



*Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) sind nach wie vor ein globales Problem und ein Impfstoff lässt bisher noch auf sich warten. Da es bis heute noch keine breit anwendbare Methode gibt, um eine erfolgte HIV-Infektion zu heilen, kann die HIV-Pandemie nur gestoppt werden, wenn Neuinfektionen verhindert werden. Obwohl bereits diverse Impfstoffkandidaten für einen HIV-Impfstoff in klinischen Studien getestet wurden, konnte bisher in den Proband\*innen keine schützende Immunantwort im ausreichenden Maße stimuliert werden. Das Hauptziel der derzeitigen Anstrengungen ist es, eine potente neutralisierende Antikörperantwort gegen HIV zu induzieren. Diverse Schutzmechanismen des Virus stehen diesen Anstrengungen im Weg und Antikörper können mehr als Virus neutralisieren...*

# Die HIV-Pandemie

Ein Problem weltweit, auch in Deutschland

Von Christina B. Karsten

Am 5. Juni 1981 publizierten Wissenschaftler\*innen des amerikanischen Center for Disease Controls (CDC) eine ungewöhnliche Beobachtung: In Los Angeles hatten fünf zuvor gesunde junge schwule Männer schwere Pneumocystis-Pneumonien entwickelt. Das war bemerkenswert, da diese seltene Erkrankung in den USA normalerweise nur bei Patient\*innen mit einem schwer beeinträchtigten Immunsystem diagnostiziert wurde. Am selben Tag meldete ein weiterer Mediziner dem CDC, dass in New York und Kalifornien die seltene Krebserkrankung Karposi-Sarkom

mit besonders aggressiven Verläufen bei einer Gruppe von jungen schwulen Männern diagnostiziert wurde. Das Karposi-Sarkom, das in der Regel nur bei älteren Männern mediterranen Ursprungs beschrieben wurde, ist wie die Pneumocystische-Pneumonie ebenfalls mit einer Schwächung des Immunsystems assoziiert. Nach Veröffentlichung dieser beiden Beobachtungen folgte eine Flut von weiteren Meldungen an das CDC. Diese machten bald deutlich, dass bei Männern, die Sex mit Männern haben (MSM), eine neues Krankheitsbild zu beobachten war. Dieses wurde erworbenes

Immunschwächesyndrom (Englisch: acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)) benannt. AIDS wurde definiert als Krankheitsbild, bei dem es nach einem langfristigen Verlust von CD4+ T-Zellen zu einem Zusammenbruch des Immunsystems und in dessen Folge zum Erwerb von opportunistischen Infektionen, sowie der Ausbildung von bestimmten Krebsarten und weiteren Syndromen wie zum Beispiel Demenz kommt. Nur kurze Zeit nach der Entdeckung von AIDS im Jahr 1983 wurde das humane Immundefizienzvirus (HIV) zum ersten Mal von einem Patienten iso-

liert, der Symptome zeigte, die AIDS vorausgehen können (pre-AIDS). Unter dem Elektronenmikroskop zeigte sich, dass es sich bei HIV um ein umhülltes Virus aus der Familie der Retroviren handelt, dessen Erbinformation auf zwei positiv orientierten RNAs kodiert ist, die sich in einem konischen Capsid befinden. Für ihre Entdeckung von HIV wurden Luc Montagnier und Françoise Barré-Sinoussi vom Institut Pasteur in Frankreich mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Ebenfalls 1983 gelang es Robert Gallo und seinem Team am amerikanischen National Cancer Institute HIV von 48 weiteren Personen zu isolieren, die noch gesund waren, aber mit hoher Wahrscheinlichkeit AIDS entwickeln würden, sowie von weiteren Individuen mit pre-AIDS oder AIDS-Symptomen. Sie konnten von 47 Prozent der Patient\*innen mit pre-AIDS- oder AIDS-Symptomen HIV isolieren, was dazu führte, dass HIV von der wissenschaftlichen Gemeinschaft als Verursacher von AIDS anerkannt wurde.

HIV hat sich seit seinem ersten Auftreten weltweit verbreitet. Es kann sexuell übertragen werden, durch kontaminierte Blutprodukte, kontaminiertes Nadelbesteck bei intravenösen Drogengebrauch, sowie von der Mutter auf das Kind während der Geburt und des Stillens. Die *World Health Organization* schätzt, dass 2019 insgesamt 38 Millionen Menschen mit einer HIV-Infektion gelebt haben. Der am stärksten betroffene Kontinent ist dabei Afrika mit 25,7 Millionen HIV-Infizierten. Im selben Jahr verstarben 690.000 Personen aufgrund ihrer Infektion, und 1,7 Millionen Menschen infizierten sich neu. Die weltweite HIV-Pandemie ist auch in Deutschland noch ein Problem, es ist nur weniger sichtbar geworden als dieses noch der Fall zu Beginn der HIV-Pandemie war. Grund dafür ist der Erfolg von Präventionsmaßnahmen, die Neuinfektionen verhindern können, und der einfache und vermehrte Zugang zu HIV-

