

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkultur und Medien

Alle Zelllinien sowie PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) wurden in Zellkulturflaschen 25 ml - 75 ml oder 6- bis 24-Loch-Platten (Greiner) bei 37°C, 5% CO₂ und 98% Luftfeuchtigkeit gehalten. Vor Verwendung wurden die Zellen mit PBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ (137 mM NaCl; 3 mM KCl, 16.5 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) gewaschen und bei Bedarf die Zellzahl im Zellzählgerät „Coulter Z2“ (Beckman-Coulter) bestimmt.

Für unterschiedliche Nachweisverfahren wurden C8166- Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine durch HTLV-I immortalisierte, CD4-positive T-Zelllinie. Für Transfektionen wurden Cos-7-Zellen, SV-40 immortalisierte Fibroblasten-Zellen der Afrikanischen Grünen Meerkatze sowie 293T-Zellen, Humane Embryo Nierenzellen, Adenovirus immortalisiert eingesetzt. Die Suspensions-Zelllinie C8166 wurde in Zellkulturflaschen gehalten und bei Bedarf das Medium gewechselt sowie ein Teil der Zellen verworfen. Die adherenten Zell-Linien Cos-7 und 239 wachsen in einem Monolayer auf dem Boden der Zellkulturflasche, zum Umsetzen werden diese Zelle zunächst gelöst durch Inkubation über 10 min bei 37°C mit einer PBS - 0,25% Trypsin / 0,02% EDTA Lösung (Biochrom AG), dann in 10 ml Medium aufgenommen und davon ein Teil ausgesät.

Zellen	Medium	Additive
C8166	RPMI 1640	10% FKS (Life Technologies), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alles Biochrom AG)
PBMC	RPMI 1640	wie oben, mit 20 % FKS und 180 IU/ml Il-2 (Proleukin) (Sigma)
Cos7	CMRL 1066	10% FKS (Life Technologies), 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin (alles Biochrom AG)
293T	DMEM	wie oben, mit 4,5 g/l Glucoselösung (Sigma)

Die Behandlung von Zellkulturen mit Nevirapin (C₁₅H₁₄N₄O, Stoffbezeichnung BI-RG 587; Handelsname des in der Therapie eingesetzten Medikaments: Viramun®, Hersteller Boehringer Ingelheim) wurde durch Beziehen des Reinstoffes (AIDS Research and Reference Reagent Program, NIAID, NIH) ermöglicht. Laut Hersteller-Angabe ist Nevirapin wasserunlöslich, es wurde die gelieferte Menge in einem geringen Volumen DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst um eine 10 mM Stammlösung zu erhalten. Die hochkonzentrierte Stammlösung wurde in Zellkultur-Medium bis zu den eingesetzten Konzentrationen verdünnt.

2.1.2 Lymphozytenseparation

Um periphere, mononukleäre Zellen aus heparinisierem Vollblut zu gewinnen, wurde eine Dichtezentrifugation in Ficoll (Histopaque 1077, Sigma), einer Polysaccharose der Dichte 1.077 g/l, durchgeführt. Hierzu wurden 15 ml heparinisieretes Vollblut auf die Membran eines mit 15 ml Histopaque gefüllten Leucosep-Röhrchen (Greiner) pipettiert und für 30 min bei 1000g bei Raumtemperatur. Aufgrund ihrer höheren Dichte sinken dabei die Erythrozyten und Granulozyten durch das Ficoll nach unten, während die PBMC oberhalb der Membran einen weißen Ring im Plasma bilden. Mit einer Pipette wurden die PBMC aus der Interphase abgenommen, in ein neues Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 200 g für 10 min/RT mit Bremse). Zur Lyse weiterhin vorhandenen Erythrozyten wurden die Zellen in hypotoner 0,86%iger Ammoniumchlorid-Lösung aufgenommen und für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die PBMC in Medium aufgenommen und es wurde mittels dem automatischen Zellzähler „Coulter Z2“ die Zellzahl bestimmt.

2.1.3 FACS-Analyse

Fluoreszenzfarbstoff-exprimierende Zellen können im FACS-Gerät (FACSscalibur, Becton Dickinson (BD), Heidelberg) mit Licht entsprechender Wellenlänge angeregt werden und emittieren Signale, die ihre numerische Erfassung ermöglichen. Gleichzeitig wird im Streulicht die Größe und Granularität der Zellen dargestellt.

Um die Transfektions-Effizienz zu bestimmen wurden Cos7- oder 293T-Zellen ko-transfiziert mit einem *green fluorescent protein* (GFP) exprimierenden Vektor zu den Wildtyp/Codon-optimierten Immunisierungskonstrukten. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen aus der Zellkultur-Platte mittels Trypsinisierung entnommen und in FACS-Puffer (FACSFlow, BD) aufgenommen und fixiert (CellFix, BD). Im FACS-Gerät konnten im FITC-Kanal (520 nm) die GFP-exprimierende Population von der untransfizierten Population unterschieden werden.

2.2 Immunologische Methoden

2.2.1 Benutzte Antikörper

Durch die spezifische Wechselwirkung von Antikörper mit seinem Antigen werden Antikörper für den spezifischen Nachweis von Proteinen eingesetzt. Für unterschiedliche Nachweis-Methoden werden native, aufgereinigte Antikörper eingesetzt, bei weit verbreiteter Anwendung existieren kommerziell erhältliche monoklonaler Antikörper, an die direkt ein

Enzym wie die *horseradish*-Peroxidase (HRP) gebunden ist. Durch Einsatz von monoklonalen Antikörper steigt die Sensivität, die Hintergrundsignale werden geringer und durch Direkt-Konjugate wird ein Enzym-gekoppelter sekundärer Antikörper für z.B. den Westen Blot überflüssig. Sekundäre Antikörper erkennen den Fc-Teil des primären Antikörper, binden also unabhängig vom Antigen und sind Enzym-gekoppelt, damit die Detektion-Reaktion wie z.B. Umsetzung zu einem farbigen Substrat an der Stelle stattfindet, an der auch der primäre Antikörper gebunden hat.

