

5 Zusammenfassung

Kaninchen wurden mit rekombinanten Vakziniaviren immunisiert, die das gesamte Glykoprotein von SIV_{mac} und HIV-2_{ben} oder C-terminal verkürzte Bereiche des HIV-2_{ben}-gps exprimieren. Insgesamt wurden acht verschiedene rekombinante Vakziniaviren verwendet, wobei jeweils zwei Kaninchen mit demselben Vakziniavirus immunisiert wurden. Die Immunisierung erfolgte durch drei aufeinanderfolgende Infektionen mit den rekombinanten Vakziniaviren, gefolgt von einer Immunisierung mit dem über Gelelektrophorese gereinigten rekombinanten Glykoprotein oder Extrakten rVV-infizierter Zellen, beides suspendiert in komplettem Freundschem Adjuvans. Daran anschließend wurden alle Kaninchen viermal mit Extrakten rVV-infizierter Zellen in inkomplettem Freundschem Adjuvans immunisiert.

Durch Lymphoproliferationstests wurde ein Aspekt der zellulären Immunantwort gegen HIV-2 und SIV_{mac}-Glykoprotein bestimmt. Die humorale Immunantwort der Kaninchen gegen HIV-2_{ben}- und SIV_{mac}-Glykoprotein wurde qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Fähigkeit der Kaninchenserum, HIV-2_{ben} und SIV_{mac} in vitro zu neutralisieren, wurde mit zwei verschiedenen Virusneutralisationstests, dem MT4-Test und einem Synzytieninhibitionstest im Ag-Nachweis im Zellkulturüberstand, untersucht.

Durch drei aufeinanderfolgende Infektionen mit rVV konnte in 15 von 16 Kaninchen eine deutliche zelluläre und humorale Immunantwort gegen das native Glykoprotein von HIV-2_{ben} und SIV_{mac} induziert werden. In einem Kaninchen konnte sowohl eine zelluläre Immunantwort als auch eine eindeutige Serokonversion gegenüber HIV-2-gp nach drei aufeinanderfolgenden Infektionen nicht beobachtet werden. Erst nach der ersten Immunisierung mit rgp konnten eine zelluläre Immunantwort gegen HIV-2_{ben} und Ak gegen HIV-2_{ben}-gp gemessen werden.

Die Intensität der zellulären Immunantwort, definiert durch die gemessenen Proliferationsindices der PBL immunisierter Kaninchen nach antigener Restimulation mit rekombinantem oder nativem Glykoprotein war nicht vom zur Immunisierung verwendeten rVV abhängig. Gleiches gilt für die durch RIP und ELISA bestimmte Stärke der humoralen Immunantwort. Dies zeigt, daß die Stärke der durch Immunisierung mit rekombinanten Vakziniaviren erzeugte Immunantwort gegen das rekombinante Protein, über einen sehr weiten Bereich unabhängig von der Größe des exprimierten Proteins ist.

Die Untersuchung der Seren in den Virusneutralisationstests führte zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Im MT-4-Test wurden in den Seren der Tiere, die mit den rVV immunisiert wurden, die die 198 bzw. 332 N-terminalen Aminosäuren von HIV-2_{ben} exprimieren, die höchsten Titer an neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-2_{ben} und SIV_{mac} gemessen. Dies ist ein Beweis für die Existenz mindestens einer neutralisierenden Domäne innerhalb der 198 N-terminalen Aminosäuren des HIV-2_{ben}-Glykoproteins. Die Tatsache, daß durch Immunisierung mit VVenv198 bzw. VVenv332 erheblich höhere Ak-Titer in den immunisierten Tieren erzielt wurden, als mit denjenigen rekombinanten Vakziniaviren, die

größere Abschnitte des Glykoproteins exprimieren, spricht für eine unterschiedliche Präsentation dieser Abschnitte durch VVenv198 bzw. VVenv332.

Im Synzytieninhibitionstest mit Nachweis des Virusantigens im Zellkulturüberstand zeigten die Seren der Tiere, die mit rVV immunisiert wurden, die die 708 N-terminalen Aminosäuren von HIV-2_{ben}-Glykoprotein exprimieren, die höchsten Titer an nAk. Die nAk-Titer dieser Tiere waren höher als die der Kaninchen, die mit rVV immunisiert wurden, die für das gesamte HIV-2_{ben}-gp oder C-terminal noch stärker verkürzte Bereiche des HIV-2_{ben}-gp kodieren. Dies ist ein Hinweis für eine Präsentation von Bereichen des Glykoproteins im Bereich des N-terminalen gp41 bzw. des C-terminalen gp130 durch rVVenv708, die zur Induktion neutralisierender Ak im immunisierten Tier führt. Diese Bereiche scheinen durch rVV, die das gesamte gp exprimieren, nicht in gleicher Weise präsentiert zu werden.