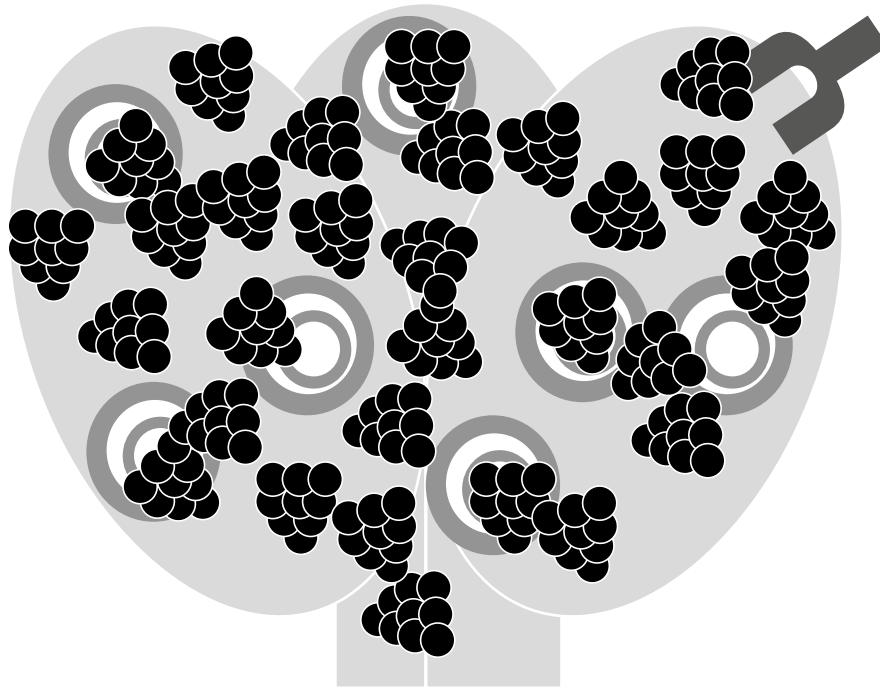
Tests, die Personen ermöglichen, ihre HIV-Infektion früher zu erkennen. Da antiretrovirale Medikamente das Auftreten von AIDS verzögern oder verhindern können, trägt auch die verbesserte Medikamentenversorgung der Infizierten dazu bei, dass HIV weniger als gesundheitliche Bedrohung wahrgenommen wird. Nach den letzten Schätzungen des Robert-Koch-Instituts (Stand 2018) leben in Deutschland aber immer noch 87.900 Personen mit HIV (19.300 in NRW), von denen sich 10.600 ihrer Infektion (2.200 in NRW) nicht bewusst sind. Die Anzahl der Erstinfektionen pro Jahr ist weltweit rückläufig, dennoch infizierten sich 2018 noch 2.400 Menschen in Deutschland neu mit HIV. Da es bis heute noch keine breit anwendbare Methode gibt um eine erfolgte HIV-Infektion zu heilen, kann die HIV-Pandemie nur gestoppt werden, wenn Neuinfektionen verhindert werden.

### **Warum haben wir bis heute keinen Impfstoff gegen HIV?**

Obwohl bereits diverse Impfstoffkandidaten für einen HIV-Impfstoff in klinischen Studien getestet wurden, konnte bisher in den Proband\*innen keine schützende Immunantwort im ausreichenden Maße stimuliert werden. Das Hauptziel der derzeitigen Anstrengungen ist es, eine potente Antikörperantwort zu induzieren, da Antikörper den Schutz in fast allen bekannten Impfstoffen vermitteln. Antikörper können neutralisierend und nicht-neutralisierend wirken. Neutralisation meint, dass ein Antikörper ein Pathogen bindet und dadurch verhindert, dass dieses eine uninfizierte Zelle attackieren kann, um sich darin weiter zu vermehren. Antikörper, die nicht-neutralisierende Funktionen ausüben, binden ebenfalls Pathogene oder infizierte Zellen. Danach stimulieren sie diverse Immunzellen, die Gefahr zu beseitigen oder aber sie ermöglichen die Ablagerung von Komplementfaktoren, die zur Zerle-

gung des Ziels führen. Antikörperneutralisation ist ein viel erforschter Prozess und die Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch einen HIV-Impfstoff-Kandidaten war lange das ausschließliche Ziel der Antikörper-basierten Impfstoffforschung. Dafür spricht, dass neutralisierende Antikörper die Infektion mit HIV im Tiermodell verhindern und die Infektion im Menschen kontrollieren können. Die Forschungsgemeinschaft wurde aber im Jahr 2009 davon überrascht, dass in der RV144-Studie, der bisher einzigen Impfstoff-Studie, bei der ein Schutz gegen HIV vermittelt werden konnte, nicht-neutralisierende Antikörper scheinbar die Zahl der Neuinfektionen verringerten<sup>1</sup>. Seitdem wird auch die nicht-neutralisierende Antikörperantwort verstärkt erforscht und ist als mögliches Endziel eines erfolgreichen Antikörper-basierten Impfstoffs gegen HIV anerkannt. Die alleinige Zielstruktur für eine Antikörperantwort ist das Hüllprotein von HIV (siehe Abb.), da es das einzige von außen zugängliche Protein ist. Das Hüllprotein ist ein Trimer aus Heterodimeren, die selbst aus den Proteinen gp120 und gp41 bestehen. Das Protein gp120 erlaubt dem Virus sich an den CD4-Rezeptor und Co-Rezeptoren von infizierbaren Zellen zu binden. Das Protein gp41 verankert gp120 in der Membran des Virus und, nachdem gp120 an seine Rezeptoren gebunden hat, ermöglicht gp41 die Fusion des Virus mit den Zellen. Durch diesen Prozess wird das Erbgut übertragen, sodass neue Viren hergestellt werden können. Das Hüllprotein ist damit nicht nur das einzig mögliche Ziel eines Impfstoffs, es ist auch ein essentielles Protein für die Vermehrung und Weiterverbreitung des Virus.

Es gibt viele Faktoren von denen angenommen wird, dass sie eine wichtige Barriere bei der Entwicklung eines Antikörper-basierten Impfstoffs darstellen und deren Effekte vermutlich kumulativ wirken. Besondere Bedeutung haben



### (1) Das Hüllprotein von HIV

Das Hüllprotein von HIV ist ein Trimer auf der Oberfläche des Virus, welches essentiell für die Infektion von neuen Zellen und damit die Vermehrung des Virus ist. Jedes Trimer besteht aus der Untereinheit gp120 (oberer Teil der Abb.) mit dem die Zielzelle gebunden werden kann und der Untereinheit gp41 (unterer Teil der Abb.), welche das Protein in der Virusmembran verankert und die Fusion mit einer gebundenen Zielzelle ermöglicht. Das Hüllprotein ist die einzige virale Struktur, die auf der Oberfläche des Virus präsentiert wird, und damit auch der einzige mögliche Angriffspunkt für das Immunsystem. Eine wichtige Barriere für die Entwicklung einer HIV-Impfstoffs ist die dichte Decke aus Körper-eigenen Zuckern, mit denen das Virus sein Hüllprotein bedeckt. Das Zuckerschild von HIV täuscht dem Immunsystem vor, dass es sich beim Hüllprotein um ein Körper-eigenes Protein handelt und blockiert zusätzlich die Bindung von Antikörpern an mögliche Zielstrukturen des Hüllproteins.