Primäre Antikörper:	Epitop:	aus:	Herkunft :
α -HIV-1 Plasma (gepoolt)	HIV-1 Proteine	Blutproben von Patienten der Uniklinik Frankfurt	getestet und gepoolt in AG S. Norley, PEI
AG 3.0 α -Gag (monoklonal)	SIVmac, SIVagm / HIV-1 p24 kreuzragierend (SPRTLNA)	Maus-Myeloma (aus BALB/c)	AG J. Allen, San Antonio, USA
ID9D5 α -Tat (monoklonal)	HIV-1 tat; Aminosäuren 1-20	"	NIH/ EVA3021
J4B4F4 α -Tat (monoklonal)	Immunogen = gereinigtes HIV Tat	"	NIH/ EVA3022
α -SV5/pK-Tag (monoklonal)	SV5-pK (IPNPLLGLD)	"	Serotec (UK)

Sekundäre Antikörper:	Epitop:	Herkunft :
α -Human-IgG Peroxidase Konjugat	γ -Kette spezifisch	Sigma
α -Maus-IgG Peroxidase Konjugat	"	"

Direkt- Konjugate:	Epitop:	Herkunft :
α -SV5/pK-Tag HPR-Konjugat (monokl.)	s.o.	Invitrogen
α -GFP HPR-Konjugat (monokl.)	Immunogen = rek.GFP	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.2.2 IPA

Der Immuno-Peroxidase-Assay wird benutzt, um die Expression viraler Proteine in Zellen nachzuweisen. Dadurch kann die Infektion von Zellkulturen bzw. die Transfektion mit Expressionsvektoren gezeigt werden. Das Prinzip beruht auf der Bindung eines primären Antikörpers an virale Proteine der vorab fixierten Zellen, welcher durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper sichtbar gemacht wird. Dabei führt die enzymatische Umsetzung des Substrates zu einer Färbung der infizierten Zellen. Die entstehende Rotfärbung ist mikroskopisch auswertbar.

Für Suspensions-Zellen wurden Flachboden Mikrotiterplatten mit Poly-L-Lysin (5 μ g pro Loch in 100 μ l Aqua Bidest.) über Nacht im Kühlschrank inkubiert und vor Zugabe der Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es wurden jeweils 100 μ l Suspension der zu untersuchenden Zellen pro Loch transferiert und es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C zum Absetzen der Zellen. Bei adherente Zellen wie Cos7- oder 239T-Zellen wurde

direkt mit der Fixierung begonnen. Die Überstände wurden entfernt und durch Eintauchen der Platte in eiskaltes Methanol und anschließender Inkubation bei -20°C für 15 min erfolgte eine Fixation und Permeabilisierung der Zellen. Daran schloß sich ein dreimaliges Waschen mit PBS. Unspezifische Proteinbindungsstellen wurden mit Blockierungspuffer (2% Milchpulver in PBS) blockiert. Nach 60 min Inkubation wurde der Blockierungspuffer verworfen. Der primäre Antikörper wurde in einer entsprechenden Verdünnung in 2% Milchpulver/PBS angesetzt und es wurden 50 μl / Loch pipettiert. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden die Platten wieder 3x gewaschen und 50 μl / Loch des sekundären Antikörpers, Peroxidasegekoppeltes anti-Human IgG oder anti-maus IgG (beide Sigma), in einer Verdünnung von 1:1000 in 2% Milchpulver/ PBS, pipettiert. Es erfolgte ein weiterer Inkubationsschritt von 30 min bei 37°C . Die Platten wurden dann erneut gewaschen, bevor die Zugabe des Substrats (19 ml Na-Acetat 20 mM, pH5,0; 0,4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol gelöst in 1 ml DMF; 10 μl H_2O_2) in einer Menge von 50 μl / Loch erfolgte. Durch die Umsetzung des Substrats kam es zu einer unlöslichen Rotfärbung, welche mikroskopisch auswertbar war. Somit konnten infizierte und nicht infizierte Zellen differenziert werden.

Primäre Antikörper:	Verdünnung:	Sekundäre Antikörper:	Verdünnung:
α -HIV-1 Plasma (gepoolt)	1:300	α -Human-IgG Peroxidase Konjugat	1:1000
AG 3.0 (monoklonal)	1:300	α -Maus-IgG Peroxidase Konjugat	1:1000
α -Tat (monoklonal)	1:500	"	"
α -pK-Tag (monoklonal)	1:1000	"	"

2.2.3 p24-ELISA

Das Prinzip des ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) beruht auf der hoch spezifischen und stabilen Bindung von Antikörper an Antigen. Ist gegen ein Antigen ein polyklonales Serum oder ein spezieller monoklonaler Antikörper vorhanden, kann das Antigen im Antigen Trapping Assay oder „Sandwich-ELISA“ detektiert und quantifiziert werden. Der in der Arbeitsgruppe etablierte p24-ELISA wurde benutzt, um die Produktion von Gag durch die Immunisierungskonstrukte oder die Infektion von Zellkulturen durch RTSHIV Δnef -Mutanten zu zeigen. Eine genaue Quantifizierung von p24-Protein, um die Expressionsstärke von Codon-optimierten Genen versus Wildtyp-Genen im Immunisierungsvektor pTH zu zeigen wurde durch einen kommerziell erhältlichen Coulter HIV-1-p24-Antigen-Assay (Beckman-Coulter) vorgenommen. Im ELISA gleicht das Prinzip der Detektion des primären Antikörpers durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper und einer anschließenden Färbereaktion in der Vertiefung dem des IPA.

