralisierenden Antikörpern verursacht wurde, oder ob bindende Antikörper einen Einfluss auf die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen hatten, wurden Mäusen daher aufgereinigte, Hexon-bindende oder -neutralisierende Antikörpern transferiert. Während der Transfer neutralisierender Antikörper die Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen vollständig unterband, hatte der Transfer Hexon-bindender Antikörper keinen negativen Effekt auf die Induktion einer Transgen-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort.

Parallel zu diesen Experimenten wurde der zugrundeliegende Mechanismus der Steigerung Transgen-spezifischer Antikörperantworten in Ad5-prä-immunen Mäusen von Kaulfuß *et al.* weiter untersucht. Ein Anstieg Transgen-spezifischer Antikörpertiter konnte weder durch Transfer von Ad5-prä-immunem Plasma, Protein G-behandeltem Plasma, Hexon-neutralisierenden Antikörpern oder $CD4^+$ T-Zellen aus Ad5-prä-immunen Mäusen reproduziert werden. Umgekehrt führte der Transfer derselben Komponenten nicht zur einer Verringerung der Env-spezifischen Antikörpertiter verglichen zu naiven, Ad5.Env-immunisierten Mäusen [130]. Dies deutet daraufhin, dass durch den Vektor induzierte Ad5-spezifische sowie Transgen-spezifische Antikörperantworten unabhängig vom Vorhandensein Ad5-spezifischer Antikörper induziert werden. Ob Hexon-bindende Antikörper einen positiven Einfluss auf die Induktion Transgen-spezifischer Antikörperantworten haben, wurde bisher noch nicht überprüft. Dies könnte interessant sein, da IgG-Moleküle mit Adenoviren Komplexe bilden können. Die Transduktion dendritischer Zellen durch ungebundene Adenoviren ist sehr ineffizient, da dendritische Zellen keinen Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor exprimieren. Im Gegensatz dazu können mit IgG-komplexierte Adenoviren über Fcγ-Rezeptoren besser von dendritischen Zellen gebunden und internalisiert werden. Bei der genaueren Untersuchung dieses Phänomens konnte zudem Ad5-induzierte Gen-Expression in tranduzierten dendritischen Zellen nachgewiesen werden [162]. Die Transduktionseffizienz der resultierenden Ad5-IgG-Komplexe hängt von den vorherrschenden Antikörperkonzentrationen, sowie von den vorhandenen Antikörperspezifitäten ab [42, 206, 287]. Choi *et al.* fanden in einer detaillierte Studie heraus, dass Ad5-IgG-Komplexe, die bei höheren Antikörperkonzentrationen gebildet wurden, in naiven Mäusen zur Induktion starker Transgen- und Virus-spezifischer humoraler und zellulärer Immunantworten führten [42]. Ad-IgG-Komplexe, die bei niedrigen Ad5-spezifischen Antikörperkonzentrationen gebildet wurden, hatten hingegen keinen steigernden Effekt auf die Induktion humoraler oder zellulärer Immunantworten in naiven Mäusen. Waren die Mäuse Ad5-prä-immun, konnten mit Ad5-IgG-Komplexen aus den niedrigen Antikörperkonzentrationen potente Immunantworten induziert werden. Daher könnte auch in unserem Modell durch FcγR-vermittelte Transduktion dendritischer Zellen trotz Ad5-Prä-Immunität Ad5-vermittelte

Gen-Expression stattfinden, durch die sowohl Vektor- als auch Transgen-spezifische Immunantworten induziert würden. Es ist möglich, dass Ad5-spezifische Immunantworten nach der FcγR-vermittelten Transduktion von z. B. dendritischen Zellen zur Veränderung des Zytokin-Milieus führen, oder dass FcγR-abhängig internalisierte Ad5-Vektoren verstärkt im MHC-II-Kontext präsentiert werden und somit bevorzugt $CD4^+$ T-Zell- anstatt von $CD8^+$ T-Zellantworten induzieren. Fcy-Rezeptoren werden nicht nur auf herkömmlichen dendritischen Zellen, sondern auch auf follikulären dendritischen Zellen, sowie auf T-Zellen oder B-Zellen exprimiert [149, 261]. Die Transduktion unkonventioneller Ad5-Zielzellen könnte sich ebenfalls auf die Ausprägung der resultierenden Immunantworten auswirken.

Ad5-Vektoren können, neben $CD8^+$ T-Zellantworten, starke humorale Immunantworten induzieren, indem sie sowohl Transgen- als auch Ad5-spezifische follikuläre T-Helferzellen, sowie B-Zellen stimulieren [277]. Dabei ist die Immunantwort von der Unterstützung durch $CD4^+$ T-Helferzellen abhängig [202–204]. $CD4^+$ T-Helferzellen entstehen aus naiven $CD4^+$ Vorläuferzellen, die abhängig von der vorhandenen Antigenmenge, der assoziierten Antigen-präsentierenden Zelle, sowie dem sie umgebenden Zytokin-Milieu zu unterschiedlichen T-Helferzell-Typen mit variierenden Funktionen ausdifferenzieren [11, 257]. T_H1-Zellen sezernieren unter anderem IL2 und fördern die Proliferation sowie die Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen, während T_H2-Zellen hauptsächlich Entzündungs-regulierende Zytokine sezernieren und humorale Immunantworten unterstützen. Follikuläre T-Helferzellen (Tfh) sind für die Differenzierung von B-Zellen zu Ig-produzierenden Plasmazellen oder die Entwicklung von Gedächtnis-B-Zellen essentiell [122]. In Immunisierungsexperimenten mit einem LCMV-Glykoprotein-exprimierenden Ad5-Vektor wurde gezeigt, dass der Ad5-Vektor einen negativen Einfluss auf die Frequenz bzw. Funktionalität von $CD4^+$ T_H1-Zellen hatte [141]. Dies könnte die Ausbildung von $CD4^+$ T_{H2}-Zellen oder follikulärer T-Helferzellen anstelle von $CD4^+$ T_{H1}-Zellen bevorzugen und humorale Immunantworten anstatt von $CD8^+$ T-Zellantworten fördern. Des Weiteren wurde im ersten Teil dieser Arbeit die Dominanz Ad-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen über Transgen-spezifische $CD8^+$ T-Zellen aufgezeigt. Somit könnte die mehrfache Immunisierung mit Ad5 zur Entstehung einiger weniger Ad5-spezifischer $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen führen, die nach erneuter Exposition mit dem Vektor rapide expandieren und die Expansion Transgen-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen supprimieren [123]. Der geringe negative Effekt auf die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten, der in den dargestellten Experimenten nach dem Transfer Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen beobachtet wurde, könnte damit erklärt werden, dass es sich bei den verantwortlichen $CD8^+$ T-Zellen nicht um zirkulierende, sondern um

gewebsständige $CD8^+$ T-Zellen handelt, die schlechter isoliert und transferiert werden können [182].

Eine mögliche Strategie zur Umgehung der Ad5-Prä-Immunität stellt die Verwendung seltener oder nicht-humaner Adenovirus-Typen als Impfvektoren dar. Seltene Adenoviren besitzen häufig alternative Immunogenitätsprofile hinsichtlich des Phänotyps, der Qualität sowie der Ausprägung der von ihnen induzierten Immunantwort [190, 256]. So führte die Immunisierung mit Vektoren basierend auf den Adenovirus-Typen Ad26, Ad35 und Ad48 zu einer verbesserten Induktion von $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen und polyfunktionalen $CD8^+$ T-Zellen, während die Immunisierung mit Ad5 primär kurzlebige $CD8^+$ T-Zellen des Effektor-Typs hervorrief [1]. Im Gegensatz dazu ist die Transgen-bezogene Immunogenität seltener oder nicht-humaner Adenoviren im Vergleich zu Ad5 reduziert. Nach der Immunisierung mit $1 \cdot 10^9$ vp der Adenovirus-Typen Ad11, Ad35, Ad50, Ad48, Ad49 wurden in naiven Mäusen ähnliche Immunantworten induziert, wie nach der Immunisierung mit Ad5. Nach der Immunisierung mit niedrigeren Dosen von $1 \cdot 10^8$ vp oder $1 \cdot 10^7$ vp konnten, im Gegensatz zur Immunisierung mit Ad5, keine Immunantworten mehr detektiert werden [1].

In den hier durchgeführten Immunisierungsexperimenten besaßen auf Ad48- und Ad50-basierende Vektoren eine verringerte Immunogenität im Vergleich zu Ad5. Die geringe Immunogenität wurde vor allem in Experimenten mit TxnGagL-kodierenden Vektoren deutlich. Das TxnGagL-Transgen kodiert außer dem Thioredoxin-fusionierten $GagL_{85\text{-}93}$-Epitop für keine weiteren immunogenen Komponenten, sodass der induzierte Schutz vor einer FV-Infektion nur auf der Induktion $GagL_{85\text{-}93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen beruht. Weder Ad48.TxnGagL noch Ad50.TxnGagL induzierten $CD8^+$ T-Zellantworten und vermittelten keinen Schutz vor der FV-induzierten Erkrankung. Im Gegensatz zu TxnGagL kodieren sowohl das Leader-Gag_{C1K}-Transgen, als auch das Ovalbumin-Transgen vollständige Proteine, die zusätzliche $CD4^+$ T-Zell- und B-Zell-Epitope enthalten [164]. Durch die Immunisierung mit Leader-Gag_{C1K} bzw. mit Ovalbumin werden breiter gefächerte Immunantworten hervorgerufen. Die Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} induzierte in ähnlichem Maße $GagL_{85\text{-}93}$-spezifische $CD8^+$ T-Zellen wie die Immunisierung mit Ad5.Leader-Gag_{C1K}. Vermutlich wurden in beiden Fällen durch die Immunisierung mit dem gesamten Leader-Gag-Protein zusätzlich $CD4^+$ T-Zellen induziert, die maßgeblich zur Kontrolle der FV-induzierten Erkrankung beitrugen. Dass zum Schutz vor einer FV-Infektion komplexe Immunantworten aus $CD4^+$ T-, $CD8^+$ T-Zellen und Antikörpern benötigt werden, konnte von Dittmer *et al.* sowohl nach der Immunisierung mit dem in *Fv1*$^{b/b}$-Mäusen attenuierten F-MuLV-N, aber vor allem in damit verbundenen Transferexperimenten gezeigt werden [59, 60]. In diesen konnte ein steriler Schutz vor

einer FV-Infektion nur nach dem Transfer von $CD4^+$ T-, $CD8^+$ T-. sowie B-Zellen aus F-MuLV-N-immunisierten Mäusen erreicht werden, nicht aber wenn nur zwei oder eine der Zellpopulationen transferiert wurden [60]. Die Immunisierung mit Ad5.TxnGagL vermittelt vermutlich daher keinen sterilen Schutz vor einer FV-Infektion, führt aber zur Induktion potenter $CD8^+$ T-Zellantworten in naiven Mäusen [93]. Unsere Versuche mit Ad48.- und Ad50.TxnGagL zeigten, dass die Immunogenität des Transgens mitunter vom transportierenden Vektor abhängt, und dass weder Ad48- noch Ad50-Vektoren hinreichend zur Induktion von $CD8^+$ Effektor-T-Zellantworten geeignet sind. Es wird weiter vermutet, dass die Ad48.Leader-Gag_{C1K}-induzierte Immunantwort durch eine gemischte T_H1/T_H2-Helferzellantwort geprägt war und der vermittelte Schutz, wie auch die induzierten $CD8^+$ Effektor-T-Zellen von der Unterstützung durch $CD4^+$ T-Helferzellen abhingen. Nach der Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag_{C1K}, sowie nach der Immunisierung mit den übrigen Ad48-Konstrukten existierten in jeder Gruppe Mäuse mit detektierbaren Immunantworten. Jede Gruppe enthielt aber auch Tiere, in denen keine oder nur niedrige Immunantworten nachgewiesen werden konnten. Eine Begründung könnte darin liegen, dass Ad48 sowie weitere seltene humane Adenoviren wie Ad35 oder Ad26 das angeborene Immunsystem stimulieren und eine hohe Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IFNγ, 10-kDa gamma-Interferon-induziertes Protein (IP-10), Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), oder IL6 induzieren [259]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Interaktion von Ad48 mit dem zum Zelleintritt verwendeten Rezeptor an der erhöhten Induktion proinflammatorischer Immunantworten beteiligt ist. Das resultierende Zytokin-Milieu rekrutiert unter anderem zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen zum Ort der Entzündung, die zu einer schnellen Beseitigung der Impfvektoren führen können [124].

