

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Charakterisierung von Δ nef-RTSHIVs

Ziel dieses Projekts war die Entwicklung von Δ nef-SHIV-Mutanten zur spezifischen Untersuchung der Schutzmechanismen von SIV *nef*-Deletionsmutanten im SIV/Rhesusaffen Impfstoff-Modell. Obwohl HIV *nef*-Deletionsmutanten durch die mittlerweile belegte, zeitlich verzögerte Induktion von AIDS nicht mehr als Impfstoffe in Frage kommen, sind die nach Immunisierung auftretenden protektiven Mechanismen nicht völlig geklärt. Die zu untersuchende Frage ist, ob Immunisierung mit *nef*-Deletionsmutanten die Infektion durch den Wildtyp dadurch verhindert, daß eine bisher nicht genau beschriebene Immunantwort induziert wird oder ob sich die Wildtyp-Infektion aufgrund des Mangels an uninfizierten Zielzellen nicht manifestieren kann. Vorstellbar ist, daß durch Vorhandensein des Immunisierungsvirus die primären, CCR5-positiven Zielzellen für SIV bzw. HIV zum größten Teil infiziert sind und somit das Belastungsvirus zu wenig Möglichkeiten zur Replikation und Verbreitung im Organismus hat. In dieser Arbeit sollten zumindest die Grundlagen geschaffen werden, diese Frage mittels eines Tiermodells zu untersuchen.

Hinweise dazu sollte ein Experiment liefern, in dem das Immunisierungsvirus, die *nef*-Deletionsmutante, nach Entwicklung einer möglichen Immunantwort durch medikamentöser Unterdrücken der Replikation davon abgehalten wird, sämtliche Zellen zu infizieren. Nach therapeutischer Inhibition der *nef*-Deletionsmutante können sich relativ schnell die potentiellen Zielzellen für das Wildtyp-Virus regenerieren, während eine möglicherweise protektive Immunantwort erhalten bliebe (Abbildung 3·1). Unserer Arbeitsgruppe wurde von Prof. Dr. K. Überla (Institut für Molekulare und Medizinische Virologie, Bochum) freundlicherweise der Molekularklon eines SIVmac239 zur Verfügung gestellt, in dem das eigentliche Gen für die Reverse Transkriptase durch das aus HIV-1 stammende Gen ersetzt wurde (Überla *et al.*, 1995). Die aus diesem Molekularklon entstehenden Viren sind sensitiv gegenüber pharmazeutischen Non-Nukleosid-Analoga Reverse-Transkriptase-Inhibitoren (NNRTI), wie sie auch bei der HIV-Therapie eingesetzt werden. Die SIV-Reverse Transkriptase jedoch wird von solchen HIV RT-Inhibitoren wie z.B. Viramun[®] (Boehringer Ingelheim) nicht beeinflußt. Somit kann im Tiermodell nach Immunisierung mit der oben genannten Reversen Transkriptase-SIV/HIV Chimäre (RTSHIV) diese Mutante durch medikamentöse Behandlung im Organismus in ihrer Verbreitung gehemmt werden, ohne daß das Belastungsvirus SIV beeinträchtigt wird.

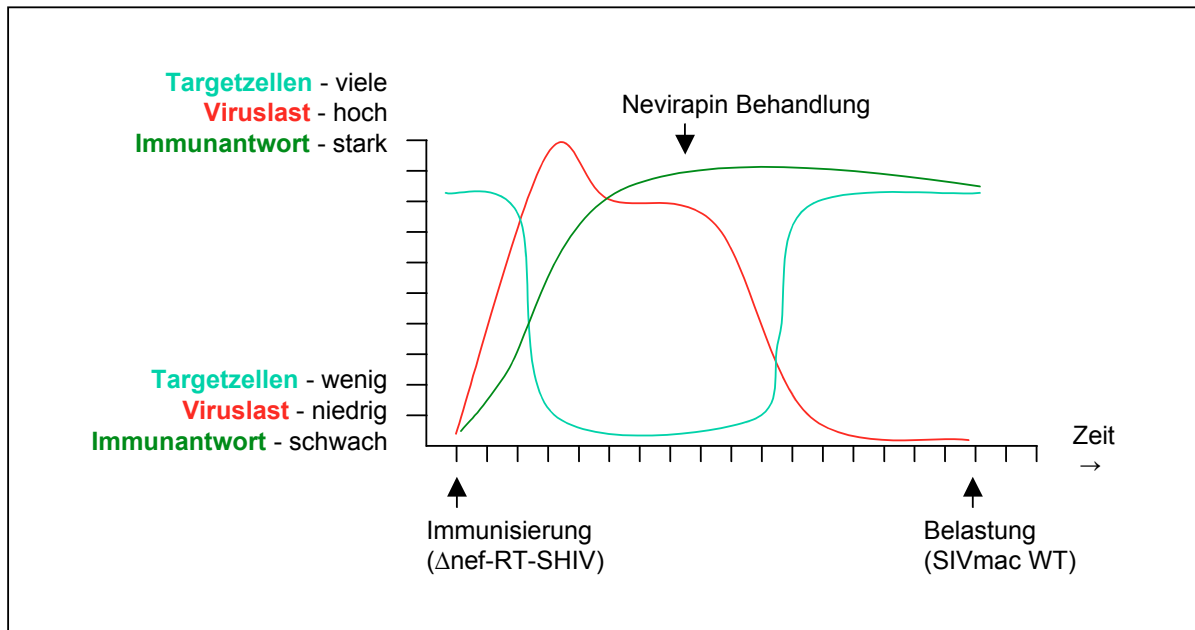


Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Δ nef-RTSHIV Studie. Die Parameter der Kurven für die Immunantwort und Viruslast sind meßbar, die Kurve der potentiellen Zielzellen hypothetisch.

Zunächst wurde der als Plasmid-DNA erhaltene Moleklarklon RTSHIV in verschiedene *E.coli*-Zellen transformiert, bis der Vektor stabil in TB1-*E.coli*-Zellen vorlag. In daraus wieder isolierter Plasmid-DNA wurde durch Restriktionsanalysen das SIV-Genom bestätigt. Das Vorhandensein der HIV-Reversen Transkriptase wurde durch für HIV-spezifische Primer als auch durch Sequenzierung des PCR-Produktes bestätigt. Die Plasmid-DNA wurde in Cos7-Zellen transfiziert, nach 48 Stunden wurde der nach Zentrifugation zellfreie Zellkulturüberstand auf C8166-Zellen gegeben. In der C8166-Zellkultur konnte nach neun Tagen durch Beobachtung von Synzytienbildung im Lichtmikroskop eine Infektion nachgewiesen werden, die durch einen p24-Nachweis bestätigt wurde. Ein aus genomischer DNA der C8166-Zellen amplifiziertes Fragment wurde ebenfalls zum Nachweis der HIV-RT sequenziert.

3.1.1 Konstruktion der *nef*-Deletionsmutanten

Damit diese Studie zu den vorhergehenden Immunisierungsexperimenten mit *nef*-Deletionsmutanten vergleichbare Ergebnisse liefern kann, sollte in den RTSHIV Moleklarklon die entsprechenden Deletionen im *nef*-Gen eingeführt werden. Es wurden bisher zwei Mutanten eingesetzt, welche unterschiedlich große Deletionen im Leserahmen von *nef* tragen (siehe auch Abb. 3.11, Seite 57). Eine SIV *nef*-Deletionsmutante wurde erzeugt, indem der gesamte Bereich von *nef* deletiert wurde, der nicht mit anderen

genomischen Bereichen überlappt. Zwischen den Leserahmen von *env* und der 3'-LTR wurden 182 Basen aus dem Genom entfernt (Gibbs *et al.*, 1994; Kestler *et al.*, 1991). Dadurch entsteht gegenüber dem Wildtyp ein vorzeitiges Stop-Codon und ein verkürztes Genprodukt. Eine natürliche, in Zellkultur entstandene Mutante von SIVmac 32H ist als C8-*nef*-Deletionsmutante beschrieben und trägt eine 12 Basen Deletion (Rud *et al.*, 1994; Rud *et al.*, 1991). Diese führt zu einem nahezu kompletten Genprodukt, bei dem nur in der ungefähren Mitte vier Aminosäuren fehlen. Ausschalten des *nef*-Gens durch Einführen eines Stop-Codons mittels Mutation einer einzelnen Base kann für *in vivo* Versuche nicht in Betracht gezogen werden, da es häufig zu einer Reversion dieses Codons kommt (Kestler *et al.*, 1991).

Das *nef*-Gen wird sehr früh während der Infektion gebildet, in mehreren Untersuchungen konnte ein Einfluß von *nef* auf die zeitliche Steuerung der viralen Replikation in infizierten Zellen gezeigt werden. Eine größere Deletion scheint eine langsamere Replikation zu bedeuten und somit eine geringere Anzahl von viralen Proteinen in mit Δ *nef*-Mutanten infizierten Zellen. Für die Immunisierungstudien bedeutet dies, daß die sehr gering deletierte C8-Mutante auch wesentlich früher als die Δ 181 bp-Mutanten einen Schutz vor Belastung induziert (Norley *et al.*, 1996a; Norley *et al.*, 1996b). Aufgrund dessen soll in das *nef*-Gen des RTSHIV analog beide Deletions-Varianten eingeführt werden (Abbildung 3·2).

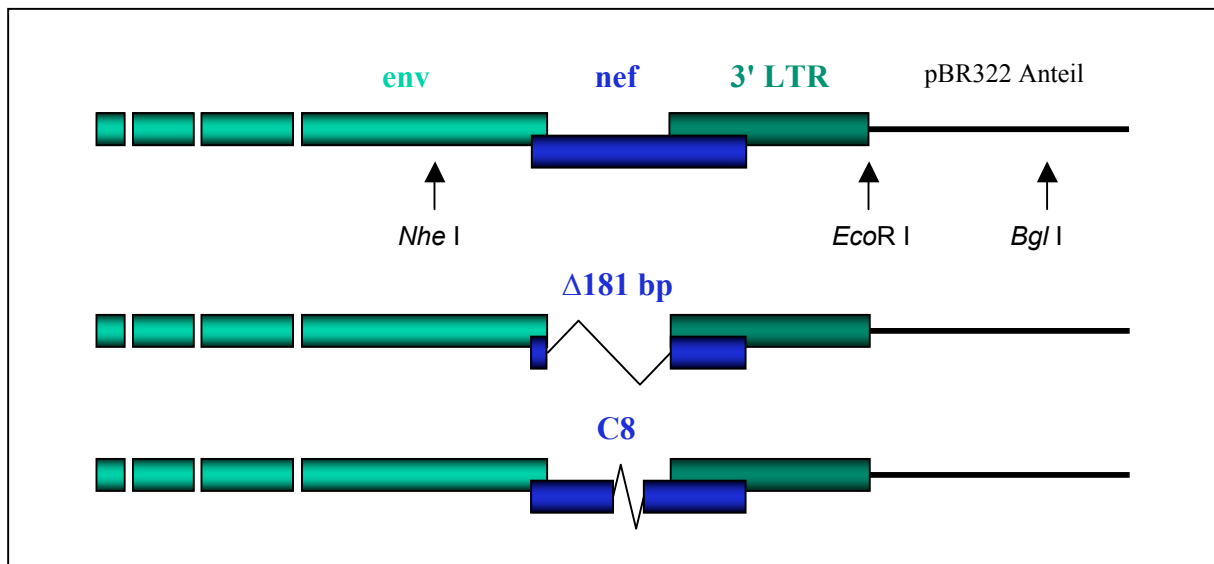


Abb. 3·2: Schematische Darstellung der in den RTSHIV-Molekularklon einzufügenden Deletionen

Zuerst wurde versucht in dem RTSHIV-Plasmid einen circa 3,8 kb großen Bereich, umfassend Teile von *tat*, die vollständigen Gene von *env*, *nef*, die 3'-LTR sowie nicht-kodierende Sequenz durch das entsprechende Fragment aus dem Plasmid p239SpE3'/*nef*-del (zur Verfügung gestellt durch das AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH : pSIVmac239 Δ *nef* Deletion Mutant from Dr. Ronald Desrosiers, (Gibbs *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1991; Regier and Desrosiers, 1990)) auszutauschen. Dieses Plasmid enthält die 3'-Hälfte des proviralen SIVmac239-Genoms mit einer 182 bp-Deletion in *nef*. Durch die in beiden Vektoren je unikat vorliegenden Schnittstellen für *Sph* I und *Eco*R I wurden beide Plasmide geschnitten, das *nef*-Fragment bzw. den offenen RTSHIV-Vektor aufgereinigt und versucht, beide durch die T4-Ligase zu verknüpfen. Es konnte kein replikationsfähiger Δ *nef*-RTSHIV Moleklarklon hergestellt werden, auch durch Transfektion des Ligationsansatzes in Cos7-Zellen konnte kein replizierendes Virus erzeugt werden. Neben Mißlingen der Ligation beider genomischer Teile könnte auch eine letale Mutation in dem Plasmid p239SpE3'/*nef*-del dafür verantwortlich sein.

Aufgrund dessen wurde beschlossen, daß *nef*-Gen aus RTSHIV selbst zu subklonieren, in diesem die Deletion mittels PCR einzuführen und das entstandene Δ *nef*-Gen wieder in das RTSHIV-Plasmid einzubringen. Dazu sollte der komplette Leserahmen von *nef* als möglichst kleines Fragment aus dem RTSHIV geschnitten werden. Über die in *env*, kurz vor *nef* liegende Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Nhe* I und die am Ende der 3'-LTR gelegene Schnittstelle für *Eco*R I konnte ein 1539 bp großes Fragment isoliert werden, welches in den ebenfalls so geschnittenen Vektor pCR3.1-uni (Invitrogen) ligiert wurde. Die beiden Enzyme schneiden im RTSHIV-Plasmid nur an den genannten Stellen, im Subklonierungsvektor befinden sich die Schnittstellen auch jeweils unikat im designierten Klonierungsbereich.

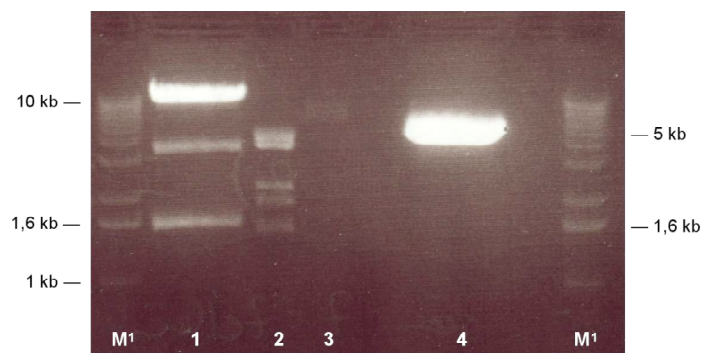


Abb. 3:3: Klonierung des *Nhe* I / *Eco*R I *nef*-Fragments in pCR3.1-uni.

Spur 1 = RTSHIV *Nhe* I / *Eco*R I geschnitten führt zu 1,54 kb *nef*-Fragment; Spur 2 = Kontrolle RTSHIV *Pst* I geschnitten; Spur 3 = Kontrolle RTSHIV ungeschnitten; Spur 4 = pCR3.1-uni Vektor *Nhe* I / *Eco*R I offen. M¹ = 1 kb Leiter.

Die Deletion des *nef*-kodierenden Bereichs wurde nun über Fusions-PCR der vor bzw. nach der Deletion liegenden *nef*-Bereiche eingeführt. Um Fehleinbauten zu vermeiden, wurde die *Pfu*-Polymerase benutzt. In der ersten PCR wurden die Fragmente 5'- und 3'-gelegen von dem zu deletierenden Bereich hergestellt. Das 5'-Fragment entspricht einem PCR-Produkt, dessen Forward-Primer im Klonierungsvektor pCR3.1-uni bindet und dessen Reverse-Primer vor dem Beginn der Deletion bindet, aber auch noch 10 Basen entsprechend der Sequenz nach der Deletion enthält. Das 3'-Fragment wird dem entsprechend von einem Forward-Primer, der direkt nach dem auszuschließenden Bereich in *nef* bindet und einem Reverse-Primer, welcher im Subklonierungsvektor liegt, gebildet. Dadurch, daß das 5'-Fragment an seinem 3'-Ende dieselbe Sequenz enthält, mit der das 3'-Fragment beginnt, können beide in einer Fusions-PCR miteinander verschmolzen werden. Es wurde ein PCR-Amplifikat erzeugt, welches in *nef* um 181 bp kürzer ist und flankierende Bereiche enthält, in denen die Restriktionsenzyme *Nhe* I und *EcoR* I schneiden. Um vor dem Einbau in das RTSHIV die Deletion zu verifizieren wurde dieses PCR-Produkt in den pCR® Blunt II-TOPO -Vektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert.

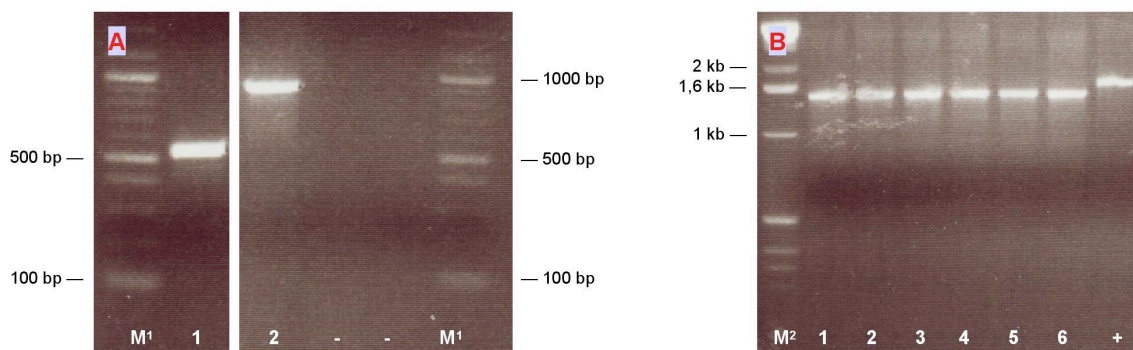


Abb. 3-4: Einfügen der 181 bp Deletion im *nef*-Gen.

- a) Spur 1 = 5'-Fragment als PCR-Produkt 552 bp; Spur 2 = 3'-Fragment als PCR-Produkt 935 bp; (-) = Keine DNA-Kontrolle für beide PCR-Ansätze; M¹ = 100 bp Leiter.
- b) Spur 1-6 = Replikate des Fusions-PCR-Produkt Δ 181 *nef*; (+) = Kontrolle PCR-Produkt *nef* Volllänge aus pCR3.1-uni/*nef*; M² = 1 kb Leiter.

Durch Restriktion des zweiten Subklonierungs-Vektor pCR® Blunt II-TOPO mit *Nhe* I und *EcoR* I konnte das 1358 bp große Fragment, welches das Δ *nef*-Gen enthält wieder gewonnen werden. Ebenso konnte nach *Nhe* I / *EcoR* I Verdau aus einem präparativen Gel das 11,2 kb große Fragment des RTSHIV-Plasmids ohne *nef* isoliert werden. Eine Ligation beider Fragmente führte zu replikationsfähigen Plasmiden, die sich aber in der Restriktionskontrolle als nicht vollständige RTSHIV-Konstrukte erwiesen. Bei der Ligation kam es zur Bildung von Plasmiden, bei denen ein großer Bereich des RTSHIV-Genoms deletiert wurde. Um dieses

Problem zu umgehen wurden weitere, einmal schneidende Enzyme in relativer Nähe zu *nef* gesucht und das entsprechende Fragment kloniert. Auch mit *Cla* I, *Bsp*E I (5'-gelegen) und *Pvu* I, *Eco*R V (3'-gelegen) sowie mit Kombinationen aller 5'- und 3'-gelegenen Schnittstellen konnte keine erfolgreiche Rückklonierung des Δ *nef*-Fragmentes in RTSHIV erfolgen.

Weitere Analysen führten zu der Auffassung, daß eine Rekombination über den Bereich der beiden LTR in jeder Klonierung zu einem verkürzten Vektor-Konstrukt führt, welches nur noch die Sequenz der LTR und den zur Replikation notwendigen pBR-322 Anteil trägt. Beide Sequenzbereiche würden bei Linearisierung durch ein Restriktionsenzym ein Fragment von 3,3 kb ergeben. In Restriktionsanalysen ergab sich nach Linearisierung der Plasmide diese Größe statt einer Bande bei 12,7 kb wie für ein vollständiges RTSHIV-Konstrukt. Um eine derartig mögliche Rekombination zu umgehen wurde als neue Strategie gewählt, das deletierte *nef*-Gen zunächst in ein Konstrukt zurück zu klonieren, welches nur eine LTR trägt. Anschließend wird das Fragment, welches die 5'LTR und die restlichen Gene bis hin zum Vollängen-Genom enthält wieder so eingefügt, das die Ligation über eine in dem pBR-322-Bereich liegende Schnittstelle erfolgt. Durch die im RTSHIV vorhandenen Restriktionsschnittstellen für *Hind* III bot sich die Möglichkeit, circa 66% des SIV-Genoms auszuschließen.