Um p24/gag nachzuweisen wurden 96-Loch-Platten (Falcon Micro test III Probind Plate, BD) mit dem monoklonalen Antikörper AG3.0 beschichtet. Die optimale Konzentration wurde durch Vorversuche ermittelt, ein Richtwert liegt bei 0,675 µg aus Hybridoma-Zellkulturüberstand über Protein G Sepharose Säulen (Amersham-Pharmacia, Erlangen) gereinigter Antikörper pro Loch (Beer *et al.*, in Vorbereitung). Die Beschichtung erfolgt durch Pipettieren der Antikörper-Verdünnung in Wasser in die Vertiefungen der Platten und Eintrocknen der Lösung über Nacht bei RT vor einem Ventilator. Vor dem Test wurden unspezifische Bindungsstellen mit 100 µl/ Loch des Blockierungspuffer (2% Milchpulver in PBS) abgesättigt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C im Brutschrank und anschließendem Waschen (0,05% Tween 20, 0,01% NaAzid in PBS) wurden die zu testenden Zellkulturüberstände oder Zelllysate (Lyse durch 0,2% Tween20 in PBS für 30 min) unverdünnt oder in Blockierungspuffer verdünnt in 50 µl/ Loch zugegeben. Die Platten wurden bei 37°C im Brutschrank für 1-2 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend 5x gewaschen. Danach wurde der primäre Antikörper, ein aus SIVmac infizierten Rhesusaffen gewonnenes Plasma in einer ebenfalls zuvor ermittelten Konzentration in Blockierungspuffer verdünnt (hier Rh41-Plasma, 1:500 verdünnt) im Volumen von 50 µl/ Loch hinzugegeben. Nach wiederum 30-60 min Inkubation wurden die Platten 5x gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde anti-human IgG Peroxidase-Konjugat (Sigma) 1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer benutzt. Es wurde wieder für 30-60 min bei 37°C inkubiert und dann 5x gewaschen. Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die Zugabe des Substrats (5 ml PBS, pH 6.0, 5 mg o-phenylenediaminedihydrochlorid (OPD, Sigma), 7,5 µl H₂O₂) in einem Volumen von 50 µl/ Loch. Die Farbreaktion konnte nach etwa 15 min mit 25 µl 2.5 N H₂SO₄ abgestoppt werden. Die Platten wurden dann bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im Meßgerät Easy Reader EAR 400 AT (SLT-Labinstruments) ausgewertet.

2.2.4 RT-Test

Die Messung von Reverser Transkriptase in zellfreien Kulturüberständen aus Infektionsversuchen wurde mittels dem Kit „C-Typ Virus RT-Aktivitäts-Assay“ (CAVIDI Tech, Uppsala, Schweden) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Die im Kit enthaltene 96-Loch Platten sind mit Poly-Adenosin beschichtet. Liegt in der Probe durch freigesetzte Viruspartikel eine C-Typ Virus (u.a. HIV, SIV) Reverse Transkriptase vor, werden die im Reaktions-Mix enthaltenen Brom-Deoxyuridintriphosphate (Br-dUTP) durch dieses Enzym an das Poly-Adenosin der Platte synthetisiert. Ein im „Produkt-Tracer“

enthaltener Br-dU-bindender Antikörper bindet an das DNA-Stück und ermöglicht über das Alkalische Phosphatase-Konjugat den RT-Nachweis durch eine Farbreaktion. Gemessen wird die Farbintensität anhand der Extinktion bei der Wellenlänge von 405 nm. Die Quantifizierung erfolgt über die als Standard eingesetzte Aktivität von MuLV-RT.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Western Blot Analyse

Mit dem Western Blot (Immunoblot) können Proteine spezifisch nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel und Transfer auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) nachgewiesen werden. In einem Gesamt-Protein Aufschluß aus transfizierten Zellen kann durch spezifische Antikörper das exprimierte Fremd-Protein oder der Fusionsanteil angefärbt werden. Das Protein ist in der Größe durch mitgeführte Standards bestimmbar und kann auch unter bestimmten Voraussetzungen quantifiziert werden. Der Western Blot wurde eingesetzt, um einen Unterschied in der Expressionsstärke zwischen den Wildtyp-Genen und Codon-optimierten Konstrukten im Immunisierungsvektor anhand von unterschiedlich starken Banden darzustellen.

Dazu wurde 24 Stunden nach Transfektion der Zellkulturüberstand der transfizierten Zellen abgenommen, die adhärenen Zellen vorsichtig mit 1 ml pro Loch PBS gewaschen und 5 min bei 37°C mit 0,5 ml Trypsin/EDTA (Biochrom AG) inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mit 0,5 ml PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 300 g für 10 Minuten pelletiert und einmal mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung des Überstandes ist das Zellpellet in 30 µl Lysispuffer (PBS mit 20 mM Tris-HCl pH7,5; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton[®]-X 100) resuspendiert worden. Der Lyse-Ansatz wurde auf Eis für 15 Minuten inkubiert und die Zelltrümmer bei max. g abzentrifugiert. Der Überstand von ca. 30 µl wurde nach Zugabe von 30 µl Laemmli Sample Buffer (BioRad) 5 min bei 95°C erhitzt und konnten in die Geltaschen des SDS-Gels aufgetragen werden.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgt die Auftrennung von Proteinfractionen unter denaturierenden Bedingungen mit Hilfe einer vertikalen Gelelektrophoresekammer (Mini Protean II und III, BioRad). Die Proteine wurden in einem Polyacrylamid-Sammelgel (5%ig) fokussiert und über ein Polyacrylamid-Trenngel (15%ig) ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Gelherstellung und die Durchführung der Gelelektrophorese erfolgten nach den Angaben von BioRad (Tris/Glycin, Laemmli). Nach