Während nach Immunisierungen mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} Transgen-spezifische Immunität induziert werden konnte, führten weder die Immunisierungen mit TxnGagL-, Leader-Gag_{C1K}-, noch Ovalbumin-kodierenden Ad50-Vektoren zur Ausbildung Transgen-spezifischer Immunantworten. Ad5-Vektoren transduzieren Zellen hauptsächlich über die Interaktion mit dem Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) [292]. Derweil können Adenoviren der Gruppe D (Ad26, Ad48, Ad49) CD46 oder Sialylsäure-Reste auf der Zelloberfläche für die Anheftung und den Eintritt in die Zelle nutzen [53]. Adenoviren der Gruppe B (Ad11, Ad35, Ad50) verwenden vor allem CD46 als Eintrittsrezeptor [268]. CAR und Sialylsäure-Reste sind in der Maus auf vielen Zelltypen und in vielen Geweben zu finden. Hingegen ist die CD46-Expression in Mäusen auf Zellen der Hoden beschränkt [84]. Hieraus könnte eine verminderte Transduktionseffizienz für Ad50-Vektoren in Mäusen resultieren, die deren eingeschränkte adaptive Immunogenität erklären würde.

Überraschenderweise konnte nach Immunisierung mit einem F-MuLV Env-kodierenden Ad50-Vektor nahezu steriler Schutz vor einer FV-Infektion vermittelt werden. Das F-MuLV Env-Protein enthält zahlreiche immunogene Epitope, unter anderem mehrere $CD4^+$ T-Zell-Epitope, sowie Epitope zu Induktion neutralisierender Antikörper, und wird weiterhin erfolgreich in unterschiedlichen Immunisierungsstudien im FV-Modell eingesetzt [21, 22, 68, 108, 130]. Die Immunisierung mit Ad5.Env induziert F-MuLV-spezifische $CD4^+$ T-Zellen sowie F-MuLV-bindende und -neutralisierende Antikörper, die potenten Schutz vor einer nachfolgenden FV-Infektion vermitteln. Im Gegensatz zu den Ad5.Env-immunisierten Mäusen wurden in Ad50.Env-immunisierten Mäusen nur geringe Titer F-MuLV-bindender Antikörper, und nur in einzelnen Tieren Titer neutralisierender Antikörper, nachgewiesen. Daher wird vermutet, dass der Schutz vor der FV-Infektion vor allem durch die Induktion von $CD4^+$ T-Zellantworten vermittelt wurde. In den ersten hier gezeigten Experimenten resultierte die Immunisierung mit Ad50.Env nicht im Schutz vor einer nachfolgenden FV-Infektion. Dies wird auf die geringe Infektiosität des anfangs verwendeten Ad50.Env zurückgeführt, der in den späteren Experimenten durch einen neu aufgereinigten, infektiöseren Vektor ausgetauscht wurde.

Mittlerweile werden zahlreiche auf seltenen oder nicht-humanen Adenoviren-basierende Vektoren auf ihre Sicherheit und Effektivität in klinischen Studien untersucht [17, 51, 72]. Es wird vermutet, dass Ad-neutralisierende Antikörper Typ-spezifisch sind, da sie gegen sehr heterogene Sequenzen, wie beispielsweise die hypervariablen Regionen des Hexon oder die Knopf-Region des Fiber-Proteins, gebildet werden [195, 210, 264]. Es wurde jedoch gezeigt, dass eine wiederholte Immunisierung mit phylogenetisch weiter entfernten Ad-Vektoren aus unterschiedlichen Spezies zur Induktion hoher Titer kreuzreaktiver, aber nicht kreuzneutralisierender Antikörper führte [170]. Neben der direkten Neutralisation können auch bindende Antikörper, z. B. FcγR-abhängig durch Phagozytose oder Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität, oder FcγR-unabhängig die Ablation viraler Vektoren vermitteln. Der ChAd68-basierte Vektor AdCDQ ist durch die Mutation einer *major neutralization site* in dessen Hexon-Proteinen gegen die *in vitro* Neutralisation durch den Antikörper 4C1 resistent [195]. *In vivo* konnte aber eine Beeinträchtigung der Transduktionskapazität des Vektors nachgewiesen werden, wenn die Mäuse vor der Impfung passiv mit 4C1 immunisiert wurden [196]. Der genauere Wirkmechanismus ist nicht geklärt, war in der entsprechenden Studie aber FcγR-unabhängig. Bereits wenige Applikationen eines Vektors sind zur Etablierung Vektor-spezifischer Immunantworten ausreichend, um die effiziente Readministration eines homologen Vektors deutlich zu beschränken [216]. Daher waren wir daran interessiert, inwieweit die Immunisierung mit Ad48- und Ad50-Vektoren zur Induktion Vektor-spezifischer Antikörper führen würde.

Nach der Immunisierung mit Ad5 wurden neben Ad5-spezifischen Antikörpern auch Ad50-bindende Antikörper detektiert. Die Immunisierungen mit Ad48 oder Ad50 induzierte aber nicht nur Typ-spezifische bindende und neutralisierende Antikörper, sondern auch kreuzreaktive Antikörper. Abbink und Kollegen verglichen verschiedene Ad-Typ-Paarungen auf ihre Tauglichkeit in einer Prime-Boost-Immunisierung [1]. Hierbei wurde eine reduzierte Effektivität festgestellt, wenn Gruppen-gleiche Ad-Typen kombiniert wurden. Zudem wurde gezeigt, dass Ad11 und Ad35 aus der Gruppe B kreuzreaktive neutralisierende Antikörper gegeneinander induzierten [143, 263]. In der vorliegenden Arbeit wurden Ad-Typen aus unterschiedlichen Gruppen verwendet. Trotz der phylogenetischen Unterschiede konnten dennoch sowohl kreuzbindende Antikörper zwischen Ad5 (Gruppe C) und Ad50 (Gruppe B) als auch kreuzneutralisierende Antikörper zwischen Ad48 (Gruppe D) und Ad50 (Gruppe B) in den immunisierten Mäusen nachgewiesen werden. Die stärksten Ad-neutralisierenden Antikörper werden gegen Sequenzen der hypervariablen Regionen der Hexon-Proteine gebildet. In diversen Tierversuchen wurde mit Fiber- und Hexon-chimärischen Ad-Vektoren Neutralisation nur dann beobachtet, wenn die Typ-Spezifität von Antikörpern und Hexon homolog war. Stammten Fiber-Protein und Antikörper vom selben Ad-Typ, konnte hingegen keine Neutralisation festgestellt werden [30, 87, 210]. Bisher wurden keine B-Zell-Epitope für Ad48 und Ad50 annotiert. Yuan und Kollegen schlugen *in silico* einige potentielle B-Zell-Epitop-Kandidaten in Hexon-Proteinen unterschiedlicher Adenovirus-Typen vor, unter anderem für Ad5 und Ad50, aber diese Epitope wurden nach aktuellem Kenntnisstand nicht verifiziert [286]. Zudem ist nicht bekannt, gegen welche Komponenten des adenoviralen Partikels die in unseren Versuchen generierten Antikörper gerichtet waren. Daher ist eine Analyse von Analogien der B-Zell-Epitope von Ad48 und Ad50 bislang nicht möglich.

Die potenzielle Kreuzreaktivität von Antikörpern wird hauptsächlich im Kontext der Prä-Immunität gegen verbreitete Ad-Typen wie Ad2, Ad4 oder Ad5 untersucht. So wurde gezeigt, dass die Immunisierung oder Infektion zuvor Ad4-naiver Individuen mit Ad4 zur Induktion kreuzreaktiver Antikörper gegen eine Reihe verschiedener adenoviraler Vektoren, unter anderem ChAd3, führte [189]. In der vorliegenden Arbeit hatte die Ad5-Prä-Immunität keinen nachweislichen negativen Effekt auf die Immunisierung mit Ad48.Env. Im Gegensatz dazu war die Immunisierung mit Ad50.Env in Ad5-prä-immunen Mäusen beeinträchtigt. Anhand der erhobenen Daten kann keine Aussage über die Induktion F-MuLV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen getroffen werden. Kaulfuß *et al.* konnten aber in ähnlichen Versuchen zeigen, dass Transgen-spezifische $CD4^+$ T-Zellantworten in Ad5-pär-immunen Mäusen im Gegensatz zu vorher naiven Tieren nicht vermindert waren

[130]. Für die Inhibition Ad50.Env-induzierter Immunantworten waren keine neutralisierenden, sondern kreuzreaktive, bindende Antikörper verantwortlich. Möglicherweise wurde die Beeinträchtigung der Immunisierungseffizienz durch einen synergistischen Effekt der Ad50-bindenden Antikörper mit dem Mangel an CD46-Expression bewirkt. Trotz der Verminderung der Immunogenität von Ad50.Env konnte in allen Ad5-prä-immunen Gruppen ein steigernder Effekt auf die Induktion Transgen-bindender Antikörper beobachtet werden. Dieser Effekt ist somit nicht auf die Folge-Immunisierung mit Ad5-Vektoren beschränkt, sondern besteht auch nach Immunisierung mit anderen adenoviralen Vektoren. Es wurde bereits diskutiert, dass durch FcyR-vermittelte Transduktion Antigen-präsentierender Zellen mit IgG-komplexierten Ad-Vektoren, trotz neutralisierender Antikörper, weiterhin Gen-Expression stattfinden kann. Es wurde ebenfalls vorgeschlagen, dass entweder Vektor-induzierte Immunantworten B-Zell-fördernder Tfh- oder T_H2-Helferzellen induzieren. Bei in dieser Arbeit durchgeführten Immunisierungsexperimenten mit Env-kodierenden Vektoren wurde gezeigt, dass die Induktion F-MuLV-Env-bindender Antikörper sowohl in Ad5-prä-immunen Ad5.Env- und Ad50.Env-immunisierten Mäusen jeweils höher war als in den naiven Vergleichsgruppen. Gleichzeitig war die Induktion Env-spezifischer neutralisierender Antikörper in Ad5.Env- oder Ad50.Env-immunisierten, Ad5-prä immunen Mäusen aber niedriger als in den naiven Vergleichsgruppen. Dasselbe galt für die jeweils induzierten Ad-spezifischen bindenden und neutralisierenden Antikörper. Die selektive Induktion bestimmter Antikörperspezies könnte durch die unterschiedliche Immunogenität der B-Zell-Epitope und der daraus resultierenden Dominanz einer B-Zell-Population über andere erklärt werden. Bei einigen Viren sind Epitope, gegen die potente neutralisierende Antikörper induziert werden subdominant, während durch dominante Epitope induzierte Antikörper für diese Viren entweder nicht schädlich sind, zur Evasion des Immunsystems dienen oder sogar zur Verstärkung der Infektion genutzt werden können [9, 78, 238]. Hiermit könnte der ambivalente Mechanismus der durch Ad5-Prä-Immunität verbesserten Induktion bindender Antikörper bei gleichzeitiger Suppression neutralisierender Antikörperantworten erklärt werden.

