

DEC-VAC-Forscher aktivieren die Immunabwehr gegen HIV-Infektionen

Wo bleibt der HIV-Impfstoff?

Klaus T. Überla

Nur drei Jahre nach der Erstbeschreibung von AIDS identifizierten amerikanische und französische Forscher 1984 den Erreger der Immunschwächekrankheit – das HI-Virus. Das ließ Wissenschaft und Politik voreilig eine schnelle Lösung des Problems verkünden. Doch die Entwicklung eines HIV-Impfstoffs gleicht heute der „Chronik eines andauernden Scheiterns“. Fast unbemerkt entwickeln und prüfen Forscher derzeit einen Gen-basierten HIV-Impfstoff, von dem sie sich sehr viel erhoffen.

Seit über 20 Jahren sind Forscher weltweit intensiv darum bemüht, einen HIV-Impfstoff zu entwickeln. Bei 12 000 HIV-Neuinfektionen pro Tag bleibt dies eine der drängendsten Aufgaben biomedizinischer Grundlagenforschung. Aktuelle Computersimulationen der HIV-Epidemie bis in das Jahr 2030 lassen selbst bei massivem Ausbau aller verfügbaren Aufklärungs- und Behandlungsstrategien

keinen wesentlichen Rückgang an HIV-Infektionen erwarten. Dagegen weisen diese Simulationen HIV-Impfstoffen eine beträchtliche Wirkung zu – selbst wenn sie erst 2015 bei 40 Prozent der Bevölkerung zur Anwendung kämen und nur einen 70-prozentigen Schutz vor der HIV-Infektion bieten würden.

Auch wenn das Wissen über die AIDS-Pathogenese in den letzten 25 Jahren wie in kaum einem anderem Feld zugenommen hat, mussten Hoffnungen auf erfolgreiche Impfstoffstrategien immer wieder begraben werden. Die größte Hürde bilden dabei die biologischen Eigenschaften des Virus. Wie andere Viren auch, kommt HIV in zwei Phasen vor: als vollständiger Viruspartikel (Abb. 2) außerhalb und in seine Untereinheiten zerlegt innerhalb von Wirtszellen