Quelle: Paran Pour

jedoch die vielfältigen Schutzmechanismen des HIV-Hüllproteins, die eine effektive Erkennung des Virus durch das Immunsystem verhindern. So gibt es auf der Oberfläche von HIV nur ungefähr 14 Hüllproteine pro Virus und damit sehr wenig Angriffspunkte für das Immunsystem, während zum Beispiel SARS-CoV-2, ein Virus mit kleinerer Größe, etwa 24 Spike-Proteine in seine Membran einbaut. Diese Hüllproteine sind aber auch nicht alle funktional, denn HIV präsentiert dem Immunsystem auch sogenannten Hüllprotein-Müll (Env junk). Dieser besteht zum Beispiel aus Hüllproteinen, die sich aufgrund ihrer Instabilität in Einzelteile zerlegt haben, sodass gp120 an die Umgebung abgegeben wird und

gp41-Stümpfe auf der Virusoberfläche zurückbleiben. Eine weitere Form von Hüllprotein-Müll sind Hüllproteine, die als Monomer statt als Trimer vorliegen oder die falsche Konformationen eingenommen haben. Hüllprotein-Müll ist sehr immunogen, induziert aber Immunantworten, die ein funktionales Hüllprotein nicht attackieren können. Daher wird die Präsentation von Hüllprotein-Müll auf der Oberfläche von HIV und in der Form des sekretierten gp120 als ein Schutzmechanismus des Virus vor einer effektiven Erkennung durch das Immunsystem betrachtet.

Ein weiterer Schutzmechanismus von HIV, der der Entwicklung eines Impfstoffs im Wege steht, ist die extrem hohe Mutationsrate des Virus.

Viren mit RNA-Genom sind allgemein dafür bekannt, hohe Mutationsraten zu besitzen und sogar ganze Segmente ihres Genoms austauschen können – der Grund, warum wir uns jedes Jahr neu gegen das Influenza-Virus impfen lassen müssen. Die Menge an Mutationen, die das virale Enzym Reverse Transkriptase in das Genom von HIV einbaut, während es dieses in einem Zwischenschritt zur Vermehrung des Virus in DNA übersetzt, ist aber selbst unter RNA-Viren einzigartig. Es konnte gezeigt werden, dass in einem\*<sup>r</sup> einzigen mit HIV infizierten Patient\*<sup>n</sup> in die zirkulierenden Viren mehr genetische Diversität aufweisen als sie in einem Jahr weltweit für Influenza zu beobachten ist. Das hat zur Folge, dass die Bereiche des Hüllproteins,

die verzichtbar für die Funktion des Hüllproteins sind, genetisch sehr variieren können. Wenn das Hüllprotein im Virusschwarm eines\*r Infizierten aber immer anders aussieht, kann das Immunsystem nicht zuverlässig erkennen, dass eine systemische Infektion vorliegt. Zusätzlich wird die Ausbildung der adaptiven Immunantwort erschwert. Wiederholtes Erkennen von Pathogenen durch Immunzellen ist notwendig, um diese zu schulen, damit sie beim nächsten Zusammentreffen mit dem Pathogen diesen schnell und wirksam bekämpfen können.

Die wenigen funktionalen Hüllproteine, die auf der Oberfläche von HIV zu finden sind, haben nicht nur hochvariable Aminosäuresequenzen, sondern sind auch noch von einer dichten Hülle aus Zuckern bedeckt. Alle Zellen und die Mehrheit der Proteine im menschlichen Körper tragen Zucker auf ihrer Oberfläche. Zucker gilt als einer der Grundsteine des Lebens und ist essentiell für die Entwicklung und Funktionen von Lebewesen. Da HIV sich in menschlichen Zellen vermehrt, wird es wie andere menschliche Proteine auch durch zuckerverarbeitende Enzyme modifiziert (glykosyliert). Jedoch ist auch hier das Hüllprotein von HIV ein Sonderfall, denn es ist kein anderes Protein bekannt, welches einen dichteren Zuckerbesatz besitzt. Durchschnittlich 25 Bindestellen für Zucker befinden sich auf einem gp120-Molekül. Die Menge der Zucker ist so groß im Verhältnis zum Protein gp120, dass sie für etwa 50 Prozent der Masse von gp120 verantwortlich sind. Da die Zucker vom Körper selbst hergestellt werden und gp120 fast vollständig mit diesen bedeckt ist, ist es für das Immunsystem sehr schwer, das darunterliegende Protein des Virus zu binden und als körperfremde, bekämpfungswerte Struktur zu erkennen. Deshalb wird die Zuckerhülle von HIV auch als Zuckerschild bezeichnet, welches insbesondere die Erkennung des Virus durch Antikörper sehr erfolgreich unterbinden kann.

### **Das Zuckerschild des HIV Hüllproteins – mehr als „nur“ ein Schutzmechanismus**

Die an gp120 gebundenen Zucker gehören fast ausschließlich zur Klasse der N-verknüpften Glykane (kurz N-Glykane). N-Glykane macht aus, dass diese an ein Asparagin (= N im Code für Aminosäuren) in einer Erkennungssequenz (Sequon) von „Asparagin, jede Aminosäure außer Prolin, Serin oder Threonin“ binden. Sie besitzen außerdem eine gemeinsame Kernstruktur aus den immer gleichen Zuckerspezies mit bis zu vier abstehenden Zuckerketten, die aus verschiedenen Zuckerspezies aufgebaut sein können. Die N-Glykane werden an das Hüllprotein von HIV im endoplasmatischen Retikulum angehängt, während die RNA-Vorlage des Moleküls in seine Proteinsequenz übersetzt wird. Der Einbau von einigen der N-Glykane in bestimmte Sequons ist absolut essentiell für die korrekte Faltung des Hüllproteins, während andere Sequons unbesetzt bleiben können. Nachdem das Hüllprotein korrekt gefaltet wurde, wird es in den Golgi-Apparat transportiert. Dort können die Zuckerketten einzelner N-Glykane weiterverarbeitet werden vom Typ der Oligomannose-Glykane (Zuckerketten bestehen nur aus der Zuckerspezies Mannose), zu hybriden Glykanen (mindestens eine der Zuckerketten besteht auch/nur aus anderen Zuckerspezies als Mannose) zu komplexen Glykanen (alle Zuckerketten bestehen auch/nur aus anderen Zuckerspezies als Mannose).