In Bezug auf die Fragestellungen, deren Beantwortung die Aufgabe dieser Arbeit gewesen ist (1.6), lassen sich folgende Antworten formulieren.

1. Repetitive Infektionen mit rVV sind möglich. Die humorale und zelluläre Immunantwort gegen das rekombinante rVV-exprimierte gp wurde durch jede der drei aufeinander folgenden Immunisierungen verstärkt (3a). Eine Toleranzinduktion gegen das rgp zeigte sich in keinem Fall (3a). Die zelluläre Immunantwort gegenüber dem rgp ist jedoch deutlich schwächer als gegenüber VV-Ag.
2. Durch weitere Immunisierungen mit Extrakten rVV-infizierter Zellen werden die humorale und zelluläre Immunantwort gegen das rekombinante gp weiter verstärkt (3).
3. Antikörper, die Immundefizienzviren in vitro neutralisieren, werden durch die Infektion mit rVV bzw. Immunisierungen mit rgp in den Impfungen induziert. Weitere Immunisierungen mit nativem lentiviralem gp oder inaktivierten Lentiviren sind dazu nicht erforderlich (2, 2b).
4. Unabhängig vom verwendeten Testsystem waren rVV, die das gesamte gp von HIV-2_{ben} exprimieren, nicht in der Lage, die höchsten Titer neutralisierender Ak im Kaninchen zu induzieren. Alle übrigen Aussagen über die Induktion neutralisierender Ak sind abhängig vom Testsystem, insbesondere der Zielzelllinie. Kaninchen, die mit rVV immunisiert wurden, die für die 708 N-terminalen Aminosäuren kodieren, entwickelten die höchsten nAk-Titer im Synzytieninhibitionstest. Kaninchen, die mit rVV immunisiert wurden, die nur die 198 N-terminalen Aminosäuren kodieren, entwickelten die höchsten nAk-Titer im MT4-Test. Abschnitte auf beiden Glykoproteinen scheinen für die Induktion neutralisierender Ak wichtig zu sein. Die gleichzeitige Expression C-terminal von Aminosäure 708 gelegener Bereiche hingegen ist für die Induktion neutralisierender Ak ungünstig (1).
5. Diese Antikörper zeigen kreuzneutralisierende Eigenschaften. Sie neutralisieren nicht nur den Klon des Immundefizienzvirus, dessen env-Gen vom zur Immunisierung verwendeten rVV exprimiert wird, sondern auch verwandte Isolate (1a).
6. Hinweise auf die Notwendigkeit zellulären Antigens für die Induktion protektiver Immunmechanismen ergaben sich aus dieser Arbeit nicht.

7. Die Eignung der hier untersuchten Kaninchenserum zur Serumtherapie muß in Makaken untersucht werden (5). Die hohen Titer neutralisierender Ak in einzelnen Seren empfehlen den Einsatz dieser Seren zur experimentellen passiven Immunisierung von Makaken gegen HIV-2_{ben} und SIV_{mac}.

5 Summary: Jörg Schöffner: Examination of the immunogenicity of the glycoprotein of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) by immunization of rabbits with vaccinia virus recombinant for HIV-2 glycoprotein

Rabbits were immunized with recombinant vaccinia virus (rVV), expressing the entire glycoprotein (gp) of SIV_{mac} or HIV-2_{ben} or C-terminal truncated fragments of the HIV-2_{ben}-gp. Altogether, eight different rVV were used. Two rabbits were immunized with the same rVV. In detail, the immunization schedule consisted of three subsequent infections with rVV, followed by one immunization with either recombinant glycoprotein (rgp) separated by gel-electrophoresis or extracts of cells infected with the respective rVV. Both antigens were dissolved in complete Freund's adjuvant. Thereafter all rabbits were immunized four times with extracts of rVV-infected cells, dissolved in incomplete Freund's adjuvant.

The cellular immune response towards HIV-2 and SIV_{mac}-gp was determined by performing proliferation assays with the rabbits' peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

The quality and intensity of the humoral immune response towards HIV-2 and SIV_{mac}-gp was determined. The in vitro neutralizing activity of the rabbits' sera was determined by means of two different neutralization assays -MT4-assay and syncytial inhibition assay with detection of viral antigen in cell culture supernatant- using HIV-2_{ben} and SIV_{mac} as virus strains for neutralization.