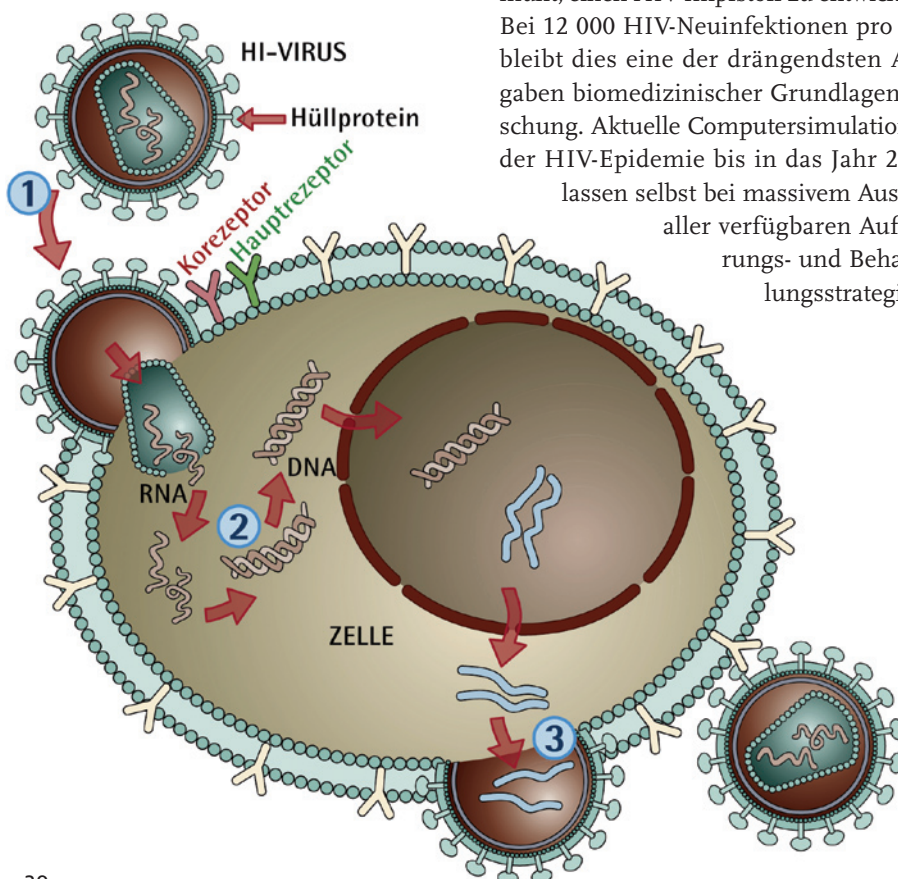
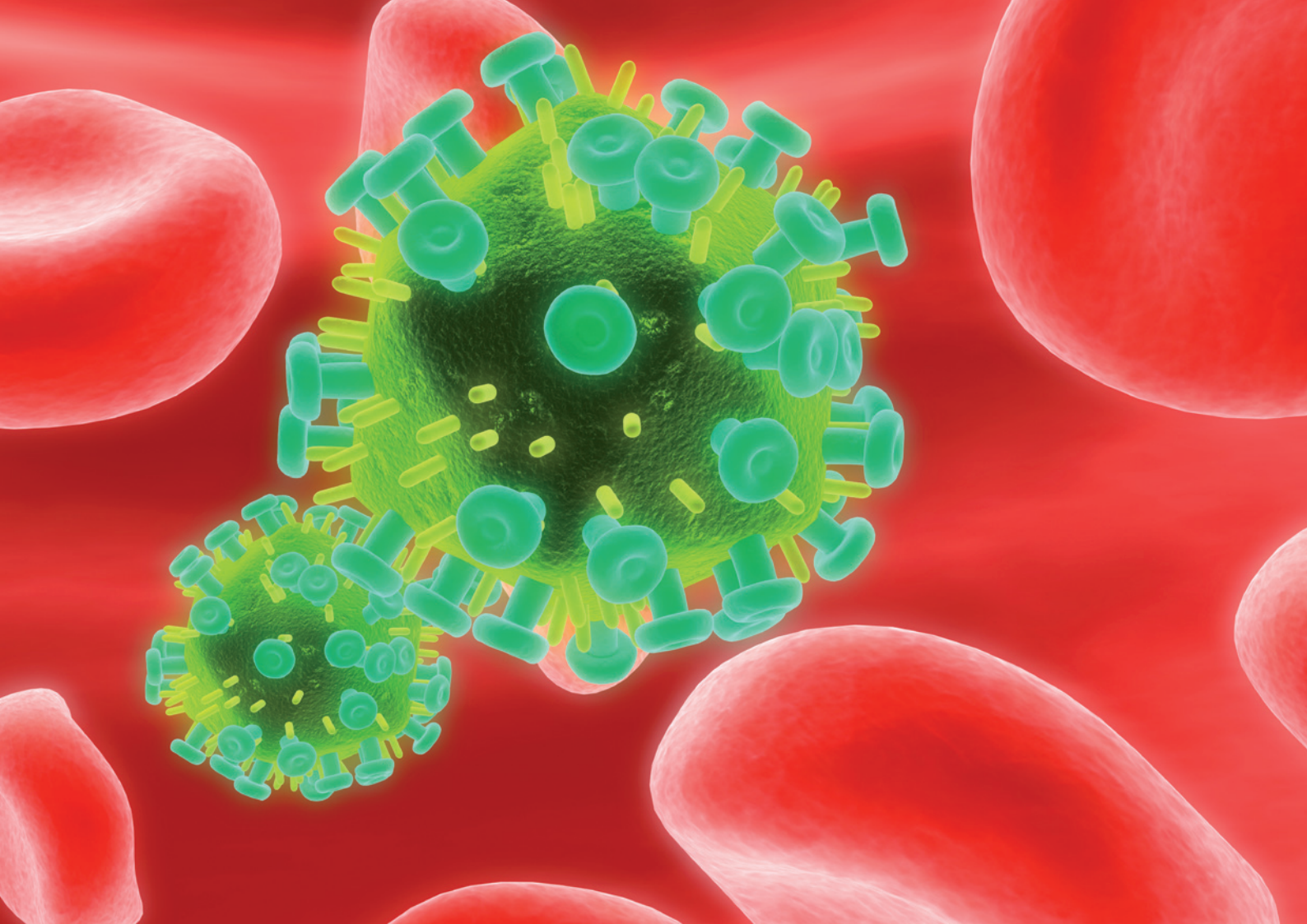


Abb. 1: HIV-Verbreitung: Das Virus dockt über Haupt- und Korezeptoren an die T-Helferzelle an. Mit der Fusion gelangt die HIV-RNA in die Zelle, wird in DNA zurückübersetzt und in die Wirts-DNA eingebaut. Die Zelle produziert Virusproteine, die sich mit Stücken der Zellmembran umgeben und so neue Viren bilden, die sich von der Zelle abknospen.