Während genetisch kodiert ist, an welchen Positionen insgesamt wie viele Zucker an das Hüllprotein binden können, ist die Menge der angehängten N-Glykane und deren Zuckerspezies-Zusammensetzung ein hochkomplexer, flexibler und von äußeren Umständen abhängiger Prozess. Ob ein Sequon mit einem N-Glykan besetzt wird, hängt davon ab, welche Sequenz das Sequon hat und ob N-Glykan-Vorläufermole-

küle zur Verfügung stehen. Ob ein angehängtes N-Glykan aus Oligomannose weiterprozessiert wird, ist davon abhängig, welche zuckerprozessierenden Enzyme in dem spezifischen Zelltyp zum jeweiligen Zeitpunkt exprimiert werden, welche Zuckerspezies zur Verfügung stehen und ob die N-Glykane an ihrer Position im Hüllprotein zugänglich für Enzyme sind. In Experimenten, die gp120-Moleküle eines Virusschwarms nach Größe und der Anwesenheit einer Zuckerspezies getrennt haben, wurden mehr als 30 verschiedene Glykosylierungsvarianten von gp120 detektiert. Aufgrund der Limitationen der Methode ist aber davon auszugehen, dass die tatsächliche Anzahl an Glykosylierungsvarianten von gp120 deutlich höher liegt. Damit tragen die variable Zuckerhülle genauso wie die häufigen Mutationen aktiv zur Diversität von HIV bei.

Die komplexe Rolle des Zuckerschildes von HIV für die Biologie des Virus wurde bisher in wenigen Studien systematisch charakterisiert. Einsichten zum Einfluss von Zelltyp abhängigen Unterschieden in der Zuckerspezies-Komposition von HIVs Zuckerschild auf das Virus, ergaben sich aus Forschung mit dem Simianen Immundefizienz-Virus (SIV). HIV ist von SIV abstammend, welches ähnliche Eigenschaften besitzt und im Tiermodell zur Modellierung von HIV-Infektionen genutzt werden kann. Produziert man SIV in Makrophagen und CD4+ T-Zellen, den Zelltypen, die HIV normalerweise für seine Vermehrung benutzt, wird gp120 in beiden Zelltypen mit fast ausschließlich den gleichen Zuckerspezies ausgestattet<sup>2</sup>. Es gab jedoch quantitative Unterschiede im Einbau und SIV aus T-Zellen (T-SIV) und T-SIV trägt mehr N-Glykane vom Typ Oligomannose als SIV aus Makrophagen (M-SIV). T-SIV war dadurch besser gegen eine Neutralisation durch Antikörper geschützt, während M-SIV weniger stark von Mannose-bindenden Proteinen

inhibiert wurde. M-SIV war zudem infektiöser und wurde in Zellkultur besser durch zuckerbindende Proteine dendritischer Zellen an uninfitzierte Zellen übertragen, ein Prozess der Bedeutung für die sexuelle Übertragung des Virus hat. Nachfolgende Tierexperimente mit Rhesusaffen zeigten jedoch, dass M-SIV im Tier trotz höherer Infektiosität und besserer Bindung an relevante Proteine von dendritischer Zellen im Labor schlechter übertragbar war als T-SIV. Der spezielle Einfluss von N-Glykanen des Typs Oligomannose wurde in einer weiteren Studie analysiert<sup>3</sup>. Dafür wurde SIV einerseits in einer regulären menschlichen Zelllinie hergestellt (R-SIV), sodass das Zuckerschild wie üblich in alle drei möglichen Typen von N-Glykanen prozessiert werden kann, und andererseits in einer genetisch modifizierten Variante derselben Zelllinie (O-SIV), die ausschließlich Oligomannose-Glykane produzieren kann. O-SIV wurde in Zellkultur, wie es zu erwarten war, besser durch Mannose-bindene Proteine dendritischer Zellen an neu infizierbare Zellen übertragen als R-SIV. O-SIV inkorporierte aber auch weniger Hüllproteine in seine Oberfläche als R-SIV, war in Zellkultur weniger infektiös und konnte im Experiment mit Rhesusaffen kein einziges Tier infizieren. Die Ergebnisse der beiden Studien machen deutlich, dass die Komposition des Zuckerschildes nicht nur die Neutralisationssensitivität von HIV durch Antikörper beeinflusst, sondern auch dessen Infektiosität, Hüllproteininkorporation und Übertragung. Ein Zuckerschild, was ideal für einen Aspekt der Virusbiologie ist, kann zum Nachteil einer anderen Funktion sein. Das Zuckerschild ist damit mehr als „nur“ ein Schutzmechanismus vor dem Immunsystem. Die optimale Zusammensetzung des Zuckerschildes unterscheidet sich abhängig davon, welche Aspekte der Virologie zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion vereint werden müssen.

### Schwer mutierte Antikörper durchschlagen das schützende Zuckerschild

Das Zuckerschild von HIV galt lange als fast unüberwindbare Barriere für das Immunsystem, denn es ist ausgesprochen schwer, breit-neutralisierende Antikörper aus Patient\*innen zu isolieren. Obwohl der Großteil der HIV-Infizierten neutralisierende Antikörper bilden können, sind diese meist nur in der Lage, Virus aus der jeweiligen Person von einem Zeitpunkt vor der Isolation des Antikörpers zu neutralisieren und wenige zusätzliche Virusisolate. Dieses Phänomen wird häufig als *too little, too late* (übersetzt: zu wenig und zu spät) beschrieben. Es meint, dass eine nur schwach neutralisierende Antikörperantwort im Körper ausgebildet wird nachdem das Virus sich bereits wieder so stark verändert hat, dass es nicht mehr erkannt werden kann. Nur etwa ein Prozent der HIV-Infizierten können breit-neutralisierende Antikörper ausbilden, die ihr eigenes aktuelles Virus und andere Isolate neutralisieren können, und diese Patient\*innen benötigen keine antiretrovirale Medikamente, um ihre Infektion zu kontrollieren. Breit-neutralisierende Antikörper aus diesen Individuen zu isolieren, ist allerdings technisch eine große Herausforderung, da im menschlichen Körper Antikörper gegen viele Ziele produziert werden und die B-Zellen gefunden werden müssen, deren Antikörper sich spezifisch gegen HIV richten. Dank der Entwicklung von neuen Hochdurchsatz-Technologien in den letzten Jahren wurde es deutlich einfacher, eine große Anzahl an B-Zellen zu isolieren und die Spezifität und Funktion der von ihnen exprimierten Antikörper zu charakterisieren. Dies führte zu einer großen Anzahl an neuentdeckten breit-neutralisierenden und potenten Antikörpern. Diese sind in der Lage das Zuckerschild von HIV vollständig zu durchstoßen oder aber neben Aminosäuren von gp120 auch die