In zahlreichen Tierversuchen, sowie in den hier dargestellten Experimenten, wurde kein Einfluss der zellulären Immunität gegen Ad5 auf die Immunisierung mit einem Ad5-Vektor bestätigt. Es bleibt zu beachten, dass sich die im Labor induzierte Prä-Immunität in ihren Eigenschaften von der natürlich vorkommenden unterscheidet. Die Prä-Immunität von Versuchstieren wird meist durch ein bis zwei Immunisierungen mit hohen Dosen eines leeren Ad-Vektors in relativ kurzen Abständen hervorgerufen. Natürliche Prä-Immunität im Menschen entsteht hingegen im Laufe eines Lebens als Antwort auf wiederholte

Infektionen mit vermutlich unterschiedlichen Adenovirus-Typen. Hieraus könnten Unterschiede in der Zusammensetzung der Antikörperantwort resultieren, die den Ausgang von Immunisierungsstudien im Menschen beeinflussen könnten. So induzieren kurz aufeinanderfolgende Expositionen mit hohen Dosen Adenovirus vor allem potente Hexon-neutralisierende Antikörper, während im Menschen vorrangig neutralisierende Antikörper gegen Penton und Fiber nachgewiesen wurden [207, 287]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die in Mäusen induzierten Antikörpertiter höher sind als im Großteil der humanen Bevölkerung [8]. Auf diesen Umständen könnte der dominante Effekt Ad5-spezifischer Antikörper gegenüber zellulären Immunantworten beruhen, der in den dargestellten Transfer-Experimenten beobachtet wurde. Daher ist es wichtig, die artifiziell induzierten humoralen Antworten genauestens zu charakterisieren, um eine verlässliche Übertragung der gewonnenen Daten auf den Menschen zu gewährleisten. Die wiederholte, natürliche Exposition mit replikationskompetenten Adenoviren über einen längeren Zeitraum könnte zudem die Entwicklung verschiedener Ad-spezifischer Gedächtnis-T-Zellpopulationen begünstigen, wie z. B. polyfunktionale Effektor-Gedächtnis-T-Zellen [115, 142]. Anders als in Tierexperimenten konnte ein Einfluss Ad-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen auf die Immunisierung mit Ad5-basierten Vektoren im Menschen gezeigt werden. So waren erhöhte Anzahlen Ad5-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen mit reduzierten Anzahlen HIV-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen und einer damit verbundenen reduzierten Breite HIV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantwort assoziiert. Die Frequenz Ad5-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen war aber nicht von der Höhe der Ad5-spezifischen Antikörpertiter abhängig [82]. Ein direkter Einfluss Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen wurde noch nicht belegt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Immunisierung mit Ad5-Vektoren unabhängig vom Ad5-Serostatus der Individuen zur Restimulation und Expansion vorhandener, Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen führt [115]. Es wird zudem spekuliert, dass diese Restimulation nicht von einer effizienten Transduktion und *de novo* Proteinsynthese abhängig ist, sondern durch vorhandene Kapsidkomponenten über *Cross-Priming* ausgelöst werden kann [201]. Ad-reaktive T-Zellen konnten in weiten Teilen der Bevölkerung nachgewiesen werden und waren zum Teil weiter verbreitet als Ad-spezifische Antikörper [110]. T-Zell-Epitope wurden in Fiber, Penton und in der C-terminalen Region des Hexon Proteins beschrieben [142, 186, 255, 275]. T-Zell-Epitope sind im Gegensatz zu B-Zell-Epitopen unter den verschiedenen Adenovirus-Typen hochkonserviert, sodass ein hohes Maß an Kreuzreaktivität Ad5-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen existiert. So wurden kreuzreaktive T-Zellen zwischen Ad5, ChAd7 und ChAd6 [115], Ad4, Ad5 und ChAd68, sowie AdS32 [35] beschrieben. Es ist daher möglich, dass auch die für Ad50.Env beobachtete reduzierte Immunisierungseffizienz in Ad5-präimmunen Mäusen durch kreuzreaktive $CD4^+$ T- oder $CD8^+$ T-Zellen mitverursacht wurde.

Ad-Vektoren, basierend auf seltenen humanen oder nicht-humanen Adenoviren, stellen eine Bereicherung für das Repertoire viraler Impfvektoren dar. Abhängig vom Adenovirus-Typ können sie zur Transduktion unterschiedlicher Zielzellen und -gewebe genutzt werden und induzieren verschiedene Immunitätsprofile. Eine gründliche Charakterisierung ihrer immunologischen Eigenschaften ist zwingend erforderlich, um anwendungsbezogen den optimalen Vektor auszuwählen und um zu gewährleisten, dass die Effektivität des Vektors nicht durch existierende direkte oder kreuzreaktive Immunantworten gegen diesen beeinträchtigt wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich Vektoren des Typs Ad48 eignen, um komplexe Immunantworten zu induzieren. Diese besteht aus $CD8^+$ T- und B-Zell- und vermutlich $CD4^+$ T_H1-Zellantworten. Ad48-basierte Vektoren sollten allerdings nicht als erste Immunisierung mit Vektoren des Ad50-Typs in Prime-Boost-Strategien kombiniert werden. Ad50-Vektoren konnten sehr erfolgreich zur Induktion protektiver $CD4^+$ T-Zellantworten, vermutlich des T_H2-Typs, eingesetzt werden. Aufgrund der hohen Kreuzreaktivität Typ-fremder Antikörper, die in diesen Experimenten sowohl durch Immunisierung mit Ad5, als auch mit Ad48 induziert wurden, sind Vektoren basierend auf Ad50 allerdings nur mit Vorsicht zur Anwendung in Ad-prä-immunen Individuen geeignet.

6. Zusammenfassung

Ad5-basierte Impfvektoren werden aufgrund ihrer hohen Immunogenität geschätzt, obwohl diese gleichzeitig ihren klinischen Nutzen limitieren kann. Bei Studien im Friend Virus-Modell wurde beobachtet, dass nach Immunisierung mit Ad5.Leader-Gag, der für das FV Leader-Gag-Protein mit dem darin enthaltenen, immundominanten $CD8^+$ T-Zell-Epitop $GagL_{85-93}$ kodiert, keine $CD8^+$ T-Zellantworten induziert werden. Die Immunisierung mit einem Leader-Gag-kodierenden DNA-Plasmid resultierte hingegen in der Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten, während in einem weiteren Experiment keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen detektiert werden konnten, wenn das Plasmid neben $GagL_{85-93}$ die beiden adenoviralen $CD8^+$ T-Zell-Epitope $DBP_{418-426}$ und $Hexon_{486-494}$ kodierte. Diese Ergebnisse unterstrichen einen suppressiven Effekt adenoviraler Epitope auf die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten, der in dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Während das H2-D^b-restringierte $DBP_{418-426}$ keinen negativen Einfluss auf die Induktion $GagL_{85-93}$(H2-D^b)-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen hatte, wurde $GagL_{85-93}$ vor allem durch das H-2D^d-restringierte $Hexon_{486-494}$-Epitop dominiert. Da in H2-$D^{b/b}$-Mäusen keine Immundominanz des $Hexon_{486-494}$-Epitops über $GagL_{85-93}$ festgestellt wurde, ließ sich auf die Konkurrenz aktivierter $CD8^+$ T-Zellen schließen. Durch Co-Immunisierung mit IL2- oder IL23-kodierenden DNA-Plasmiden konnte die $Hexon_{486-494}$-bedingte Suppression $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen partiell aufgehoben werden. Im Gegensatz dazu resultierte weder die Co-Immunisierung mit IL2- oder IL23-kodierenden Ad5-Vektoren, noch die Immunisierung von H2-$D^{b/b}$-Mäusen mit Ad5.Leader-Gag in der Induktion $GagL_{85-93}$-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen. Dies wurde dem Vorkommen weiterer dominanter Epitope im Ad5-Vektor beigemessen und konnte mittels ELISpot-Assay bestätigt werden. Mithilfe der OVA-abgeleiteten Epitope Y3, Q4 und T4 wurde zudem gezeigt, dass eine Immunisierung mit schwächeren Transgen-kodierten Epitopen in stärkeren Ad5-spezifischen $CD8^+$ T-Zellantworten resultierte.

Neben Vektor-induzierten Immunantworten wird die Effektivität Ad5-basierter Vektoren durch die weit verbreitete Ad5-Prä-Immunität beeinträchtigt. In Ad5-prä-immunen Mäusen konnten demgemäß nach Immunisierung mit Ad5.TxnGagL keine $GagL_{85-93}$-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen induziert werden. Eine Publikation über den Anstieg Transgen-bindender Antikörpertiter in Ad5-prä-immunen Mäusen widersprach jedoch einer vollständigen Eliminierung des Ad5-Vektors durch neutralisierende Antikörper und deutete auf fortlaufende Transgen-Expression hin. In eigenen Experimenten wurde kein negativer Einfluss Ad5-spezifischer $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen auf die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten nachgewiesen, während $GagL_{85-93}$-spezifische

$CD8^+$ T-Zellantworten nach dem Transfer von Plasma aus Ad5-prä-immunen Mäusen inhibiert wurden. Weitere Versuche zeigten, dass Ad5-bindende Antikörper die Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen nicht beeinträchtigten und eine Rolle bei der erhöhten Antikörperinduktion spielen könnten.
Aufgrund ihrer phylogenetischen Unterschiede zu Ad5 wird angenommen, dass seltene Adenovirus-Typen von Ad5-neutralisierenden Antikörpern nicht beeinträchtigt werden. In dieser Arbeit wurden daher Vektoren basierend auf den seltenen Adenovirus-Typen Ad48 und Ad50 als Alternativen zu Ad5 evaluiert. Ad48- und Ad50-basierte Vektoren waren nur hinreichend zur Induktion Transgen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellantworten geeignet. Durch Immunisierung mit Ad48.Leader-Gag_{C1K} oder Ad50.Env konnte dennoch ein vergleichbarer Schutz vor einer FV-Infektion erzielt werden, wie nach der Immunisierung mit dem entsprechenden Ad5-Konstrukt. Dieser Schutz basierte vermutlich auf der Induktion von $CD4^+$ T-Zell- und Antikörperantworten. Die Immunisierung mit Ad48 und Ad50-Vektoren induzierte allerdings Vektor-neutralisierende Antikörperantworten, die gegen beide Typen kreuzreaktiv waren. Prä-Immunität gegen Ad5 beeinflusste die Immunisierung mit Ad48-Vektoren nicht negativ. Im Gegensatz dazu war die Effektivität Ad50-basierter Vektoren in Ad5-prä-immunen Mäusen, vermutlich aufgrund kreuzreaktiver Antiköper, ähnlich eingeschränkt, wie die von Ad5-basierten Vektoren.

Anti-Vektor-Immunität kann sowohl in Form von Vektor-induzierter Immunität als auch von Prä-Immunität gegen Ad5 maßgeblich den Ausgang Adenovirus-basierter Impfungen beeinflussen. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Notwendigkeit einer gründlichen Charakterisierung des Immunogens, sowie des Impfvektors bei der Entwicklung Adenovirus-basierter Vakzinierungsstrategien für die Anwendung im Menschen.

7. Summary

Immunization vectors based on an adenovirus type 5 (Ad5) backbone are valued for their high immunogenic potential, a characteristic which simultaneously limits their clinical use. Immunization studies in the murine Friend retrovirus (FV) model have shown that FV Leader-Gag protein delivered by Ad5 did not lead to induction of $CD8^+$ T cell responses against the known immunodominant epitope, Leader-Gag-derived $GagL_{85-93}$. In contrast, immunization with a DNA plasmid expressing Leader-Gag protein led to the induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cell responses. A second immunization study demonstrated that this induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cells was abrogated if the DNA plasmid encoding $GagL_{85-93}$ also expressed the adenovirus epitopes $Hexon_{486-494}$ and $DBP_{418-426}$. These results suggested that adenoviral $CD8^+$ T cell epitopes may have an inhibitory effect on the induction of transgene-specific $CD8^+$ T cells, and it is this hypothesis which is explored in this thesis.

We were able to demonstrate that while the presence of H-$2D^b$-restricted $DBP_{418-426}$ did not have an effect on the induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cells, the $GagL_{85-93}$(H-$2D^b$) response was dominated by that of the H-$2D^d$-restricted $Hexon_{486-494}$ epitope. However, no $Hexon_{486-494}$-dependent suppression of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cells was observed in H2-$D^{b/b}$ mice, suggesting that competition is occurring on the level of the responding $CD8^+$ T cells. Co-immunization with either IL2- or IL23-encoding DNA plasmids was able to partially restore induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cells in the presence of $Hexon_{486-494}$. In contrast, neither co-immunization with IL2- or IL23-encoding Ad5 vectors, nor immunization of H2-$D^{b/b}$ mice with Ad5.Leader-Gag led to induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cell responses. This difference was attributed to the presence of other dominant Ad5-derived epitopes in the vector, which were verified by ELISpot assay. When less immunogenic OVA-derived epitopes Y3, Q4 and T4 were employed, enhanced induction of vector-specific $CD8^+$ T cell responses following immunization was also observed.