(s. Abb. 1). Dabei dient das Viruspartikel selbst nur der Übertragung des viralen Genoms von einer Wirtszelle zur nächsten bzw. von einem Individuum zum anderen. Innerhalb einer von einem einzigen Virus infizierten Wirtszelle kann sich der Erreger in zwei bis drei Tagen hundert- bis tausendfach vermehren.

Den zwei Phasen der Virusvermehrung stehen zwei Strategien der Erreger-spezifischen Immunantwort gegenüber – vermittelt durch Antikörper bzw. sog. zytotoxische T-Zellen. Antikörper sind lösliche Proteine des Blutes, die sehr selektiv virale Oberflächenbestandteile binden

HIV blockiert beide Strategien der Immunantwort: durch Antikörper und durch T-Zellen

und damit entweder den Eintritt des Virus in eine Wirtszelle verhindern (Neutralisation) oder das Viruspartikel zerstören können. Beide Mechanismen scheinen bei HIV unwirksam zu sein. Weil die für das Eindringen des Virus wichtigen Bereiche der viralen Oberflächenproteine für Antikörper überwiegend unzugänglich sind, werden keine neutralisierenden An-

Abb. 2: Zwei HI-Viren in der Blutbahn: Wenn eines der Viren an die T-Helferzellen (weiße Blutkörperchen) andockt und mit der Zelle fusioniert, setzt die Vermehrung der Viren ein. Mit den T-Helferzellen, den Hauptwirtszellen für HIV, greift das Virus quasi die Zentrale der Immunabwehr an: Denn sie sind für die Ausbildung von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen mitverantwortlich.

tikörper gebildet. Das Viruspartikel enthält außerdem zelluläre Proteine, die normalerweise die Zelle vor einer Antikörper-vermittelten Zerstörung schützen. Diese zellulären Proteine verhindern auch die Zerstörung des Virus durch die Antikörper. Die zweite Strategie unseres Immunsystems beruht auf zytotoxischen T-Zellen, die im Unterschied zu Antikörpern nicht das Viruspartikel, sondern die infizierte

Zelle erkennen. Dafür müssen aber den zytotoxischen T-Zellen kleine Bruchstücke (Peptide) des Virus durch spezialisierte Oberflächenproteine (MHC-Moleküle) der infizierten Zelle wie auf einem Tablett präsentiert werden. Wenn dann die zytotoxischen T-Zellen die infizierte Zelle zerstören, bevor diese Viruspartikel freisetzen kann, wird die Virusvermehrung beein-

trächtigt. Dieser Kontrolle des Immunsystems entgeht HIV, indem es die Präsentation der HIV-Peptide auf den MHC-Molekülen verhindert. Beide Strategien des Immunsystems verlieren zudem an Wirksamkeit, weil sich die viralen Zielstrukturen von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen nach der Infektion ständig verändern können. Das Immunsystem hinkt dem Erreger quasi immer hinterher.

Neben diesen molekularen Mechanismen schränkt die HIV-Infektion auch die Funktionsfähigkeit des Immunsystems ein. Denn die Hauptwirtszellen für HIV sind die sog. T-Helfer-Zellen des Immunsystems, die gerade für die Ausbildung von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen wichtig sind. Neuere Untersuchungen zeigen, dass bereits innerhalb weniger Wochen nach HIV-Infektion über die Hälfte der T-Helfer-Zellen zerstört ist, was auch die Immunantwort gegen HIV selbst beeinträchtigen dürfte.