N-Glykane selbst zu binden<sup>4</sup>. In Folge dessen wurde anerkannt, dass das Zuckerschild von HIV zwar ein ausgesprochen starker Schutzmechanismus ist, dieser aber durchaus vom Immunsystem überwunden werden kann. Diese Arbeiten zeigten auch, warum breit-neutralisierende Antikörper so selten gebildet werden. Die meisten Hüllproteine von HIV-Isolaten sind nicht in der Lage an die Vorläufer von breit-neutralisierenden Antikörper auf B-Zellen zu binden und somit kann die Ausreifung dieser Antikörper nicht eingeleitet werden. Außerdem müssen die Antikörper Bindestellen mit ausgesprochen langen HCDR3-Regionen besitzen, damit sie Aminosäuren von gp120 unter dem Zuckerschild für eine Bindung erreichen können. Abschließend müssen die Antikörper auch noch extreme viele Mutationen ansammeln und daher vermutlich lange ausreifen bis sie breit-neutralisierend wirken können.

Impfstoffkandidaten, die solche breit-neutralisierenden Antikörper induzieren sollen, müssen daher gewährleisten, dass die schwach bindenden Vorläuferantikörper gebunden und die dazugehörigen B-Zellen stimuliert werden können. Außerdem ist inzwischen anerkannt, dass eine Folge von mehreren Vakzinierungen mit unterschiedlichen Immunogenen notwendig sein wird um eine ausreichende Antikörperausreifung zu erzielen. Um diese Hürden zu meistern bedarf es eines geschickten Designs von Impfstoffkandidaten. Es muss entweder eine einzige gp120-Aminosäuresequenz gewählt werden, die möglichst repräsentativ für eine Vielzahl von Virusisolaten ist, oder aber es müssen mehrere Hüllproteine in einem Vakzin vereint werden um die genetische Diversität der Virusisolate abzubilden. Weiterhin muss das Hüllprotein als lösliches Trimer und in großen Mengen exprimiert werden – mit einer möglichst ähnlichen Konformation zu dem natürlich vorkommenden Hüllprotein des Virus. Abschließend muss das

Zuckerschild des Impfstoffkandidaten so angelegt werden, dass es die optimale Stimulation von B-Zellen ermöglicht. Für das Design des Zuckerschilds gibt es grundsätzlich zwei verschiedene Möglichkeiten. Es kann entweder die genetisch kodierte Sequenz der Sequons manuell verändert werden oder aber das Zuckerschild global modifiziert werden durch die Herstellung von Hüllproteinen in Zelllinien mit Defekten in der Zuckerprozessierung. Die manuelle Veränderung des Zuckerschilds durch eine strategische Anpassung der Sequenz-Anzahl, -Sequenzen und -Positionen ermöglicht eine passgenaue Modulierung<sup>5</sup>. So können z.B. Bereiche auf gp120, die häufig nicht-funktionale Antikörperantworten stimulieren durch das Einfügen von zusätzlichen N-Glykanen stärker bedeckt werden, sodass eine Erkennung des Immunsystems verhindert wird. Es können aber auch N-Glykane gezielt entfernt werden um das Immunsystem auf einen bestimmten Bereich von gp120 zu fokussieren oder aber die Interaktion mit Vorläufermolekülen von breit-neutralisierenden Antikörpern zu ermöglichen. Da einige N-Glykane essentiell für die Faltung des Hüllproteins sind, birgt diese Technik die Schwierigkeit, dass sie Konformationsänderungen herbeiführen kann und die hergestellten Hüllproteine dann nicht mehr ausreichend dem Hüllprotein des Virus ähneln. Dennoch kann diese Technik erfolgreich angewendet werden. So wurde in einem Projekt die optimale Sequenz zur verbesserten Bindung eines suboptimalen Hüllproteins an zwei zuckerbindende Antikörper durch bioinformatische Methoden berechnet<sup>6</sup>. Als Datengrundlage für den Deep Learning-Algorithmus dienten Informationen über die Fähigkeit der beiden Antikörper 94 Hüllproteine verschiedener HIV-Isolate zu binden sowie das Wissen über die Besetzung von dessen Sequons mit N-Glykanen. Anschließend Binstudien mit den veränderten Hüllproteinen bestätig-

ten die vorhergesagten Eigenschaften und zeigten eine verbesserte Bindung zu den Antikörpern. Globale Veränderungen des Zuckerschilds sind weniger gerichtet als lokale Veränderungen, erzeugen jedoch weniger wahrscheinlich Probleme mit der Faltung des Hüllproteins. Weiterhin vereinfacht diese Strategie eine spätere Impfstoffproduktion, da die Qualität einer einheitlichen Glykosylierung besser zu kontrollieren ist als die einer gemischten. In einem Hochdurchsatz-Screen wurde detailliert untersucht, ob die Inhibition der Genexpression von 200 Genen, die die Zuckerprozessierung beeinflussen, die Menge, Qualität und Antikörperbindung von löslichen Hüllproteinen beeinflussen können<sup>7</sup>. Es zeigte sich, dass mehrere Gene alle drei Faktoren deutlich verbessern konnten. Die Hüllproteine aus Zelllinien, denen die Gene fehlen, werden derzeit detailliert charakterisiert. Zusätzlich wird geprüft, ob durch Kombination der Gene die Resultate noch weiter verbessert werden können um eine optimale Zelllinie für die Produktion eines HIV-Impfstoffs zu erhalten.