erfolgter Elektrophorese wurden die Proteine auf PVDF-Membranen geblottet (s.u.), danach wurden die Gele mit dem GELCODE® Blue Stain Reagent (Pierce) nach den Angaben des Herstellers gefärbt und mit der Gel-Dry® Drying Solution (Invitrogen) getrocknet.

Das Übertragen der Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (BioRad) erfolgte im Naßblotverfahren mit der Trans-Blot SD®-Semi Dry Transfer Cell (BioRad) nach den Angaben der Hersteller. Es wurde eine Stunde bei 10 Volt geblottet.

Die geblottete Membran wurde eine Stunde bei RT in Blockierungspuffer (PBS mit 0,1% Tween20, 1% BSA, 5% Trockenmilch und 10% FKS) auf einem Horizontalschüttler blockiert und dann mit dem primären Antikörper in Blockierungspuffer eine Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde dann 3x mit PBS/ 0,1% Tween20 gewaschen durch Schwenken für je 5 min. Danach erfolgte die Inkubation des sekundären Antikörper in Blockierungspuffer wieder 60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schwenken. Nach viermaligem Waschen mit PBS/ 0,1% Tween20 erfolgte die Detektion durch Schwärzung eines Röntgenfilms bei Chemilumineszenz-Substraten. Die Chemilumineszenz wurde mit dem ECL Western Blotting Detection Reagents (Amersham) nach den Angaben der Hersteller erzeugt, durch Variation der Auflagezeit des Röntgenfilms auf die Membran in der Filmkassette konnten unterschiedlich starke Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Als Größenstandards wurden Full-Range- und High-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham) sowie der Protein Precision Standard (BioRad) eingesetzt.

Direkt Konjugat:	Verdünnung:	Inkubationsdauer :
α -SV5/pK-Tag HPR-Konjugat (Sigma)	1:10 000	1 Stunde / RT

Primäre Antikörper:	Verdünnung:	Inkubationsdauer :
α -HIV-1 Serum	1:30	über Nacht / 4°C
α -Gag AG 3.0	1:30	über Nacht / 4°C
α -Tat (Mix 1:1 von ID9D5 + J4B4F4)	1:50	1 Stunde / RT

Sekundäre Antikörper:	Verdünnung:	Inkubationsdauer :
α -Human-IgG Peroxidase Konjugat	1:2000	1 Stunde / RT
α -Maus-IgG Peroxidase Konjugat	1:2000	1 Stunde / RT

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Benutze Vektoren

Produkte aus den Fusion-PCR wurden mit der *PfuTurbo*® Polymerase (Stratagene) generiert und besitzen sogenannte glatte Enden (blunt ends). Um diese reproduzierbar sequenzieren zu

können und genügend Material für die weiteren Schritte zu Verfügung zu haben, wurden diese in den pCR[®]4 Blunt-TOPO Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) kloniert. Zur Subklonierung von Fragmenten mit glatten Enden wurde auch der Vorgänger des oben genannten TOPO-Vektors benutzt, der pCR[®] Blunt II-TOPO Vektor (Invitrogen). Ebenso wurde für eine Subklonierung über Restriktionsschnittstellen der pCR3.1-uni (Invitrogen) benutzt. Die Vektoren entstammen den entsprechenden TOPO-Klonierungs Kits. Vektordaten sind unter <http://www.invitrogen.com> einzusehen.

Als Kontrollen für Transfektionsversuche wurde ein pCDNA3-Vektor (Invitrogen) benutzt, in dem neben einem Cytokin-Vorläuferprotein auch der SV5-Tag, ein Epitop aus dem Simianen Virus 5 eingeführt wurde (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bannert, RKI). Auch bei dem designierten Immunisierungsvektor pTH wird nach dem eingefügten HIV-Gen der SV5-Tag exprimiert. Dieses Epitop (IPNPLLGLD) wird auch als SV5/pK-Tag bezeichnet und ist mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern zu detektieren. Das ebenfalls in dem Vektor enthaltene Gen (pro-IL16) hat keinen Einfluß auf die durchgeführten Experimente. Weiterhin wurde ein pCDNA3-Vektor mit einem Green Fluorescens Protein (GFP) als Expressionskonstrukt benutzt. Dieser Vektor wurde in der Ko-Transfektion zur Detektion der transfizierten Zellpopulation im FACS eingesetzt.

Die Δnef -Immunisierungsstudie wird ermöglicht durch den Molekularklon eines SIV-Genoms, in dem eine aus HIV stammende Reverse Transkriptase eingeführt wurde (Überla *et al.*, 1995). Dieses Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. K. Überla (Insitut für Molekulare und Medizinische Virologie, Bochum) zur Verfügung gestellt. Das Genom des SIV entspricht dem SIVmac239-*nef* open, die Reverse Transkriptase (RT) inklusive Rnase H-Anteil stammt aus HIV-1 IIIB Klon HXBc2. Dieses Enzym wurde *in-frame* zwischen Protease und Integrase eingeführt (Abbildung 2.1), daß ein infektiöses SIV/HIV-Hybrid Virus (SHIV) aus diesem Molekularklon entstehen kann. Nach dem eingeführten Enzym wird dies als RTSHIV bezeichnet. Das provirale Genom liegt in einem pBR322-Vektor vor und kann somit in *E.coli*-Bakterien replizieren.