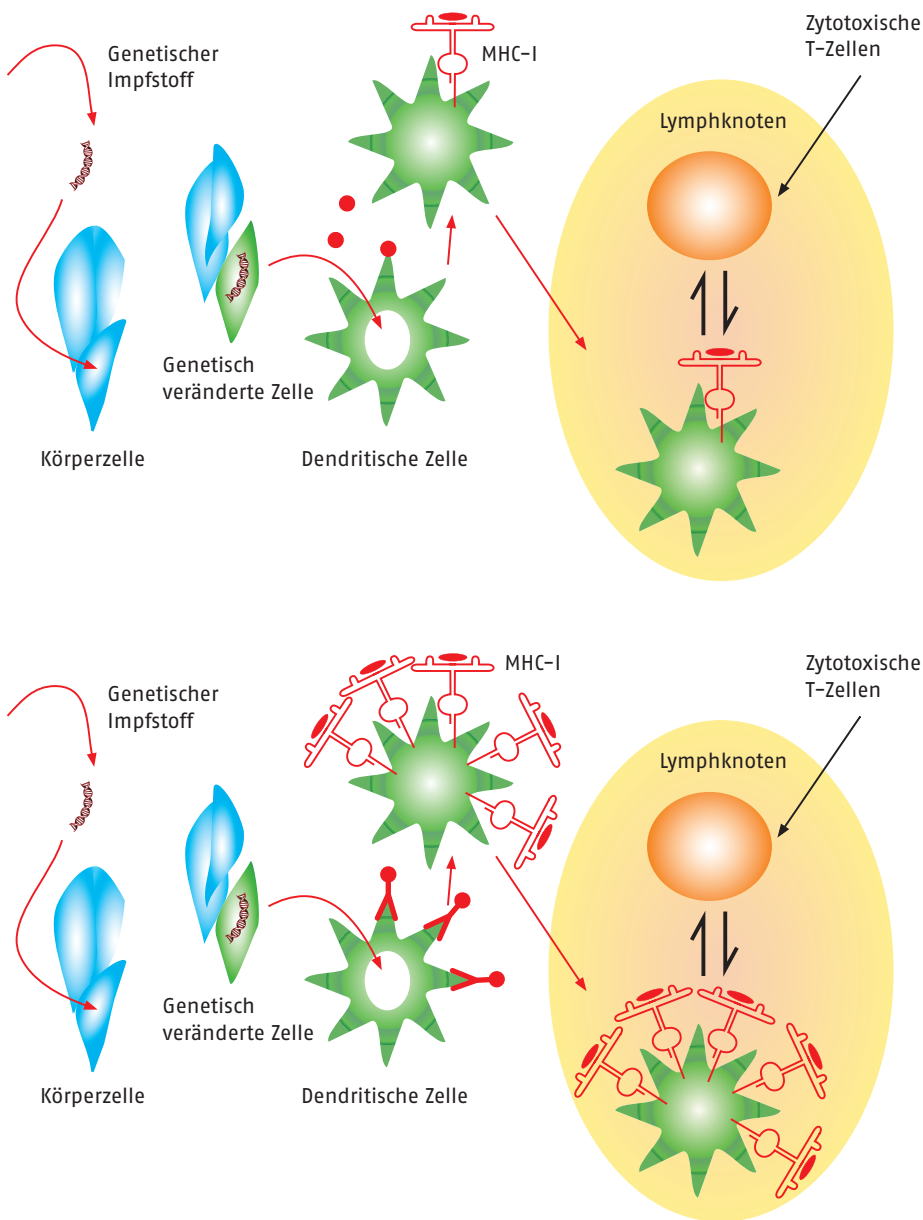


Abb. 3: Die Gen-basierte Impfung (oben) und das neue DEC-VAC-Verfahren (unten). Nach Injektion des genetischen Impfstoffes in den Muskel gelangt das Impf-Gen mit Hilfe von Genfähern in die Muskelzelle, die das Impfprotein (rote Kugel) bildet. Ein kleiner Teil der Impfproteine wird von dendritischen Zellen aufgenommen und auf MHC-I-Molekülen präsentiert. Dies setzt die zytotoxische T-Zell-Abwehr in den Lymphknoten in Gang. Beim DEC-VAC-Verfahren ist das Impfprotein mit Antikörpern gegen das Oberflächenprotein DEC205 gekoppelt, was die Aufnahme des Impfproteins durch dendritische Zellen und damit die zytotoxische Abwehr verbessert.

Ziel von Impfstoffen muss es daher sein, dieser fatalen Entwicklung frühzeitig entgegen zu wirken. Dass inzwischen einige wenige Antikörper identifiziert werden konnten, die verschiedene HIV-Isolate doch neutralisieren, bestärkt den Weg, mit Hilfe gentechnischer Impfstoffe die Bildung solcher Antikörper auszulösen und damit Neuinfektionen zu verhindern. Auch zytotoxische T-Zellen sind nicht unwirksam. Wenn sie auch nicht in der Lage

sind, Virus-infizierte Zellen komplett zu eliminieren, so reduzieren sie doch die Virusbelastung während der akuten Infektion tausend- bis hunderttausendfach. Darüber hinaus zeigte sich in sog. Tiermodellen, dass mit vermehrungsfähigen, abgeschwächten Immundefizienzviren (Lebendimpfstoff) ein Schutz vor AIDS-Erkrankungen möglich ist. Auch wenn diese Impfstrategie beim Menschen aus Sicherheitsgründen kaum zum Einsatz

kommen dürfte, gibt sie doch Hoffnung, dass sich ein wirksamer HIV-Impfstoff prinzipiell entwickeln lässt. Im Gegensatz zu den sog. Lebendimpfstoffen erwiesen sich die auf inaktivierten Viruspartikeln oder auf gentechnisch hergestellten viralen Proteinen beruhenden „Totimpfstoffe“ als wenig wirksam. Deshalb verfolgt die Forschung gegenwärtig intensiv die Strategie der Gen-basierten Impfstoffe, indem einige Aspekte von „Lebendimpfstoffen“ – ohne deren Sicherheitsrisiken – aufgegriffen werden.