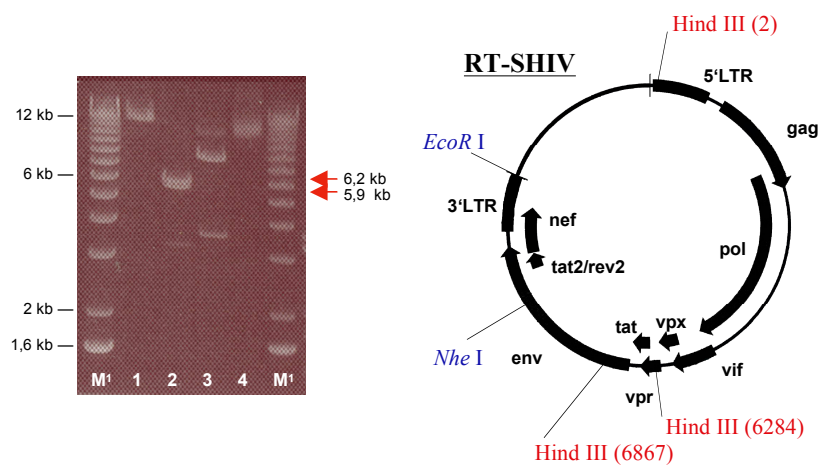


Abb. 3·5: Herstellung des verkürzten RTSHIV durch *Hind* III Schnitt und Selbst-Ligation der 3'-LTR, *nef* und Teilen von *env* enthaltenden 5,9 kb großen Bande (Spur 2, roter Pfeil). Die darüber liegende 6,2 kb große Bande enthält die restlichen, 5'-gelegenen Bereiche, die noch zu erwartende 583 bp Bande ist nicht zu sehen. Spur 1 = RTSHIV durch *Bam*H I linearisiert; Spur 2 = *Hind* III Schnitt; Spur 3 = *Bgl* I Kontroll-Restriktion; Spur 4 = ungeschnittene Plasmid-DNA; M¹ = 1 kb Leiter.

Durch Restriktion mit *Hind* III, anschließender Gelaufreinigung der entsprechenden 5,9 kb großen Bande (Abbildung 3·5) und Selbstligation dieses Fragmentes ergab sich ein Vektor, der nahezu das komplette *env*, *rev2*, *nef* die 3'-LTR sowie den zur Replikation notwendigen pBR-322 Anteil enthält. In dieses Plasmid wurde über *Nhe* I / *Eco*R I das im Subklonierungsvektor pCR3.1-uni vorliegende Δ *nef*-enthaltende Fragment eingeführt. Dazu wurden beide Vektoren mit den oben genannten Restriktionsenzymen geschnitten, das Δ *nef*-Fragment bzw. der offene Vektor über ein Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Diese beiden Fragmente wurde über die T4-Ligase ligiert und nach Hitzeschock-Transformation in TOP10-Zellen konnten wieder Plasmide isoliert werden, die in der PCR die 181 bp Deletion in *nef* aufwiesen.

Durch Einführen des Δ *nef*-Fragments in einen Vektor, der aus dem ursprünglichen RTSHIV hergestellt wurde, konnten nun eine Reihe von Restriktionsenzymen getestet werden, die vor und nach Δ *nef* liegen und für den Δ *nef*-tragenden Vektor als auch für das original RTSHIV-Plasmid unikat sind. Letztendlich konnte durch die Kombination von *Nhe* I mit *Bgl* I, welches 3'-gelegen innerhalb der pBR-322-Sequenz schneidet, ein 2,4 kb großes Fragment in das RTSHIV-Plasmid zurück kloniert werden, um Δ *nef*-RTSHIV zu erzeugen. In der Restriktionsanalyse erwiesen sich mehrere untersuchte Klone als dem original RTSHIV entsprechend, in der anschließenden analytischen PCR konnte in diesen RTSHIV Konstrukten die Deletion im *nef*-Gen nachgewiesen werden.

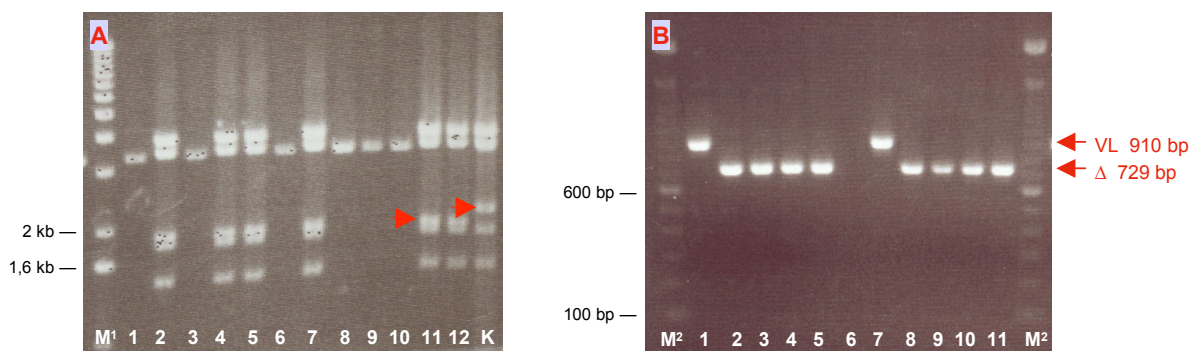


Abb. 3·6: Restriktionsanalyse und Deletionsnachweis der Δ 181-RTSHIV-Klone

a) Spur 1-12 = *Pst* I Verdau von 12 Δ *nef*-RTSHIV Klonen, (K) = Kontrolle parentales RTSHIV, 181 bp-Deletion (Spur 11) sichtbar gegenüber RTSHIV Kontrolle (K) an markierter Bande; M¹ = 1 kb Leiter.

b) Amplifikation eines *nef* umfassenden Bereichs im RTSHIV-Genom. Spur 1,7 = 910 bp *nef* PCR-Produkt (*nef* = 789 bp + flankierende Bereiche) aus RTSHIV; Spur 2,8 = 729 bp PCR-Produkt Δ 181-*nef* aus p239SpE3'/*nef*-del; Spur 6 = Keine DNA Kontrolle; Spur 3,4,5 und 9,10,11 = *nef*-PCR-Produkt der sechs im *Pst* I Verdau positiven Δ *nef*-RTSHIV Klonen; M² = 100 bp Leiter.

Um die Moleklarklone auf die Produktion von vollständigen und infektiösen Viruspartikeln zu testen wurden fünf Δnef -RTSHIV Plasmide (#1, #3, #5, #7 und #10) in Cos7-Zellen transfiziert. Der Zellkultur-überstand wurde 24 und 48 Stunden nach Transfektion auf die Menge an produzierten p24 als Maß für die Virusproduktion untersucht. Bei allen Moleklarklonen konnte SIV Gag nachgewiesen werden (Abbildung 3·7).

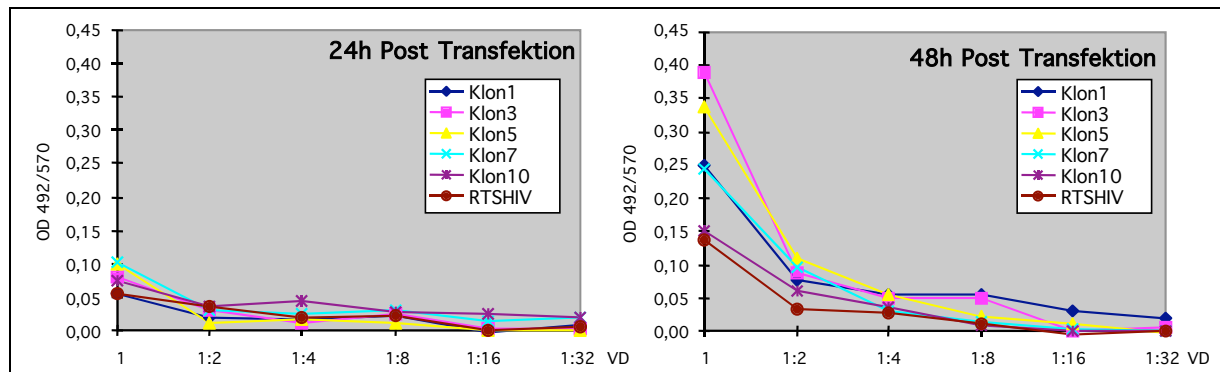


Abb. 3·7: p24-Nachweis im Zellkulturüberstand der mit Δnef -RTSHIV transfizierten Cos7-Zellen

Um zu zeigen, daß das gemessene Gag-Protein auch infektiöse Viruspartikel bedeutet, wurden fünf Ansätze von C8166-Zellen mit je einen Aliquot der Cos7-Zellkulturüberstände inkubiert. Nach 30 min bei 37°C sollte eine Infektion erfolgt sein, die Zellen wurden gewaschen und unter Standardbedingungen kultiviert. Im Lichtmikroskop konnte eine Infektion der C8166-Kultur beobachtet werden, nach sechs Tagen konnte dies im IPA als auch im p24-Test bestätigt werden. Weiterhin wurde am neunten Tag nach der Infektion aus den Überständen der fünf C8166-Kulturen virale RNA isoliert, um diese in der PCR zu untersuchen. Es konnte sowohl im Provirus durch eine Direkte-Lyse-PCR (Abbildung 3·8 a, nächste Seite) als auch durch RT-PCR in den viralen RNA-Genomen (Abbildung 3·8 b) die Deletion im *nef*-Gen gezeigt werden.

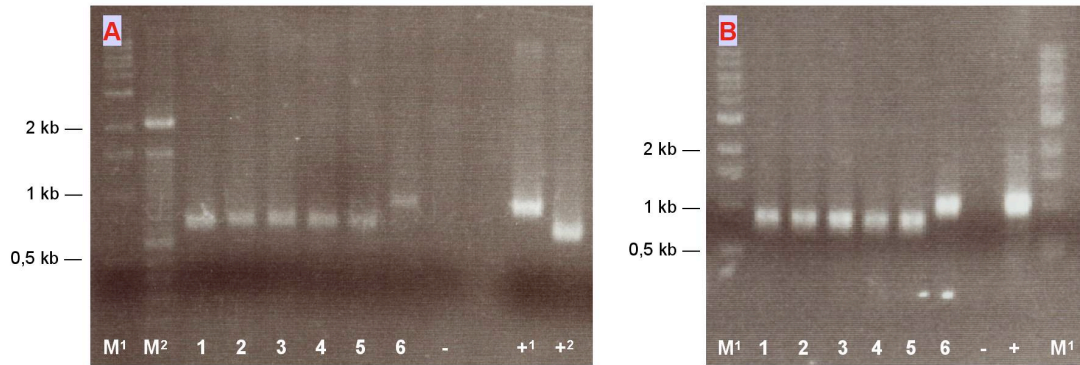


Abb. 3-8: Deletionsnachweis im proviralen und im viralen Genom.

a) Direkte-Lyse PCR aus C8166-Zellen, Spur 1-5 = *nef* PCR-Produkt aus Δ *nef* RTSHIV Proviren; Spur 6 = *nef* aus RTSHIV Provirus; (-) = Keine DNA Kontrolle; Spur 8 = leer; (+¹) = Kontrolle *nef* PCR-Produkt aus RTSHIV-Plasmid DNA, (+²) = Kontrolle Δ *nef* PCR-Produkt aus p239SpE3'/*nef*-del; M¹ = 1 kb Leiter, M² = 100 bp Leiter.

b) RT-PCR aus aufgereinigter viraler RNA, Spur 1-5 = *nef* PCR-Produkt aus Δ *nef* RTSHIVs; Spur 6 = *nef* PCR-Produkt aus RTSHIV; (-) = Keine DNA Kontrolle, (+) = Kontrolle *nef* PCR-Produkt aus RTSHIV-Plasmid DNA.

Mit den Klonen #³- und #⁵- Δ *nef*-RTSHIV wurde eine weitere Transfektion von Cos7-Zellen durchgeführt, der Zellkulturüberstand wurde wiederum nach 48 Stunden benutzt, um C8166-Zellen als auch aus Rhesusaffenblut isolierte Lymphozyten (PBMC = Peripheral blood mononuclear cells) zu infizieren. Mit Klon #³ konnten in diesem Versuch keine Cos7-Zellen transfiziert werden, es wurde nur bei den mit Klon #⁵ durchgeführten Folgeversuchen eine Infektion beobachtet. Aus den mit Klon #⁵- Δ *nef*-RTSHIV infizierten C8166-Zellen wurde zwölf Tage nach Infektion genomische DNA isoliert und diese in einer PCR eingesetzt. Es wurden von den proviralen Template als auch von der Plasmid-DNA von Klon #⁵- Δ *nef*-RTSHIV PCR-Produkte amplifiziert, die den Bereichen von *nef* und der Reversen Transkriptase in *pol* entsprechen. Diese wurden sequenziert, um die Deletion in *nef* und die HIV-RT in den aus Cos7-Zellen stammenden Viren zu verifizieren. Ebenfalls wurden zu diesem Zeitpunkt die Zellkulturüberstände der transfizierten Cos7-Zellen, der infizierten C8166-Zellen und der infizierten PBMC auf Reverse Transkriptase Aktivität hin getestet.

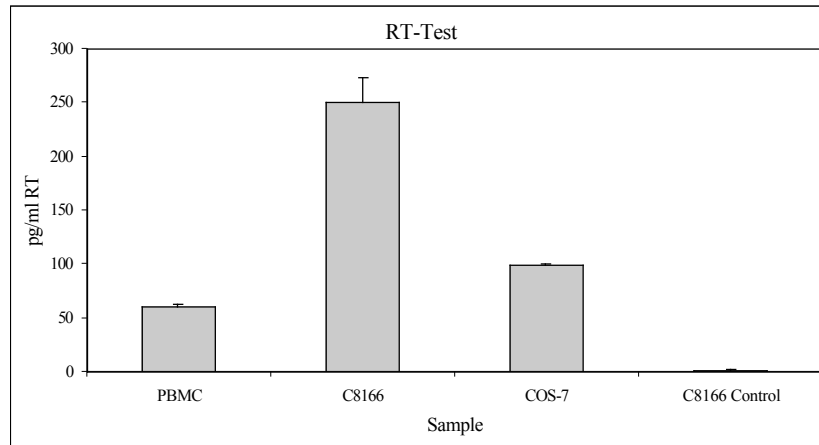


Abb. 3-9 Nachweis von Reverser-Transkriptase Aktivität im Zellkulturüberstand mit Δnef -RTSHIV infizierten PBMC, C8166-Zellen und der transfizierten Cos7 Zellen.

Da diese Vorgehensweise sich als erfolgreich herausgestellt hatte, wurde über die selben Schritte auch eine RTSHIV C8-Deletionsmutante hergestellt und die Infektiosität der entstandenen Viren wie oben beschreiben bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Vor weiterführenden Experimenten wurde in beiden RTSHIV *nef*-Deletionsmutanten die Größe der Deletion durch Sequenzierung nachgewiesen.

141	CAAGGGCTTGAGCTCACTCTCTTGTGAGGGACAGAAATACAATCAGGGACAGTATATGAATACTCCATGG	RTSHIV
141	CAAGGGCTTGAGCTCACTCTCTTGTGAGGGACAG	$\Delta 181$
141	CAAGGGCTTGAGCTCACTCTCTTGTGAGGGACAGAAATACAATCAGGGACAGTATATGAATACTCCATGG	C8
211	AGAAACCCAGCTGAAGAGAGAGAAAAATTAGCATACAGAAAACAAAATATGGATGATATAGATGAGTAAG	RTSHIV
211		$\Delta 181$
211	AGAAACCCAGCTGAAGAGAGAGAAAAATTAGCATACAGAAAACAAAATATGGATGATATAGATGAGTAAG	C8
281	ATGATGACTTGGTAGGGGTATCAGTGAGGCCAAAAGTTCCCCTAAGAACAATGAGTTACAAATTGGCAAT	RTSHIV
281		$\Delta 181$
281	ATGATGACTTGGTAGGGGTATCAGTGAGGCCAAAAGTTCCCCTAAGAACAATGAGTTACAAATTGGCAAT	C8
351	AGACATGTCTCATTTTATAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGATTTATTACAGTGCAAGAAGACATAGA	RTSHIV
351		$\Delta 181$
351	AGACATGTCTCATTTTATAAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGATTTATTACAGTGCAAGAAGACATAGA	C8
421	ATCTTAGACATATACTTAGAAAAGGAAGAAGGCATCATAACCAGATTGGCAGGATTACACCTCAGGACCAG	RTSHIV
421	ATCTTAGACATATACTTAGAAAAGGAAGAAGGCATCATAACCAGATTGGCAGGATTACACCTCAGGACCAG	$\Delta 181$
421	ATCTTAGA	C8

Abb. 3-10: Alignment von RTSHIV (entspricht in *nef* SIVmac239) und RTSHIV *nef*-Deletionsmutanten. Die Numerierung bezieht sich auf das *nef*-Gen, mit „A“ des ATG als Position 1.

Abbildung 3-11 faßt die Schritte zu den RTSHIV *nef*-Deletionsmutanten schematisch zusammen.

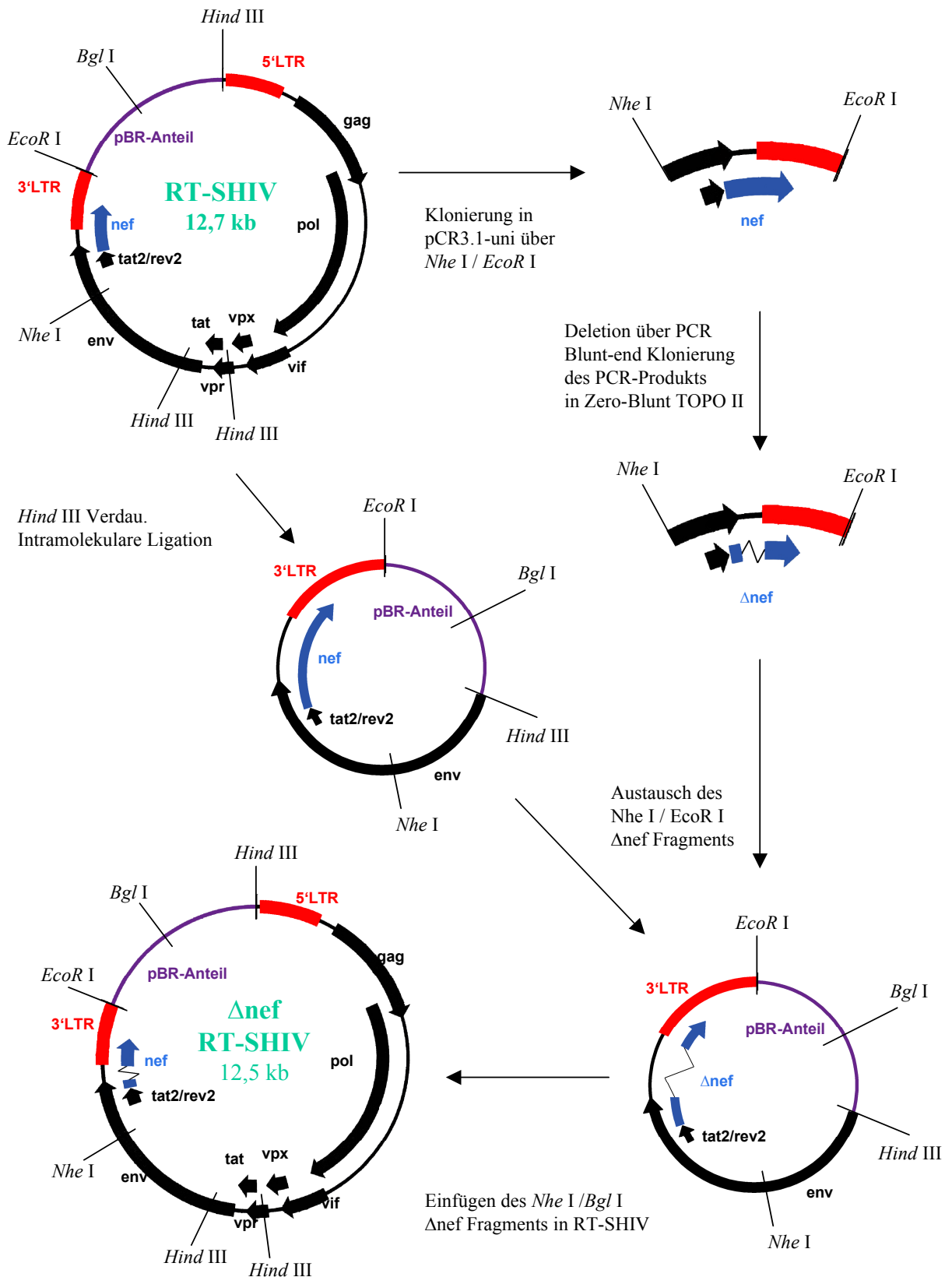


Abb. 3-11: Schematische Darstellung der Klonierungsschritte zum Δ nef-RTSHIV Molekularklon

3.1.2 Etablierung einer analytischen PCR zur Detektion der C8-Mutante

Da sich das um nur 12 Basenpaar kürzere PCR-Produkt für *nef* im Agarosgel nur unter günstigen Bedingungen von dem undeletierten *nef* unterscheiden läßt, wurde zur Identifizierung der C8-Mutanten eine PCR eingesetzt. Dazu wurden Primer gewählt, die spezifisch an der Stelle der Deletion binden. Mit dem Forward-Primer, der am Anfang des *nef*-Gens bindet und einem Reverse-Primer, der mit seinem 3'-OH-Ende an der Stelle der zu deletierenden Basen liegt wird das undeletierte *nef*-Gen detektiert. Es entsteht ein PCR-Produkt, welches den 5'- der Deletion gelegenen Bereich darstellt. Mit einem Forward-Primer, der aus der Sequenz vor und nach der Deletion besteht, also nur binden kann, wenn die 12 Basen fehlen und einem Reverse-Primer am Ende des *nef*-Gens wird das 3'-gelegene Fragment amplifiziert. Bei einer stringenten Annealing-Temperatur kann somit je nach Template nur eines der PCR-Produkte entstehen (Abbildung 3·13).