In addition to interference by vector-induced immune responses, the efficacy of Ad5 vectors is greatly impaired by widespread pre-existing immunity against Ad5. This phenomenon can be observed by the complete lack of a $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cell response to immunization with Ad5.TxnGagL in Ad5-pre-immune mice. However, increased binding antibody titers have also been reported in experiments using Ad5-pre-immune mice, contradicting the suggestion of vector neutralization and indicating possible ongoing transgene expression. Work presented here demonstrates that adoptive transfer of $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells from Ad5-pre-immune mice showed no inhibitory effect on the

induction of $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cells, whereas $GagL_{85-93}$-specific $CD8^+$ T cell responses were abrogated after transfer of Ad5-pre-immune plasma. Adoptive transfer of Ad5-binding antibodies did not have a detectable effect on the induction of $CD8^+$ T cells, therefore suggesting a role for Ad5-binding antibodies in enhancement of transgene-specific antibody titers in Ad5 pre-immune mice.

Based on phylogenetic differences between rare adenovirus types and Ad5 it is commonly assumed that vectors based on rare types are not subject to Ad5-specific immune responses. We therefore characterized and evaluated vectors based on adenovirus 48 and 50 and compared them to Ad5. Vectors based on both types were less immunogenic than Ad5 in most experiments and failed to induce transgene-specific $CD8^+$ T cell responses. Only immunization with Ad48.Leader-Gag_{C1K} or Ad50.Env resulted in protective immune responses comparable to those induced by Ad5, which were dependent on the induction of $CD4^+$T helper cells and humoral immune responses. Both, Ad48 and Ad50, induced vector-specific neutralizing antibodies which were cross-reactive against each other. Interestingly, vectors based on Ad48 were not influenced by pre-existing immunity against Ad5, whereas efficacy of Ad50-based vectors was impaired in Ad5-pre-immune mice to a similar extent as with Ad5 itself.

The work presented here further elucidates the influence of vector-induced immunity on vaccine responses, as well as the effect of pre-existing immunity against Ad5 on adenovirus-based immunization. These results highlight the importance of thorough immunogen and vector characterization during the development of vaccine regimens targeted for use in humans.

Literaturverzeichnis

1. Abbink P, Lemckert AAC, Ewald BA, Lynch DM, Denholtz M, Smits S, et al. Comparative seroprevalence and immunogenicity of six rare serotype recombinant adenovirus vaccine vectors from subgroups B and D. J Virol. 2007;81:4654–63.
2. Agosto LM, Henderson AJ. CD4+ T cell subsets and pathways to HIV latency. AIDS Res Hum Retroviruses 2018.
3. Ahlers JD, Belyakov IM, Matsui S, Berzofsky JA. Mechanisms of cytokine synergy essential for vaccine protection against viral challenge. Int Immunol. 2001;13:897–908.
4. Aidshilfe.de. Aktuelle Liste der antiretroviralen Medikamente 2018. https://www.aidshilfe.de/sites/default/files/documents/aktuelle_liste_der_antiretroviralen_medikamente_2018_02.pdf.
5. Akram A, Inman RD. Immunodominance: a pivotal principle in host response to viral infections. Clin Immunol. 2012;143:99–115.
6. Aldhamen YA, Seregin SS, Amalfitano A. Immune recognition of gene transfer vectors: focus on adenovirus as a paradigm. Front Immunol. 2011;2:40.
7. Andersson S, Norrgren H, da Silva Z, Biague A, Bamba S, Kwok S, et al. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. Arch Intern Med. 2000;160:3286–93.
8. Andrade Pereira B de, Maduro Bouillet LE, Dorigo NA, Fraefel C, Bruna-Romero O. Adenovirus Specific Pre-Immunity Induced by Natural Route of Infection Does Not Impair Transduction by Adenoviral Vaccine Vectors in Mice. PLoS ONE. 2015;10:e0145260.
9. Angeletti D, Yewdell JW. Is It Possible to Develop a "Universal" Influenza Virus Vaccine? Outflanking Antibody Immunodominance on the Road to Universal Influenza Vaccination. Cold Spring Harb Perspect Biol 2018.
10. Antrobus RD, Coughlan L, Berthoud TK, Dicks MD, Hill AV, Lambe T, Gilbert SC. Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens. Mol Ther. 2014;22:668–74.
11. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. Science. 2000;287:860–4.
12. Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N. Sexual transmission of HIV according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. AIDS. 2009;23:1397–404.
13. Baba TW, Jeong YS, Pennick D, Bronson R, Greene MF, Ruprecht RM. Pathogenicity of live, attenuated SIV after mucosal infection of neonatal macaques. Science. 1995;267:1820–5.
14. Baba TW, Liska V, Khimani AH, Ray NB, Dailey PJ, Penninck D, et al. Live attenuated, multiply deleted simian immunodeficiency virus causes AIDS in infant and adult macaques. Nat Med. 1999;5:194–203.
15. Bachmann MF, Rohrer UH, Kündig TM, Bürki K, Hengartner H, Zinkernagel RM. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. Science. 1993;262:1448–51.
16. Bangari DS, Mittal SK. Development of nonhuman adenoviruses as vaccine vectors. Vaccine. 2006;24:849–62.

17. Barnes E, Folgori A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A, et al. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. Sci Transl Med. 2012;4:115ra1.
18. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science. 1983;220:868–71.
19. Bauerschmitz GJ, Barker SD, Hemminki A. Adenoviral gene therapy for cancer: from vectors to targeted and replication competent agents (review). Int J Oncol. 2002;21:1161–74.
20. Bauer U, Flunker G, Bruss K, Kallwellis K, Liebermann H, Luettich T, et al. Detection of antibodies against adenovirus protein IX, fiber, and hexon in human sera by immunoblot assay. J Clin Microbiol. 2005;43:4426–33.
21. Bayer W, Schimmer S, Hoffmann D, Dittmer U, Wildner O. Evaluation of the Friend Virus model for the development of improved adenovirus-vectored anti-retroviral vaccination strategies. Vaccine. 2007;26:716–26.
22. Bayer W, Tenbusch M, Lietz R, Johrden L, Schimmer S, Uberla K, et al. Vaccination with an adenoviral vector that encodes and displays a retroviral antigen induces improved neutralizing antibody and CD4+ T-cell responses and confers enhanced protection. J Virol. 2010;84:1967–76.
23. Bayer W, Lietz R, Ontikatze T, Johrden L, Tenbusch M, Nabi G, et al. Improved vaccine protection against retrovirus infection after co-administration of adenoviral vectors encoding viral antigens and type I interferon subtypes. Retrovirology. 2011;8:75.
24. Bergelson JM, Krithivas A, Celi L, Droguett G, Horwitz MS, Wickham T, et al. The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses. J Virol. 1998;72:415–9.
25. Bieniasz PD, Cullen BR. Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. J Virol. 2000;74:9868–77.
26. Bolesta E, Kowalczyk A, Wierzbicki A, Eppolito C, Kaneko Y, Takiguchi M, et al. Increased level and longevity of protective immune responses induced by DNA vaccine expressing the HIV-1 Env glycoprotein when combined with IL-21 and IL-15 gene delivery. J Immunol. 2006;177:177–91.
27. Bongard N, Lapuente D, Windmann S, Dittmer U, Tenbusch M, Bayer W. Interference of retroviral envelope with vaccine-induced CD8+ T cell responses is relieved by co-administration of cytokine-encoding vectors. Retrovirology. 2017;14:28.
28. Bonsignori M, Pollara J, Moody MA, Alpert MD, Chen X, Hwang K-K, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediating antibodies from an HIV-1 vaccine efficacy trial target multiple epitopes and preferentially use the VH1 gene family. J Virol. 2012;86:11521–32.
29. Bour S, Schubert U, Peden K, Strebel K. The envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 enhances viral particle release: a Vpu-like factor? J Virol. 1996;70:820–9.
30. Bradley RR, Lynch DM, Iampietro MJ, Borducchi EN, Barouch DH. Adenovirus serotype 5 neutralizing antibodies target both hexon and fiber following vaccination and natural infection. J Virol. 2012;86:625–9.
31. Brun-Vézinet F, Rouzioux C, Montagnier L, Chamaret S, Gruest J, Barré-Sinoussi F, et al. Prevalence of antibodies to lymphadenopathy-associated retrovirus in African patients with AIDS. Science. 1984;226:453–6.
32. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, et al. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-

blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. Lancet. 2008;372:1881–93.
33. Burton DR, Hangartner L. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. Annu Rev Immunol. 2016;34:635–59.
34. Buzon MJ, Sun H, Li C, Shaw A, Seiss K, Ouyang Z, et al. HIV-1 persistence in CD4+ T cells with stem cell-like properties. Nat Med. 2014;20:139–42.
35. Calcedo R, Vandenberghe LH, Roy S, Somanathan S, Wang L, Wilson JM. Host immune responses to chronic adenovirus infections in human and nonhuman primates. J Virol. 2009;83:2623–31.
36. Capasso C, Garofalo M, Hirvinen M, Cerullo V. The evolution of adenoviral vectors through genetic and chemical surface modifications. Viruses. 2014;6:832–55.
37. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC. Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. Nature. 2005;433:834–41.
38. Chen W, Qin H, Chesebro B, Cheever MA. Identification of a gag-encoded cytotoxic T-lymphocyte epitope from FBL-3 leukemia shared by Friend, Moloney, and Rauscher murine leukemia virus-induced tumors. J Virol. 1996;70:7773–82.
39. Chesebro B, Wehrly K, Doig D, Nishio J. Antibody-induced modulation of Friend virus cell surface antigens decreases virus production by persistent erythroleukemia cells: influence of the Rfv-3 gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:5784–8.
40. Chesebro B, Bloom M, Wehrly K, Nishio J. Persistence of infectious Friend virus in spleens of mice after spontaneous recovery from virus-induced erythroleukemia. J Virol. 1979;32:832–7.
41. Chesebro B, Miyazawa M, Britt WJ. Host genetic control of spontaneous and induced immunity to Friend murine retrovirus infection. Annu Rev Immunol. 1990;8:477–99.
42. Choi JH, Dekker J, Schafer SC, John J, Whitfill CE, Petty CS, et al. Optimized adenovirus-antibody complexes stimulate strong cellular and humoral immune responses against an encoded antigen in naive mice and those with preexisting immunity. Clin Vaccine Immunol. 2012;19:84–95.
43. Chuang I, Sedegah M, Cicatelli S, Spring M, Polhemus M, Tamminga C, et al. DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding P. falciparum CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. PLoS ONE. 2013;8:e55571.
44. Chun T-W, Moir S, Fauci AS. HIV reservoirs as obstacles and opportunities for an HIV cure. Nat Immunol. 2015;16:584–9.
45. Cmarik J, Ruscetti S. Friend Spleen Focus-Forming Virus Activates the Tyrosine Kinase sf-Stk and the Transcription Factor PU.1 to Cause a Multi-Stage Erythroleukemia in Mice. Viruses. 2010;2:2235–57.
46. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. N Engl J Med. 2011;365:493–505.
47. Cohen MS, Chen YQ, McCauley M, Gamble T, Hosseinipour MC, Kumarasamy N, et al. Antiretroviral Therapy for the Prevention of HIV-1 Transmission. N Engl J Med. 2016;375:830–9.
48. Colloca S, Barnes E, Folgori A, Ammendola V, Capone S, Cirillo A, et al. Vaccine vectors derived from a large collection of simian adenoviruses induce potent cellular immunity across multiple species. Sci Transl Med. 2012;4:115ra2.
49. Coughlan L, Alba R, Parker AL, Bradshaw AC, McNeish IA, Nicklin SA, Baker AH. Tropism-modification strategies for targeted gene delivery using adenoviral vectors. Viruses. 2010;2:2290–355.
50. Coughlan L, Mullarkey C, Gilbert S. Adenoviral vectors as novel vaccines for influenza. J Pharm Pharmacol. 2015;67:382–99.