Die Vorteile der Gen-basierten Impfstoffe beruhen vor allem auf der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen. Bei Gen-basierten Impfstoffen wird nicht das virale Protein verabreicht, gegen das geimpft werden soll, sondern ein Gen, das die Bildung dieses Proteins nach der Impfung ermöglicht (Abb. 3). So genannte Genfähern helfen, diese Gene nach der Impfung effizient in die Zellen einzuschleusen. Als Genfähern werden häufig Viren verwendet, da sie ihr Erbgut sehr effizient von einer Zelle zur nächsten übertragen. Als virale Genfähern (Vektoren) dienen gut charakterisierte, für Menschen ungefährliche Viren. Diese Vektoren sind gentechnisch so verändert, dass sie sich nicht mehr vermehren können. So lässt sich z.B. das Gen für das HIV-Hüllprotein in das Genom eines gentechnisch veränderten Adenovirus, ein meist harmloses Atemwegsvirus, einsetzen. Dieser adenovirale Vektor kann in Zellkultur unter bestimmten Bedingungen vermehrt und gereinigt werden. Nach Injektion (Impfung) der adenoviralen Vektorpartikel wird das Gen für das HIV-Hüllprotein in die Zellen eingeschleust und bewirkt dort die Synthese des Hüllproteins. Das Immunsystem reagiert mit der Bildung von Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen, die beide gegen das HIV-Hüllprotein gerichtet sind. Dabei werden – wie nach einer natürlichen viralen Infektion – die Bruchstücke des viralen Hüllproteins (Peptide) auf der Oberfläche der Zellen von bereits vorhandenen zytotoxischen T-Zellen erkannt. Für die Erstausbildung zytotoxischer T-Zellen nach einer Impfung müssen jedoch zunächst spezialisierte Zellen des Immunsystems, sog. dendritische Zellen, die viralen Peptide aufnehmen und prä-

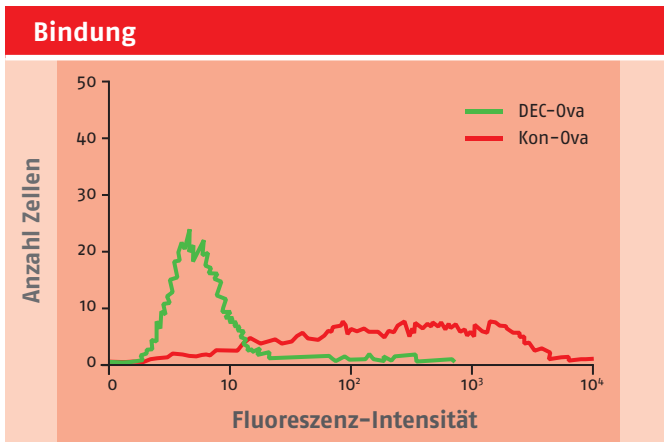


Abb. 4: Der Antikörper des Fusionsproteins sorgt für dessen Bindung an die dendritische Zelle. Den Nachweis erbringt die deutliche Zunahme der Fluoreszenz-Intensität einzelner Zellen nach Anfärbung mit dem Fusionsprotein (DEC-Ova) im Vergleich zur Fluoreszenz-Intensität der Kontrolle (Kon-Ova).

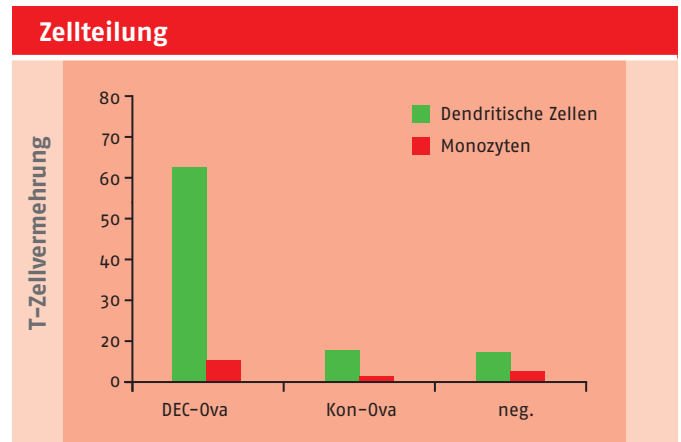


Abb. 5: Der Antikörper verstärkt die Aufnahme und Präsentation des Fusionsproteins, denn die dendritischen Zellen, die das Fusionsprotein aus Antikörpern gegen DEC205 und Testprotein (Ovalbumin) erhielten, regen die T-Zellen zur Teilung an (Kontrolle: Monozyten).