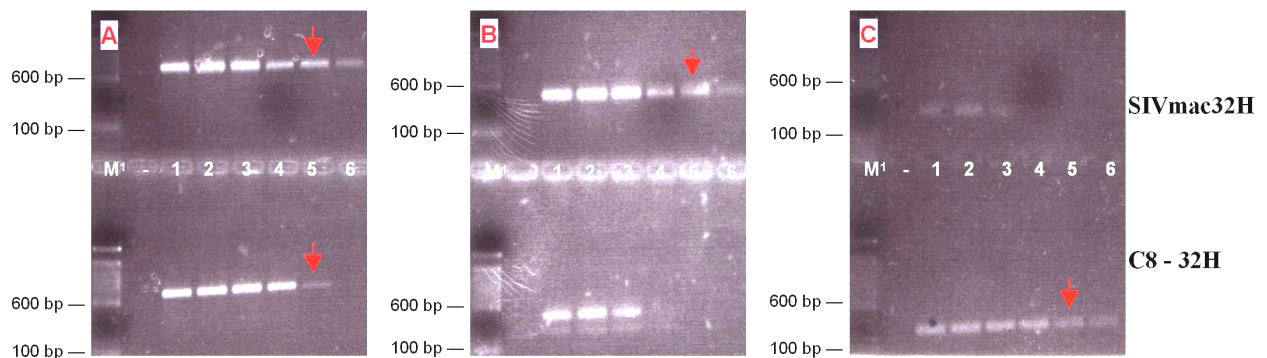


Abb 3·12 Etablierung der C8-Finder PCR auf *nef*-Deletionsmutanten im Annealing-Temperatur Gradienten Spur 1-6 = 57°/ 57,5°/ 58,3°/ 59,5°/ 60,9°/ 62,3°C. Markiert ist die Annealing-Temperatur von 60,9°C, bei der das komplette Gen, als auch die beiden Fragmente spezifisch für *nef*-Volllänge oder -Deletionsmutante nachgewiesen werden. (SIVmac C8-Mutante freundlich zur Verfügung gestellt von Fr. Dr. Binninger-Schinzel, PEI.)

- a) Amplifikation des kompletten *nef*-Gens bei SIVmac *nef*-Vollängen (oben) und SIVmac *nef*-C8 Mutante (unten). M¹ = 100 bp Leiter; (-) = Keine DNA Kontrolle.
- b) Amplifikation des 451 bp Fragments bei 60,9°C nur auf dem Vollängen-Template.
- c) Amplifikation des 329 bp Fragments bei 60,9°C nur bei Vorhandensein der 12 bp Deletion.

3.1.3 Sensitivität der RTSHIV-Konstrukte gegenüber einem Non-Nukleosid-Analoga Inhibitor

Um *in vitro* die Inhibition der RTSHIV-Konstrukte durch ein Therapeutikum zu simulieren, wurden C8166-Zellkulturen mit Viren und einem Non-Nukleosid-Analoga RT-Inhibitor (NNRTI) inkubiert. Die Viren wurden durch Transfektion der RTSHIV-, Δ181-RTSHIV- und C8-RTSHIV-Moleklarklone in Cos7-Zellen erzeugt. Dazu wurde der Zellkulturüberstand zwei Tagen nach Transfektion abgenommen, zellfrei zentrifugiert, durch einen p24-ELISA

die Menge an produziertem Virus ermittelt. Die nach p24-Bestimmung abschätzbare gleiche Menge an Viren wurden auf drei C8166-Kulturen gegeben. Ebenfalls wurde eine C8166-Kultur mit SIVmac 32H, dem potentiellen Belastungsvirus im Rhesusaffen-Experiment, infiziert. Nevirapin ist der Grundwirkstoff der in der HIV-Therapie eingesetzten NNRT-Inhibitoren, es konnte eine geringe Menge als Reinstoff durch das "AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH" (Rockville, MD, USA) bezogen werden. Nevirapin (Dipyridodiazepinon-Derivat) ist spezifisch für die HIV-1 Reverse Transkriptase, es bindet nicht im aktiven Zentrum des Enzyms sondern verursacht wahrscheinlich durch die Bindung an das Enzym eine Konformationsänderung, welche bei HIV-1 die RT-Aktivität als auch die RNase H-Aktivität beeinflusst (Merluzzi *et al.*, 1990). Um verschiedene Konzentrationen des Inhibitors zu testen wurden die infizierten C8166-Kulturen in 6 Ansätze geteilt und mit Konzentrationen von 0,2 nM bis 2 µM Nevirapin über 11 Tage kultiviert. An den Bestimmungspunkten wurde jeweils 1 ml des Zellkulturüberstandes entnommen und im p24-ELISA getestet (Abbildung 3·13). Die Kulturen wurden mit Medium gefüttert, welches die entsprechende Konzentration von Nevirapin enthielt.

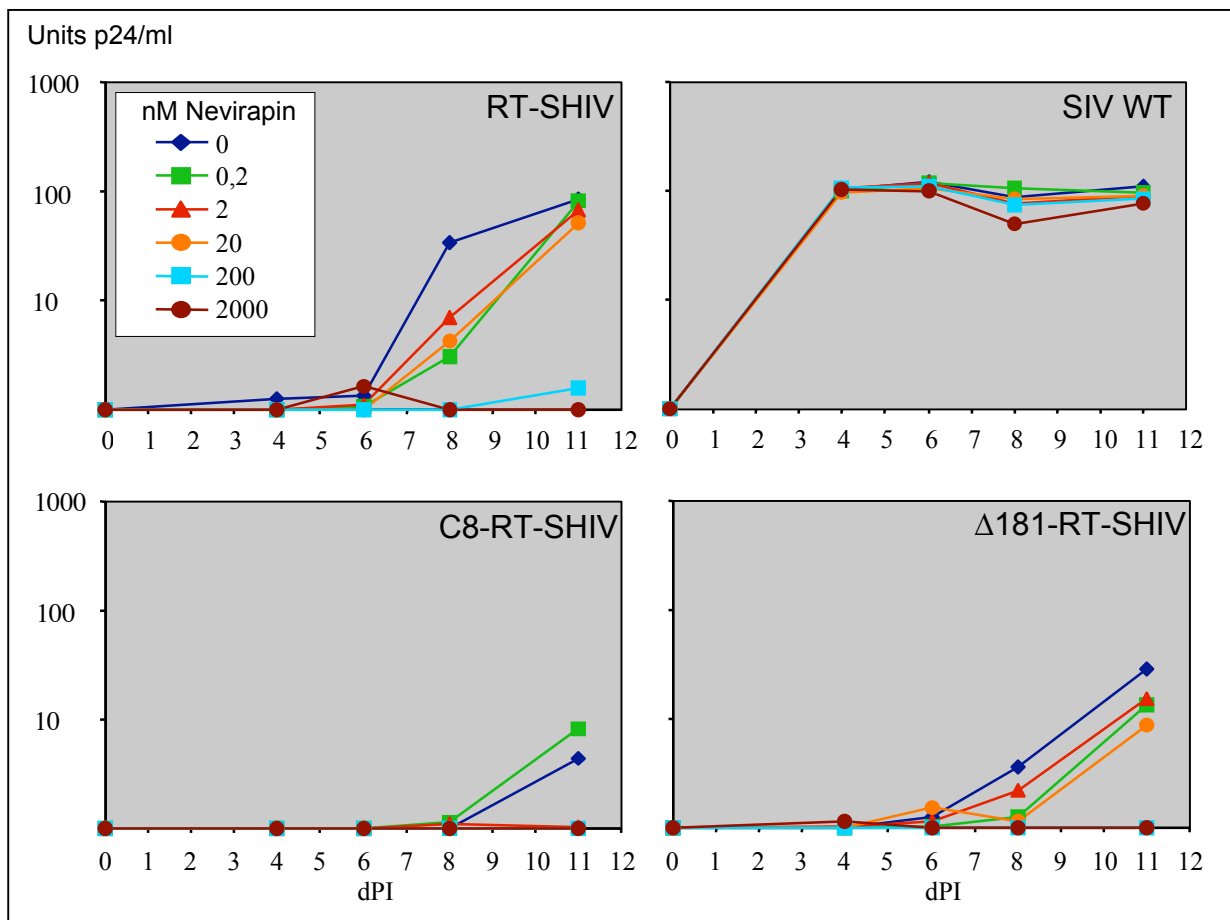


Abb. 3·13 p24-Nachweis im Zellkulturüberstand infizierter und mit Nevirapin behandelter C8166 Zellen. Pro Virus (RTSHIV, SIVmac 32H Wildtyp und die *nef*-Deletionsmutanten C8- und Δ181- RTSHIV) wurden 6 Kulturen angesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen an Nevirapin über 12 Tage kultiviert. (dpi) = Tage nach Infektion / days post infection.

Die ermittelte, notwendige Konzentration von Nevirapin entspricht den in der Literatur beschriebenen Werten (Uberla *et al.*, 1995). Die wesentlich stärkere Replikation des Wildtyp-Virus 32H und auch des RTSHIV-Konstrukts in Abwesenheit von Nevirapin gegenüber beiden Δnef -Mutanten kann auf unterschiedliche Mengen an zur Infektion eingesetztem Virus liegen. Auch ist SIVmac 32H bereits *in vitro* an T-Zellen adaptiert. Der p24-ELISA spiegelt nur bedingt die Menge an tatsächlich infektiösen Partikeln in der Probe wieder. In Abbildung 3·13 ist zu sehen, daß nur das SIV Wildtyp Virus SIVmac 32H nicht von steigenden Konzentrationen Nevirapin beeinflusst wird. Bei sämtlichen RTSHIV-Konstrukten wird durch die Konzentration von 200 nM im Medium die Virusproduktion fast vollständig gehemmt, es kann kein p24 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden.

3.1.4 Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR zur Viruslast-Bestimmung

Um in den geplanten Tierversuchen die Viruslast nach Immunisierung bzw. nach Belastung möglichst genau zu ermitteln, wurde eine Real-Time RT-PCR etabliert. Nach Aufarbeitung von viraler RNA aus Blutproben kann durch die quantitative Real-Time PCR die Kopienzahl der RNA-Templates ermittelt werden und somit die Anzahl von Viruspartikel pro Milliliter Blut bestimmt werden. Die RT-PCR wurde mit Virus-RNA aus Zellkulturüberständen auf den Geräten ABI PRISM -7000, -7700 (Perkin Elmer) und dem MX 4000 (Stratagene) getestet. Die Primer und die Fluoreszenz-markierte Sonde binden in einem relativ konservierten Bereich im *gag* und sind somit für die Isolate SIVmac239, SIVmac 32H und SIVmac 251 bzw. für die aus den Δnef -RTSHIV Konstrukten entstehenden Viren verwendbar. Die PCR wurde mittels RNA-Isolation von SIVmac 32H nach *in vitro* Infektion von C8166-Zellen soweit optimiert, daß 100 RNA-Kopien pro Ansatz nachweisbar sind. Während der Etablierungsphase wurde der RTSHIV Moleklarklon titriert und als Standard benutzt, dieser DNA-Standard war bis zu 10 Kopie pro Ansatz nachweisbar (Abbildung 3·14, nächste Seite).

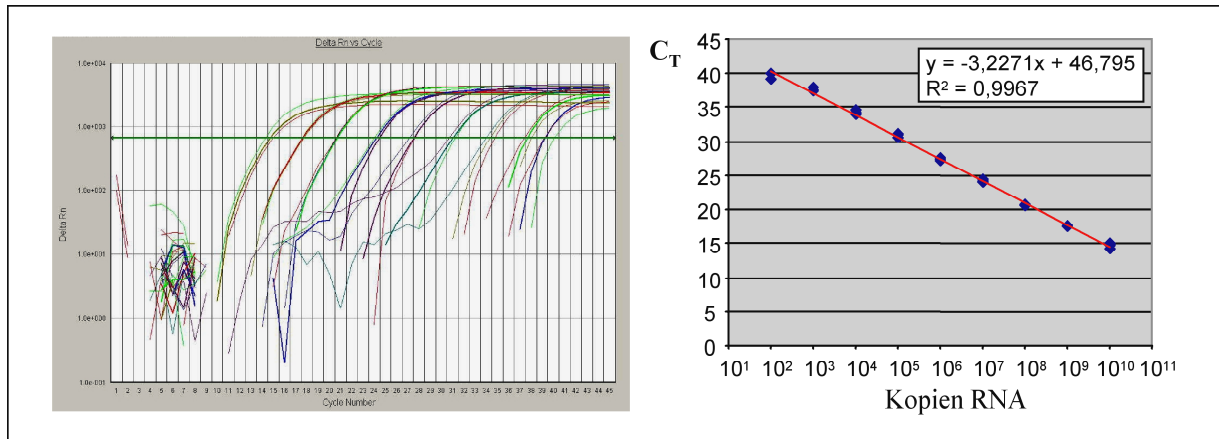


Abb. 3-12 Amplification-Blot und Standard-Gerade der RT-PCR mit viraler RNA aus Zellkulturüberstand auf dem ABI PRISM 7000. Im Amplification-Blot ist der Anstieg der gemessenen Fluoreszenz nach Korrektur durch Background-Substraktion (ΔR_n) über die 45 Zyklen der PCR. Standard-Gerade wurde aus den C_T-Werten errechnet. Der CT-Wert entspricht dem PCR-Zyklus, in dem das gemessene Signal einer Probe über den festzulegenden Background-Wert steigt.

3.1.5 Ausstehender Einsatz der Δnef -RTSHIV im Tier-Modell

Die beschriebenen Δnef -RTSHIV-Mutanten sind somit geeignet, um nach Transfektion in Zellkultur infektiöse, RT-Inhibitor sensitive Viruspartikel anzuzüchten und mit diesen nach Aufreinigung und Titer-Bestimmung Rhesusaffen experimentell zu infizieren. Der NNRTI Nevirapin ist als Therapeutikum für AIDS-Patienten erhältlich und kann in dieser Form bei Rhesusaffen eingesetzt werden. Nach Abschluß dieses molekularbiologischen Projekts wäre die Weiterführung in Form einer Studie in Rhesusaffen möglich. Zu diesem Zeitpunkt aber begab sich der Umzug der Arbeitsgruppe in das Robert Koch-Institut, Berlin und somit eine veränderte Aufteilung der Forschungsschwerpunkte im PEI. In den S3-tauglichen Ställen für Primaten, in denen die Tierexperimente mit gentechnisch veränderten, infektiösen Viren erfolgen müssen ergab sich kein Platz mehr für die zu dieser Studie nötige Zahl an Tieren. Dadurch wurde das Projekt an dieser Stelle zunächst beendet, es werden momentan Ausweichmöglichkeiten im Sinne von Kooperationen mit anderen Primatenzentren in Deutschland abgewogen.

3.2 Entwurf und Konstruktion eines HIV-1 Subtyp-spezifischen DNA-Immunogens

Im Robert Koch-Institut wurden zur Zeit der Durchführung dieser Arbeit von der Arbeitsgruppe um Frau Dr. C. Kücherer mehrere HIV-1 Primär-Isolate aus dem afrikanischen Staat Nigeria untersucht. Unter andern wurden von den zwei Isolaten, 00_187 aus der Region Kogi und 00_200 aus der Region Niger eine Virusanzucht etabliert, beiden Isolate wurde dann aufgrund der analysierten Sequenz von Bereichen im *env*- und *gag*-Gen als Subtyp CRF02_AG eingestuft. Da diese HIV-1 Mosaikgenome, aus Subtyp A und Subtyp G bestehend, erst vor kurzer Zeit als eigener Subtyp eingestuft wurden, wird auch die Bezeichnung „IbNG-ähnlich“, nach dem ersten untersuchten Isolat dieses Typs verwendet. Von diesen beiden Isolaten wurden „Near-Full-Length“-Molekularklone hergestellt, indem das Virusgenom mit nur einem Teil der 5'-LTR in einer RT-PCR amplifiziert und in Cosmid-Vektoren kloniert wurde (AG Dr. Kücherer). Von diesen Klonen ergaben sich pro Isolat vier in der Restriktionsanalyse unterschiedliche Klone (Daten nicht gezeigt). Diese acht Molekularklone der zwei IbNG-ähnlichen Primär-Isolate wurden an unsere Arbeitsgruppe weitergegeben, um aus diesen ein HIV-1 Subtyp CRF02_AG Genom auszuwählen, welches als Basis für ein in Nigeria einzusetzende DNA-Vakzine dienen sollte.

Dazu sollten von den Molekularklonen 5¹, 5⁶, 5⁸ und 5⁹ für das Isolat 00_187 und 7³, 7⁶, 7⁷ und 7⁸ für das Isolat 00_200 zunächst die Leserahmen für *gag*, *tat* und *env* sequenziert werden, um diese Bereiche auf Ähnlichkeit zu den bekannten CRF02_AG Subtypen hin zu analysieren, sowie auf die Ähnlichkeit zu einander oder auf frühzeitige Stop-Codons oder Mutationen. Um die Amplifikation und somit die Subklonierung der bislang unbekannt Sequenzbereiche zu ermöglichen, mußten anhand eines Alignments (nicht dargestellt) mit den bisher bekannten und veröffentlichten Genom-Sequenzen der CRF02_AG-Subtypen Isolat-unspezifische Primer in konservierten Region vor bzw. nach den Leserahmen gewählt werden.

Das Alignment umfaßte den „IbNG“-Prototyp, das erste, von Howard, Olayele und Rasheed 1997 beschriebene Subtyp A/ Subtyp G Mosaikgenom (Genbank-Accession Number L39106) sowie die in West- oder West-Zentral Afrika gefundenen Isolate 92NG003 (Genbank U88825), VI1035 (Genbank AJ276595), DJ263 (Genbank AF063223), DJ264 (Genbank AF063224) und das Isolat 98SE-MP1213 (Genbank AJ251057).

Mit den gewählten Primern wurde eine PCR mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt (Abbildung 3·15), um den Einbau von falschen Basen in das zu klonierende Fragment während der

Amplifikation möglichst gering zu halten. Als PCR-Positiv-Kontrolle diente der Einsatz von Plasmid-DNA des Moleklarklons des IbNG-ähnlichen Isolats 92NG002 (erhältlich durch das AIDS-Reagent Program, NIH, USA). Die Primer sollten Amplifikate liefern, die den Leserahmen von *tat1* = 213 bp, *tat2* = 90 bp, *gag* = 1478 bp und *env* = 2564 bp der IbNG-ähnlichen Referenz-Sequenzen, plus 50-60 Basen im Alignment vor/nach dem Start- bzw. Stop-Codon. Die PCR-Fragmente wurden in den pCR[®]4 Blunt-TOPO-Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert und sequenziert.