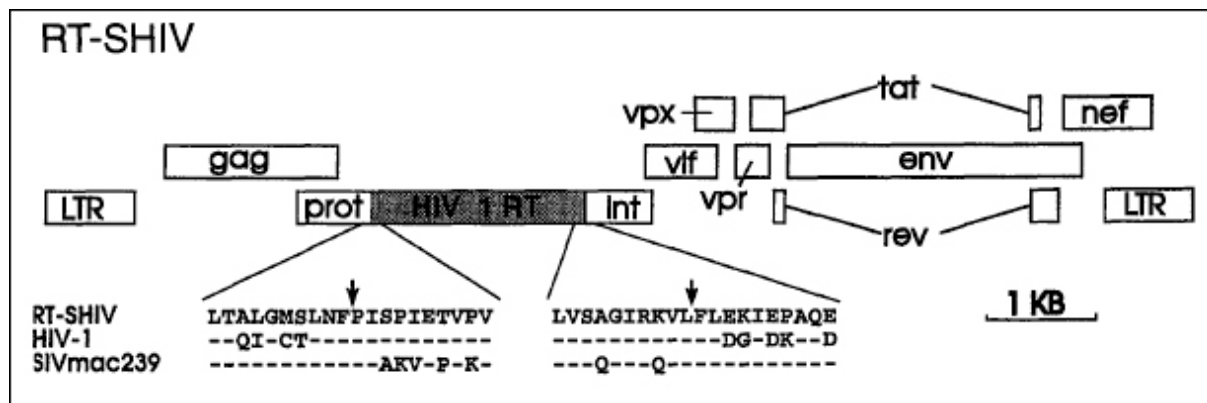


Abb. 2.1: Genom des RTSHIV
 Dunkel dargestellt die HIV-1 Reverse Transkriptase, die Pfeile zeigen die vorhergesagten Protease-Spaltungsstellen (aus Überla *et al.*, 1995).

Für die DNA-Immunsierung mit kompletten Gene des Subtyp A/ Subtyp G rekombinanten Isolats aus Nigeria wurde als Expressionsplasmid der Vektor pTH (Hanke *et al.*, 1998) verwendet. Dieses modifizierte pCR/CMV-Derivat erlaubt die Expression in Säugertierzellen und ist in mehreren Studie bereits auf Ungefährlichkeit und Eignung getestet worden. Der Vektor pTH wurde freundlicherweise von Dr. T. Hanke (Institute of Molecular Medicine, The John Radcliffe, Oxford) zur Verfügung gestellt.

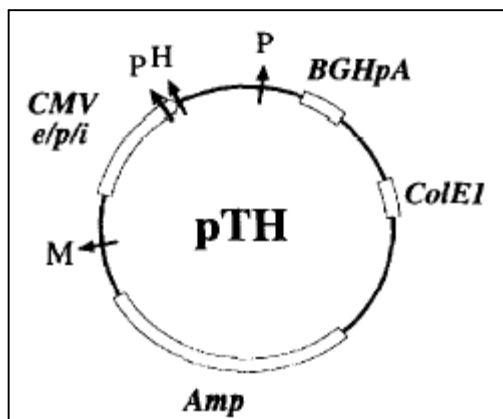


Abb. 2.2: Immunisierungsvektor pTH (5,3 kb)
 pCR/CMV-Derivat, Modifikationen wurden in der Polylinker-Region und im CMV-Promoter eingeführt, das *neo*-Resistenzgen sowie der M13 f1-ori wurden deletiert. CMV e/p/i = CMV enhancer/promotor/intron region; BGHpA = Bovine growth hormone polyadenylation signal; Amp = β -lactamase Gen; ColE1 = Origin der Plasmid Replikation; M = *Mlu* I-, P = *Pst* I-, H = *Hind* III- Schnittstellen (aus Hanke *et al.*, 1998).

2.4.2 Bakterienstämme und -medien

Die Subklonierungsvektoren wurden in die im Kit mitgelieferten chemokompetenten TOP10-Zellen oder auch elektrokompenten TOP10-Zellen (Invitrogen) transfomiert. Für die Transformation der RTSHIV-Derivate wurden elektrokompente TB1-*E.coli*-Zellen (New England Biolabs) benutzt.

Genotyp TB1 :	F ⁻ <i>ara</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15) <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>thi</i> <i>hsdR</i>
Genotyp TOP10 :	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) (ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD</i> 139 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>

Nach Transformation wurden die Zellen auf LB/Amp-Agarplatten (LB/Amp-Medium mit 20 g/l Agar) ausgestrichen. Nach Über-Nacht Inkubation bei 37°C oder zweitägiger Inkubation bei 30°C für die RTSHIV-Konstrukte erhaltene Kolonien wurde in eine Übernachtskultur genommen. Die Bakterien wurden in LB/Amp-Medium (Luria-Bertani Medium, 1% Bacto-Trypton; 0,5% Bacto Hefe Extrakt; 1% NaCl; pH 7,0 mit 100 µg/ml Ampicillin; alle Feinchemikalien und Zusätze von Sigma) oder LB/Kan-Medium (s.o., mit 50 µg/ml Kanamycin) bei 37°C über Nacht geschüttelt. Vor Plasmid-Präparation wurde aus der vitalen Kultur ein Aliquot Bakteriensuspension abgenommen und mit 20% wasserfreiem Glycerol versetzt. Diese Glycerol-Dauerkulturen wurden bei -80°C aufbewahrt, um bei Bedarf neue Kulturen anzupflanzen.