sentieren. Denn nur dendritische Zellen sind in der Lage, unreifen zytotoxischen T-Zellen die notwendigen Aktivierungs- und Differenzierungssignale zu vermitteln. Auf dendritischen Zellen basierende Impfverfahren haben etwa im Rahmen

dendritische Zellen isoliert, in Zellkultur mit dem Impfstoff beladen und anschließend aktiviert. Für die Immunisierung werden den Patienten dann diese maßgeschneiderten dendritischen Zell-Impfstoffe gespritzt. Für eine breite prophylaktische

wäre ein Gen-basierter Impfstoff, der im menschlichen Organismus dendritische Zellen ansteuert und diese aktiviert. Genau dies ist das Ziel des von der Ruhr-Universität Bochum koordinierten EU-Verbundprojektes DEC-VAC (s. Info). Die durch Gen-basierte Impfstoffe gebildeten viralen Proteine sind dabei an Antikörper gekoppelt, die an ein zelluläres Oberflächenprotein von dendritischen Zellen binden. Als vielversprechende Zielstruktur hat sich dabei das Oberflächenprotein DEC205 erwiesen. Wie unser Kooperationspartner Prof. Dr. Ralph Steinman

Vorteil Gen-basierter Impfstoffe: Erst nach der Impfung wird das virale Protein gebildet

einer therapeutischen Immunisierungsstudie bei HIV-Patienten bereits eindrucksvolle Ergebnisse gezeigt. Dabei werden aus dem Blut der zu Impfinden zunächst den-

Impfung gegen HIV-Infektionen kommt dieses Verfahren jedoch nicht in Frage, da für jeden Patienten ein eigener Impfstoff hergestellt werden müsste. Wegweisend

info

DEC-VAC-Projekt entwickelt und prüft HIV-Impfstoff

Ziel des EU-Projektes DEC-VAC (Development of a Dendritic Cell-targeted Vaccine against AIDS) ist es, die Immunogenität und Wirksamkeit von Gen-basierten HIV-Impfstoffen im Maus- und Rhesusaffenmodell zu überprüfen. Gen-basierte Impfstoffe bewirken die Bildung von Fusionsproteinen, bestehend aus viralen Proteinen und Antikörpern. Indem die Fusionsproteine an spezielle Oberflächenproteine (DEC205) von spezialisierten Zellen des Immunsystems (dendritische Zellen) binden, soll die Immunabwehr gegenüber HIV-Infektionen aktiviert werden. An dem durch das 6. Forschungsrahmenprogramm der Europäischen Union von 2006 bis Ende 2009 mit 3,4 Millionen Euro geförderten und von der Bochumer Gruppe unter

Leitung von Prof. Dr. Klaus Überla koordinierten Projekt sind neun weitere Forschergruppen beteiligt: Rockefeller-Universität, New York (Prof. Dr. R. Steinman), Swedish Institute for Infectious Disease Control (Prof. Dr. B. Wahren), German Primate Center, Göttingen (Dr. C. Stahl-Henning), Charité, University Medicine of Berlin (PD Dr. R. Ignatius), Bernhard-Nocht-Institute for Tropical Medicine (Prof. Dr. P. Racz/ Dr. K. Tenner-Racz), Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona (Dr. M. Ugucioni), GeneArt GmbH (Prof. Dr. R. Wagner), Innsbruck Medical University (Prof. Dr. H. Stoiber), Université des Montagnes, Cameroon (Prof. Dr. L. Kaptue). ► Weitere Informationen: <http://www.ruhr-uni-bochum.de/virologie/>