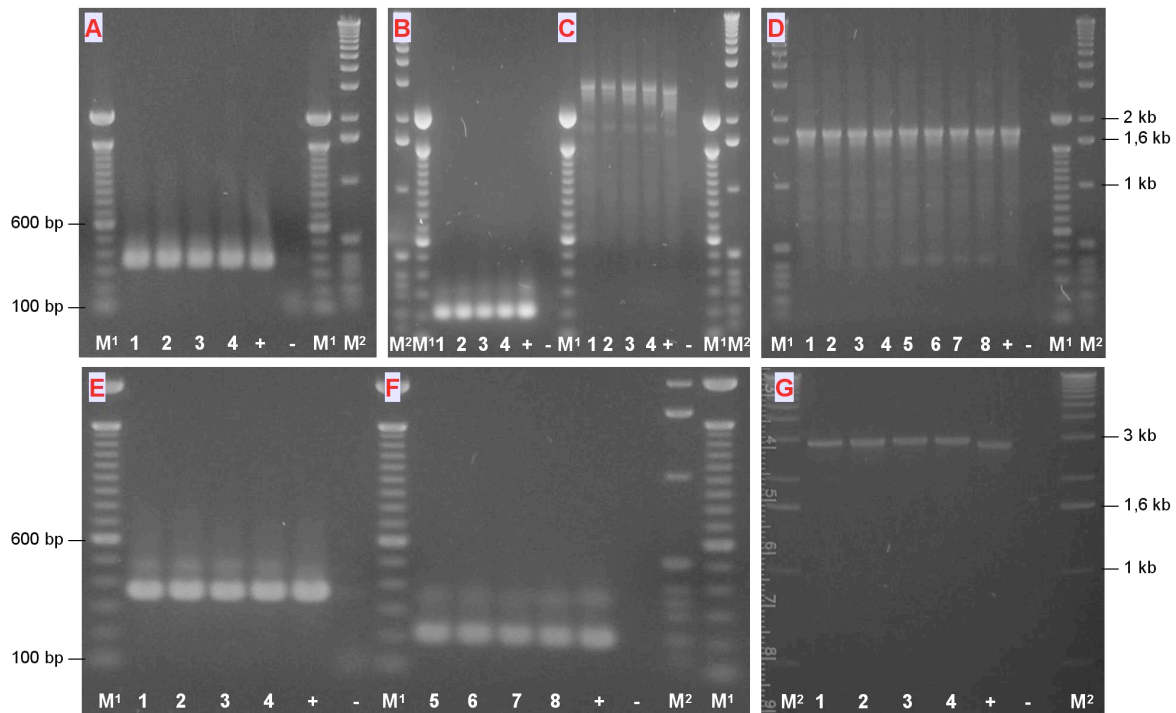


Abb. 3-15: Amplifikation der Wildtyp-Gene aus den acht Moleklarklonen. M¹ = Marker 100 bp Leiter; M² = Marker 1 kb Leiter; (+) = Positivkontrolle p92NG003 DNA; (-) = Keine DNA Kontrolle.

- a) *tat*-Exon1 PCR-Produkt 354 bp; Spur 1-4 = 5^{/1}, 5^{/6}, 5^{/8}, 5^{/9} für a) - c).
- b) *tat*-Exon2 PCR-Produkt 213 bp.
- c) *env* PCR-Produkt 2837 bp.
- d) *gag* PCR-Produkt 1792 bp; Spur 1-4 = 5^{/1}, 5^{/6}, 5^{/8}, 5^{/9}; Spur 5-8 = 7^{/3}, 7^{/6}, 7^{/7}, 7^{/8}.
- e) *tat*-Exon1 PCR-Produkt 354 bp; Spur 1-4 = aus 7^{/3}, 7^{/6}, 7^{/7}, 7^{/8} für e) - f).
- f) *tat*-Exon2 PCR-Produkt 213 bp.
- g) *env* PCR-Produkt 2837 bp.

Um Verzögerungen durch die zeitaufwendige Sequenzierung der relativ großen *env*-Gene zu vermeiden, wurde zunächst mit der Analyse von *tat* und *gag* fortgefahren. Die erhaltenen Sequenzen wurden als Aminosäure-Sequenzen mit den entsprechenden Bereichen der IbNG-Prototyp-Sequenz als Referenz angeordnet und verglichen. Der Moleklarklon 5^{/8} exprimiert wegen einer Mutation zu einem Stop-Codon nach 542 Basen ein 180 Aminosäuren langes Genprodukt, gegenüber dem 492 Aminosäuren langen Gag-Protein bei der Referenz-Sequenz. Die Klone 7^{/3} bis 7^{/8} des Isolates 00_200 tragen das Stop-Codon erst ab Position 1492 und

exprimieren somit ein 497 Aminosäuren langes Gag. Das größere Protein entsteht durch eine Insertion von 15 Basen bzw. 5 Aminosäuren im Bereich p6 (in Abbildung 3·16, nächste Seite gelb dargestellt) ab Position 469 im Aminosäure-Alignment.

Als weiteres Auswahlkriterium wurde in der Aminosäure-Sequenz nach Übereinstimmungen mit bekannten CTL-Epitopen gesucht. Für viele HIV-Proteine sind Epitope in Form von 8-12 Aminosäuren beschrieben, die aufgrund gewisser Sequenzmotive an bestimmten humanen MHC-Klasse-I Molekülen binden. Infizierte kernhaltige Zellen präsentieren diese kurzen viralen Peptide den zytotoxischen T-Zellen (cytotoxic T-lymphocytes, CTL) und induzieren somit eine spezifische Lyse durch die CTL. Um Aussagen über die Bedeutung von vorhandenen CTL-Epitope machen zu können, müssen die in Nigeria vorkommenden HLA-Typen berücksichtigt werden. Obwohl die unterschiedlichen MHC-Klasse-I Allele in der gesamten Bevölkerung auch alle exprimiert werden können, sind bestimmte vorherrschende Typen beschreiben. Für Nigeria konnten folgende Daten gefunden werden (Tabelle 3·1) :

Tab. 3·1: HLA-Klasse-I Verteilung für Nigeria (aus Cao *et al.*, 1997).

HLA Allel	Verbreitung in %	
	in Nigeria	in gesamt Süd-Afrika
- A2	14,7	13,0
- A3	9,7	97,0
- B7	7,3	10,5
- B14	0,0	3,3
- B35	5,9	2,1

Die für diese HLA-Typen in Frage kommenden Epitope sind in Abbildung 3·16 durch farbige Boxen in den Sequenzen dargestellt (siehe auch Tabelle 3·2).

IbNG	MGARASVLSGGKLD WEKIRLRPGGKKYRLKHLV WASRELERF ALNPGLLETAEGCQQIMEQLQSALRT	70
Gag 5/1	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKYRLKHLV WASRELERF ALNPGLLETAEGCQQIMEQLQSALGT	70
Gag 5/6	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKYRLKHLV WASRELERF ALNPGLLETAEGCQQIMEQLQSALGT	70
Gag 5/8	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKYRLKHLV WASRELERF ALNPGLLETAEGCQQIMEQLQSALGT	70
Gag 5/9	MGARASVLSGGKLDWEKIRLRPGGKKYRLKHLV WASRELERF ALNPGLLETAEGCQQIMEQLQSALGT	70
Gag 7/3	MGARASVLSGGKLD DAWEKIRLRPGGRKKYRLKHLV WASRELERFALNPGLLETAEGCQQIMDQLQSALGT	70
Gag 7/6	MGARASVLSGGKLD DAWEKIRLRPGGRKKYRLKHLV WASRELERFALNPGLLETAEGCQQIMDQLQSALGT	70
Gag 7/7	MGARASVLSGGKLD DAWEKIRLRPGGRKKYRLKHLV WASRELERFALNPGLLETAEGCQQIMDQLQSALGT	70
Gag 7/8	MGARASVLSGGKLD DAWEKIRLRPGGRKKYRLKHLV WASRELERFALNPGLLETAEGCQQIMDQLQSALGT	70
IbNG	GSEELKSLFN TIATLWCVHQRIDIRDTKEALDKIEEIQNKSKQKTQAAAAATGSSSQNYPIVQNAQGQMT	140
Gag 5/1	GTEELKSLFN TIATLWCVHQRIDIRDTKEALDKIEE VKNKSKQKAQAAAAATGSSSQNYPIVQNAQGQMT	140
Gag 5/6	GTEELKSLFN TIATLWCVHQRIDIRDTKEALDKIEE VKNKSKQKAQAAAAATGSSSQNYPIVQNAQGQMT	140
Gag 5/8	GTGELKSLFN TIATLWCVHQRIDIRDTKEALDKIEE VKNKSKQEAQAAAAATGSSSQNYPIVQNAQGQMT	140
Gag 5/9	GTGELKSLFN TIATLWCVHQRIDIRDTKEALDKIEE VKNKSKQEAQAAAAATGSSSQNYPIVQNAQGQMT	140
Gag 7/3	GTEELKSLFN TIATLWCVHKRIEIKDTKEALDKIEE IQNKSKQKTQAAAAATGSSSQNFPIVQNAQGQMV	140
Gag 7/6	GTEELKSLFN TIATLWCVHKRIEIKDTKEALDKIEE IQNKSKQKTQAAAAATGSSSQNFPIVQNAQGQMV	140
Gag 7/7	GTEELKSLFN TIATLWCVHKRIEIKDTKEALDKIEE IQNKSKQKTQAAAAATGSSSQNFPIVQNAQGQMV	140
Gag 7/8	GTEELKSLFN TIATLWCVHKRIEIKDTKEALDKIEE IQNKSKQKTQAAAAATGSSSQNFPIVQNAQGQMV	140
IbNG	HQPMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF SALSEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 5/1	YQSMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF TAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 5/6	YQSMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF TAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 5/8	YQSMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF TAL SEGATPQD.NMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 5/9	YQSMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF TAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 7/3	HQTMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF SAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 7/6	HQTMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF SAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 7/7	HQTMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF SAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
Gag 7/8	HQTMSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIMF SAL SEGATPQDLNMMMLNIVGGHQAAQMQLKDTINEEAAEWD	210
IbNG	RVHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQIGWMTSNPPVPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 5/1	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPVPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 5/6	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPVPVGETYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 5/8	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPVPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 5/9	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPVTVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 7/3	RAHPV R AGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPIPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 7/6	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPIPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 7/7	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPIPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
Gag 7/8	RAHPVHAGPIPPGQ MREPRGSDIAGTTSTLQEQ IGWMTSNPPIPVGEIYKRWIVLGLNKIVRMYSVPSIL	280
IbNG	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPGATLEEMMTACQGV	350
Gag 5/1	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ STQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPAATLEEMMTACQGV	350
Gag 5/6	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ STQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPAATLEEMMTACQGV	350
Gag 5/8	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ STQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPAATLEEMMTACQGV	350
Gag 5/9	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ STQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPAATLEEMMTACQGV	350
Gag 7/3	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ ATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPGATLEEMMTACQGV	350
Gag 7/6	DIRQGPKEPFRDY ADR FFKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPGATLEEMMTACQGV	350
Gag 7/7	DIRQGPKEPFRDY ADR FFKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPGATLEEMMTACQGV	350
Gag 7/8	DIRQGPKEPFRDYVDR FFKTLRAEQ ATQEVKNWMTETLLVQANANPDCKSILRALGPGATLEEMMTACQGV	350
IbNG	GGPGHKARVLA EAMSVQDQSNIMVQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPRKKGCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 5/1	GGPSHKARVLA EAM SVQDQSNIMVQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPRKKGCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 5/6	GGPSHKARVLA EAM SVQDQSNIMVQR S NFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPRKKGCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 5/8	GGPSHKARVLA EAM SVQDQSNIMVQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPRKKGCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 5/9	GGPSHKARVLA EAM SVQDQSNIMVQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPRKKGCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 7/3	GGPGHKARVLA EAM SVQHANVMIQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPR K GCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 7/6	GGPGHKARVLA EAM SVQHANVMIQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPR K GCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 7/7	GGPGHKARVLA EAM SVQHANVMIQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPR K GCWCKGKEGHQMKD	420
Gag 7/8	GGPGHKARVLA EAM SVQHANVMIQRGNFRGQRTIKCFNCGKEGHLARNCKAPR K GCWCKGKEGHQMKD	420
IbNG	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQSRTEPTAPPAESLGMGEEITSPFKQEPKDKEYPPLTSLKSLFGN	490
Gag 5/1	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQSR TEPTAPPAESLGMGEEITSPFKQEPKDKEYPPLTSLKSLFGN	490
Gag 5/6	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQSR TEPTAPPAESLGMGEEITSPFKQEPKDKEYPPLTSLKSLFGN	490
Gag 5/8	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQSR TEPTAPPAESLGMGEEITSPFKQEPKDKEYPPLTSLKSLFGN	490
Gag 5/9	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQSR TEPTAPPAESLGMGEEITSPFKQEPKDKEYPPLTSLKSLFGN	490
Gag 7/3	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQ NRLTEPTAPPAESLGMGEEITSP ITSPQ KQEPDKGLYPPLTSLR	490
Gag 7/6	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQ NRLTEPTAPPAESLGMGEEITSP ITSPQ KQEPDKGLYPPLTSLR	490
Gag 7/7	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQ NRLTEPTAPPAESLGMGEEITSP ITSPQ KQEPDKGLYPPLTSLR	490
Gag 7/8	CTERQANFLGKI WPSSKGRPGNFQ NRLTEPTAPPAESLGMGEEITSP ITSPQ KQEPDKGLYPPLTSLR	490

IbNG	DP.	492
Gag 5/1	DP.	492
Gag 5/6	DP.	492
Gag 5/8	DP.	492
Gag 5/9	DP.	492
Gag 7/3	SLFGNDP.	497
Gag 7/6	SLFGNDP.	497
Gag 7/7	SLFGNDP.	497
Gag 7/8	SLFGNDP.	497

Abb. 3-16: Aminosäure-Alignment der sequenzierten gag-Bereiche.

Die vier 5/-Moleklarklone basierend auf dem Primär-Isolat 00_187, die vier 7/-Moleklarklone auf dem Primär-Isolat 00_200. Unterschiede zur IbNG- Referenz-Sequenz sind türkis unterlegt, die Insertion in den Moleklarklonen des Isolats 00_200 ist gelb unterlegt. Berücksichtigte CTL-Epitope sind farblich unterlegt.

Tab. 3-2: CTL-Epitope (aus Brander and Goulder, 2000, ^{#)} Altfeld et al., 2001).

Unter Berücksichtigung der in Nigeria häufig vorkommenden HLA-Typen für Gag ausgewählte CTL-Epitope, welche in den IbNG-ähnlichen Isolaten 00_187 und 00_200 gefunden werden konnten. Farbliche Unterlegung in der Tabelle entspricht den Boxen im Aminosäure-Alignment. Rot sind die Unterschiede zu den für HXB2R-Epitop dargestellt, in fett gedruckt sind die Verankerungsreste zur stabilen Präsentation an dem MHC-Klasse-I Molekül.

Epitop			Restriktion	Beschrieben
00_200	HXB2R (Ref.)	Variation		
RLRPGG R KK	R L RPGGKKK		HLA-A3, -A2	p17, AA 20-28
WASRELER F	W A SRELER F		HLA-B35	p17, AA 36-44
SL F NT I ATL	S L YNTVAT L	S L FNT I AT L	HLA-A2	p17, AA 77-85
SPRTLNAWV	SPRTLNAWV		HLA-B7	p24, AA 16-24
TPQDLN M ML	TPQDLN T ML		HLA-B7	p24, AA 48-56
PPIPVGE I Y	PPIPVGD I Y		HLA-B35	p24, AA 122-130
GPGHKARVL	GPGHKAR V L		HLA-B7	p24, AA 223-231
VLAEAMSQV	VLAEAMSQV		HLA-A2	Gag-286 ^{#)}

Die Analyse der *tat*-Sequenzen (nicht gezeigt) konnte nicht als Auswahlkriterium benutzt werden, da die DNA-Sequenzen sich nicht grundlegend von den Referenzen unterschieden und auch kein bekanntes Tat-CTL-Epitop passend zu den bekannten HLA-Typen in Nigeria gefunden wurde.

Aufgrund geringer Sequenz-Unterschiede zwischen den einzelnen Moleklarklonen in den Bereichen einiger Epitope oder auch der Ähnlichkeit der einzelnen Klone zur IbNG-Prototyp Referenz-Sequenz wurde entschieden, daß der Moleklarklon 7⁷ als Basis für die Konstruktion der Vakzinierungsvektoren gewählt wird. Die Aminosäure-Sequenz dieses Moleklarklons ist den in der Literatur beschriebenen Epitop-Sequenzen am ähnlichsten, speziell sind öfters die Aminosäuren gleich, die zur Verankerung des Polypeptides am HLA-Klasse-I Molekül dienen.

3.2.1 Klonierung der Wildtyp-Gene *gag* und *tat*

Nach Auswahl der geeigneten Sequenz wurde damit begonnen, die Wildtyp-Gene aus dem zu dem CRF02_AG Isolat 00_200 gehörigen Moleklarklon 7⁷ in den ausgewählten Vakzinierungsvektor zu klonieren. Dazu wurden zunächst die beiden Exons von *tat* aus den Subklonierungsvektoren in einer Fusions-PCR zusammen gefügt, um ein Konstrukt für ein komplettes Tat-Protein zu erhalten. Es wurde ein Forward-Primer eingesetzt, der das 5'-Ende von *tat*-Exon 1 um die notwendigen Restriktionsschnittstellen verlängert. Weiter werden auch 18 Nukleotide vor dem Start-Codon von *tat* eingefügt, welche im Ursprungsvektor pTH eine Kozak-Sequenz erzeugen. Der Reverse-Primer verlängert das Exon 1-Fragment am 3'-Ende um 14 Nukleotide, die dem 5'-Ende des Exon 2 entsprechen, um einen überlappenden Bereich zur Fusion beider Fragmente zu erhalten. Analog wurde der Forward-Primer für das Exon 2 sowie der Reverse-Primer mit zur Klonierung geeigneter *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle gewählt (Abbildung 3·17a). Die beiden entstandenen Fragmente wurden in einer zweiten PCR miteinander verbunden, um ein 367 Basenpaar langes Konstrukt zu erhalten (Abbildung 3·17b), welches die 303 Basenpaar lange Sequenz zur Expression eines kompletten Tat-Proteins des Isolats 00_200 als auch die notwendigen Vektoranteile enthält.

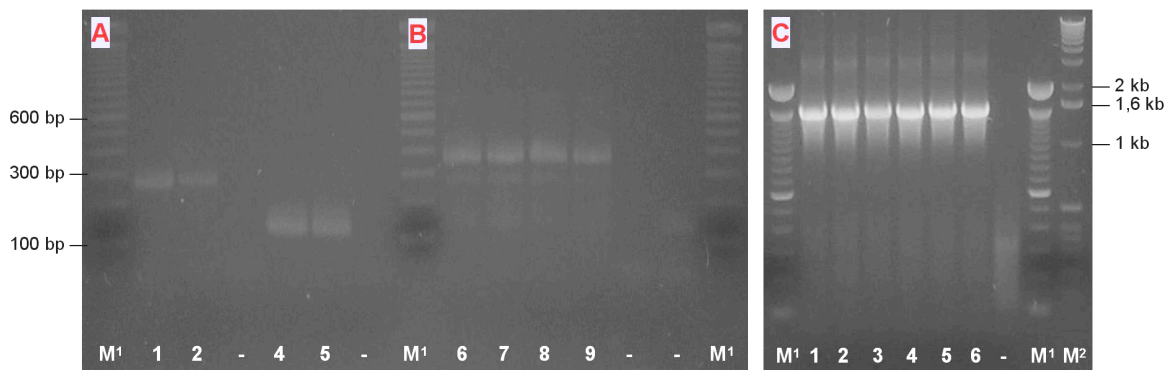


Abb. 3·17: Amplifikation der Leserahmen von *tat* und *gag* des Moleklarklons 7⁷. M¹ = Marker 100 bp Leiter; M² = Marker 1 kb Leiter; (-) = Keine DNA Kontrolle.

- a) Amplifikation der Exons *tat* 1; Spur 1, 2 = 267 bp und *tat* 2 Spur 3, 4 = 140 bp mit mutagenisierenden Primern
- b) Fusions-PCR; Spur 6-9 = 367 bp Fusions-Produkt der beiden Exon mit je 5 µl Input der PCR-Ansätze zu Spur 1 und Spur 4; bzw. zu Spur 2 und Spur 5
- c) Amplifikation des *gag* Leserahmen mit mutagenisierenden Primern; Spur 1-6 Replikate = 1554 bp.