2.4.3 Oligonukleotide

Sämtliche unmodifizierte Oligonukleotide wurden bei ARK-Sigma oder bei MWG-Biotech synthetisiert, die Sonden für die Real-Time PCR wurden bei Eurogentech, Belgien bestellt. Standard-Primer wie T7, Sp6, M13 For/Rev und GAPDH For/Rev wurden zum Teil zur Sequenzierung benutzt und waren in den Kits enthalten.

Zum Nachweis der HIV-1 Reversen Transkriptase sowie zur Amplifikation von SIVmac239 *nef* aus RTSHIV und das Einfügen der Deletionen wurden folgende Primer benutzt:

Name	Sequenz 5' - 3'
HIV-RT_For	ATT AGC CCT ATT GAG ACT GTA CCA
HIV-RT_Rev	AGC ACT GAC TAA TTT ATC TAC TTG
nef_For	CTG CAG AAC CTT GCT ATC
nef_Rev	TCA GCG AGT TTC CTT CTT G
nef-del_Rev	ATG AGA CAC TGT CCC TCA CAA GAG AGT G
nef-del_For	AGG GAC AGT GTC TCA TTT TAT AAA AGA AAA GGG GGG
C8-del_Rev	TCC TTT TCT AAG ATT CTA TGT CTT CTT GCA CT
C8-del_For	GAA TCT TAG AAA AGG AGG AAG GCA TC
Finder_For	ATG GGT GGA GCT ATT TCC AT
Finder_Rev	TCT TCT AAC CTC TTC CTC TG
Finder-C8_Rev	CTT CTT CCT TTT CTA AGT ATA TGT C
Finder-VL_For	AGA AGA CAT AGA ATC TTA GAA AAG G

Für die quantitative Real-time PCR wurden folgende Sonde und Primer eingesetzt:

Name	Sequenz 5' - 3'
SIVmac239_For	CTA GTG GTG GAA ACA GGA ACA
SIVmac239_Rev	TGT TCT CGG GCT TAA TGG CA
SIVmac239_Probe	6FAM- CCA ACA GCA CCA TCT AGC GGC AGA GGT -TAMRA

Zur Amplifikation der unbekannt Gensequenzen aus den Moleklarklonen der A/G-rekombinanten Isolaten 00_187 und 00_200:

Name	Sequenz 5' - 3'
gag/AG_For	TGA CTA GCG GAG GCT AG
gag/AG_Rev	TGT ATC ATC TGC TCC TGT GT
env/AG_For	GTT ACT TGA TAG AAT AAG AGA AAG AGC
env/AG_Rev	GTT TGT CTT ATT CTT TCC CTA ACC
tat1/AG_For	GTG TCA ACA TAG CAG AAT AGG
tat1/AG_Rev	ACA CAA CTA TGG CTG CTA TG
tat2/AG_For	GTT AGG CAG GGA TAC TCA C
tat2/AG_Rev	CTG CAA TCA AGA CTA AGT CTC

Zur Klonierung der Wildtyp *tat*- und *gag*-Leserahmen mittels *Hind* III/*Bam*H I-Schnittstellen in den designierten Immunisierungsvektor pTH:

Name	Sequenz 5' - 3'
tat1-HindIII_For	GTA CGT ACG TAA GCT TAG ATC TCC CGC CGC CAC CAT GGA TCC AGT AGA TCC TAA C
tat1-Fusion_Rev	ATG ATG GGT AAG GGT TGC TTT GGT ACA GGA TTT TGA T
tat2-Fusion_For	CCT GTA CCA AAG CAA CCC TTA CCC ATC ATC AGA
tat2-BamHI_Rev	ACG TAC GTA CGG ATC CTA GGT CAT CCA TAG CGC ACT GAT CTG CC
gag-HindIII_For	GTA CGT ACG TAA GCT TAG ATC TCC CGC CGC CAC CAT GGG TGC GAG AGC G
gag-BamHI_Rev	ACG TAC GTA CGG ATC CTA GGT CAT CCA TCT AGG GGT CGT TGC C

Die 40 oder 80 Basen langen Oligonukleotide (CO-1, CO-1a usw.), die zur Herstellung der Codon-optimierten Konstrukte benutzt wurden entsprachen der Sequenz der Vorgabe in Abbildung 3-18 bzw. 3-19 und sind hier nicht aufgeföhrt. Diese wurden im 0,05 μ m Synthesemaßstab eingesetzt (MWG-Biotech AG, Ebersberg), die Arbeitslösungen auf 10 μ m in H₂O bidest. angesetzt und bei -20°C gelagert. Hilfreiche Auskünfte bei dem Erstellen der Codon-optimierten Sequenz erteilte die Firma „Geneart“ in Regensburg.