### **Moderne Technologien der Impfstoffentwicklung**

Die Erforschung der neutralisierenden und nicht-neutralisierenden Antikörperantwort zu HIV mit besonderem Fokus auf Antikörper, die das Zuckerschild überwinden können, erfordert spezialisierte Techniken und Technologien. Seit Aufnahme meiner Arbeit an der Universität Duisburg-Essen im Januar dieses Jahres etablierte ich zu diesem Zweck drei Kerntechnologien in meinem Labor: Proteinproduktion, virale Durchflusszytometrie und die *Systems Serology Pipeline*. Proteinproduktion ist essentiell für die Herstellung von HIV-Immuno- genen. Dabei ist insbesondere die Produktion von hoch-qualitativen löslichen HIV-Hüllproteinen von Bedeutung. Denn Hüllproteine, die nicht in ihrer natürlichen Form als

Trimer vorliegen, oder die inkorrekt gefaltet sind, induzieren unfunktionale Antikörper in Immunisierungsstudien und isolieren irrelevante Antikörper aus Patientenproben. Zusätzlich werden im Labor Antikörper produziert, die zur Herstellung von Chromatographie-Säulen zur Isolation von Immuno- genen, aber auch für Experimente benötigt werden. Die Proteinproduktion erfolgt dabei in menschlichen Zellen in Suspensionszellkultur und die Aufreinigung der Proteine erfolgt durch automatisierte Affinitäts- oder Größenausschlusschromatographie. Für die Generierung von Immuno- genen und Antikörpern mit verschiedenen Zuckerbesatz werden globale Änderungen des Zuckerbesatzes durch die Produktion der Proteine in Zelllinien mit Defekten in den Zuckerprozessierungswegen genutzt. Mit Hilfe der Proteinproduktion können wir somit detailliert untersuchen, wie die Zusammensetzung des Zuckerschilds von HIV die Induktion einer Antikörperantwort im Tiermodell beeinflusst. Außerdem ermöglicht sie die funktionelle Analyse von tatsächlich auch an das Virus bindenden nicht-neutralisierenden Antikörpern und stellt Reagenzien für die Analyse von neutralisierenden Antikörpern zur Verfügung.

Die neutralisierende Antikörperantwort wird üblicherweise untersucht, indem HIV mit infizierbaren Zellen in Anwesenheit eines Antikörpers inkubiert wird. Im Anschluss wird dann gemessen, wie viele der Zellen infiziert wurden und es können in Folge dessen Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob der Antikörper Infektionen verhindern kann. Diese weitverbreitete Technik gibt wichtige Einblicke in die Neutralisationseffektivität von Antikörpern und zeigt, ob die Antikörper breit-neutralisierend sind und damit einen therapeutischen Wert für eine Vielzahl von Patient\*innen haben könnten. Neutralisationsexperimente demonstrierten, dass bei genetisch diversen Virusisolaten aus

Patient\*innen und auch bei im Labor hergestellten genetisch identischen Viren, ein Anteil der Viren von potenten neutralisierenden Antikörpern nicht erkannt wird. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass die Diversität in der Zuckerkomposition des Hüllproteins die Erkennung von Viren verhindert. Für die Untersuchung dieser Hypothese und zur näheren Charakterisierung des nicht-neutralisierbaren Anteils der Viruspopulation, kann die erst kürzlich entwickelte Methode der viralen Durchflusszytometrie<sup>8</sup> genutzt werden. Für diese Technik wird fluoreszentes HIV produziert, welches mit Hüllproteinen verschiedener HIV-Isolate ausgestattet werden kann. Die Viren werden dann mit Antikörpern inkubiert, die ebenfalls mit einem Fluorophor markiert sind. Anschließend können die Viren mit Hilfe von regulären Durchflusszytometriegeräten analysiert werden. Dabei kann zum Beispiel festgestellt werden, wie groß der Anteil der unerkannt gebliebenen Viren ist, ob Viren mehrere Antikörper binden können, und ob die unerkannten Viren einen besonderen Zuckerbesatz des Hüllproteins besitzen. Nicht durch Antikörper gebundene Viren können zudem sortiert werden und nachfolgend in verschiedenen Experimenten eingesetzt werden um zum Beispiel festzustellen, ob sie funktional sind und durch dendritische Zellen zu neu infizierbaren Zellen transportiert werden können. Mit dieser Technologie ist es uns daher möglich neue Erkenntnisse darüber zu gewinnen, wie Viren die Erkennung durch Zucker bindende neutralisierende Antikörper umgehen. Dieses Wissen soll in das Design von Impfstoffkandidaten miteinfließen, damit eine Antikörperantwort erzeugt werden kann, die dauerhaften Schutz vermittelt.

Für die Analyse von nicht-neutralisierenden Antikörperfunktionen können eine Reihe von Hochdurchsatz-ELISAs und Durchflusszytometrietechniken angewendet

werden. Diese werden in Kombination mit mehreren statistischen Analysen als *Systems Serology Pipeline*<sup>9</sup> zusammengefasst. Sie erlauben eine umfassende Charakterisierung der nicht-neutralisierenden Antikörperantwort in Patientenseren und -plasma oder isolierten Antikörpern zu Proteinen von Pathogenen und Impfstoffkandidaten. Bestimmt werden mittels Bindungsstudien Eigenschaften wie Antikörperbindung an Proteine, die Subklassen der gebundenen Antikörper, sowie die Interaktion von Antigen-spezifischen Antikörpern an zelluläre Rezeptoren. Weiterhin wird das funktionale Antikörperprofil analysiert, indem Antikörper-vermittelte NK Zell-Degranulation und -Zytotoxizität, Komplementdeposition und Phagozytose durch Monozyten und Neutrophile untersucht werden. Bei der NK Zell-Degranulation werden Zellmarker für Degranulation auf den NK Zellen gemessen, nachdem diese mit Antikörper-gebundenen Immunogen inkubiert wurden. Bei der NK Zell-Zytotoxizität wird Immunogen an die Oberfläche von Zellen gebunden und festgestellt, ob nach Inkubation von Antikörperproben es zu einer Abtötung der Immunogen-gekoppelten Zellen durch NK Zellen kommt. Zur Analyse der Antikörper-vermittelten Komplementdeposition wird die Oberfläche von fluoreszenten Perlen mit Immunogen bedeckt, die Perlen dann im Anschluss mit Plasma oder Serum inkubiert und nachfolgend auch noch mit Komplementfaktoren. Kommt es zu einer Induktion der Komplementkaskade kann die Ablagerung des Komplementfaktors C3 auf den Perlen durch die Bindung fluoreszent-markierter Antikörper in der Durchflusszytometrie gemessen werden. Um zu verstehen, ob ein Antikörper Phagozytose vermitteln kann, wird ebenfalls mit fluoreszenten Perlen gearbeitet<sup>10</sup>. Auch hier wird Immunogen an die Perlen gebunden und diese anschließend mit Antikörper-enthaltenen Proben inkubiert. Im Anschluss werden die