Die PCR-Produkte wurden vereint, aufgereinigt und in einem Doppelschnitt verdaut. Der Restriktionsansatz wurde wieder mittels dem PCR-Clean Up Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und ein Aliquot in die Ligation mit dem ebenfalls *Hind* III/*Bam*H I geschnittenen

und über ein Agarosegel aufgereinigten Vektor pTH eingesetzt. Die nach Elektroporation in TOP10 Zellen erhaltenen Klone wurden zunächst auf korrekte Insertlänge in einer PCR getestet und darauf der entsprechende Bereich in fünf Klonen sequenziert. Es wurde ein Klon als "tat-WT" bezeichnet und im Laufe der Arbeit zusammen mit den folgenden Konstrukten auf Expression von Tat und dem im Vektor kodierten SV5/pK-Antikörper-Tag hin untersucht. Ebenso wurde der Leserahmen von *gag* aus dem Subklonierungsvektor mit mutagenisierenden Primern amplifiziert (Abbildung 3·17c), um analog zu *tat* die zur Klonierung nötigen Modifikationen der 5'- und 3'-Enden vorzunehmen. Mit dem erhaltenen PCR-Produkt wurde weiterhin wie oben beschrieben verfahren und nach Restriktionsanalyse und Sequenzierung von sechs *gag*/pTH Klonen ein Klon als "gag-WT" ausgewählt.

3.2.2 Konstruktion der Codon-optimierten Gene *tat* und *gag*

Nach der Sequenzierung des *tat*- bzw. *gag*-Gens des unbekanntes CRF02_AG Isolats ist ersichtlich, welche Aminosäuresequenz die exprimierten Proteine haben werden. Diese Aminosäuresequenz wurde nun unter den schon in der Einleitung erwähnten Kriterien in eine Codon-optimierte DNA-Sequenz umgeschrieben, inklusive der gewünschten Modifikationen bei *gag* (Abbildung 3·19). Bei *tat* ergaben sich weniger notwendige Änderungen (Abbildung 3·18).

Es wurden insgesamt durch die Codon-Optimierung in *tat* des Moleklarklons 7⁷ (Isolat 00_200) 63 von 303 Basen, entsprechend 20,8 % der gesamten Sequenz ausgetauscht.

1	ATGGATCCAGTAGATCCTAACCTAGAGCCCTGGAACCAACCAGGAAGTCAGCCTACAACCTGCTTGTAAACA	tat	WT
1	ATGGA ACC GT GAC CC CAACCT GAGCCCTGGAACCAACC GG CAG CAGCC AC AC CGC TG AACA	tat	CO
71	AGTGTACTGTAAATTCTGCTGCTGGCATTGCCAATTGTGCTTTCTGAACAAGGGCTTAGGCATCTCCTA	tat	WT
71	AGTG CTACTG AA CTTCTGCTGCTGGCA TGCCA CC TGTGCTT CTGAACAAGGGC CT GGCATC AC CTA	tat	CO
141	TGGCAGGAAGAAGCGGAGACACCGACGAGGAACCTCCTCAGAACCGTCAGGACCATCAAAATCCTGTACCA	tat	WT
141	GGC CG AAGAAGCG CCG CACCG CG GG CAC CC CAGAACCG CAGGACCA CA GAA CC GT CC	tat	CO
211	AAGCAACCCCTACCCATCATCAGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAAAGAATCGAAGAAGGAGGTGGCGAATC	tat	WT
211	AAGCA CCC CT CCCATCATC GG GG GACCC AC GGCC AA GGA GAGC AAGAAGGAGGTGGC AA C	tat	CO
281	AGACAGAGGCAGATCAGTGCCTTAG	tat	WT
281	AGAC GAGGC GAC CAGTGCCT	tat	CO

Abb. 3·18 Vergleich der *tat*-Wildtyp Sequenz zu der Codon-optimierten Sequenz. Die 63 von 303 umgeschriebenen Basen sind rot unterlegt, das Stop-Codon wurde wegen Expression des im pTH-Vektor codierten SV5/pK-Antikörper Tags nicht übernommen.

Bei *gag* mußten bzw. konnten mehrere Veränderungen erfolgen. Durch Einfügen von stillen Mutationen in der schon Codon-optimierten Sequenz, also dem Austausch bestimmter Basen

ohne das die Aminosäure-Sequenz verändert wird, konnte die Elimination von zwei internen *Pst* I-Schnittstellen sowie die Konstruktion von 12 CpG-Motiven erreicht werden. Weiter wurde eine kryptische splice-Donor Sequenz und eine splice-Akzeptor Sequenz entfernt, sowie ein langer homopolymere Bereich und ein stark repetetiver Bereich aufgelöst. Durch diesen Prozeß wurden die *cis*-aktiven, inhibitorischen Sequenzen in *gag* entfernt, die dem entstehenden Konstrukt eine starke Expression in Abwesenheit des Rev-Proteins erlauben. Im Zuge der Codon-Optimierung wurden bei *gag* 421 von 1491 Basen, entsprechend 28,2 % der gesamten Sequenz verändert (Abbildung 3·19, folgende Seite).

1	ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGTGGAGGAAAATTAGATGCATGGGAGAAAATTCGGCTAAGGCCAG	gag	WT
1	ATGGGGCGCCGCGCAGCGTCTGAGCGGCGGAAGCTGGACGCCTGGGAGAAATCCGCTCCGCCG	gag	CO
71	GGGGAAGGAAAAATATAGACTAAAACATCTAGTATGGGCAAGCAGAGAGCTGGAAAGATTCGCACTTAA	gag	WT
71	GGGGCCGAAAGTAACCGCTCAAGCAGCTGCTGTTGGGCAGCGGAGCTGGAGCGCTTCGCTCTGAA	gag	CO
141	CCCTGGCCTTTTAGAAACAGCAGAAGGATGTCAACAAATAATGGATCAGTTACAATCAGCTCTCGGGACA	gag	WT
141	CCCCTGGCCTCTGAGAGACCGCGAGGGGTGCCACAGATCATGGACAGCTACAGAGCGCTCGGGCAC	gag	CO
211	GGAACAGAAGAACTTAAATCATTTAATAACAATGCAACCCCTTGGTGCGTACATAAAAGGATAGAGA	gag	WT
211	GGACCGAGAGCTCAAGAGCCCTTCAACACATCGCACCCCTTGGTGCGTCCAAACCGCATCGAGA	gag	CO
281	TAAAAGACACCAAGGAAGCCTTAGATAAAAATAGAGGAAATACAAAATAAGAGCAAGCAAAAGACACAGCA	gag	WT
281	TAAAGGACACCAAGGAGGCCCTGAGCAAGATGAGGAGATCCAGAAAGAGCAAGCAAAAACCCAGCA	gag	CO
351	GGCAGCAGCTGCCACAGGAAGCAGCAGCCAAAATTTCCCTATAGTGCAAAATGCACAAGGGCAAATGGTA	gag	WT
351	GGCCGCCTGCCACCGGAGCAGCAGCCAGAACTTCCCATCGTGCAAGCGCCAGCGGCGCATGGT	gag	CO
421	CATCAGACCATGTCACCTAGGACTTTGAATGCATGGGTTAAGGTAATAGAAGAAAAGGCTTTCAGCCCAG	gag	WT
421	CACAGACCATGAGCCCGCGCACCTGGAACCGCTGGGTGAAGGTATCGAGGAGCAAGGCCTTCAGCCC	gag	CO
491	AAGTAATACCATGTTCTCAGCATTATCAGAAGGAGCAACCCACAGATTTAAATATGATGCTAAATAT	gag	WT
491	AGGTGATCCCATGTTCAAGCGCTGAGCGAGGGCGCACCCCAAGAGACTTAAATGATGCTAAATAT	gag	CO
561	AGTGGGGGGACACCAGGCAGCAATGCAAAATGTTAAAAGATACCATCAATGAGGAGGCTGCAGAATGGGAT	gag	WT
561	CGTGGGGGGACACCAGGCCTCATGCAGATGCTAAAGAGACACCATCAAAGAGGAGGCGCGAGCTGGGAG	gag	CO
631	AGAGCACATCCAGTACATGCAGGACCTATCCCACCAGGCCAGATGAGGGAACCAAGGGGAAGTGACATAG	gag	WT
631	CGCGCCACCCCGTGCAGCGCGGCCCATCCCTCCGGCCAGATGCGGAGCCCGCGGAGCGACATCG	gag	CO
701	CAGGAACAAC TAGTACCCTTCAAGAACAAGTAGGATGGATGACAAGCAATCCACCTATCCAGTGGGAGA	gag	WT
701	CCGGCACACAGCACCTCCAGAGCAAGTGGGTGGATGACAGCAAACCTCCCATCCCCTGTGGCGA	gag	CO
771	AATCTATAAAAGATGGATAGTCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTACAGCCCTGTCAGCATTTTG	gag	WT
771	GATCTAAGAGCGCTGGATGCTCTGGGCTGAAAGATCGTGGGATGTACAGCCCCTGTCAGCATCTG	gag	CO
841	GACATAAGACAAGGGCCAAAAGAACCTTTTAGAGATTATGCGGATAGGTTCTTTAAAACCTTTGAGAGCTG	gag	WT
841	GACATCCGCAAGGGCCCAAAGAGCCCTTCCGAGATAGCGCGAGCGCTTCTTCAAACACCTGCGCGC	gag	CO
911	AACAAGCTACGCAGGAGGTAAAGAACTGGATGACAGAAACCTTGCTGGTCCAAAATGCGAATCCAGACTG	gag	WT
911	AGCAGGCACCCAGGAGGTAAAGAACTGGATGACAGAACCTTGCTGGTCCAAAGCGAAACCCGACTG	gag	CO
981	TAAGTCCATTTTAAGAGCATTAGGACCAGGGGCTACATTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTG	gag	WT
981	GAAGAGCATCTCGCGCCTGCGGCCCGCGCACCTGGAGGATGATGACCGCTGCGCAGGGCTG	gag	CO
1051	GGAGGACCTGGCCATAAAGCAAGGGTTTTGGCTGAGGCAATGAGTCAAGTACAACATGCCAATGTAATGA	gag	WT
1051	GGGGCCCGGCCCAAGGCGCGCTGCTGGCGAGGCCATGAGCAAGTGCAGCAGCCAAAGTGATGA	gag	CO
1121	TACAGAGAGGCAATTTTAGGGGTCAGAGAACAATAAAGTGTTCACCTGTGGCAAAGAAGGACACCTAGC	gag	WT
1121	TCAGCGGGCAACTTCCGGGCGAGCGCACATTAAGTGCTTCAACTGCGGAAAGGAGGCGCACCTGCG	gag	CO
1191	CAGAAATTGCAAAGCCCCTAGGAAAAGAGGCTGTGGAAATGTGGGAAGGAAGGACATCAAAATGAAAGAC	gag	WT
1191	CGGAAATGCAAAGCCCTGGAAGCGCGGCTGTGGAAATGTGGGAAGGAGAGGGCAGCAGATGAAAGAC	gag	CO
1261	TGTACTGAGAGACAGGCTAATTTTTTAGGGAAAATCTGGCCTTCCAGCAAGGGGAGGCCAGGAAATTTCC	gag	WT
1261	TGACCGAGCGCAGGCCAACTTCTGGGCAAGATCTGGCCAGCAGCAAGGGCCGCGCGGAACTTCC	gag	CO
1331	CTCAGAACAGACTGGAACCGACAGCCCCACCAGCAGAGAGCCTTGGGATGGGGGAAGAGATAACCTCCCC	gag	WT
1331	CTCAAAACCGCTGGAGCCACCGCCCCCTCCCGCGAGAGCCTGGGATGGGCGAGGAGATCACAGCCC	gag	CO
1401	TCCGATAACCTCCCCTCAGAAGCAAGAACCGAGGGACAAGGGGCTATATCCTCCTCTAACTTCCCTCAGA	gag	WT
1401	TCCCATCACAGCCCTCAGAAGCAGAGCCCGGAGACAAGGGCTATACCTCCCTCACAGCCTGGG	gag	CO
1471	TCACTCTTTGGCAACGACCCTTAG	gag	WT
1471	AGCCTGTTGGCAACGACCC	gag	CO

Abb. 3-19: Vergleich der gag-Wildtyp Sequenz zu der Codon-optimierten Sequenz. Die 421 von 1491 umgeschriebenen Basen sind rot unterlegt, das Stop-Codon wurde wegen Expression des im Vektor codierten SV5/pK-Antikörper Tags nicht übernommen.

Somit wurden parallel zu der Herstellung des Immunisierungsvektor mit den Wildtyp-Genen *tat* und *gag* synthetische, einzelsträngige Oligonukleotide bestellt, die durch Fusions-PCR zu den neuen, Codon-optimierten Gene von 303 bp bzw. 1491 bp verschmolzen werden sollten. Zu beachten war, daß aufgrund der Synthesemethode eine maximale Länge von ca. 100-120 Basen möglich ist, aber die Rate von Fehleinbauten während der Synthese mit der Länge des Oligonukleotides schon ab 50-60 Basen steigt. Ebenso sind längere G- bzw. C-Wiederholungen schwierig zu synthetisieren (persönliche Mitteilung, MWG-Biotech). Es wurden somit vier Oligonukleotide à 80 Basen + ein Oligonukleotid mit 63 Basen für *tat* sowie 24 Oligonukleotide à 80 Basen + ein Oligonukleotid mit 51 Basen für *gag* gewählt.

Die Bezeichnung der 80 Basen langen Oligonukleotiden ist dem Schema in Abbildung 3-20 zu entnehmen. An den 3'-Ende wurde die Sequenz so gewählt, das eine 18-22 bp Überlappung, einem T_M -Wert von ungefähr 60°C entsprechend, entsteht. Dadurch können sich diese Oligonukleotide in einer PCR aneinander lagern und die Polymerase kann die freien 3'-OH-Enden gemäß der Template-Sequenz des jeweilig anderen Oligonukleotids (self-priming) verlängern. Bei einer erfolgreichen PCR entsteht ein 140 bp Doppelstrang-Fragment, welches wiederum in den ersten und letzten 20 bp mit den vorhergehenden bzw. nachfolgenden Fragmenten überlappt.

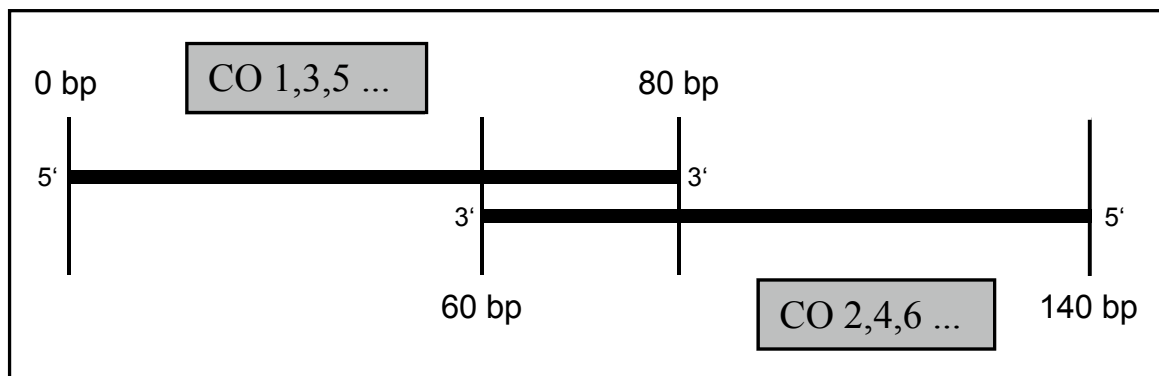


Abb. 3-20: Schematische Darstellung der Fusions-PCR mit 80 Basen langen Oligonukleotiden

Bei der Herstellung des *gag*-Konstruktes ergaben sich durch dieses System bei manchen Oligonukleotid-Paaren zu diffuse Banden, die auch durch Variieren der PCR-Bedingungen (MgCl₂-Gehalt, Denaturierungs- und Annealing-Temperatur) nicht verbessert werden konnten. Daraufhin wurden äußere Primer eingesetzt, die, nachdem in dem ersten Zyklus durch „self-priming“ einige Vollängen-Templates von 140 bp Länge entstanden sind, wie in einer herkömmlichen PCR diesen Doppelstrang amplifizieren. Ergab sich nach mehreren Versuchen mit diesem Ansatz keine weiter verwertbare Bande in der entsprechenden Größe,

wurde die Sequenz durch kleinere Oligonukleotide dargestellt (Abbildung 3·21). Wie die größeren Stücke überlappen sich diese um 20 Basen, lassen aber durch die Anordnung jeweils nur 20 Basen am 5'- und am 3'-Ende frei, die durch die Polymerase ergänzt werden müssen. Die 40 Basen Oligonukleotide wurden unterschiedlich eingesetzt, im günstigsten Fall konnten alle sechs Stücke zusammen mit äußeren Primern, die das 140 bp lange entstehende Fragment umfassen, in einem PCR-Ansatz verschmolzen werden. Es wurden auch die jeweiligen Paare –a und –b usw. zu 60 bp Fragmenten fusioniert und diese doppelsträngigen DNA-Stücke mit oben beschriebenen äußeren Primern zu dem 140 bp großen Fragment verschmolzen. Auch konnten die doppelsträngigen DNA-Stücke wie z.B. [-a/-b] dazu benutzt werden, schrittweise bereits vorhandene Fragmente um jeweils 60 Basen zu verlängern.

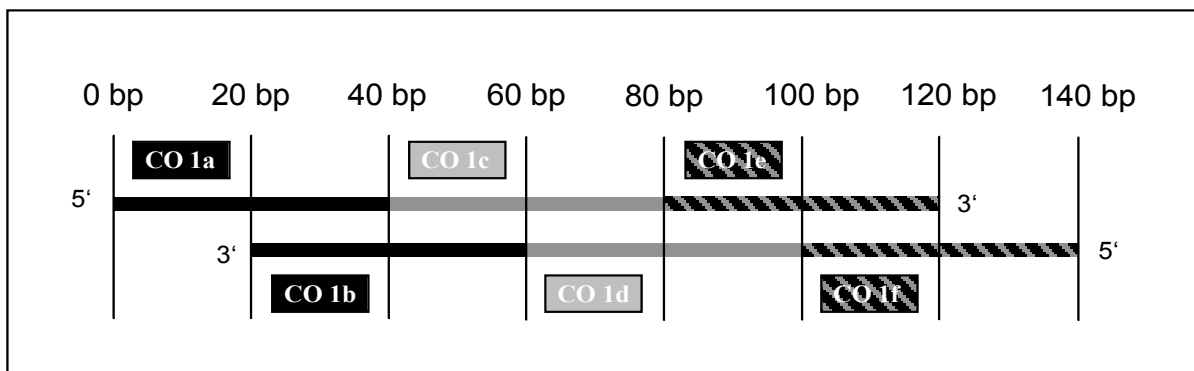


Abb. 3·21: Schematische Darstellung der Fusions-PCR mit 40 Basen langen Oligonukleotiden

3.2.2.1 Herstellung des Codon-optimierten *tat* Konstruktes

Die synthetisierten fünf Oligonukleotide (CO-1 bis CO-5) ergeben nach Fusion den Leserahmen für das codon-optimierte *tat*-Gen (*tat*-CO), entsprechend dem Moleklarklon 7⁷ des Isolats 00_200. Zunächst wurde versucht, in einer Reaktion alle fünf Oligonukleotide miteinander zu der 303 Basenpaar langen *tat*-Expressionssequenz zu verschmelzen (Abbildung 3·22). Dabei wurden äußere Primer eingesetzt, die im T_M -Wert der Überlappung zwischen den einzelnen Oligonukleotiden angepaßt wurden. Die PCR wurde in einem Gradientencycler (DNA Engine PTC-200, MJ Research) durchgeführt, dadurch konnte in einem Lauf bei mehreren gleichen Reaktionsansätzen die Annealing-Temperatur von niedrig bis hoch variiert werden. Für die Elongationszeit wurde 1 Minute/72°C gewählt.

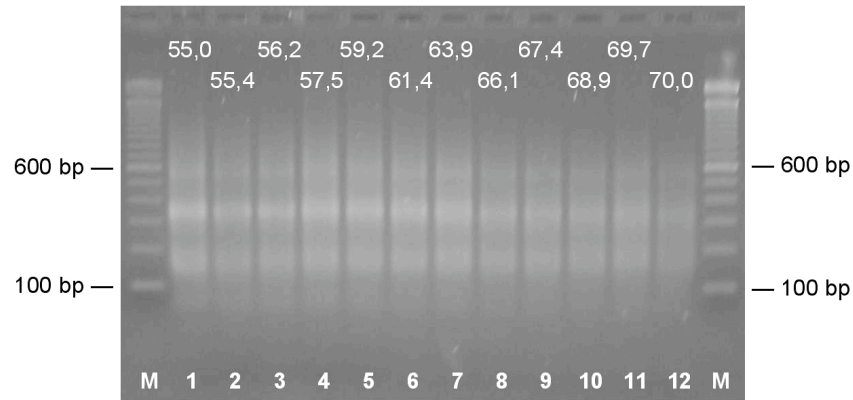


Abb. 3-22: Herstellung des kompletten *tat*-CO Konstrukts aus fünf Oligonukleotiden.