A considerable cellular and humoral immune response directed against the native gp of HIV-2_{ben} and SIV_{mac} could be elicited by three subsequent immunizations with rVV in 15 out of 16 rabbits. One animal showed neither a cellular nor a humoral immune response towards the recombinant gene product after the three subsequent infections. It was only after the first immunization with rgp that HIV-2-gp-specific seroconversion and cellular immune response could be detected.

The intensity of the cellular immune response, i.e. gp-specific proliferation of PBMCs, and the humoral immune response, measured in a radioimmunoprecipitation and an enzyme linked immuno sorbent assay against the native or recombinant gp, were independent of the rVV used for immunization. That shows that the intensity of the immune response against the rgp elicited by an immunization with rVV is, within a wide range, completely independent of the size of the rVV-expressed protein.

The examination of the sera in two different virus-neutralization assays led to different results.

Using the MT-4-assay, sera of rabbits immunized with those rVV expressing only 198 or 332 N-terminal aminoacids of HIV-2, developed the highest titers of HIV-2_{ben}- and SIV_{mac}-neutralizing antibodies. This is a distinct proof for the existence of at least one neutralizing domain within the 198 N-terminal aminoacids of the HIV-2-gp. The fact that immunizations with VVenv198 or VVenv332 respectively do elicit higher titers of neutralizing antibodies in the immunized rabbits than those expressing larger fragments of the HIV-2-gp is a hint of different presentation of the N-terminus of HIV-2-gp by VVenv198 or VVenv332, respectively.

Regarding the results of syncytia inhibition assay with detection of virus antigen in the cell culture supernatant, sera of the animals immunized with rVV expressing the 708 N-terminal aminoacids of HIV-2-gp developed the highest titers of neutralizing antibodies. Titers of neutralizing antibodies of these animals were considerably higher than those of the rabbits immunized with rVV expressing complete or C-terminally further truncated HIV-2-gp. This can be considered as a clue to the effective presentation of neutralization-inducing regions within the N-terminal gp41 or the C-terminal gp130 by rVVenv708. Obviously, the use of rVV expressing a gp with a truncation of the 155 C-terminal aminoacids is superior to an immunization with a rVV expressing the entire gp160, regarding the induction of neutralizing antibodies directed against the N-terminus of gp41 or the C-terminus of gp130. It seems that those immunologically important regions are not presented in the same way to the B-cells by rVV expressing the whole env-gene as they are presented by rVV708.

From these results some conclusions can be drawn concerning the questions raised in the first chapter of this work (1.6).

1. Repeated immunizations up to three times with rVV are possible. Humoral and cellular immune response against the VV-recombinant gp were improved by three subsequent immunizations. There has been no induction of immunotolerance in the infected host during the immunization. The cellular immune response against the foreign gene product elicited by rVV-infection is much weaker than the one elicited against VV-antigen.
2. Further immunizations with extracts of rVV-infected cells continued to improve the humoral and cellular immune response against rgp.
3. Antibodies, neutralizing immunodeficiency viruses in vitro, were induced by the infection with rVV or the immunization with rgp. Further immunizations either with whole inactivated virus or native lentiviral gp were not necessary for the induction of neutralizing antibodies.
4. Independent of the test system neutralizing antibodies were detected with, the rVV expressing the complete HIV-2_{ben}-env-gene were not able to elicit the highest titers of neutralizing antibodies in the rabbits.

Other results concerning the induction of neutralizing antibodies are dependent on the test system used, in particular the target-cell line. Rabbits immunized with rVV, expressing the 708 N-terminal aminoacids of the HIV-2_{ben}-env-gene, developed highest titers of neutralizing antibodies in the syncytia inhibition assay. Rabbits immunized with rVV recombinant for the 198 N-terminal aminoacids developed highest antibody titers in an MT4-assay. Epitopes situated on both gp-fragments seem to be important for the induction of neutralizing antibodies. The co-expression of regions situated C-terminally of aminoacid 708 seems to be disadvantageous for the generation of neutralizing antibodies in the immunized host.

5. These antibodies show cross-reactive activities towards different immunodeficiency viruses.
6. From this work no conclusions can be drawn concerning the necessity of cellular antigen for the generation of protective immunity.
7. There is a need to investigate whether the sera of rVV-immunized rabbits will be appropriate for serum therapy. High titers of neutralizing antibodies in rabbits' sera do recommend these sera for an experimental passive immunization of immunodeficiency virus-infected macaques.