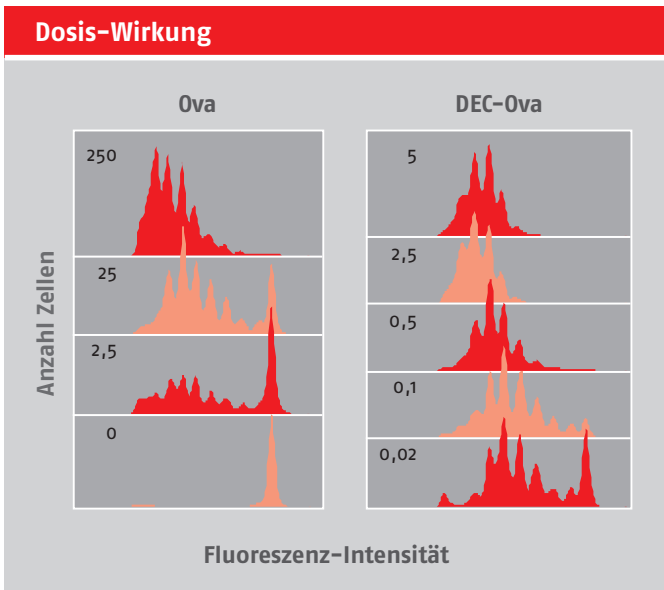


Abb. 6: T-Zellen in Mäusen aktiviert: Die Abnahme der Fluoreszenzintensität der T-Zellen steht für deren erhöhte Teilungsaktivität. Das Fusionsprotein (Ovalbumin und DEC-Antikörper) bewirkt bei einer Dosis von nur 0,1 µg eine stärkere T-Zell-Teilung als eine 25 µg-Dosis bei alleiniger Impfung mit dem Testprotein Ovalbumin.

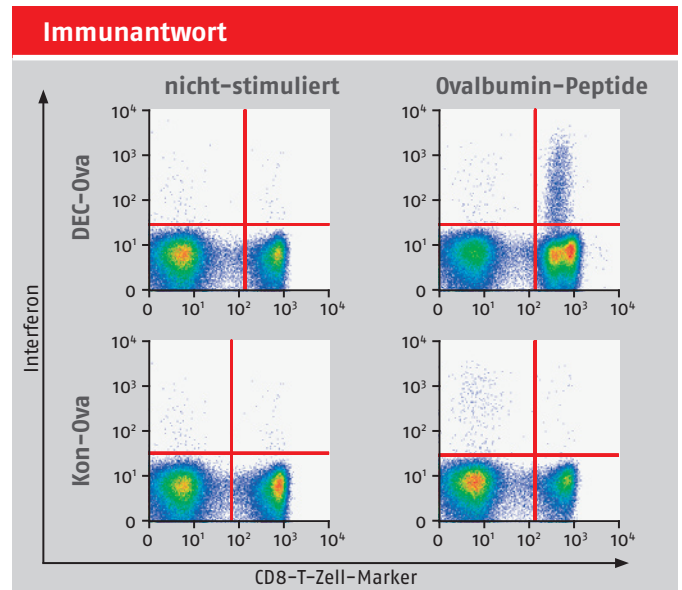


Abb. 7: Interferon-Immunantwort in Mäusen ausgelöst: Nach Impfung mit dem Gen-basierten Impfstoff und einer anschließenden Auffrischungsimpfung wurden Milzzellen der Tiere mit Ovalbumin-Peptiden stimuliert und für Interferon und einen zytotoxischen T-Zell-Marker (CD8) angefärbt. Die mit dem Fusionsprotein (DEC-Ova, Abb. oben) behandelten T-Zellen ließen sich im Vergleich zur Kontrolle (Kon-Ova, Abb. unten) zur Interferon-Bildung anregen.

(Rockefeller University, New York) zeigen konnte, ermöglicht DEC205 die effiziente Präsentation von viralen Peptiden, die an einen Antikörper gegen DEC205 gekoppelt sind, auf der Oberfläche von dendritischen Zellen. Um diesen Ansatz auf Gen-basierte Impfstoffe zu übertragen, haben wir in den ersten 18 Monaten des DEC-VAC-Projektes spezielle Antikörper gegen DEC205 hergestellt, die mit „Impfproteinen“ gekoppelt werden können. Hierbei wurde zunächst kein „HIV-Impfprotein“ fusioniert, sondern das Pro-

Um festzustellen, ob der Antikörper die Aufnahme und Präsentation von Ovalbumin durch dendritische Zellen verstärkt, injizierten wir dieses Fusionsprotein in einem nächsten Schritt Mäusen, aus denen wir am Tag darauf dendritische Zellen isolierten und mit Ovalbumin-spezifischen T-Zellen mischten. Es zeigte sich, dass nur dendritische Zellen von Mäusen, die das Fusionsprotein aus Antikörpern gegen DEC205 und Ovalbumin erhielten, die T-Zellen zur Teilung anregten (s. Abb. 5). Dies weist deutlich auf eine verbesserte

nahme der Fluoreszenzintensität der T-Zellen deren Teilungsaktivität an. Im Vergleich zu Ovalbumin führte das Fusionsprotein bereits in 100-fach niedriger Dosis zur Vermehrung der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen (s. Abb. 6).