Eingesetzt wurden 2,5pmol pro Ansatz mit äußeren Primern in einer Gradienten-PCR. Annealing-Temperaturen = 55,0°C - 70,0°C von links nach rechts. M = Marker 100 bp Leiter.

Die Bande des kompletten Konstrukts bei ungefähr 300 Basenpaare ist zu erkennen, aber durch die vielen Nebenprodukte nicht weiter verwertbar. Daraufhin wurden, wie oben beschrieben jeweils zwei Oligonukleotide durch „self-priming“ miteinander verschmolzen. Dazu wurde ein PCR-Programm mit einer Annealing-Temperatur von 60°C für 20 Sekunden und einer Elongations-Temperatur von 72°C für 40 Sekunden gewählt (Abbildung 3-23).

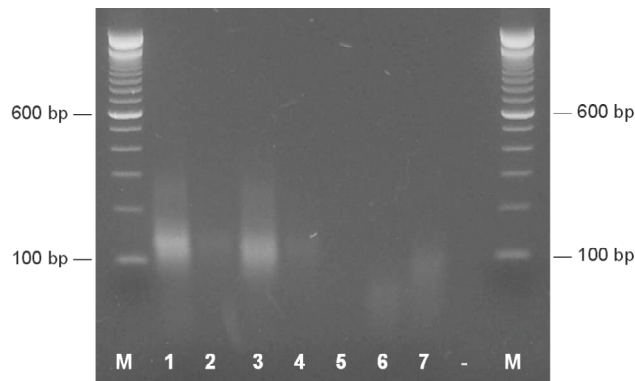


Abb. 3-23: 1.Runde der Fusions-PCR mit 80 bp Oligonukleotiden von *tat*-CO.

Spur 1,2 = PCR-Reaktion mit CO-1 + CO-2 mit 25 pmol bzw. 12,5 pmol à Oligonukleotid; Spur 3,4 = CO-3 + CO-4 in Konzentrationen wie oben; Spur 5 = Negativkontrolle ohne Oligonukleotid-DNA in der PCR-Reaktion; Spur 6 = Nur CO-1 à 25 pmol; Spur 7 = nur CO-2 à 25 pmol; (-) = Keine DNA Kontrolle; M = Marker 100 bp Leiter.

In Abbildung 3-23 ist zu sehen, daß die miteinander verschmolzenen Oligonukleotid-Paare eine Größe von ungefähr 140 bp haben. Die beiden weiter verwendeten Produkte der ersten Runde CO-[1/2] in Spur 1 und CO-[3/4] in Spur 3 entsprechen den Fragmenten von Basenpaar 1- 140 und 121-260 der Codon-optimierten *tat*-Expressionssequenz. In Spur 6 und

Spur 7 sind Aliquots der original Oligonukleotid-Lösungen aufgetragen, eine Bande bei nahezu 100 bp für CO-2 in Spur 7 entsteht wahrscheinlich durch Multimerisierung.

In der sich anschließenden Fusions-PCR (Runde 2) wurden die entstandenen Fragmente CO-[1/2] und -[3/4] eingesetzt, um ein Fragment von Basenpaar 1-260 zu erzeugen. Um möglichst wenig unspezifische Produkte und unverschmolzene Oligonukleotide aus dem ersten PCR-Ansatz zu übernehmen, wurden die beiden Fragmente als Templates in unterschiedlichen Mengen eingesetzt. Dazu wurden aus dem zu oben gezeigter Spur 1 gehörigen PCR-Ansatz jeweils 1-, 2-, 5- und 10 µl entnommen und zusammen mit derselben µl-Menge aus dem zu Spur 3 gehörigen PCR-Ansatz in eine neue 50 µl PCR-Reaktion pipettiert.

In einem zusätzlichen PCR-Ansatz wurde versucht, direkt das verbliebene Oligonukleotid CO-5 anzufügen. Diese PCR wurde mit denselben PCR-Parametern durchgeführt wie oben beschrieben (Abbildung 3·24).

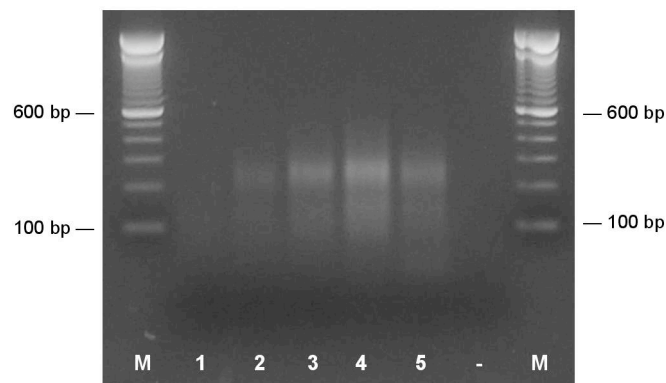


Abb. 3·24: 2.Runde der Fusions-PCR mit den Fragmenten *tat*-CO [1/2] und [3/4].

Spur 1 = je 1 µl Input aus PCR-Ansatz 1 und 3 der 1.Runde; Spur 2 = je 2 µl Input; Spur 3 = je 5 µl Input; Spur 4 = je 10 µl Input, Spur 5 = je 5 µl Input von PCR-Ansatz 1 und 3 der 1. Runde plus 5 µl bzw. 12,5 pmol des Oligonukleotid CO-5; (-) = Keine DNA Kontrolle; M = Marker 100 bp Leiter.

Die erhaltenen Banden zeigen das Fragment CO-[1-4], entsprechend Basenpaar 1-260. In Spur 5 ist durch die gleiche Größe zu Spur 4 zu erkennen, daß die Verschmelzung inklusive CO-5 nicht erfolgte. In der folgenden Fusions-PCR wurde das letzte Oligonukleotid CO-5 an das Fragment CO-[1-4] angeknüpft. Dazu wurde eine konstante Menge an CO-5 mit unterschiedlichen Mengen aus dem zur Spur 3 gehörigen PCR-Ansatz der 2. Runde in einem 50 µl PCR Ansatz pipettiert, zusätzlich wurde in einem PCR-Ansatz Primer mit eingesetzt, welche die komplette *tat*-Sequenz umfassen. Das PCR-Programm blieb unverändert gegenüber der 2. Runde.

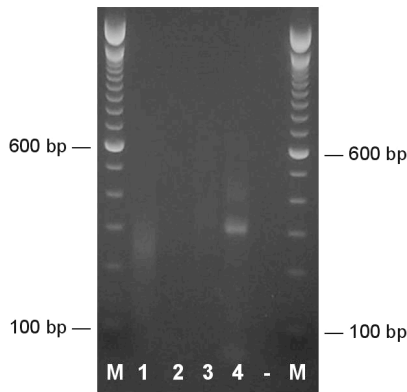


Abb. 3·25:

3.Runde der Fusions-PCR mit dem Fragment CO-[1/4] und dem Oligonukleotid CO-5.

Spur 1 = 5 µl Input aus PCR-Ansatz 3 der 2.Runde ohne CO-5; Spur 2,3 = 5 µl bzw. 10 µl Input aus PCR-Ansatz 3 der 2.Runde plus je 25 pmol CO-5; Spur 4 = 5 µl Input plus 25 pmol CO-5 und je 15 pmol der Primer *tatCO_For* und *tatCO_Rev*; (-) = Keine DNA Kontrolle; M = Marker 100 bp Leiter

Als Größenvergleich ist das 260 Basenpaar Fragment CO-[1-4] mit aufgetragen. Rechts ist das komplette, aus fünf Oligonukleotiden zusammengesetzte Konstrukt zu sehen. Dieses 303 Basenpaar große Fragment stellt die vollständige Sequenz dar, die benötigt wird um mittels einem entsprechenden Expressionsvektor ein Tat-Protein gleich dem A/G-rekombinanten Isolat 00_200 zu erzeugen. Um dieses deutlicher darzustellen und weniger der unspezifischen Bande bei ungefähr 400 Basenpaar zu erzeugen, wurde aus dem zu Spur 4 gehörigen PCR-Ansatz der 3. Runde eine geringe Menge mit den äußeren Primern in einem Gradientencycler nochmals amplifiziert (Abbildung 3·26a). Um dieses Konstrukt in den Immunisierungsvektor pTH klonieren zu können, mußten noch entsprechende Modifikationen vorgenommen werden. Die mutagenisierenden Primer *tatCO-HindIII_For* und *-BamHI_Rev* fügen an das komplette *tat*-CO Konstrukt in einer 5. Runde die Restriktionsschnittstellen an (Abbildung 3·26b).

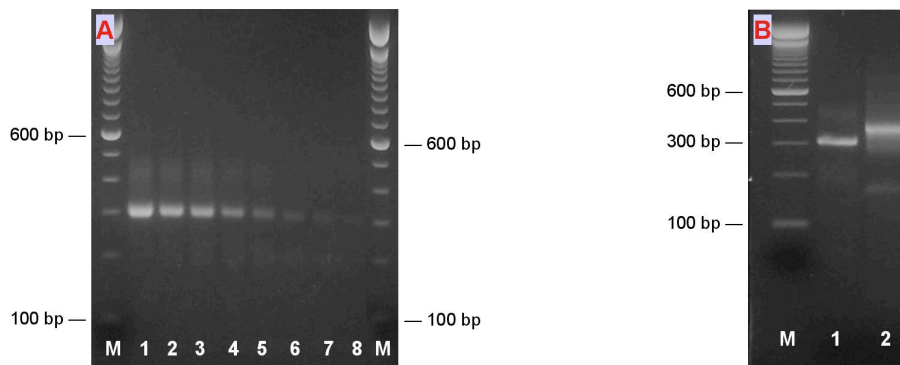


Abb. 3·12: 4. und 5. Runde der Konstruktion der Codon-optimierten *tat*-Sequenz.

a) 4. Runde : Eingesetzt wurden je 1 µl des Fragments CO-[1-5] aus dem PCR-Ansatz 4 der 3. Runde mit *tatCO_For/Rev* in einem Annealingtemperatur-Gradienten von 60°C - 68°C von links nach rechts; M = Marker 100 bp Leiter.

b) Spur 1 = unmodifiziertes Volllängen-Konstrukt; Spur 2,3 = 2 µl Input aus PCR-Ansatz 1 der 4. Runde mit je 15 pmol der mutagenisierenden Primer *tatCO-HindIII_For* und *tatCO-BamHI_Rev*; M = Marker 100 bp Leiter.

Das PCR-Produkt aus Abbildung 3-26b, Spur 2 wurde wie beschrieben in pTH kloniert. Die Kontroll-Sequenzierung zeigte, daß alle untersuchten Klone eine unterschiedlich stark fehlerhafte *tat*-CO Sequenz besaßen. Die Fehler waren zumeist ein fehlendes oder ein zusätzliches Nukleotid in G- oder C-Wiederholungen oder willkürliche Austausche innerhalb der Sequenz, ohne das sich bestimmte Mutationen als dominant erwiesen. Bei "Klon 11" enthielt die Sequenz gegenüber der Soll-Sequenz *tat*-CO 12 zu korrigierende bzw. einzufügende oder zu deletierende Basen, welche durch ihre Anordnung in zwei aufeinander folgenden Mutagenese-PCRs korrigierbar sein sollten (Abbildung 3-27).

1	ATGGACCCCGTGGACCCCAACCTGGAGCCCTGGAACCAACCCGGCAGCCAGCCACCACCGCCTGCAACA	<i>tat</i> CO
1	ATGGACCCCGTGGACCCCAACCTGGAGCCCTGGGAC-----GGCAGCCAGCCACCACCGCCTGCAACA	Klon11
71	AGTGCTACTGCAAGTTCCTGCTGCTGGCACTGCCAGCTGTGCTTCCCTGAAC-AAGGGCCTGGGCATCAGCT	<i>tat</i> CO
71	AGTGCTACTGCAAGTTCCTGCTGCTGGCACTGCCAGCTGTGCTTCCCTGAACC AAGGGCCTGGGCATCAGCTA	Klon11
141	ACGGCCGCAAGAAGCGCCGCCACCGCCGGCACCACCCCAAGAACCAGGACCACCAGAACCCCGTGCC	<i>tat</i> CO
141	CGGGCCGCAAGAAGCGCCGCCACCGCCGGCACCACCCCAAGAACCAGGACCACCAGAACCCCGTGCC	Klon11
211	CAAGCAGCCCCTGCCATCATCCGCGGGCAGCCCAACCGGCCCAAGGAGAGCAAGAAGGAGGTGGCCAAC	<i>tat</i> CO
211	CAAGCAGCCCCTGCCATCATCCGCGGGCAGCCCAACCGGCCCAAGGAGAGCAAGAAGGAGGTGGCCAAC	Klon11
281	CAGACCGAGCCGACCAAGTGCGCC	<i>tat</i> CO
281	CAGACCGAGCCGACCAAGTGCGCC	Klon11

Abb. 3-27: Vergleich der gefunden Sequenz nach Konstruktion des *tat*-CO mit der Soll-Sequenz

Die erste Mutagenese-PCR mit Plasmid-DNA des oben dargestellten Klons wurde mit 43 Basen langen Primern durchgeführt, die an Position 34 G zu A abänderte und gleichzeitig die fehlenden sechs Basen einfügen. Von den erhaltenen Klonen wurden aufgrund der Effektivität dieses Systems nur fünf Stück sequenziert und es erwiesen sich drei als an dieser Stelle korrigiert, aber in zwei dieser Klone wurde durch die Mutagenese-PCR gegenüber dem Ausgangsmaterial eine neue Insertion eingeführt. Mit dem verbliebenen, an der ersten Stelle korrigierten, aber ansonsten unveränderten Klon wurde die zweite Mutagenese-PCR durchgeführt. Diese deletiert mittels 59 Basen langer Primer die überschüssige Base an Position 121 und tauscht die vier Basen an Position 139-142 zu denen in der Soll-Sequenz aus. Nach Sequenzierung von zehn Klonen, die aus der zweiten Mutagenese-PCR stammten erwiesen sich davon drei Klone als das der geplanten Sequenz entsprechende *tat*-CO Konstrukt. Davon wurde ein Klon als "*tat*-CO" Konstrukt ausgewählt und weiterhin auf Expression von Tat und des SV5/pK-Epitops getestet.

3.2.2.2 Herstellung eines Codon-optimierten *gag*-Konstruktes

Analog der Konstruktion des *tat*-Gens wurden für *gag* 25 Oligonukleotide à 80 Basen Länge (CO-1 bis CO-25) bestellt, um die 1491 Basen lange Sequenz zu erzeugen. Um die zu erwartenden Fehler in der erzeugten Sequenz schneller korrigieren zu können, sah die Strategie zur Konstruktion des *gag*-Gens vor, zunächst ca. 500 bp lange Fragmente zu erzeugen und diese in Subklonierungsvektoren einzufügen. In diesen Vektoren kann die Sequenzierung und gegebenenfalls die Korrektur durch Mutagenese-PCR parallel erfolgen. Nach der Kontrolle können diese Fragmente dann aus der Plasmid-DNA amplifiziert und miteinander fusioniert werden.

In den ersten PCR, die mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen und der für die überlappenden Bereiche errechneten Annealing-Temperatur von 60°C in einem üblichen 3-Schritt PCR-Programm durchgeführt wurden, ergaben sich keine klaren Banden in der Größe von den erwarteten 140 Basenpaaren (Abbildung 3·28).

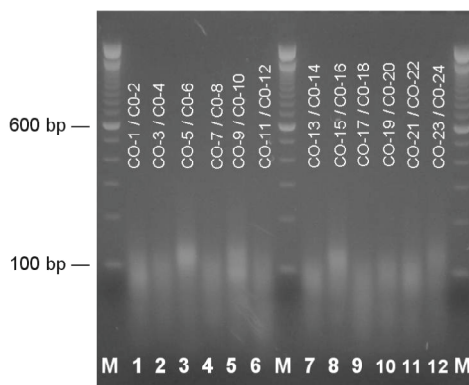


Abb. 3·28:

Fusion-PCR der 80 Basen Oligonukleotide mittels 3-Schritt PCR Programm. M = Marker 100 bp Leiter.

Diese PCR-Produkte wurden in einer weiteren PCR eingesetzt, um in einer zweiten Runde aus den zum Teil vorliegenden 140 bp-Produkten nun größere, ehemals vier Oligonukleotiden entsprechende Fragmente zu erzeugen. Im Agarosegel war nach dieser PCR jedoch keinerlei diskrete Bande zu erkennen, auch in weiteren Versuchen unter Variation der PCR-Parameter konnte kein PCR-Produkt in der entsprechenden Größe erzeugt werden.

Erst durch Anwendung der „Touchdown“-PCR konnten einige Verschmelzungen zwischen den 80 Basen langen Oligonukleotiden dermaßen durchgeführt werden, daß im Agarosegel eine diskrete Bande zu sehen war (Abbildung 3·29). Dieses PCR-Programm erwies sich nur bei der Verschmelzung der Ursprungs-Oligonukleotide als notwendig, die PCR-Reaktionen zur Fusion größerer Bereiche wurden mit herkömmlichen 3-Schritt PCR-Programmen durchgeführt.

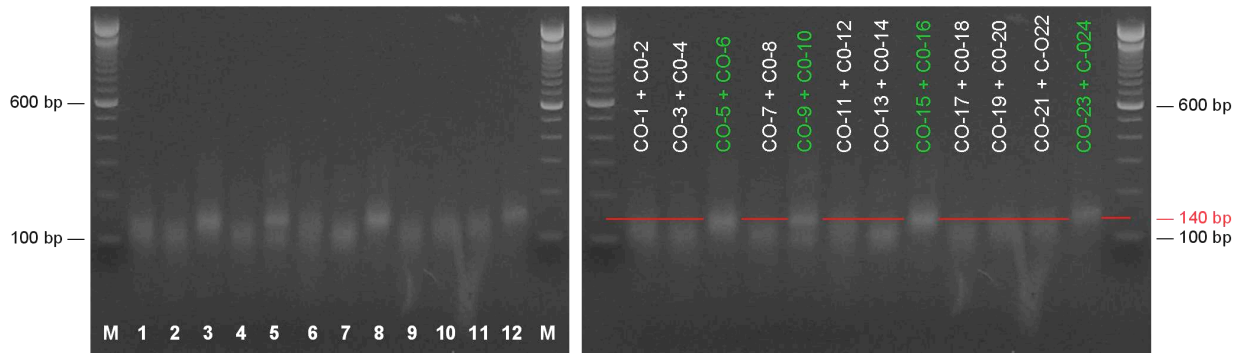


Abb. 3-29: Fusion-PCR der 80 bp Oligonukleotide mittels "Touchdown" PCR Programm.

Spur 1 – 12 siehe Beschriftung rechts, Input 10 pmol je Oligonukleotid. Rechts zur Verdeutlichung positive Verschmelzung zu 140 bp Produkten grün dargestellt. M = Marker 100 bp Leiter.

Eine weitere Verschmelzung der Fragmente [5/6], [9/10], [15/16] und [23/24] mit ihrem vorhergehenden oder auch nachfolgenden Paar konnte in einer zweiten Runde nicht erreicht werden. Aufgrund der Annahme, daß die 80 Basen langen Oligonukleotide durch Sekundärstrukturen oder zu vielen Fehlern durch die Synthese zum 3'-Ende hin nicht zu einem längeren Konstrukt zusammen gesetzt werden können, wurden zunächst nur bestimmte Sequenzabschnitte als kleinere, 40 – 60 Basen lange Oligonukleotide dargestellt. Diese wurden zur schrittweisen Verlängerung der oben genannten Fragmente eingesetzt. Die Bezeichnung wurde so gewählt, daß der ursprünglich durch die zwei 80 Basen langen Stücke CO-7 und CO-8 dargestellte Bereich unterteilt wurde in die sechs 40 Basen langen Oligonukleotide CO-7a, -7b, -7c, -8a, -8b und -8c (Schematische Darstellung siehe Abbildung 3-21).