ungebundenen Antikörper entfernt und die fluoreszenten Perlen Zellen zur Aufnahme angeboten. Vermitteln die Antikörper Phagozytose kann das Ausmaß im Anschluss durch die Visualisierung von Zellen anhand von Zelltyp-spezifischen Markern mit gleichzeitiger Messung des Signals für die Perlen bestimmt werden. Die *Systems Serology Pipeline* ermöglicht es uns besser zu verstehen unter welchen Bedingungen potente nicht neutralisierende Antikörper gebildet werden. Da nicht-neutralisierende Antikörper generell sehr wenig erforscht sind, soll mit der *Systems Serology Pipeline* festgestellt werden unter welchen Bedingungen Patient\*innen nicht-neutralisierende Antikörper ausbilden können. Weiterhin soll detailliert analysiert werden, in welchem Ausmaß Zucker bindende Antikörper an der nicht-neutralisierenden Antikörperantwort beteiligt sind. Schlussendlich sollen auch diese Arbeiten das Design von neuen Impfstoffkandidaten inspirieren und damit die globalen Anstrengungen zur Beendigung der HIV-Pandemie unterstützen.

### **Aktuelle Forschung der Arbeitsgruppe**

Durch die beschriebenen Technologien wird es möglich das funktionale Profil von Antikörperantworten zu HIV, anderen Pathogenen und Vakzinkandidaten detailliert und in hoher Auflösung zu charakterisieren. Für eine erfolgreiche Nutzung der Technologien bedarf es aber zusätzlicher Forschungsstrukturen, die am Universitätsklinikum Essen zur Verfügung stehen. Insbesondere der Zugang zu klinischen Proben ist unverzichtbar, und Dank gilt den vielen Patient\*innen, die sich dafür entscheiden die Forschung mit einer Blutspende zu unterstützen. Um Zugang zu Proben von HIV-infizierten Patient\*innen zu erhalten, habe ich in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Esser (Leiter Institut für translationale HIV-Forschung und



der HPSTD-Ambulanz der Hautklinik) die Verarbeitung von klinischen Proben dieser Patient\*innengruppe übernommen. An fünf Tagen in der Woche werden seitdem am Institut für translationale HIV-Forschung Proben aufgearbeitet, dokumentiert und für Projekte am und außerhalb des Instituts bereitgestellt. Zusätzlich ist für die Analyse der von Antikörpern stimulierten zellulären Immunantwort der Zugang zu weißen Blutzellen von gesunden Spendern notwendig, der von der Transfusionsmedizin (Leiter Prof. Dr. Peter Horn) ermöglicht wird. Für klassische virologische Arbeiten ist zusätzlich der Zugang zum Labor der Sicherheitsstufe S3 des Instituts für Virologie (Leiter: Prof. Dr. Ulf Dittmer) essentiell und für die virologische Durchflusszytometrie die Nutzung des durchflusszytometrischen Zellsortierers des Imaging Centers Essen (Leiter: Prof. Dr. Matthias Gunzer).

Aufgrund der günstigen Forschungsstrukturen war es möglich bereits erste Forschungsprojekte anzustoßen, deren Ziel es ist, neues Wissen zu generieren, welches zu der Entwicklung eines HIV-Impfstoffs und einer Verbesserung der Therapie von HIV-Infizierten beitragen kann. In Zeiten der Corona-Pandemie war es uns wichtig zu verstehen, ob HIV-Infizierte anders als gesunde Menschen von einer SARS-CoV-2-Infektion betroffen sind. Das Forschungsfeld ist sich diesbezüglich noch uneinig, da verhältnismäßig wenige Fälle von HIV-Infizierten mit gleichzeitiger Corona-Infektion beobachtet werden konnten und der Zustand des Immunsystems von HIV-Infizierten zum Zeitpunkt der Infektion für die Schwere der Erkrankung COVID-19 eine wichtige Rolle spielen könnte. Um zu verstehen, ob HIV-Infizierte aufgrund ihrer chronischen Infektion bei der Bekämpfung einer SARS-CoV-2-Infektion benachteiligt sein könnten, vergleichen wir daher in einem Forschungsprojekt die Antikörperantwort von gesunden,