51. Coughlan L, Sridhar S, Payne R, Edmans M, Milicic A, Venkatraman N, et al. Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults. EBioMedicine. 2018;29:146–54.
52. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. Virology. 2013;435:157–69.
53. Crespo HJ, Lau JTY, Videira PA. Dendritic cells: a spot on sialic Acid. Front Immunol. 2013;4:491.
54. Crise B, Li Y, Yuan C, Morcock DR, Whitby D, Munroe DJ, et al. Simian immunodeficiency virus integration preference is similar to that of human immunodeficiency virus type 1. J Virol. 2005;79:12199–204.
55. Danthinne X, Werth E. New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors. Gene Ther. 2000;7:80–7.
56. D'arc M, Ayouba A, Esteban A, Learn GH, Boué V, Liegeois F, et al. Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:E1343-52.
57. Desselberger U. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, edited by M.H.V. van Regenmortel, C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Carstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner, Virology Division, International Union of Microbiological Societies, Academic Press, San Diego, 1162 pp. ISBN: 0-12-370200-3; US$159.95. Virus Research. 2002;83:221–2.
58. Dittmer U, Brooks DM, Hasenkrug KJ. Characterization of a live-attenuated retroviral vaccine demonstrates protection via immune mechanisms. J Virol. 1998;72:6554–8.
59. Dittmer U, Brooks DM, Hasenkrug KJ. Protection against establishment of retroviral persistence by vaccination with a live attenuated virus. J Virol. 1999;73:3753–7.
60. Dittmer U, Brooks DM, Hasenkrug KJ. Requirement for multiple lymphocyte subsets in protection by a live attenuated vaccine against retroviral infection. Nat Med. 1999;5:189–93.
61. Dittmer U, He H, Messer RJ, Schimmer S, Olbrich ARM, Ohlen C, et al. Functional impairment of CD8(+) T cells by regulatory T cells during persistent retroviral infection. Immunity. 2004;20:293–303.
62. Dittmer U, Werner T, Kraft ARM. Co-immunization of mice with a retroviral DNA vaccine and GITRL-encoding plasmid augments vaccine-induced protection against retrovirus infection. Viral Immunol. 2008;21:459–67.
63. Doitsh G, Greene WC. Dissecting How CD4 T Cells Are Lost During HIV Infection. Cell Host Microbe. 2016;19:280–91.
64. Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov DV, et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. Hum Vaccin Immunother. 2017;13:613–20.
65. Dormond E, Perrier M, Kamen A. From the first to the third generation adenoviral vector: what parameters are governing the production yield? Biotechnol Adv. 2009;27:133–44.
66. Doronin K, Flatt JW, Di Paolo NC, Khare R, Kalyuzhniy O, Acchione M, et al. Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. Science. 2012;338:795–8.
67. Duerr A, Huang Y, Buchbinder S, Coombs RW, Sanchez J, Del Rio C, et al. Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and

demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). J Infect Dis. 2012;206:258–66.
68. Earl PL, Moss B, Morrison RP, Wehrly K, Nishio J, Chesebro B. T-lymphocyte priming and protection against Friend leukemia by vaccinia-retrovirus env gene recombinant. Science. 1986;234:728–31.
69. Ellermann V, Bang O. Experimentelle Leukämie bei Hühnern. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infectionskr. Hyg. Abt. Orig. 1908:595–609.
70. ENDERS JF, PEEBLES TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. Proc Soc Exp Biol Med. 1954;86:277–86.
71. Ersching J, Hernandez MIM, Cezarotto FS, Ferreira JDS, Martins AB, Switzer WM, et al. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. Virology. 2010;407:1–6.
72. Ewer K, Rampling T, Venkatraman N, Bowyer G, Wright D, Lambe T, et al. A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA. N Engl J Med. 2016;374:1635–46.
73. Faria NR, Rambaut A, Suchard MA, Baele G, Bedford T, Ward MJ, et al. HIV epidemiology. The early spread and epidemic ignition of HIV-1 in human populations. Science. 2014;346:56–61.
74. Fausther-Bovendo H, Kobinger GP. Pre-existing immunity against Ad vectors: humoral, cellular, and innate response, what's important? Hum Vaccin Immunother. 2014;10:2875–84.
75. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. Science. 1996;272:872–7.
76. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, Carruth LM, Buck C, Chaisson RE, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science. 1997;278:1295–300.
77. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. Nat Med. 1999;5:512–7.
78. Flipse J, Diosa-Toro MA, Hoornweg TE, van de Pol DPI, Urcuqui-Inchima S, Smit JM. Antibody-Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection in Primary Human Macrophages; Balancing Higher Fusion against Antiviral Responses. Sci Rep. 2016;6:29201.
79. Flynn NM, Forthal DN, Harro CD, Judson FN, Mayer KH, Para MF. Placebo-controlled phase 3 trial of a recombinant glycoprotein 120 vaccine to prevent HIV-1 infection. J Infect Dis. 2005;191:654–65.
80. Förster F, Medalia O, Zauberman N, Baumeister W, Fass D. Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102:4729–34.
81. Fox MP, Rosen S. Retention of Adult Patients on Antiretroviral Therapy in Low- and Middle-Income Countries: Systematic Review and Meta-analysis 2008-2013. J Acquir Immune Defic Syndr. 2015;69:98–108.
82. Frahm N, DeCamp AC, Friedrich DP, Carter DK, Defawe OD, Kublin JG, et al. Human adenovirus-specific T cells modulate HIV-specific T cell responses to an Ad5-vectored HIV-1 vaccine. J Clin Invest. 2012;122:359–67.
83. FRIEND C. Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leukemia. J Exp Med. 1957;105:307–18.
84. Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. Nat Med. 2003;9:1408–12.

85. Gahéry-Ségard H, Farace F, Godfrin D, Gaston J, Lengagne R, Tursz T, et al. Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralizing activity. J Virol. 1998;72:2388–97.
86. Galea I, Stasakova J, Dunscombe MS, Ottensmeier CH, Elliott T, Thirdborough SM. CD8+ T-cell cross-competition is governed by peptide-MHC class I stability. Eur J Immunol. 2012;42:256–63.
87. Gall J, Kass-Eisler A, Leinwand L, Falck-Pedersen E. Adenovirus type 5 and 7 capsid chimera: fiber replacement alters receptor tropism without affecting primary immune neutralization epitopes. J Virol. 1996;70:2116–23.
88. Gallo RC. The first human retrovirus. Sci Am. 1986;255:88–98.
89. Gao F, Bailes E, Robertson DL, Chen Y, Rodenburg CM, Michael SF, et al. Origin of HIV-1 in the chimpanzee Pan troglodytes troglodytes. Nature. 1999;397:436–41.
90. Gardner MB, Luciw PA. Animal models of AIDS. FASEB J. 1989;3:2593–606.
91. Gaschen B, Taylor J, Yusim K, Foley B, Gao F, Lang D, et al. Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. Science. 2002;296:2354–60.
92. Gilbert SC. Adenovirus-vectored Ebola vaccines. Expert Rev Vaccines. 2015;14:1347–57.
93. Gödel P, Windmann S, Dietze KK, Dittmer U, Bayer W. Modification of one epitope-flanking amino acid allows for the induction of friend retrovirus-specific CD8+ T cells by Adenovirus-based immunization. J Virol. 2012;86:12422–5.
94. Goulder PJR, Watkins DI. HIV and SIV CTL escape: implications for vaccine design. Nat Rev Immunol. 2004;4:630–40.
95. Gray GE, Laher F, Lazarus E, Ensoli B, Corey L. Approaches to preventative and therapeutic HIV vaccines. Curr Opin Virol. 2016;17:104–9.
96. Haase AT. Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. Nature. 2010;464:217–23.
97. Halemano K, Barrett BS, Li SX, Harper MS, Smith DS, Heilman KJ, Santiago ML. Fv1 restriction and retrovirus vaccine immunity in Apobec3-deficient 129P2 mice. PLoS ONE. 2013;8:e60500.
98. Halemano K, Harper MS, Guo K, Li SX, Heilman KJ, Barrett BS, Santiago ML. Humoral immunity in the Friend retrovirus infection model. Immunol Res. 2013;55:249–60.
99. Hammer SM, Sobieszczyk ME, Janes H, Karuna ST, Mulligan MJ, Grove D, et al. Efficacy trial of a DNA/rAd5 HIV-1 preventive vaccine. N Engl J Med. 2013;369:2083–92.
100. Harmon TM, Fisher KA, McGlynn MG, Stover J, Warren MJ, Teng Y, Näveke A. Exploring the Potential Health Impact and Cost-Effectiveness of AIDS Vaccine within a Comprehensive HIV/AIDS Response in Low- and Middle-Income Countries. PLoS ONE. 2016;11:e0146387.
101. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol. 2005;6:1123–32.
102. Hartley JW, ROWE WP, HUEBNER RJ. Host-range restrictions of murine leukemia viruses in mouse embryo cell cultures. J Virol. 1970;5:221–5.
103. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, Mitani K. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. J Virol. 1999;73:6141–6.
104. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Chesebro B. Passive immunotherapy for retroviral disease: influence of major histocompatibility complex type and T-cell responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92:10492–5.

105. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Nishio J, Chesebro B. Differing T-cell requirements for recombinant retrovirus vaccines. J Virol. 1996;70:368–72.
106. Hasenkrug KJ, Chesebro B. Immunity to retroviral infection: the Friend virus model. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94:7811–6.
107. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Dittmer U. Critical role for CD4(+) T cells in controlling retrovirus replication and spread in persistently infected mice. J Virol. 1998;72:6559–64.
108. Hasenkrug KJ, Brooks DM, Robertson MN, Srinivas RV, Chesebro B. Immunoprotective determinants in friend murine leukemia virus envelope protein. Virology. 1998;248:66–73.
109. Ha S-J, Kim D-J, Baek K-H, Yun Y-D, Sung Y-C. IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization. J Immunol. 2004;172:525–31.
110. Heemskerk B, Veltrop-Duits LA, van Vreeswijk T, Dam MM ten, Heidt S, Toes REM, et al. Extensive cross-reactivity of CD4+ adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. J Virol. 2003;77:6562–6.
111. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:2509–14.
112. Hudrisier D, Oldstone MB, Gairin JE. The signal sequence of lymphocytic choriomeningitis virus contains an immunodominant cytotoxic T cell epitope that is restricted by both H-2D(b) and H-2K(b) molecules. Virology. 1997;234:62–73.
113. Hudrisier D, Riond J, Burlet-Schiltz O, Herrath MG von, Lewicki H, Monsarrat B, et al. Structural and functional identification of major histocompatibility complex class I-restricted self-peptides as naturally occurring molecular mimics of viral antigens. Possible role in CD8+ T cell-mediated, virus-induced autoimmune disease. J Biol Chem. 2001;276:19396–403.
114. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nat Rev Immunol. 2005;5:521–31.
115. Hutnick NA, Carnathan D, Demers K, Makedonas G, Ertl HCJ, Betts MR. Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. Vaccine. 2010;28:1932–41.
116. Ikeda T, Symeonides M, Albin JS, Li M, Thali M, Harris RS. HIV-1 adaptation studies reveal a novel Env-mediated homeostasis mechanism for evading lethal hypermutation by APOBEC3G. PLoS Pathog. 2018;14:e1007010.
117. Ishihara C, Miyazawa M, Nishio J, Chesebro B. Induction of protective immunity to Friend murine leukemia virus in genetic nonresponders to virus envelope protein. J Immunol. 1991;146:3958–63.
118. Ishihara C, Miyazawa M, Nishio J, Azuma I, Chesebro B. Use of low toxicity adjuvants and killed virus to induce protective immunity against the Friend murine leukaemia retrovirus-induced disease. Vaccine. 1992;10:353–6.
119. Ishikawa F, Yasukawa M, Lyons B, Yoshida S, Miyamoto T, Yoshimoto G, et al. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor {gamma} chain(null) mice. Blood. 2005;106:1565–73.
120. Iwashiro M, Messer RJ, Peterson KE, Stromnes IM, Sugie T, Hasenkrug KJ. Immunosuppression by CD4+ regulatory T cells induced by chronic retroviral infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98:9226–30.
121. Jaafoura S, Goër Herve MG de, Hernandez-Vargas EA, Hendel-Chavez H, Abdoh M, Mateo MC, et al. Progressive contraction of the latent HIV reservoir around a core of less-differentiated $CD4^+$ memory T Cells. Nat Commun. 2014;5:5407.