Zur Klonierung der kompletten CO-Konstrukte in pTH wurde folgende Primer eingesetzt, die wie oben die entsprechenden Schnittstellen einföhren:

Name	Sequenz 5' - 3'
tatCO_For	ATG GAC CCC GTG GAC CC
tatCO_Rev	GGC GCA CTG GTC GGC
tatCO-HindIII_For	GTA CGT ACG TAA GCT TAG ATC TCC CGC CGC CAC CAT GGA CCC CGT GGA CCC
tatCO-BamHI_Rev	ACG TAC GTA CGG ATC CTA GGT CAT CCA TCT AGG CGC ACT GGT C
gagCO_For	ATG GGC GCC CGC GCC AGC GT
gagCO_Rev	GGG GTC GTT GCC GAA CAG GCT
gagCO-HindIII_For	GTA CGT ACG TAA GCT TAG ATC TCC CGC CGC CAC CAT GGG CGC CCG CGC CAG CGT
gagCO-BamHI_Rev	ACG TAC GTA CGG ATC CTA GGT CAT CCA TGG GGT CGT TGC CGA ACA GGC T

Die Oligonukleotide, die für die *in vitro*-Mutagenese PCR eingesetzt wurden entsprechen der Codon-optimierten Sequenz-Vorgabe an der zu mutierenden Stelle und waren jeweils 50-60 Basen lang.

2.4.4 PCR-Methoden

2.4.4.1 PCR und Agarosegel-Elektrophorese

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction) ist eine *in vitro* Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (Mullis and Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985). Durch eine hitzestabile Polymerase können mehrere Zyklen von Aufschmelzen (Denaturierung) des DNA-Doppelstrang, Anlagerung (Annealing) sequenzspezifischer Oligonukleotide mit einem freien 3'-OH-Ende (Primer) an die Ausgangs-DNA (Template, Matrix) und Synthese des komplementären Strangs (Elongation) nacheinander ablaufen. Damit wird das Ausgangsprodukt theoretisch exponentiell vervielfältigt. Geringe DNA-Mengen können so verstärkt (amplifiziert) werden, zum Nachweis z.B. durch Agarosegel-Elektrophorese oder zur weiteren Verwendung wie Klonierung.

Als hitzestabile Polymerase wurde die rekombinante *PfuTurbo*[®] Hotstart DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet. Dieses Enzym besitzt im Gegensatz zur herkömmlichen *Taq*-Polymerase eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität (sogenannte Korrekturlesefähigkeit), wodurch die Fehlerhäufigkeit mit nur $1,3 \times 10^{-6}$ pro Nukleotid etwa sechsmal geringer ist. Dadurch wird die eingesetzte DNA wesentlich fehlerfrei vervielfältigt, bei der Untersuchung unbekannter Sequenzen wird so bei der Klonierung das Risiko von PCR-Artefakten vergeringert. Als Hotstart-Polymerase wird bezeichnet, wenn das Enzym in einem inaktiven Zustand vorliegt, bis es durch einen 95°C-Schritt zu Anfang der PCR aktiviert wird. Dies verhindert unspezifisches Arbeiten der Polymerase vor Beginn der PCR und unerwünschte Exonukleaseaktivität. Weiter im PCR-Ansatz enthalten sind dNTPs (Eurogentec) als Bestandteile für die neuen DNA-Stränge und Magnesiumchlorid (Applied Biosystems), welches Einfluß auf die Stabilität der Primer/Template-Bindung hat, sowie der für die Polymerase spezifische Puffer.

Die PCR wurde in dem PTC-200 DNA-Engine Thermocycler (MJ Research, Vertrieb Biozym AG) durchgeführt. Standard-PCR-Programm und prinzipielle Zusammensetzung eines 50 µl PCR-Ansatzes :

PCR-Mix :		Thermocycler-Profil :		
dNTPs	à 5 pmol	Schritt	Temp.	Zeit
For/Rev Primer	à 15 pmol	Denaturierung	95°C	2 min
MgCl ₂	50 nmol	Denaturierung	95°C	30 sec
Polymerase-Puffer 10x	1x	Primer-Annealing	60°C	20 sec
PfuTurbo [®]	2,5 U	Elongation	72°C	1 min pro kb
DNA-Template	500 pg - 100 ng	Finale Elongation	72°C	10 min

Ein solches Basis-PCR Setup wurde in den einzelnen Schritten zur Klonierung der Codon-optimierten Konstrukte bei Bedarf in folgenden Punkten variiert :

- Erhöhung der Annealing-Temperatur bei Nebenprodukten.
- Erhöhung des MgCl₂-Gehalts, wenn zunächst kein Produkt erzeugt werden konnte bzw. Erniedrigung bei unspezifischen oder verschmierten Banden.
- Verlängerung der Elongations-Zeit, wenn größere Fragmente amplifiziert werden sollen.

Die analytische PCR wie zum Beispiel der Nachweis der C8-Deletion oder die Überprüfung der Insert-Länge in den Subklonierungsvektoren direkt aus der Bakteriensuspension wurden mit der Hotstart *Taq*-Polymerase (Qiagen) durchgeführt. Die ursprüngliche *Taq*-Polymerase hatte der ursprünglichen *Pfu*-Polymerase gegenüber eine höhere Produktivität und Amplifikationsgeschwindigkeit, da sie keine Korrekturlesefähigkeit besitzt. Durch molekularbiologische Veränderung der klonierten *Pfu*-Polymerase sind mittlerweile diese Unterschiede z.B. durch Entwicklung der *PfuTurbo*[®]-Polymerase geringer geworden. Dazu wurden statt dem oben genannten *Pfu*-Puffer und der -Polymerase 0,025 U/Ansatz *Taq*-Polymerase und der dazu gehörige 10x-PCR Puffer eingesetzt. Der erste Denaturierungsschritt wurde auf 10 Minuten erhöht, um die Hotstart-Polymerase zu aktivieren. Bei der PCR aus der Bakterien-Übernachtskultur dient dieser Schritt gleichzeitig zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der Plasmid-DNA. Sonstige Reagenzien und Grundlagen des PCR-Programms blieben gleich.