HIV-infizierten und immunsupprimierten Patient\*innen. Dafür wurden Proben von HIV-Infizierten (n = 1300) gesammelt und Kollaborationen aufgebaut um Proben von gesunden (Prof. Dr. Monica Lindemann, PD Dr. Hannes Klump (Transfusionsmedizin), PD Dr. Kathrin Sutter, Dr. Gennadiy Zelinsky (Virologie)) und immunsupprimierten (Dr. Olympia Anastasiou (Virologie)) Patient\*innen zu erhalten. In Such- und Bestätigungstests mittels SARS-CoV-2-Spike-spezifischer ELISAs für IgM und IgG wird die Probensammlung derzeit charakterisiert. Anhand der gewonnenen Ergebnisse und nach Ausschluss von falsch-positiven Proben aufgrund von kreuzreaktiven Antworten, werden die Proben eingeteilt, sodass sowohl die frühe Antikörperantwort zu SARS-CoV-2-Spike (IgM+IgG-) als auch die späte (IgM-IgG+) Antikörperantwort mit Hilfe der *Systems Serology Pipeline* charakterisiert werden kann. Vervollständigt werden diese Analysen durch die Charakterisierung der neutralisierenden Antikörperantwort durch Prof. Dr. Philipp Lang (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Dieses Projekt wird von der Stiftung Universitätsmedizin Essen unterstützt. Weitere Themen für Projekte, die sich derzeit in der Vorbereitungsphase befinden, sind unter anderen die Charakterisierung von viralen Sequenzen und der Antikörperantwort von HIV-infizierten Patient\*innen, deren Virus sich trotz antiretroviraler Therapie im geringen Maße weitervermehren kann (low level viremia). Außerdem verfolgen wir die Frage, ob Medikamente zur Behandlung der vermehrt bei HIV-Infizierten auftretenden kardiovaskulären Erkrankungen einen Einfluss auf das Zuckerschild von HIV und damit auf die Virusbiologie von HIV haben könnten. Beide Projekte erfolgen in Zusammenarbeit mit PD Dr. Stefan Esser und Dr. Carina Elsner (Virologie). Ich bedanke mich bei allen Kolleg\*innen, die den Start im Januar 2021 am

UK Essen vereinfacht haben, sowie allen Kollaborationspartner\*innen für ihr Vertrauen. Wir freuen uns auf spannende Ergebnisse und sind offen für neue Forschungsthemen und Zusammenarbeiten.

---

### Summary

In spite of intense global research efforts, a vaccine against the human immunodeficiency virus (HIV) is not available to date. In 2019, 38 million individuals were living with an HIV infection, which, if left untreated, causes the deadly acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The development of an HIV vaccine is particularly challenging because HIV can use a multitude of resistance mechanisms to distract the immune system and avoid recognition. For example, a dense coat of host-derived sugars (= glycans) covers the envelope protein of HIV, the sole possible target for the immune system on the viral surface, making the protein appear to be part of the host's body. While the so-called glycan shield is very effective in sabotaging the recognition of HIV by antibodies, in rare cases infected individuals develop antibodies that break through or directly bind to the glycan shield. In my research group, we use modern technologies to i) develop immunogens to induce glycan-binding antibodies, ii) explore how viral escape from glycan-binding can be avoided, and iii) profile the neutralizing and non-neutralizing functions of glycan-binding antibodies in patient samples to inform new vaccine strategies.

---

*Anmerkungen*

- 1) Rerks-Ngarm, S et al., 2009
- 2) Karsten, CB et al., 2014
- 3) Karsten, CB et al., 2015
- 4) Sok, D und Burton, DR, 2019
- 5) Karsten, CB und Alter, G, 2017
- 6) Yu, W-H et al., 2018
- 7) Karsten et al., unveröffentlicht, Patent in Vorbereitung
- 8) Bonar, MM und Tilton, JC, 2017
- 9) Chung, AW und Alter, G, 2017
- 10) Karsten, CB et al., 2019

*Literatur*

- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Premisri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, et al. (2009) Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to prevent HIV-1 infection in Thailand. *N Engl J Med.* 361:2209–2220.
- Karsten CB (2014) Impact of Host Cell-Specific Glycosylation Differences on SIV Infectivity and Mucosal Transmission. PhD thesis, Hannover Medical School
- Karsten CB, Buettner FF, Cajic S, Nehlmeier I, Neumann B, Klippert A, Sauermann U, Reichl U, Gerardy-Schahn R, Rapp E, et al. (2015) Exclusive Decoration of Simian Immunodeficiency Virus Env with High-Mannose Type N-Glycans Is Not Compatible with Mucosal Transmission in Rhesus Macaques. *Journal of Virology.* 89(22): 11727–11733.
- Sok D, Burton DR. (2018) Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV. *Nature Immunology.* 19(11):1179-1188.
- Karsten CB and Alter G (2017) The HIV-1 Glycan Shield: Strategically Placed Kinks in the Armor Improve Antigen Design. *Cell Reports.* 19(4):669–670.
- Yu W-H, Zhao P, Draghi M, Arevalo C, Karsten CB, Suscovich TJ, Gunn B, Streeck H, Brass A, Tiemeyer M, et al. (2018) Exploiting Glycan Topography to Enhance HIV Immunogen Antigenicity. *PLoS Computational Biology.* 14(4): e1006093.
- Bonar MM and Tilton JC (2017) High sensitivity detection and sorting of infectious human immunodeficiency virus (HIV-1) particles by flow virometry. *Virology.* 505:80-90.
- Chung AW and Alter G (2017) Systems serology: profiling vaccine induced humoral immunity against HIV. *Retrovirology.* 14(1):57.
- Karsten CB, Mehta N, Shin SA, Diefenbach TJ, Suscovich TJ and Alter G (2019) A highly versatile high throughput assay to characterize the efficiency of antibody-mediated neutrophil phagocytosis in clinical samples. *Journal of Immunological Methods.* (471): 46–56

*Die Autorin*

**Christina B. Karsten** studierte von 2004 bis 2008 Bioinformatik und Genomforschung an der Universität Bielefeld im Bachelor, sowie von 2008 bis 2010 im Masterstudium Biologie mit den Schwerpunkten Immunologie und Mikrobiologie an der Technischen Universität Braunschweig. Mit ihrer Doktorarbeit, die sie 2014 am Deutschen Primatenzentrum in Göttingen abschloss, wurde sie 2015 an der Medizinischen Hochschule Hannover promoviert. Danach forschte sie bis 2019 am Ragon Institut des Massachusetts General Hospital, der Harvard University und des Massachusetts Institute of Technology in Cambridge, MA, USA. Für ihre Forschung an neuartigen Strategien zur Entwicklung von Impfstoffen wurde sie mit einem Preis der Universität Harvard ausgezeichnet. Christina Karsten hat eine Juniorprofessur für Impfstoffentwicklung an der Medizinischen Fakultät der UDE und forscht am Institut für translationale HIV-Forschung des Universitätsklinikums Essen. Sie ist Mitglied der „American Society for Microbiology“, der „Society for Glycobiology“ und der „German Society for Virology“.