122. Janeway CA. Immunologie. 5th ed. Heidelberg [u.a.]: Spektrum, Akad. Verl.; 2002.
123. Johnson LR, Weizman O-E, Rapp M, Way SS, Sun JC. Epitope-Specific Vaccination Limits Clonal Expansion of Heterologous Naive T Cells during Viral Challenge. Cell Rep. 2016;17:636–44.
124. Johnson MJ, Björkström NK, Petrovas C, Liang F, Gall JGD, Loré K, Koup RA. Type I interferon-dependent activation of NK cells by rAd28 or rAd35, but not rAd5, leads to loss of vector-insert expression. Vaccine. 2014;32:717–24.
125. Jönsson F, Kreppel F. Barriers to systemic application of virus-based vectors in gene therapy: lessons from adenovirus type 5. Virus Genes. 2017;53:692–9.
126. Kabat D. Molecular biology of Friend viral erythroleukemia. Curr Top Microbiol Immunol. 1989;148:1–42.
127. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nat Rev Immunol. 2002;2:251–62.
128. Kanki PJ, Travers KU, MBoup S, Hsieh CC, Marlink RG, Gueye-NDiaye A, et al. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. Lancet. 1994;343:943–6.
129. Katsikis PD, Mueller YM, Villinger F. The cytokine network of acute HIV infection: a promising target for vaccines and therapy to reduce viral set-point? PLoS Pathog. 2011;7:e1002055.
130. Kaulfuß M, Wensing I, Windmann S, Hrycak CP, Bayer W. Induction of complex immune responses and strong protection against retrovirus challenge by adenovirus-based immunization depends on the order of vaccine delivery. Retrovirology. 2017;14:8.
131. Kedl RM, Kappler JW, Marrack P. Epitope dominance, competition and T cell affinity maturation. Curr Opin Immunol. 2003;15:120–7.
132. Keefer MC, Gilmour J, Hayes P, Gill D, Kopycinski J, Cheeseman H, et al. A phase I double blind, placebo-controlled, randomized study of a multigenic HIV-1 adenovirus subtype 35 vector vaccine in healthy uninfected adults. PLoS ONE. 2012;7:e41936.
133. Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT. A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93:5731–6.
134. Koup RA, Graham BS, Douek DC. The quest for a T cell-based immune correlate of protection against HIV: a story of trials and errors. Nat Rev Immunol. 2011;11:65–70.
135. Kron MW, Engler T, Schmidt E, Schirmbeck R, Kochanek S, Kreppel F. High-capacity adenoviral vectors circumvent the limitations of ΔE1 and ΔE1/ΔE3 adenovirus vectors to induce multispecific transgene product-directed CD8 T-cell responses. J Gene Med. 2011;13:648–57.
136. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. Nature. 1998;393:648–59.
137. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680–5.
138. Lander MR, Chattopadhyay SK. A Mus dunni cell line that lacks sequences closely related to endogenous murine leukemia viruses and can be infected by ectropic, amphotropic, xenotropic, and mink cell focus-forming viruses. J Virol. 1984;52:695–8.

139. Lan P, Tonomura N, Shimizu A, Wang S, Yang Y-G. Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation. Blood. 2006;108:487–92.
140. Learmont JC, Geczy AF, Mills J, Ashton LJ, Raynes-Greenow CH, Garsia RJ, 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. 1999;340:1715–22.
141. Lee J, Hashimoto M, Im SJ, Araki K, Jin H-T, Davis CW, et al. Adenovirus Serotype 5 Vaccination Results in Suboptimal CD4 T Helper 1 Responses in Mice. J Virol 2017.
142. Leen AM, Sili U, Vanin EF, Jewell AM, Xie W, Vignali D, et al. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8+ T cells. Blood. 2004;104:2432–40.
143. Lemckert AAC, Sumida SM, Holterman L, Vogels R, Truitt DM, Lynch DM, et al. Immunogenicity of heterologous prime-boost regimens involving recombinant adenovirus serotype 11 (Ad11) and Ad35 vaccine vectors in the presence of anti-ad5 immunity. J Virol. 2005;79:9694–701.
144. Liao H-X, Bonsignori M, Alam SM, McLellan JS, Tomaras GD, Moody MA, et al. Vaccine induction of antibodies against a structurally heterogeneous site of immune pressure within HIV-1 envelope protein variable regions 1 and 2. Immunity. 2013;38:176–86.
145. Lietz R, Bayer W, Ontikatze T, Johrden L, Tenbusch M, Storcksdieck Genannt Bonsmann M, et al. Codelivery of the chemokine CCL3 by an adenovirus-based vaccine improves protection from retrovirus infection. J Virol. 2012;86:1706–16.
146. Li JP, D'Andrea AD, Lodish HF, Baltimore D. Activation of cell growth by binding of Friend spleen focus-forming virus gp55 glycoprotein to the erythropoietin receptor. Nature. 1990;343:762–4.
147. Ling B, Veazey RS, Penedo C, Xu K, Lifson JD, Marx PA. Longitudinal follow up of SIVmac pathogenesis in rhesus macaques of Chinese origin: emergence of B cell lymphoma. J Med Primatol. 2002;31:154–63.
148. Li Y, Wang H, Lu H, Hua S. Regulation of Memory T Cells by Interleukin-23. Int Arch Allergy Immunol. 2016;169:157–62.
149. Lynch RG. Regulatory roles for FcgammaRIII (CD16) and FcgammaRII (CD32) in the development of T- and B-lineage lymphoid cells. J Leukoc Biol. 2000;67:279–84.
150. Maartens G, Celum C, Lewin SR. HIV infection: epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. Lancet. 2014;384:258–71.
151. MacNeil A, Sankale J-L, Meloni ST, Sarr AD, Mboup S, Kanki P. Long-term intrapatient viral evolution during HIV-2 infection. J Infect Dis. 2007;195:726–33.
152. Malyshkina A, Littwitz-Salomon E, Sutter K, Zelinskyy G, Windmann S, Schimmer S, et al. Fas Ligand-mediated cytotoxicity of CD4+ T cells during chronic retrovirus infection. Sci Rep. 2017;7:7785.
153. Mannioui A, Bourry O, Sellier P, Delache B, Brochard P, Andrieu T, et al. Dynamics of viral replication in blood and lymphoid tissues during SIVmac251 infection of macaques. Retrovirology. 2009;6:106.
154. Manzke N, Akhmetzyanova I, Hasenkrug KJ, Trilling M, Zelinskyy G, Dittmer U. CD4+ T cells develop antiretroviral cytotoxic activity in the absence of regulatory T cells and CD8+ T cells. J Virol. 2013;87:6306–13.
155. Marcondes MCG, Penedo MCT, Lanigan C, Hall D, Watry DD, Zandonatti M, Fox HS. Simian immunodeficiency virus-induced CD4+ T cell deficits in cytokine secretion profile are dependent on monkey origin. Viral Immunol. 2006;19:679–89.

156. Marlink R, Kanki P, Thior I, Travers K, Eisen G, Siby T, et al. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. Science. 1994;265:1587–90.
157. Marsden MD, Zack JA. Humanized Mouse Models for Human Immunodeficiency Virus Infection. Annu Rev Virol. 2017;4:393–412.
158. Martinez-Torres F, Nochi T, Wahl A, Garcia JV, Denton PW. Hypogammaglobulinemia in BLT humanized mice--an animal model of primary antibody deficiency. PLoS ONE. 2014;9:e108663.
159. McDermott AB, O'Connor DH, Fuenger S, Piaskowski S, Martin S, Loffredo J, et al. Cytotoxic T-lymphocyte escape does not always explain the transient control of simian immunodeficiency virus SIVmac239 viremia in adenovirus-boosted and DNA-primed Mamu-A*01-positive rhesus macaques. J Virol. 2005;79:15556–66.
160. McElrath MJ, Rosa SC de, Moodie Z, Dubey S, Kierstead L, Janes H, et al. HIV-1 vaccine-induced immunity in the test-of-concept Step Study: a case-cohort analysis. Lancet. 2008;372:1894–905.
161. McElrath MJ. Immune responses to HIV vaccines and potential impact on control of acute HIV-1 infection. J Infect Dis. 2010;202 Suppl 2:S323-6.
162. Mercier S, Rouard H, Delfau-Larue MH, Eloit M. Specific antibodies modulate the interactions of adenovirus type 5 with dendritic cells. Virology. 2004;322:308–17.
163. Messer RJ, Dittmer U, Peterson KE, Hasenkrug KJ. Essential role for virus-neutralizing antibodies in sterilizing immunity against Friend retrovirus infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101:12260–5.
164. Messer RJ, Lavender KJ, Hasenkrug KJ. Mice of the resistant H-2(b) haplotype mount broad CD4(+) T cell responses against 9 distinct Friend virus epitopes. Virology. 2014;456-457:139–44.
165. Mittereder N, March KL, Trapnell BC. Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. J Virol. 1996;70:7498–509.
166. Miyazawa M, Nishio J, Chesebro B. Protection against Friend retrovirus-induced leukemia by recombinant vaccinia viruses expressing the gag gene. J Virol. 1992;66:4497–507.
167. Miyazawa M, Fujisawa R, Ishihara C, Takei YA, Shimizu T, Uenishi H, et al. Immunization with a single T helper cell epitope abrogates Friend virus-induced early erythroid proliferation and prevents late leukemia development. J Immunol. 1995;155:748–58.
168. Miyazawa M, Tsuji-Kawahara S, Kanari Y. Host genetic factors that control immune responses to retrovirus infections. Vaccine. 2008;26:2981–96.
169. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare Virologie. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
170. Moffatt S, Hays J, HogenEsch H, Mittal SK. Circumvention of vector-specific neutralizing antibody response by alternating use of human and non-human adenoviruses: implications in gene therapy. Virology. 2000;272:159–67.
171. Montefiori D, Sattentau Q, Flores J, Esparza J, Mascola J. Antibody-based HIV-1 vaccines: recent developments and future directions. PLoS Med. 2007;4:e348.
172. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. Curr Opin Immunol. 1997;9:551–62.
173. Moreau-Gachelin F, Tavitian A, Tambourin P. Spi-1 is a putative oncogene in virally induced murine erythroleukaemias. Nature. 1988;331:277–80.
174. Morris JC, Wildner O. Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with an oncolytic adenovirus expressing HSV-tk. Mol Ther. 2000;1:56–62.
175. Morris SJ, Sebastian S, Spencer AJ, Gilbert SC. Simian adenoviruses as vaccine vectors. Future Virol. 2016;11:649–59.

176. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1986;51 Pt 1:263–73.
177. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth Enzymol. 1987;155:335–50.
178. Munroe DG, Peacock JW, Benchimol S. Inactivation of the cellular p53 gene is a common feature of Friend virus-induced erythroleukemia: relationship of inactivation to dominant transforming alleles. Mol Cell Biol. 1990;10:3307–13.
179. Murphy KP, Janeway C. Janeway's immunobiology. 8th ed. London [u.a.]: Garland Science; 2012.
180. Nair SR, Zelinskyy G, Schimmer S, Gerlach N, Kassiotis G, Dittmer U. Mechanisms of control of acute Friend virus infection by CD4+ T helper cells and their functional impairment by regulatory T cells. J Gen Virol. 2010;91:440–51.
181. North TW, Higgins J, Deere JD, Hayes TL, Villalobos A, Adamson L, et al. Viral sanctuaries during highly active antiretroviral therapy in a nonhuman primate model for AIDS. J Virol. 2010;84:2913–22.
182. Oberle SG, Hanna-El-Daher L, Chennupati V, Enouz S, Scherer S, Prlic M, Zehn D. A Minimum Epitope Overlap between Infections Strongly Narrows the Emerging T Cell Repertoire. Cell Rep. 2016;17:627–35.
183. Obiako OR, Muktar HM. Challenges of HIV treatment in resource-poor countries: a review. Niger J Med. 2010;19:361–8.
184. O'Hara GA, Duncan CJA, Ewer KJ, Collins KA, Elias SC, Halstead FD, et al. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. J Infect Dis. 2012;205:772–81.
185. Ohs I, Windmann S, Wildner O, Dittmer U, Bayer W. Interleukin-encoding adenoviral vectors as genetic adjuvant for vaccination against retroviral infection. PLoS ONE. 2013;8:e82528.
186. Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, Hsu S, Flomenberg P. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4+ T-cell epitope. Hum Gene Ther. 2002;13:1167–78.
187. Ouédraogo A, Tiono AB, Kargougou D, Yaro JB, Ouédraogo E, Kaboré Y, et al. A phase 1b randomized, controlled, double-blinded dosage-escalation trial to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an adenovirus type 35 based circumsporozoite malaria vaccine in Burkinabe healthy adults 18 to 45 years of age. PLoS ONE. 2013;8:e78679.
188. Pantaleo G, Koup RA. Correlates of immune protection in HIV-1 infection: what we know, what we don't know, what we should know. Nat Med. 2004;10:806–10.
189. Paris R, Kuschner RA, Binn L, Thomas SJ, Colloca S, Nicosia A, et al. Adenovirus type 4 and 7 vaccination or adenovirus type 4 respiratory infection elicits minimal cross-reactive antibody responses to nonhuman adenovirus vaccine vectors. Clin Vaccine Immunol. 2014;21:783–6.
190. Penaloza-MacMaster P, Provine NM, Ra J, Borducchi EN, McNally A, Simmons NL, et al. Alternative serotype adenovirus vaccine vectors elicit memory T cells with enhanced anamnestic capacity compared to Ad5 vectors. J Virol. 2013;87:1373–84.
191. Peng Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. Hum Gene Ther. 2005;16:1016–27.
192. Perelson AS, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. Science. 1996;271:1582–6.

