

Konstruktion von genetischen Immunogenen zur
Induktion und Charakterisierung einer protektiven
Immunantwort gegen AIDS

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

vorgelegt von :

Oliver Hohn

Februar 2004

Eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der
Freien Universität Berlin

Aus dem Robert Koch-Institut, Berlin.

Erster Gutachter : Prof. Dr. Reinhard Kurth, Robert Koch-Institut, Berlin

Zweiter Gutachter : Prof. Dr. Rupert Mutzel, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation : 19. April 2004

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Erworbene Immunschwächesyndrom (AIDS) und der Erreger HIV	1
1.1.1	Struktur und Morphologie.....	3
1.1.2	Lebenszyklus	5
1.1.3	Phylogenetik der Primaten-Lentiviren	7
1.2	Immunantwort und Pathogenese	11
1.2.1	Humorale Immunantwort.....	11
1.2.2	Zelluläre Immunabwehr.....	12
1.2.3	Pathogenese der HIV/SIV-Infektion	14
1.3	Impfstoffstrategie gegen HIV	16
1.3.1	Das Modell-System SIV im Tier.....	16
1.3.2	Ansätze der Impfstoff-Entwicklung gegen HIV	17
1.4	Zielsetzung.....	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Zellbiologische Methoden.....	25
2.1.1	Zellkultur und Medien	25
2.1.2	Lymphozytenseparation.....	26
2.1.3	FACS-Analyse	26
2.2	Immunologische Methoden.....	26
2.2.1	Benutzte Antikörper.....	26
2.2.2	IPA.....	27
2.2.3	p24-ELISA	28
2.2.4	RT-Test.....	29
2.3	Proteinchemische Methoden.....	30
2.3.1	Western Blot Analyse	30
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	31
2.4.1	Benutze Vektoren.....	31
2.4.2	Bakterienstämme und -medien	33
2.4.3	Oligonukleotide.....	34
2.4.4	PCR-Methoden.....	36
2.4.4.1	PCR und Agarosegel-Elektrophorese.....	36
2.4.4.2	RT-PCR	38
2.4.4.3	Fusions-PCR.....	39
2.4.4.4	real-Time PCR.....	39
2.4.4.5	Touchdown PCR	41
2.4.4.6	<i>in vitro</i> -Mutagenese PCR.....	42
2.4.4.7	Direkte-Lyse PCR	42
2.4.5	Nukleinsäuren Extraktion und Reinigung	43
2.4.5.1	DNA Isolation aus Zellen	43
2.4.5.2	Plasmid-DNA Isolation aus Bakterien	43
2.4.5.3	Isolierung retroviraler RNA.....	44
2.4.5.4	PCR-Produkt Aufreinigung	44
2.4.5.5	Gelaufreinigung.....	44
2.4.6	Klonierung.....	45
2.4.6.1	Subklonierung zur Sequenzierung der einzelnen Fragmente	45
2.4.6.2	Restriktion mit Endonukleasen.....	45
2.4.6.3	Ligations-Reaktion.....	46
2.4.6.4	Transformation	46
2.4.7	Transfektion.....	47

3	Ergebnisse.....	49
3.1	Konstruktion und Charakterisierung von Δnef-RTSHIVs	49
3.1.1	Konstruktion der <i>nef</i> -Deletionsmutanten	50
3.1.2	Etablierung einer analytischen PCR zur Detektion der C8-Mutante	60
3.1.3	Sensitivität der RTSHIV-Konstrukte gegenüber einen Non-Nukleosid-Analoga Inhibitor	60
3.1.4	Etablierung einer quantitativen Real-Time PCR zur Viruslast-Bestimmung	62
3.1.5	Ausstehender Einsatz der Δ nef-RTSHIV im Tier-Modell.....	63
3.2	Entwurf und Konstruktion eines HIV-1 Subtyp-spezifischen DNA-Immunogens	64
3.2.1	Klonierung der Wildtyp-Gene <i>gag</i> und <i>tat</i>	69
3.2.2	Konstruktion der Codon-optimierten Gene <i>tat</i> und <i>gag</i>	70
3.2.2.1	Herstellung des Codon-optimierten <i>tat</i> Konstruktes.....	74
3.2.2.2	Herstellung eines Codon-optimierten <i>gag</i> -Konstruktes	79
3.2.3	Nachweis der Expression der Konstrukte	87
3.2.4	Geplante Immunisierungs-Studien	90
4	Diskussion.....	92
5	Zusammenfassung	101
6	Summary	104
7	Literaturverzeichnis	106
8	Anhang	119
8.1	Abkürzungsverzeichnis	119
8.2	Plasmidkarten.....	120
8.3	Danksagung.....	123
8.4	Erklärung.....	124