Die Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen führt nicht nur zur Zellteilung, sondern auch zur Produktion von Hormonen des Immunsystems, wie etwa den Interferonen. Um diese Immunantwort zu überprüfen, injizierten wir Mäusen zunächst den Gen-basierten Impfstoff, es folgte eine Auffrischungsimpfung mit dem Fusionsprotein oder einem Ovalbumin-Kontroll-Protein. Anhand von Milzzellen der immunisierten Mäuse, die in Zellkultur mit Ovalbumin-Peptiden stimuliert wurden, konnten wir dann durch Fluoreszenzdoppelfärbungen (zytotoxische T-Zellen und Interferon-γ) tatsächlich Interferon-γ-produzierende, Ovalbumin-spezifische zytotoxische T-Zellen nachweisen. Die Immunisierung mit dem Fusionsprotein hatte die Bildung des Interferons angeregt (s. Abb. 7).

Wir hoffen nun, diese Ergebnisse durch die derzeitigen Untersuchungen mit HIV-Fusionsproteinen bestätigen zu können.

Erste Erfolge: Durch Gen-basierten Impfstoff Immunantwort im Tiermodell ausgelöst

tein Ovalbumin, da sich Immunantworten gegen Ovalbumin sehr gut untersuchen lassen. Um festzustellen, ob die veränderten Antikörper an DEC205 binden, wurde eine DEC205 tragende Zelllinie mit dem Fusionsprotein aus Antikörper und Ovalbumin versetzt. Zuvor wurde das Fusionsprotein mit einem Ovalbumin-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Bei Verwendung eines Antikörpers gegen DEC205 nahm die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen deutlich zu (Abb. 4).

Aufnahme und Präsentation des Fusionsproteins durch die dendritischen Zellen hin. Um nachzuweisen, ob sich die T-Zellen auf diese Weise auch im Organismus aktivieren lassen, injizierten wir erneut Mäusen das Fusionsprotein oder nur Ovalbumin. Zusätzlich erhielten diese Mäuse aber auch Ovalbumin-spezifische T-Zellen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt waren. Da sich nach jeder Zellteilung der Fluoreszenzfarbstoff auf beide Tochterzellen verteilt, zeigt die Ab-

Damit die an HIV-Proteine gekoppelten Antikörper nach der Impfung möglichst effizient gebildet werden, wurden die entsprechenden Gene hinsichtlich ihrer RNA-Stabilität und Kodon-Verwendung (Kodierung viraler Proteine) durch unseren kommerziellen Projektpartner (Firma GeneArt) unter Leitung von Prof. Dr. Ralf Wagner optimiert. Diese Gene haben wir inzwischen in der Bochumer Arbeitsgruppe in eine adenovirale Genfahre eingebaut, um die Übertragung der Impfgene zu verbessern. Gleichzeitig konnte durch den Immunologen Ralph Steinman, die Pathologen Prof. Dr. Paul und Dr. Klara Tenner-Racz (Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg) und die Veterinärmedizinerin Dr. Christiane Stahl-Hennig (Deutsches Primatenzentrum, Göttingen) nachgewiesen werden, dass auch in Rhesusaffen Antikörper

gegen DEC205 von dendritischen Zellen gezielt aufgenommen werden. Die durch die Impfung mit den DEC205-gerichteten Gen-basierten Impfstoffen ausgelösten Immunantworten werden gegenwärtig durch die Kooperationspartner an der Rockefeller University, der Ruhr-Universität, des Swedish Institute for Infectious Disease Control und der Medizinischen Universität Innsbruck in verschiedenen Tiermodellen analysiert. Erste Ergebnisse zeigen, dass Gen-basierte, sog. DEC205-gerichtete, Impfstoffe eine drastische Dosisreduktion erlauben. Gleichzeitig versuchen wir gemeinsam mit den Arbeitsgruppen von PD Dr. Ralf Ignatius (Charité, Berlin) und Dr. Mariagrazia Ugucconi (Institute for Biomedical Research, Bellinzona) Zusatzstoffe, sog. Adjuvantien, zu entwickeln, welche die Immunantwort verstär-

ken. Entscheidend für die Weiterentwicklung der Gen-basierten DEC205-gerichteten Impfstoffe werden die Ergebnisse aus Rhesusaffenexperimenten sein, in denen auch die Wirksamkeit, d.h. der Schutz vor einer Immundefizienzvirus-Infektion bzw. vor der AIDS-Erkrankung untersucht werden kann. Wir hoffen, dass uns diese Ergebnisse unserem Ziel – dem Gen-basierten Impfstoff gegen HIV-Infektionen – ein großes Stück näher bringen werden. Sie sind im dritten und vierten Jahr des DEC-VAC-Projektes zu erwarten.

Prof. Dr. Klaus T. Überla
Molekulare und Medizinische Virologie
Medizinische Fakultät