193. Persons DA, Paulson RF, Loyd MR, Herley MT, Bodner SM, Bernstein A, et al. Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase. Nat Genet. 1999;23:159–65.
194. Pham TTN, Burchette JL, Hale LP. Fatal disseminated adenovirus infections in immunocompromised patients. Am J Clin Pathol. 2003;120:575–83.
195. Pichla-Gollon SL, Drinker M, Zhou X, Xue F, Rux JJ, Gao G-P, et al. Structure-based identification of a major neutralizing site in an adenovirus hexon. J Virol. 2007;81:1680–9.
196. Pichla-Gollon SL, Lin S-W, Hensley SE, Lasaro MO, Herkenhoff-Haut L, Drinker M, et al. Effect of preexisting immunity on an adenovirus vaccine vector: in vitro neutralization assays fail to predict inhibition by antiviral antibody in vivo. J Virol. 2009;83:5567–73.
197. Pincus T, Hartley JW, ROWE WP. A major genetic locus affecting resistance to infection with murine leukemia viruses. I. Tissue culture studies of naturally occurring viruses. J Exp Med. 1971;133:1219–33.
198. Pitisuttithum P, Gilbert P, Gurwith M, Heyward W, Martin M, van Griensven F, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial of a bivalent recombinant glycoprotein 120 HIV-1 vaccine among injection drug users in Bangkok, Thailand. J Infect Dis. 2006;194:1661–71.
199. Plantier J-C, Leoz M, Dickerson JE, Oliveira F de, Cordonnier F, Lemée V, et al. A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. Nat Med. 2009;15:871–2.
200. Popper SJ, Sarr AD, Travers KU, Guèye-Ndiaye A, MBoup S, Essex ME, Kanki PJ. Lower human immunodeficiency virus (HIV) type 2 viral load reflects the difference in pathogenicity of HIV-1 and HIV-2. J Infect Dis. 1999;180:1116–21.
201. Prasad SA, Norbury CC, Chen W, Bennink JR, Yewdell JW. Cutting edge: recombinant adenoviruses induce CD8 T cell responses to an inserted protein whose expression is limited to nonimmune cells. J Immunol. 2001;166:4809–12.
202. Provine NM, Larocca RA, Penaloza-MacMaster P, Borducchi EN, McNally A, Parenteau LR, et al. Longitudinal requirement for CD4+ T cell help for adenovirus vector-elicited CD8+ T cell responses. J Immunol. 2014;192:5214–25.
203. Provine NM, Larocca RA, Aid M, Penaloza-MacMaster P, Badamchi-Zadeh A, Borducchi EN, et al. Immediate Dysfunction of Vaccine-Elicited CD8+ T Cells Primed in the Absence of CD4+ T Cells. J Immunol. 2016;197:1809–22.
204. Provine NM, Badamchi-Zadeh A, Bricault CA, Penaloza-MacMaster P, Larocca RA, Borducchi EN, et al. Transient CD4+ T Cell Depletion Results in Delayed Development of Functional Vaccine-Elicited Antibody Responses. J Virol. 2016;90:4278–88.
205. Quinn TC, Wawer MJ, Sewankambo N, Serwadda D, Li C, Wabwire-Mangen F, et al. Viral load and heterosexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. Rakai Project Study Group. N Engl J Med. 2000;342:921–9.
206. Rafiq K, Bergtold A, Clynes R. Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. J Clin Invest. 2002;110:71–9.
207. Rahman A, Tsai V, Goudreau A, Shinoda JY, Wen SF, Ramachandra M, et al. Specific depletion of human anti-adenovirus antibodies facilitates transduction in an in vivo model for systemic gene therapy. Mol Ther. 2001;3:768–78.
208. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, et al. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. N Engl J Med. 2009;361:2209–20.
209. Reyes-Sandoval A, Sridhar S, Berthoud T, Moore AC, Harty JT, Gilbert SC, et al. Single-dose immunogenicity and protective efficacy of simian adenoviral vectors against Plasmodium berghei. Eur J Immunol. 2008;38:732–41.

210. Roberts DM, Nanda A, Havenga MJE, Abbink P, Lynch DM, Ewald BA, et al. Hexon-chimaeric adenovirus serotype 5 vectors circumvent pre-existing anti-vector immunity. Nature. 2006;441:239–43.
211. Robertson DL, Anderson JP, Bradac JA, Carr JK, Foley B, Funkhouser RK, et al. HIV-1 nomenclature proposal. Science. 2000;288:55–6.
212. Robertson MN, Miyazawa M, Mori S, Caughey B, Evans LH, Hayes SF, Chesebro B. Production of monoclonal antibodies reactive with a denatured form of the Friend murine leukemia virus gp70 envelope protein: use in a focal infectivity assay, immunohistochemical studies, electron microscopy and western blotting. J Virol Methods. 1991;34:255–71.
213. Robertson MN, Spangrude GJ, Hasenkrug K, Perry L, Nishio J, Wehrly K, Chesebro B. Role and specificity of T-cell subsets in spontaneous recovery from Friend virus-induced leukemia in mice. J Virol. 1992;66:3271–7.
214. Robertson SJ, Messer RJ, Carmody AB, Hasenkrug KJ. In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. J Immunol. 2006;176:3342–9.
215. Rolland M, Tovanabutra S, DeCamp AC, Frahm N, Gilbert PB, Sanders-Buell E, et al. Genetic impact of vaccination on breakthrough HIV-1 sequences from the STEP trial. Nat Med. 2011;17:366–71.
216. Rollier CS, Hill AVS, Reyes-Sandoval A. Influence of adenovirus and MVA vaccines on the breadth and hierarchy of T cell responses. Vaccine. 2016;34:4470–4.
217. Roos A-K, Eriksson F, Walters DC, Pisa P, King AD. Optimization of skin electroporation in mice to increase tolerability of DNA vaccine delivery to patients. Mol Ther. 2009;17:1637–42.
218. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. J Exp Med. 1911;13:397–411.
219. ROWE WP, HUEBNER RJ, GILMORE LK, PARROTT RH, WARD TG. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med. 1953;84:570–3.
220. Roy S, Clawson DS, Calcedo R, Lebherz C, Sanmiguel J, Di Wu, Wilson JM. Use of chimeric adenoviral vectors to assess capsid neutralization determinants. Virology. 2005;333:207–14.
221. Roy S, Medina-Jaszek A, Wilson MJ, Sandhu A, Calcedo R, Lin J, Wilson JM. Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. J Gene Med. 2011;13:17–25.
222. Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. J Gen Virol. 2009;90:1–20.
223. Rutigliano JA, Ruckwardt TJ, Martin JE, Graham BS. Relative dominance of epitope-specific CD8+ T cell responses in an F1 hybrid mouse model of respiratory syncytial virus infection. Virology. 2007;362:314–9.
224. Santiago ML, Range F, Keele BF, Li Y, Bailes E, Bibollet-Ruche F, et al. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (Cercocebus atys atys) from the Taï Forest, Côte d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. J Virol. 2005;79:12515–27.
225. Santiago ML, Montano M, Benitez R, Messer RJ, Yonemoto W, Chesebro B, et al. Apobec3 encodes Rfv3, a gene influencing neutralizing antibody control of retrovirus infection. Science. 2008;321:1343–6.
226. Santiago ML, Benitez RL, Montano M, Hasenkrug KJ, Greene WC. Innate retroviral restriction by Apobec3 promotes antibody affinity maturation in vivo. J Immunol. 2010;185:1114–23.

227. Schaecher KL. The importance of treatment adherence in HIV. Am J Manag Care. 2013;19:s231-7.
228. Schepers K, Toebes M, Sotthewes G, Vyth-Dreese FA, Dellemijn TAM, Melief CJM, et al. Differential kinetics of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses in the regression of retrovirus-induced sarcomas. J Immunol. 2002;169:3191–9.
229. Schirmbeck R, Stober D, El-Kholy S, Riedl P, Reimann J. The immunodominant, Ld-restricted T cell response to hepatitis B surface antigen (HBsAg) efficiently suppresses T cell priming to multiple Dd-, Kd-, and Kb-restricted HBsAg epitopes. J Immunol. 2002;168:6253–62.
230. Schirmbeck R, Reimann J, Kochanek S, Kreppel F. The immunogenicity of adenovirus vectors limits the multispecificity of CD8 T-cell responses to vector-encoded transgenic antigens. Mol Ther. 2008;16:1609–16.
231. Schluns KS, Lefrançois L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. Nat Rev Immunol. 2003;3:269–79.
232. Schöne D, Hrycak CP, Windmann S, Lapuente D, Dittmer U, Tenbusch M, Bayer W. Immunodominance of Adenovirus-Derived CD8+ T Cell Epitopes Interferes with the Induction of Transgene-Specific Immunity in Adenovirus-Based Immunization. J Virol 2017.
233. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. Cold Spring Harb Perspect Med. 2011;1:a006841.
234. Sheehy SH, Duncan CJA, Elias SC, Choudhary P, Biswas S, Halstead FD, et al. ChAd63-MVA-vectored blood-stage malaria vaccines targeting MSP1 and AMA1: assessment of efficacy against mosquito bite challenge in humans. Mol Ther. 2012;20:2355–68.
235. Sheets RL, Zhou T, Knezevic I. Review of efficacy trials of HIV-1/AIDS vaccines and regulatory lessons learned: A review from a regulatory perspective. Biologicals. 2016;44:73–89.
236. Shen L, Siliciano RF. Viral reservoirs, residual viremia, and the potential of highly active antiretroviral therapy to eradicate HIV infection. J Allergy Clin Immunol. 2008;122:22–8.
237. Shiver JW, Fu T-M, Chen L, Casimiro DR, Davies M-E, Evans RK, et al. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity. Nature. 2002;415:331–5.
238. Silva M, Nguyen TH, Philbrook P, Chu M, Sears O, Hatfield S, et al. Targeted Elimination of Immunodominant B Cells Drives the Germinal Center Reaction toward Subdominant Epitopes. Cell Rep. 2017;21:3672–80.
239. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, Paiardini M, O'Neil SP, McClure HM, et al. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. Immunity. 2003;18:441–52.
240. Silvestri G, Paiardini M, Pandrea I, Lederman MM, Sodora DL. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. J Clin Invest. 2007;117:3148–54.
241. Simon F, Mauclère P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Müller-Trutwin MC, Saragosti S, et al. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. Nat Med. 1998;4:1032–7.
242. Sina ST, Ren W, Cheng-Mayer C. Coreceptor use in nonhuman primate models of HIV infection. J Transl Med. 2011;9 Suppl 1:S7.
243. Smith JG, Wiethoff CM, Stewart PL, Nemerow GR. Adenovirus. Curr Top Microbiol Immunol. 2010;343:195–224.
244. Stéhelin D. The transforming gene of avian tumor viruses. Pathol Biol. 1976;24:513–5.