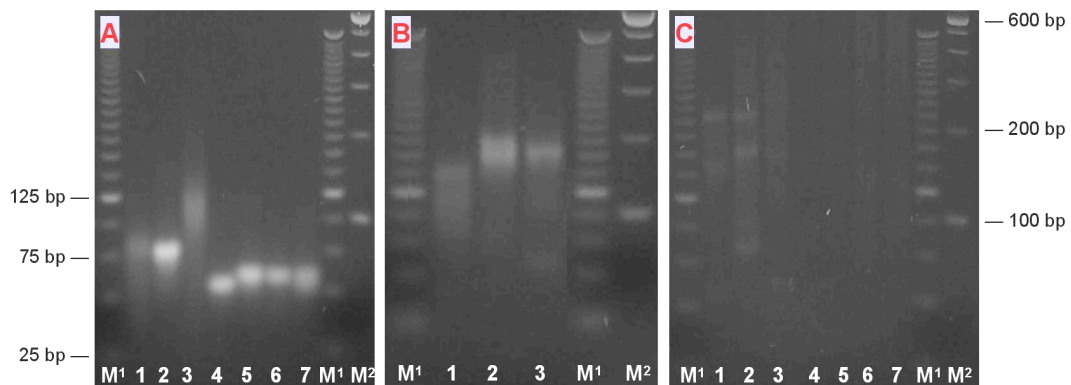


Abb. 3-30: Schrittweise Verlängerung des Fragments [5/6] mit [4a/b] in 5'- und [7a/b] in 3'-Richtung.

a) Paarweise Fusion von 40 Basen- und 80 Basen Oligonukleotiden; Input pro PCR-Ansatz = 50 pmol je Oligonukleotid; Spur 1 = CO-3 + CO-4; Spur 2 = CO-4a + -4b; Spur 3 = CO-5 + CO-6; Spur 4 = CO-7a + -7b; Spur 5 = CO-7c + -8a; Spur 6 = CO-8b + -8c; Spur 7 = Mix aller genannten Oligonukleotide 7a – 8c. M¹ = Marker 25 bp Leiter; M² = Marker 100 bp Leiter.

- b)** Anknüpfen eines 60 bp Doppelstrang PCR-Produkts aus a) an das Fragment [5/6]; Input je 5 µl aus den PCR-Ansätzen zu a). Spur 1 = CO-3 + [4a/b], kein Produkt erkennbar; Spur 2 = [4a/b] + [5/6] ergibt 197 bp Produkt; Spur 3 = [5/6] + [7a/b] ergibt 188 bp Produkt.
- c)** Verlängerung der in b) erzeugten Fragmente in die jeweilige andere 5'-/3'-Richtung, Input je 5 µl aus den PCR-Ansätzen zu b). Spur 1 = [4a-CO6] + [7a/b] ergibt 233 bp Fragment; Spur 2 = [4a/b] + [5-7b] ergibt 233 bp Produkt mit mehr Nebenprodukten als Ansatz zu Spur 1; Spur 3 = [7a-8a] + [8b/c] ergibt 133 bp Produkt. Spur 4 – 7 = weitere Versuche Fragment [5/6] bis zu –8c zu verlängern ohne erkennbares Produkt.

Andere Bereiche, die auch nach weiteren Versuchen mit den 80 Basen langen Oligonukleotiden nicht in der Fusions-PCR zu erzeugen waren, wurden komplett als 40 Basen lange Oligonukleotide dargestellt. Diese wurden analog Abbildung 3-21 in einer ersten Runde zunächst paarweise miteinander verschmolzen, um dann in einer weiteren PCR mit äußeren Primern die 60 bp langen doppelsträngigen PCR-Produkte miteinander zu verschmelzen. Dabei wurden je nach Sequenzabschnitt drei bis sechs PCR-Produkte der ersten Runde in eine PCR-Reaktion der zweiten Runde eingesetzt, um so Fragmente zwischen 140 und 260 Basenpaar zu erzeugen.

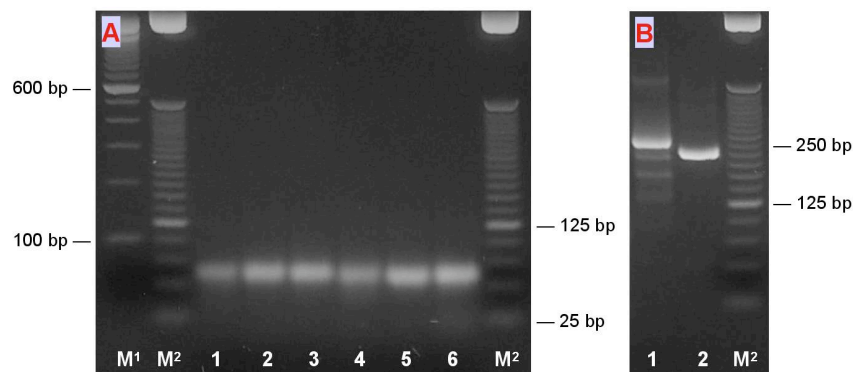


Abb. 3-31: Herstellung des [11-14] Fragmentes aus zwölf 40 Basen-Oligonukleotiden

- a)** Fusion der Oligonukleotide CO-11a + -11b; -11c + -12a usw. zu jeweils 60 bp langen doppelsträngigen DNA-Stücken (Spur 1 – 6); M¹ = Marker 100 bp Leiter; M² = Marker 25 bp Leiter.
- b)** Spur 1 = Verschmelzung der sechs Fragmente aus a) miteinander zu einem 260 bp umfassenden Bereich CO-11 bis CO-14 in der nächsten PCR unter Verwendung äußerer Primer, Input je 1 µl aus den Ansätzen zu a); Spur 2 = Amplifizierung des subklonierten Fragments [4a-7b].

Da sich die Erzeugung größerer Fragmente als schwieriger und zeitaufwendiger erwies, wurde die Strategie der Subklonierung von ungefähr 500 bp großen Fragmenten verworfen. Erhaltene Fragmente, die zumeist zwischen 140 und 260 Basenpaaren Längen erreichten wurden mittels dem PCR-Produkt Klonierungskit pCR[®] 4 Blunt-TOPO Kit for Sequencing (Invitrogen, Groning, Niederlande) subkloniert, um diese reproduzierbar in einem Vektor zu konservieren.

Letzendlich wurden so in mehreren Subklonierungen ein Set von unterschiedlich lange Bereiche des *gag*-CO- Gens geschaffen, die jeweils an den Enden zwischen 16-20 Basen Homologie aufweisen. Durch unterschiedliche Anfangs- und Endpunkte der einzelnen, subklonierten Fragmente in Bezug auf die komplette *gag*-Sequenz konnten größere Bereiche auf verschiedenen Wegen hergestellt werden, je nachdem welche Verschmelzung sich bewerkstelligen ließ.

Die nächste Subklonierung ergab sich, wenn zum Beispiel das 220 bp lange Fragment [11a-14a] in 3'-Richtung verlängert wurde mit dem Fragment [15-16]. Dazu wurde die subklonierte Sequenz mit den äußeren Primern aus der isolierten Plasmid-DNA amplifiziert und in einer zweiten Runde mit dem erweiternden Fragment fusioniert. Oft mußten die einzelnen Teile in unterschiedlicher Reihenfolge miteinander verschmolzen werden, es ergab sich keine Tendenz, daß sich besser ein längeres Stück mit einem kürzeren fusionieren ließ als zwei gleich lange Teile miteinander. Es wurden zum Teil schon erfolgreich miteinander verschmolzene Bereich verworfen, da diese sich nicht mit anderen Fragmenten fusionieren ließen; diese Teile mußten darauf in kleineren Stücken angefügt werden. Bis zum endgültigen *gag*-CO Konstrukt wurden letztendlich 19 Intermediär-Konstrukte subkloniert

Durch die Subklonierung von Teilbereichen konnte der korrekte Zusammenbau aus den einzelnen Oligonukleotiden unmittelbar durch Sequenzierung überprüft werden, um die Gefahr einer längeren, fehlerhaften Sequenz im endgültigen Produkt zu verringern. Einige PCR-Produkte, die im Agarosegel die richtige Länge besaßen, stellten sich als Wiederholungen eines einzelnen kleineren Fragments heraus. Solche, bis zu 120 bp langen Bereiche würden sich schwierig durch die Mutagenese-PCR korrigieren lassen. Auch traten falsche Sequenzen durch fehlerhaftes „self-priming“ auf. Je nach Größe der fehlerhaften Bereiche wurden die subklonierten Bereiche verworfen und unter Variation der PCR-Bedingungen neu hergestellt.

Als Beispiel für die gewählte Strategie zeigt Abbildung 3-31 die Herstellung der Fragmente [1-7b] (Basen 1-419 der *gag*-CO Sequenz), [7c-14] (Basen 401-860) und [15-20] (Basen 834-1220) aus kleineren, als Plasmid-DNA vorhandenen Bereichen. Es wurde aus den Subklonierungsvektoren die Fragmente mit solchen Primern amplifiziert, daß der für [1-7b] benutzte Reverse-Primer in der Sequenz dem für [7c-14] benutzen Forward-Primer entspricht. Dadurch ergibt sich eine Sequenzüberlappung der beiden Fragmente, mittels derer diese miteinander fusioniert werden können. Dasselbe Prinzip gilt für die Verbindungsstelle von [7c-14] und [15-20].

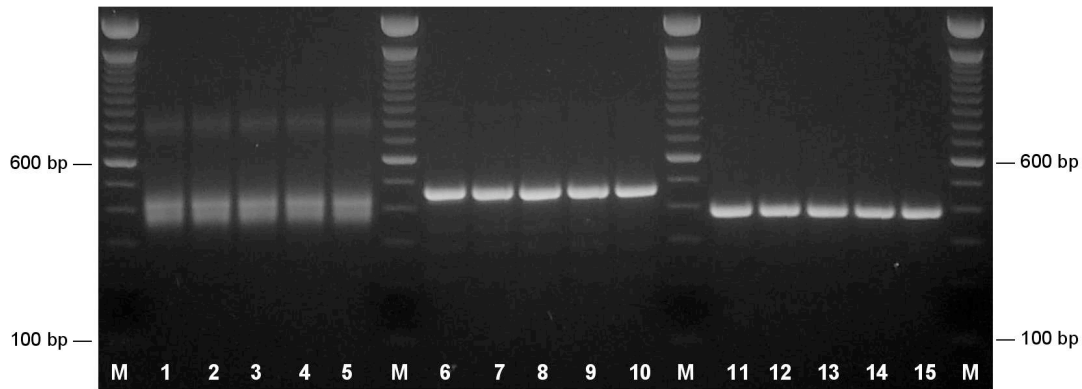


Abb. 3-32: Amplifikation der subklonierten Fragmente [1-7b], [7c-14] und [15-20].

Spur 1-5 = [1-7b] aus Plasmid-DNA im Annealing-Temperatur-Gradienten von 55°/ 57,8°/ 59,3°/ 62,4° und 64,3°C von links nach rechts, PCR-Produkt = 429 bp; Spur 6-10 = [7c-14] und Spur 11-15 = [15-20] analog zu oben; M = Marker 100 bp Leiter.

In Spur 5 der Abbildung 3-32, der mit der höchsten Annealing-Temperatur durchgeführten PCR-Reaktion für das Fragment [1-7b] ist eine geringfügig stärkerer, obere Bande zu sehen, welche das gewünschte Fragment darstellt. Die gegenüber den beiden anderen Fragmenten auftauchenden Nebenprodukte erklären sich daraus, daß in der Sequenz des subklonierten Bereichs die Basen 1- 40, entsprechend dem Oligonukleotid CO-1a nicht vorhanden waren. Deswegen wurde die PCR-Reaktion mit dem 80 Basen langen Oligonukleotid CO-1 als Forward-Primer durchgeführt, um ein korrigiertes Fragment aus dem CO-1b bis CO-7 enthaltenden subklonierten Teil zu amplifizieren.

In diesem Fall, oder auch häufiger bei zunehmender Länge der Fragmente ergaben sich vermehrt Nebenprodukte in der PCR, so daß die einzelnen Fragmente zunächst durch Aufreinigung aus einem präparativen Agarosegel isoliert werden mußten. Die in Abbildung 3-32, Spur 5 gezeigte PCR-Reaktion wurde mit mehreren Replikaten wiederholt und auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, um die gewünschte obere Bande aus dem Gel auszuschneiden und die DNA zu isolieren (Abbildung 3-33a). Aus diesem und den beiden Fragmenten direkt aus dem PCR-Ansatz zu Abbildung 3-32 konnte jetzt sowohl ein Fusionsprodukt [1-14] (Basen 1-860 der *gag*-CO Sequenz) als auch [7c-20] (Basen 401-1220) hergestellt werden, eine Verschmelzung aller drei Teile war nicht erfolgreich (Abbildung 3-33b).

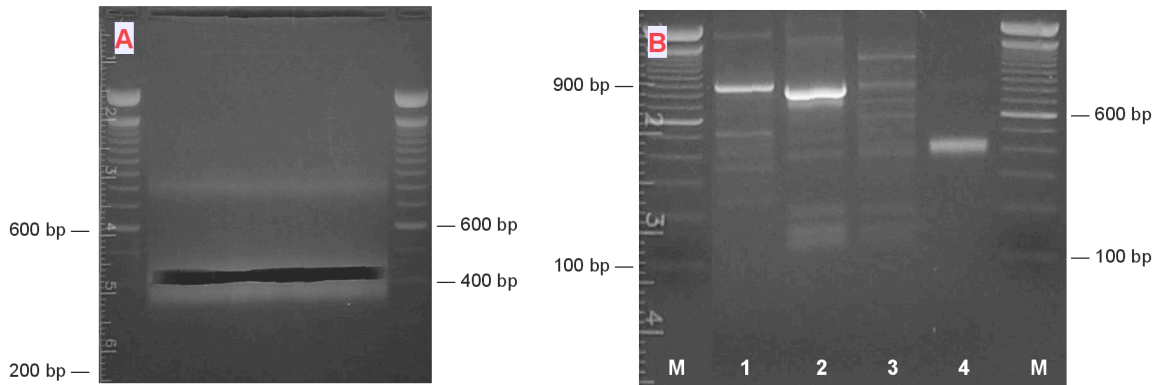


Abb. 3-33: Herstellung der Fragmente [1-14] und [7c-20].

a) PCR zur Amplifikation des Fragments [1-7b] aus Plasmid-DNA, Excision der Bande des um die Basen 1-40 verlängerten Inserts (subkloniertes Fragment entspricht [1b-7b]). Durch Agarosegelaufreinigung und Excision wurden Nebenprodukte wie bei 800 bp nicht in die nächste Fusions-PCR eingebracht; M = Marker 100 bp Leiter.

b) Fusions-PCR, Spur 1 = [1-7b] + [7c-14], Input = 200 ng der Gel-Extraktion und 2 µl des PCR-Ansatzes zu Spur 8, Abb. 3-32 ergibt 860 bp PCR Produkt entsprechend [1-14]; Spur 2 = [7c-14] + [15-20], Input je 2 µl der Spur 8 und Spur 13, beide Abb. 3-32 entsprechenden PCR-Ansätze, PCR-Produkt entspricht 800 bp für [7c-20]; Spur 3 = Verschmelzung aller drei Fragmente zu [1-20] ohne Produkt in der Größe von 1220 bp; Spur 4 = 200 ng der Gel-Extraktion von [1-7b] aufgetragen.

In der in Abbildung 3-33b dargestellten PCR ergaben sich jetzt soweit dominante Banden, daß zunächst auf eine Gel-Aufreinigung verzichtet wurde und versucht wurde, aus den Fragmenten [1-14] und [15-20] oder aus [1-7b] und [7c-20] ein den Basen 1- 1220 entsprechendes Fragment [1-20] zu fusionieren.

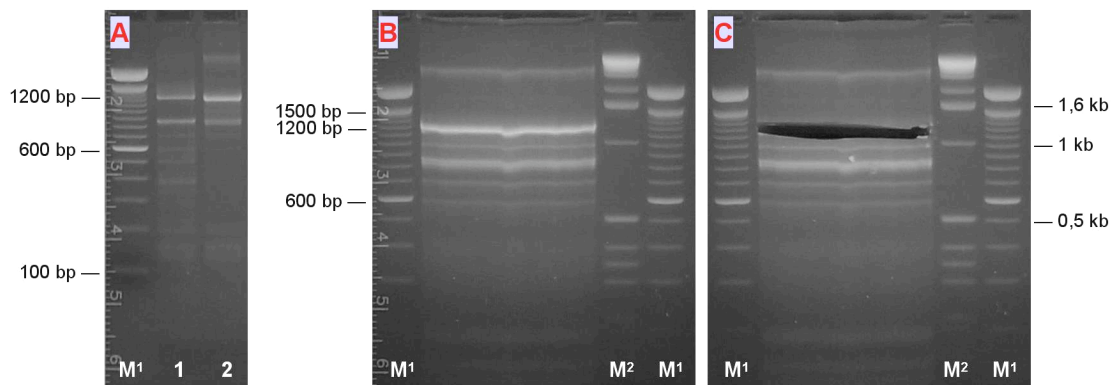


Abb. 3-34: Herstellung und Aufreinigung des Fragments [1-20].

a) Spur 1 = [1-14] + [15-20], Input 4 µl PCR-Ansatz zu Spur 1, Abb. 3-33b + 2 µl PCR-Ansatz zu Spur 15, Abb. 3-32; Spur 2 = [1-7] + [7-20], Input 200 ng des Eluats aus Abb. 3-33a + 2 µl PCR-Ansatz zu Spur 2, Abb. 3-33b, ergibt 1220 bp PCR Produkt entsprechend [1-20]; M¹ = Marker 100 bp Leiter.

b) und **c)** Präparativer Maßstab der Reaktion [1-7] + [7-20] zur Aufreinigung und anschließenden Klonierung; M² = Marker 1 kb Leiter.

Wie schon weiter oben beschrieben ist zu sehen, daß die Reihenfolge oder Kombination in der einzelne Teile miteinander verschmolzen werden, bei den Fusionen von längeren Fragmenten von Bedeutung. In Spur 2, Abbildung 3·34a ist zu ersehen, daß die PCR-Reaktion mit den Fragmenten [1-7b] und [7c-20] als Template eine stärkere und diskretere Bande liefert als die Verschmelzung der Fragmenten [1-14] mit [15-20] in Spur 1. Daher wurde im präparativen Maßstab das Fragment [1-20] aus erstgenanntem Ausgangsmaterial hergestellt, über ein Agarosegel von den Nebenprodukten getrennt, aufgereinigt (Abbildung 3·34, b und c) und wiederum kloniert.

Aus den Oligonukleotiden CO-21a, -21b, -21c, -22a, -22b und -22c wurde parallel das Fragment [21/22] hergestellt, sowie aus CO-23 und -24 und CO-25a und -25b das Fragment [23-25]. Diese Fragmente wurden untereinander verschmolzen zu [21-25] (nicht gezeigt) und danach versucht, dies an das aus dem Subklonierungsvektor amplifizierte und aufgereinigte PCR-Produkt [1-20] anzufügen (Abbildung 3·35).

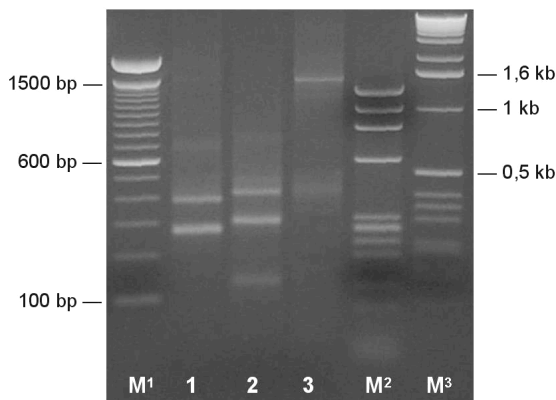


Abb. 3·35:

Fusions-PCR der Fragmente [1-20] und [21-25]

Spur 1 = Input 120 ng aufgereinigtes PCR-Produkt [1-20] + 2 µl PCR-Produkt [21-25] mit für 5'- und 3'-Ende mutagenisierenden Primern gagCO-HINDIII_For bzw. -BAMHI_Rev; Spur 2 = Input wie oben beschrieben, mit kürzer gewählten mutagenisierenden Primern; Spur 3 = Input wie oben beschrieben, mit sequenzspezifischen 5'-gelegenen Primer und gagCO-BAMHI_Rev ergibt Vollängen-Produkt mit 3'-angehängter Restriktionsschnittstelle; M¹ = Marker 100 bp Leiter; M² = Marker φX; M³ = 1 kb Leiter Leiter.