245. Stephenson KE, Hural J, Buchbinder SP, Sinangil F, Barouch DH. Preexisting adenovirus seropositivity is not associated with increased HIV-1 acquisition in three HIV-1 vaccine efficacy trials. J Infect Dis. 2012;205:1806–10.
246. Streeck H. AIDS virus seeks refuge in B cell follicles. Nat Med. 2015;21:111–2.
247. Stump DS, VandeWoude S. Animal models for HIV AIDS: a comparative review. Comp Med. 2007;57:33–43.
248. Sugahara D, Tsuji-Kawahara S, Miyazawa M. Identification of a protective CD4+ T-cell epitope in p15gag of Friend murine leukemia virus and role of the MA protein targeting the plasma membrane in immunogenicity. J Virol. 2004;78:6322–34.
249. Sui Y, Gordon S, Franchini G, Berzofsky JA. Nonhuman primate models for HIV/AIDS vaccine development. Curr Protoc Immunol. 2013;102:Unit 12.14.
250. Sumida SM, Truitt DM, Kishko MG, Arthur JC, Jackson SS, Gorgone DA, et al. Neutralizing antibodies and CD8+ T lymphocytes both contribute to immunity to adenovirus serotype 5 vaccine vectors. J Virol. 2004;78:2666–73.
251. Sumida SM, Truitt DM, Lemckert AAC, Vogels R, Custers JHHV, Addo MM, et al. Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. J Immunol. 2005;174:7179–85.
252. Super HJ, Brooks D, Hasenkrug K, Chesebro B. Requirement for CD4(+) T cells in the Friend murine retrovirus neutralizing antibody response: evidence for functional T cells in genetic low-recovery mice. J Virol. 1998;72:9400–3.
253. Tambourin PE, Gallien-Lartigue O, Wendling F, Huaulme D. Erythrocyte production in mice infected by the polycythaemia-inducing Friend virus or by the anaemia-inducing Friedn virus. Br J Haematol. 1973;24:511–24.
254. Tameris M, Hokey DA, Nduba V, Sacarlal J, Laher F, Kiringa G, et al. A double-blind, randomised, placebo-controlled, dose-finding trial of the novel tuberculosis vaccine AERAS-402, an adenovirus-vectored fusion protein, in healthy, BCG-vaccinated infants. Vaccine. 2015;33:2944–54.
255. Tang J, Olive M, Pulmanausahakul R, Schnell M, Flomenberg N, Eisenlohr L, Flomenberg P. Human CD8+ cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. Virology. 2006;350:312–22.
256. Tan WG, Jin H-T, West EE, Penaloza-MacMaster P, Wieland A, Zilliox MJ, et al. Comparative analysis of simian immunodeficiency virus gag-specific effector and memory CD8+ T cells induced by different adenovirus vectors. J Virol. 2013;87:1359–72.
257. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+ T cell differentiation. J Immunol. 1997;159:5956–63.
258. Tatsis N, Ertl HCJ. Adenoviruses as vaccine vectors. Mol Ther. 2004;10:616–29.
259. Teigler JE, Iampietro MJ, Barouch DH. Vaccination with adenovirus serotypes 35, 26, and 48 elicits higher levels of innate cytokine responses than adenovirus serotype 5 in rhesus monkeys. J Virol. 2012;86:9590–8.
260. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature. 1970;226:1211–3.
261. Tew JG, Wu J, Fakher M, Szakal AK, Qin D. Follicular dendritic cells: beyond the necessity of T-cell help. Trends Immunol. 2001;22:361–7.
262. Thomas Splettstößer. Der Verlauf einer typischen unbehandelten HIV-Infektion in Abhängigkeit von der T-Helferzellzahl (CD4+-T-Zellzahl). 2013. http://www.edinformatics.com/biotechnology/hiv.htm.
263. Thorner AR, Lemckert AAC, Goudsmit J, Lynch DM, Ewald BA, Denholtz M, et al. Immunogenicity of heterologous recombinant adenovirus prime-boost vaccine

regimens is enhanced by circumventing vector cross-reactivity. J Virol. 2006;80:12009–16.
264. Toogood CI, Crompton J, Hay RT. Antipeptide antisera define neutralizing epitopes on the adenovirus hexon. J Gen Virol. 1992;73 (Pt 6):1429–35.
265. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979;76:4350–4.
266. Tran T-A, Goër Herve M-G de, Hendel-Chavez H, Dembele B, Le Névot E, Abbed K, et al. Resting regulatory CD4 T cells: a site of HIV persistence in patients on long-term effective antiretroviral therapy. PLoS ONE. 2008;3:e3305.
267. Trichel AM, Rajakumar PA, Murphey-Corb M. Species-specific variation in SIV disease progression between Chinese and Indian subspecies of rhesus macaque. J Med Primatol. 2002;31:171–8.
268. Tuve S, Wang H, Ware C, Liu Y, Gaggar A, Bernt K, et al. A new group B adenovirus receptor is expressed at high levels on human stem and tumor cells. J Virol. 2006;80:12109–20.
269. Tzelepis F, Alencar BCG de, Penido MLO, Claser C, Machado AV, Bruna-Romero O, et al. Infection with Trypanosoma cruzi restricts the repertoire of parasite-specific CD8+ T cells leading to immunodominance. J Immunol. 2008;180:1737–48.
270. unaids.org. Global AIDS Update 2016. 2016. http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/global-AIDS-update-2016_en.pdf.
271. Vallari A, Holzmayer V, Harris B, Yamaguchi J, Ngansop C, Makamche F, et al. Confirmation of putative HIV-1 group P in Cameroon. J Virol. 2011;85:1403–7.
272. Vallée H, Carré H. Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval. C. R. Acad. Sci. 1904:331–3.
273. Varga MJ, Weibull C, Everitt E. Infectious entry pathway of adenovirus type 2. J Virol. 1991;65:6061–70.
274. Varghese R, Mikyas Y, Stewart PL, Ralston R. Postentry neutralization of adenovirus type 5 by an antihexon antibody. J Virol. 2004;78:12320–32.
275. Veltrop-Duits LA, Heemskerk B, Sombroek CC, van Vreeswijk T, Gubbels S, Toes REM, et al. Human CD4+ T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. Eur J Immunol. 2006;36:2410–23.
276. Walker BD, Ahmed R, Plotkin S. Moving ahead an HIV vaccine: use both arms to beat HIV. Nat Med. 2011;17:1194–5.
277. Wang C, Hart M, Chui C, Ajuogu A, Brian IJ, Cassan SC de, et al. Germinal Center B Cell and T Follicular Helper Cell Responses to Viral Vector and Protein-in-Adjuvant Vaccines. J Immunol. 2016;197:1242–51.
278. Weinberger AD, Perelson AS. Persistence and emergence of X4 virus in HIV infection. Math Biosci Eng. 2011;8:605–26.
279. Weiss RA. HIV receptors and cellular tropism. IUBMB Life. 2002;53:201–5.
280. Wilen CB, Tilton JC, Doms RW. HIV: cell binding and entry. Cold Spring Harb Perspect Med 2012.
281. Willis RA, Kappler JW, Marrack PC. CD8 T cell competition for dendritic cells in vivo is an early event in activation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:12063–8.
282. Wohlfart C. Neutralization of adenoviruses: kinetics, stoichiometry, and mechanisms. J Virol. 1988;62:2321–8.
283. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. Nature. 1998;393:705–11.

284. Yamamoto JK, Sanou MP, Abbott JR, Coleman JK. Feline immunodeficiency virus model for designing HIV/AIDS vaccines. Curr HIV Res. 2010;8:14–25.
285. Yang M, Mine Y. Novel T-cell epitopes of ovalbumin in BALB/c mouse: potential for peptide-immunotherapy. Biochem Biophys Res Commun. 2009;378:203–8.
286. Yuan X-H, Wang Y-C, Jin W-J, Zhao B-B, Chen C-F, Yang J, et al. Structure-based high-throughput epitope analysis of hexon proteins in B and C species human adenoviruses (HAdVs). PLoS ONE. 2012;7:e32938.
287. Yu B, Dong J, Wang C, Zhan Y, Zhang H, Wu J, et al. Characteristics of neutralizing antibodies to adenovirus capsid proteins in human and animal sera. Virology. 2013;437:118–23.
288. Zaiss AK, Machado HB, Herschman HR. The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy. J Cell Biochem. 2009;108:778–90.
289. Zehn D, Lee SY, Bevan MJ. Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. Nature. 2009;458:211–4.
290. Zelinskyy G, Balkow S, Schimmer S, Schepers K, Simon MM, Dittmer U. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. Virology. 2004;330:365–74.
291. Zelinskyy G, Kraft ARM, Schimmer S, Arndt T, Dittmer U. Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection. Eur J Immunol. 2006;36:2658–70.
292. Zhang Y, Bergelson JM. Adenovirus receptors. J Virol. 2005;79:12125–31.
293. Zhi Wei Chen. HIV Manual 3rd Edition. 2015. http://www.hivmanual.hk/content.html?gonum=9.
294. Zhou T, Xu L, Dey B, Hessell AJ, van Ryk D, Xiang S-H, et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. Nature. 2007;445:732–7.
295. Zhu P, Liu J, Bess J, Chertova E, Lifson JD, Grisé H, et al. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. Nature. 2006;441:847–52.

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Ulf Dittmer möchte ich als erstes für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung der Projekte mit stets anregenden Ideen und Vorschlägen danken.

Ich danke weiterhin Frau Prof. Dr. Wiebke Hansen für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Wibke Bayer – für die Aufnahme einer Quereinsteigerin in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas, die sehr gute technische wie inhaltliche Einarbeitung, ihre nahezu unerschöpfliche Geduld und Ausdauer, sowie für das Vertrauen und die Freiheit, die ich bei der Durchführung dieser Arbeit genießen durfte.

Weiterhin möchte ich Frau Sonja Windmann und Frau Nadine Bongard für das tolle Arbeitsklima, die Hilfe bei zu groß geratenen Versuchstagen, ihre Unterstützung mit Wort und Tat sowie die kleinen Gesten und nötigen Ablenkungen vom Ernst des Arbeitsalltages danken. Es war sehr schön bei euch!

Herrn Prof. Dr. Tenbusch und Herrn Dr. Lapuente möchte ich für Ihre Unterstützung und Aushilfe mit dem Elektroporator danken.

Des Weiteren möchte ich der gesamten AG Dittmer und AG Sutter, sowie vielen weiteren Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern auf allen Ebenen des Robert-Koch-Hauses danken – für all die kleinen Aufmunterungen oder Blödeleien zwischendurch, sowie für Ideen, Ratschläge und die Hilfe beim Erlernen neuer Experimente oder Techniken, oder wenn einfach mal zwei Hände nicht genug waren.

Ich möchte mich auch beim RTG 1949 bedanken – für all die lehrreichen Veranstaltungen und vor allem bei Frau Daniela Catrini, die sehr viel Arbeit in die reibungslose Organsiation des RTG steckt und dabei „…einen verdammt guten Job macht.“

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden - für all die Unterstützung, die ich in diesen letzten, sehr ereignisreichen 4 Jahren mit allen Höhen und Tiefen erfahren durfte. Und meinem Freund Sören, der sich trotz vehementer Einwände nicht davon abbringen ließ, es mit einer Doktorandin in der Abschlussphase ihrer Arbeit versuchen zu wollen… :*

Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. (2) g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „**Einfluss Adenovirus-spezifischer Immunantworten auf die Immunisierung mit Adenovirus-basierten Vektoren“** zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von **Camilla Patrizia Hrycak** befürworte und die Betreuung auch im Falle eines Weggangs, wenn nicht wichtige Gründe dem entgegenstehen, weiterführen werde.

Essen, den _____ _____

Unterschrift Prof. Dr. Ulf Dittmer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) d) + f) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient, bei der Abfassung der Dissertation nur die angegeben Hilfsmittel benutzt und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____ _____

Unterschrift Camilla Hrycak

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. (2) e) + g) der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät/Fachbereich abgelehnt worden ist.

Essen, den _____ _____

Unterschrift Camilla Hrycak