Als problematisch erwies sich die Fusions-PCR mit den mutagenisierenden Primern, die das gag-CO-Konstrukt um die zur Klonierung in den pTH-Vektor nötige Restriktionsschnittstelle sowie die aus dem Vektor selbst stammenden Basen zwischen Schnittstellen und Start-Codon verlängern. In Abbildung 3·35 ist dargestellt, daß die Fusion der beiden verbliebenen Fragmente [1-20] und [21-25] bei Einsatz beider Primer, die also 5'- als auch 3'-gelegene die entsprechenden Schnittstellen einfügen, nicht erfolgreich ist (Spur 1). Ebenso bei neu gewählten Primern, die im sequenzspezifischen Teil kürzer gewählt wurden (Spur 2). Nur in Spur 3 ist eine Bande zu sehen, die dem Vollängen-Konstrukt entspricht, aber nur die 3'-gelegene BamHI-Restriktionsschnittstelle besitzt. Andere Versuche, dieses Vollängen-Konstrukt aus demselben Ausgangsmaterial und 5'- bzw. 3'-mutagenisierenden Primern zu erzeugen, unter anderem die Variation der Annealing-Temperatur mittels einer Gradienten-

PCR oder Kombinationen der verschiedenen Forward- und Reverse-Primer führten ebenfalls zu keinem Ergebnis. Um eine mögliche Interaktion des Forward-Primers mit dem mutagenisierenden Reverse-Primer zu vermeiden, wurde zunächst das Vollängen-Produkt mit der 3'-Restriktionsschnittstelle subkloniert. Darauf konnte mit einem im Subklonierungsvektor liegenden Reverse-Primer (M13) in Kombination mit einem mutagenisierenden Forward-Primer das 5'- als auch 3'-modifizierte *gag*-CO Konstrukt amplifiziert werden (Abbildung 3-36). Da die Klonierung in den Subklonierungsvektor eine blunt-end Ligation bedeutet, ist kein gerichteter Einbau des PCR-Produkts zu erwarten. Es mußten somit sowohl der 5' zum Insert liegende M13-Reverse als auch der 3'-gelegene M13-Forward Primer als tatsächlicher, zum *gag*CO-HindIII_For passender Reverse Primer getestet werden.

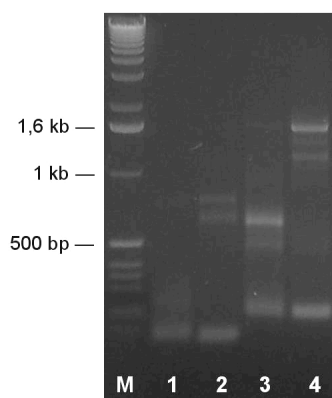


Abb. 3-36:

Anfügen der 5'-gelegenen Restriktionsschnittstelle für *Hind* III an das subklonierte Fragment [1-25(*Bam*HI)].

Input je Reaktion 50 ng Plasmid-DNA und 10 pmol Primer. Spur 1 = M13-Rev und *gag*CO-HindIII_For; Spur 2 = M13-Rev und *gag*CO-HindIII_For2; Spur 3 = M13-For und *gag*CO-HindIII_For2; Spur 4 = M13-Rev und *gag*CO-HindIII_For ergibt das 1553 bp lange *gag*-CO Konstrukt inklusive der zur Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen. M = Marker 1 kb Leiter.

Das in Abbildung 3-36, Spur 4 zu sehende Vollängen-PCR-Produkt wurde weiter in mehreren Replikaten hergestellt, um im Agarosegel von den kleineren Nebenprodukten getrennt zu werden und darauf in den Vektor pTH kloniert zu werden. In diesem Vektor wurde eine Kontroll-Sequenzierung durchgeführt, um das vollständige Konstrukt zu überprüfen. Durch die vorgehenden Sequenzierungen der subklonierten Fragmente war die Sequenz zum Teil bekannt und es wurden nur zwei Klone sequenziert. Beide Klone enthielten dieselben Abweichungen zur *gag*-CO Soll-Sequenz, im Bereich 855-888 eine Insertion sowie der Einbau von drei falsche Basen, an den Positionen 1359 und 1473 befinden sich ebenfalls Mutationen (Abbildung 3-37, nächste Seite).

841	GACATCCGCCAGGGCCCAAGGAGCCCTTCCGCG-ACTACGCCGACCGCTTCTTCAAGACCCTGCGCGCC	<i>gag CO</i>
841	GACATCCGCCAGGGCCCAAGGAGCCCTTCCGCGACTACGCCGACCGTTCTTCAAGACCCTGCGCGCC	Klon19
1350	CACCGCCCCCTCCGCGGAGAGCCTGGGCATGGGCGAGGAGATCACCAGCCCCCATCACCAGCCCtCAG	<i>gag CO</i>
1350	CACCGCCCCCTCCGCGGAGAGCCTGGGCATGGGCGAGGAGATCACCAGCCCtCCCATCACCAGCCCtCAG	Klon19
1421	AAGCAGGAGCCCCGCGACAAGGGCCTGTACCCCCCTGACCAGCCTGCGCAGCCTGTTCGGCAACGACC	<i>gag CO</i>
1421	AAGCAGGAGCCCCGCGACAAGGGCCTGTACCCCCCTGACCAGCCTGCGCAGACTGTTCGGCAACGACC	Klon19

Abb. 3-37: Vergleich der gefunden Sequenz nach Konstruktion des *gag CO* mit der Soll-Sequenz

Die vom 5'-Ende ausgehend erste falsche Base (Position 855) ist eine stille Mutation, die nicht die Aminosäure-Sequenz verändert, ebenso wie die vierte Abweichung (Position 888) von der Soll-Sequenz *gag-CO*. Da jedoch die zweite Mutation sowie die Insertion (Position 865 und 874 / 875) zu einem Aminosäure-Tausch bzw. einer Verschiebung des Leserahmens führen, wurden in einer ersten Mutagenese-PCR mittels 59 Basen langen Primern alle vier Fehler korrigiert. Es wurden zehn Klone sequenziert und es stellten sich nur zwei als im Bereich 855-888 der *gag-CO* Sequenz entsprechend heraus. Mit Plasmid-DNA dieser Klone wurde die zweite Mutagenese-PCR mit 50 Basen langen Primern durchgeführt, der nur die Mutation an Position 1473 korrigiert, da diese einen Einfluß auf die Aminosäure-Sequenz hat. Es wurden wiederum zehn Klone sequenziert, von denen sich drei als korrigiert erwiesen. Von diesen wurde ein Klon als "*gag-CO*" Konstrukt ausgewählt.

3.2.3 Nachweis der Expression der Konstrukte

Die vier erzeugten pTH-Vektoren *tat-WT*, *tat-CO*, *gag-WT* und *gag-CO* wurden nach Bestätigung der korrekten Sequenz auf Expression des Insert getestet. Mittels verschiedener Methoden wurde *in vitro* die Expression des im pTH kodierten SV5/pK-Antikörper Tag und der klonierten HIV-Proteine nachgewiesen. Nach Transfektion von Cos7- oder 239T-Zellen konnte für alle Konstrukte im Immunoperoxidase-Assay (IPA) eine Expression des SV5/pK-Tag nachgewiesen werden (Abbildung 3-38). Als Positiv-Kontrolle wurde der SV5/pK-Tag exprimierende pCDNA3-Vektor (freundlich zur Verfügung gestellt von Dr. Bannert, RKI) eingesetzt. Für *gag-WT* konnten nur wenige angefärbte Zellen beobachtet werden. Diese Beobachtung für *gag-WT* bestätigte sich im Western Blot (Abbildung 3-39a)

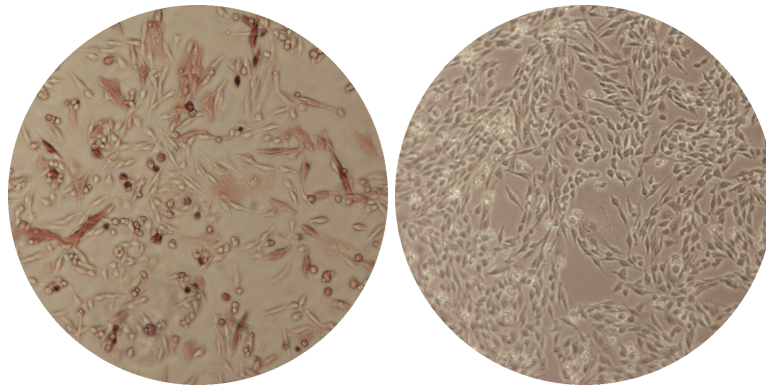


Abb. 3-38: Cos7-Zellen nach Transfektion, hier am Beispiel *tat*-CO gefärbt mit α -SV5/pK-Tag Antikörper und α -Maus-IgG Peroxidase Konjugat (200fache Vergrößerung). Rechts Zellen nach Transfektion ohne DNA im Ansatz (100fache Vergrößerung).

Weitere Transfektions-Versuche zeigten, daß auch mit α -Gag bzw. α -Tat Antikörpern Zellen im IPA angefärbt werden konnten. Bei der Transfektion von *gag*-CO konnte mit dem Antikörper AG3.0 eine starke Expression demonstriert werden, während für *gag*-WT nur einzelne Zellen angefärbt wurden. Hier wurde als Positivkontrolle eine Transfektion mit dem HIV-1 Moleklarklon pNL4-3 mitgeführt. Der Immunoperoxidase-Nachweis von Gag-Protein nach Transfektion mit *gag*-WT durch AG3.0 konnte nicht optimiert werden, auch durch den α -SV5/pK-Tag Antikörper konnte nur eine sehr geringe Expression gezeigt werden. Der monoklonale Tat-Antikörper zeigte bei *tat*-WT als auch -CO eine starke Expression des Tat-Proteins. Im Western Blot ließen sich die Ergebnisse bestätigen. Weiterhin ist ein deutlicher Unterschied in der Expression zwischen dem Codon-optimierten und dem Wildtyp *gag*-Konstrukt zu sehen (Abbildung 3-39c).

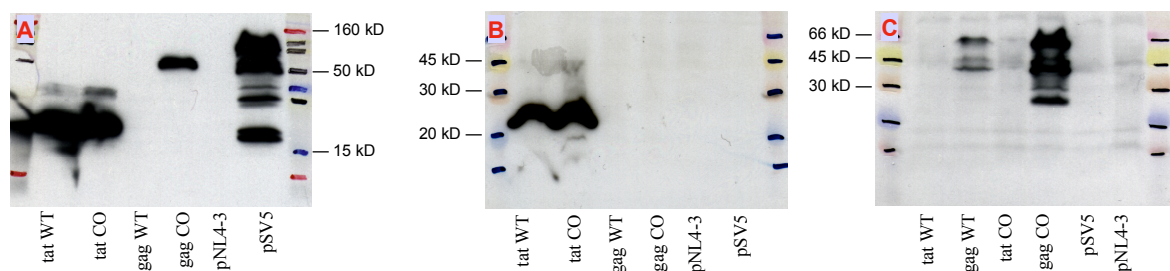


Abb. 3-39: Western Blot Analyse von Zellysat der transfizierten Cos7-Zellen.

- a) Angefärbt mit α -SV5/pK-Tag Direkt Konjugat. Positiv-Kontrolle = Transfektion mit SV5/pK-Tag-pCDNA3 Vektor, Negativ-Kontrolle = Transfektion mit pNL4-3.
- b) Primäre monoklonalen Antikörper = ID9D5/J4B4F4 (α -tat).
- c) Primärer monoklonaler Antikörper = AG3.0 (α -Gag). Zu Beachten ist die veränderte Reihenfolge des Probenauftrags gegenüber a) und b), um ein Überstrahlen der schwächeren Banden in der direkt benachbarten Spur zu vermeiden.

Um auszuschließen, daß der zu beobachtende Unterschied in der Expression *gag*-WT versus *gag*-CO durch eine stark abweichende Menge von transfizierten Zellen pro Konstrukt entsteht wurden Ko-Transfektionen durchgeführt. Die beiden Konstrukte wurden jeweils im 1:1 Gemisch mit einem *green fluorescence protein* (GFP) exprimierenden Vektor transfiziert und nach 24 Stunden die Expression analysiert. In Vorversuchen war im FACS ein deutlicher Unterschied zwischen transfizierten, GFP-exprimierenden Zellen und untransfizierten Zellen zu erkennen, bis zu 16% der analysierten Zellen waren positiv für GFP-Expression. In Abbildung 3·40 dargestellt ist eine geringere Transfektionsrate in der GFP-Transfektion, aber es wurden 6,21 % GFP-positive Zellen der *gag*-WT/GFP Ko-Transfektion gegenüber 1,88 % im *gag*-CO/GFP Ansatz gezeigt. Dadurch konnte demonstriert werden, daß die Zellen effizient für *gag*-WT transfiziert wurden und die Gene der eingeschleusten Vektoren exprimiert werden.

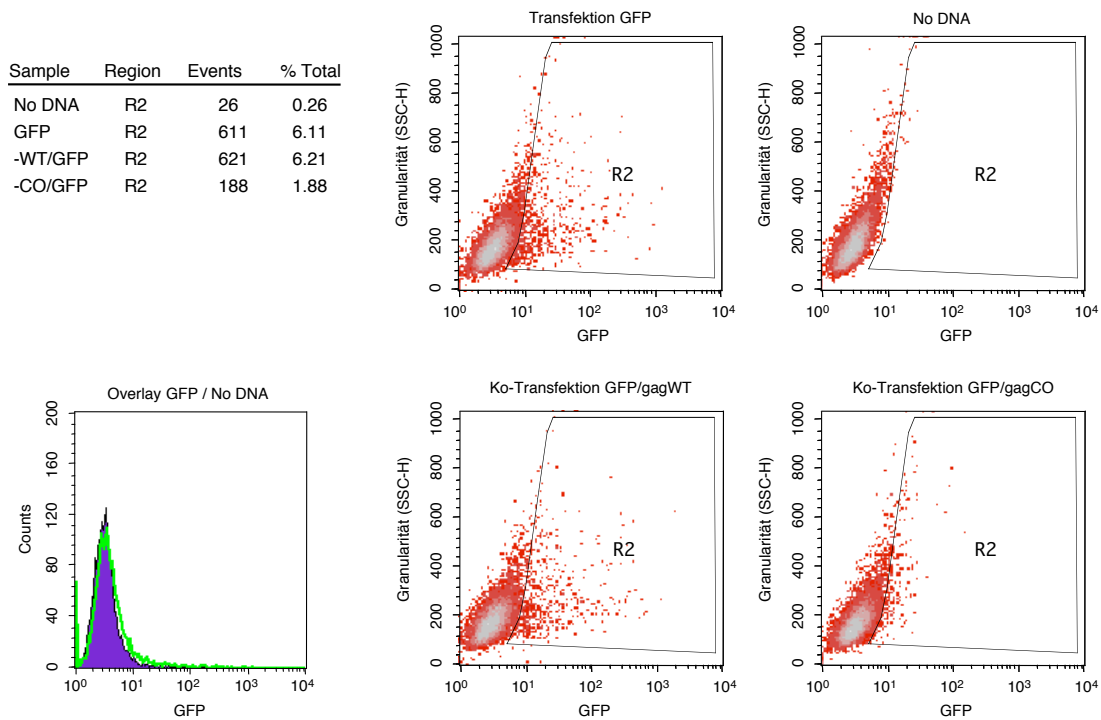


Abb. 3·40: FACS Analyse der Ko-Transfektionen

In der Tabelle sind die Werte der für GFP-positiven Zellen dargestellt. Die Dot-Blots zeigen die mit GFP bzw. die ohne DNA transfizierten Cos7-Zellen. Die Doppel-Darstellungen zeigen die ohne DNA transfizierten Zellen in der detektierbaren Emission für GFP gegenüber den mit GFP und dem jeweiligen Konstrukt transfizierten Zellen.

In der FACS-Analyse konnte eine deutliche Expression des transfizierten GFP-Konstrukts gezeigt werden. Da davon ausgegangen werden kann, daß die DNA-Aufnahme für die beiden ko-transfizierten Plasmide gleich ist, sollten somit auch die gleiche Menge von Zellen Gag-Protein exprimieren. Ist im p24-Nachweis aus Zelllysate eine unterschiedliche Menge an Protein zu messen, kann dieser Unterschied durch die unterschiedlich starke Expression von *gag*-CO gegenüber *gag*-WT in jeder einzelnen transfizierten Zelle zurückgeführt werden.

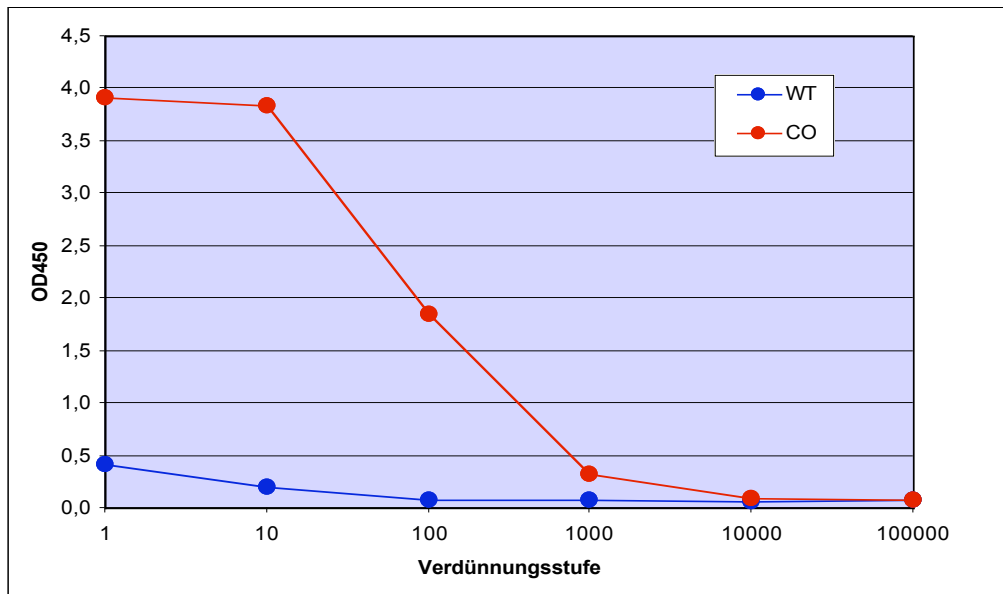


Abb. 3-41: p24 Analyse der Ko-Transfektionen mittels kommerziellen Gag-ELISA (Beckman-Coulter)

Im Diagramm in Abbildung 3-41 ist die Auswertung anhand des Coulter HIV-1-p24-Antigen-Assay (Beckman-Coulter) dargestellt. Durch die eingesetzte Menge an p24-Antigen, welches als Positiv-Kontrolle mitgeliefert wird ist eine Bestimmung der Konzentration in den Proben möglich. Errechnet wurden für das Zelllysate der *gag*-WT Transfektion 0,075 ng/ml p24-Antigen und für die *gag*-CO Transfektion 60,5 ng/ml. In Abbildung 3-41 ist zu sehen, daß die Expression von *gag*-CO wesentlich stärker p24-Antigen erzeugt als die des *gag*-WT, nach den errechneten Werten ergibt sich ein Faktor von circa 800facher stärkerer Expression gegenüber dem *gag*-Wildtyp Konstrukt.

3.2.4 Geplante Immunisierungs-Studien

Nach der Verifikation der inklonierten Sequenz und dem Nachweis der Expression von Tat und Gag durch die jeweiligen Konstrukte wurden die Plasmide durch den Endofree Maxiprep Kit (Qiagen) möglichst frei von bakteriellen LPS und in größerem Maßstab dargestellt. In dieser Form sind die Vektoren als Teile eines DNA-Impfstoff einsetzbar, wobei bei klinischen

Einsatz in Menschen die im Vektor kodierte Antibiotika-Resistenz entfernt werden müsste, Um den Transfer dieses Gens zu möglicherweise pathogenen Bakterien zu verhindern. Durch andere Selektionssysteme ist es ebenso möglich, die gewünschten Plasmide ohne Antibiotika-Resistenz-Gen in Bakterienkulturen anzureichern. Doch sind diese Systeme zeitaufwendiger als die Ampicillin-Selektion; die in dieser Arbeit hergestellten Vektoren mit Antibiotika-Resistenz sind auch so im Tierversuch einsetzbar. Der Unbedenklichkeitsnachweis des eingesetzten Vektors selbst wurde schon in Veröffentlichungen der Gruppe um A.McMichael (Oxford, UK) gezeigt, ebenso die Möglichkeit, in diesem Vektor die Antibiotika-Resistenz zu entfernen. Der Immungenitäts-Nachweis im Tiermodell der *tat*- und *gag*-Vektoren sowie die Herstellung und Testung eines Codon-optimiertes Konstrukt für das *env*-Gen des A/G-rekombinanten Isolats 00_200 konnte aus Zeitmangel nicht durchgeführt werden. In Zukunft wäre es möglich, auf dieser Basis eine DNA-Vakzine für Nigeria herzustellen oder auch mit den oben beschriebenen Konstrukten in eine Phase I Studie in Deutschland und/oder Nigeria zu gehen.