PCR-Produkte werden durch Agarosegel-Elektrophorese nachgewiesen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes werden DNA-Fragmente durch die Maschen-Struktur des Agarosegels

nach ihrer Größe und Form aufgetrennt und können durch Ethidiumbromid, welches in den Doppelstrang interkaliert unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Für das Gel wird Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; 1 mM EDTA; pH 7,2) in Konzentration zwischen 0,8% (w/v) für große Fragmente und 3% (w/v) für PCR-Produkte um 100 bp. Es wurde Agarose-1000 (Gibco-Life Technologies) und für sehr kleine Fragmente FMC NuSieve 3:1 Agarose, (Biozym AG) im Elektrophorese-System Mini-Sub Cell, Wide Mini-Sub Cell (BioRad) verwendet. Um die DNA in die Geltaschen pipettieren zu können wurden die Proben mit DNA 6x-Loading-Puffer (10 mM Tris-Acetat; 50 mM EDTA; 10% Ficoll-400 (w/v); 0,4% Orange-G (w/v) in H₂O) versetzt. Durch Orange-G (Sigma) wird im Gel während der Elektrophorese nur eine Bande sichtbar, die sich direkt an der Lauffront befindet. Dadurch wird der ungleiche Kontrast im Gel-Photo bei kleinen Fragmenten durch Bromphenolblau- und Xylenblau-Färbung des Gels vermieden. Als Größenstandards wurden die 25 bp Leiter, die 100 bp Leiter, die 1 kb Leiter Plus und ϕ X174-DNA/*Hae* III-geschnitten (alle Gibco-Life Technologies) benutzt.

2.4.4.2 RT-PCR

Die Reverse-Transkriptase PCR dient zur Amplifikation von RNA-Templates. Es wird der Standard-PCR ein Reaktionschritt vorgeschaltet, die dem die RNA-Templates durch eine Reverse-Transkriptase wie z.B. MuLV-RT, aus dem Murine Leukämie-Virus isoliert, in cDNA (copy-DNA) umgeschrieben werden. Der in der PCR eingesetzte Reverse-Primer dient der RT dabei als Startpunkt zur Synthese des cDNA-Strangs.

Für die real-Time RT-PCR (s.u.) als auch für den Deletionsnachweis aus viraler RNA wurde der OneStep-RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Der Vorteil, speziell für die quantitative real-Time RT-PCR liegt in der Durchführung der RT-Reaktion im selben Mix, in der auch die PCR abläuft. Im Gegensatz zu RT-PCR Systemen, bei denen nach der RT-Reaktion durch z.B. die MuLV der PCR-Mix inklusiver DNA-Polymerase für die nachfolgende Amplifikation zugegeben wird und damit das Gefäß geöffnet werden muß, wird im OneStep-System diese Kontaminations-Gefahr vermieden.

Der dabei eingesetzte Enzymmix enthält neben der Hotstart-DNA-Polymerase zwei verschiedene rekombinante Reverse Transkriptasen. Die Moloney Murine Leukemia Virus RT, welche besonders effizient bei der Umschreibung großer Mengen RNA (mehr als 50 ng) arbeitet, und eine Avian Myeloblastosis Virus RT, die optimiert wurde für sehr kleine Mengen RNA (<50 ng). Durch einen 15 minütigen Denaturierungsschritt werden die Reversen Transkriptasen inaktiviert und die Hotstart-*Taq*-Polymerase aktiviert.

OneStep RT-PCR Mix :		Thermocycler-Profil :		
dNTPs	à 10 pmol	Schritt	Temp.	Zeit
For/Rev Primer	à 15 pmol	RT-Reaktion	50°C	30 min
MgCl ₂	100 nmol	Denaturierung/Aktivierung	95°C	15 min
One Step 5x Puffer	1x	Denaturierung	95°C	30 sec
Rnase Inhibitor	20 U	Primer-Annealing	55°C	20 sec
Enzym Mix	2 µl / Ansatz	Elongation	68°C	1 min
RNA-Template	1 pg - 2 µg	Finale Elongation	72°C	10 min

2.4.4.3 Fusions-PCR

Mit der PCR ist es auch möglich, mehrere kurze, synthetisch hergestellte einzelsträngige Oligonukleotide zu längeren DNA-Sequenzen zu verschmelzen. Dabei können zwei Oligonukleotide sich selbst „primen“, d.h. in einer geeignet langen Region am 3'-Ende komplementär sein und somit paarweise zum Doppelstrang ergänzt werden; oder die kurzen Oligonukleotide stellen zusammengesetzt den kompletten Doppelstrang dar und dieser wird mittels zusätzlicher Primer amplifiziert (Siehe auch Abb. 3·6 und 3·7). Ebenso können zwei längere DNA-Fragmente, die durch mutagenisierende Primer komplementäre Sequenzen am 3'-Ende enthalten miteinander verbunden werden. Bei der Fusion-PCR kann nur die *Pfu*-Polymerase eingesetzt werden, da *Taq*-Polymerasen Template-unabhängig am 3'-Ende des neuen Strangs ein Adenosin-Überhang einbauen, welcher bei der Verschmelzung zweier solcher Fragmente zu zusätzlichen Basen in der Sequenz führen würde. Es wurde das Standard-PCR Setup verwendet, die Menge an Template der zu fusionierenden Fragmente oder Oligonukleotide wie auch die Annealing-Temperatur musste jeweils optimiert werden.

2.4.4.4 real-Time PCR

Der Begriff „real-Time PCR“ bedeutet, daß unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoff-markierter Oligonukleotiden (Sonden) im PCR-Ansatz und dem Einsatz spezieller PCR-Geräte ein post-PCR Detektionssystem nicht mehr erforderlich ist. Anhand der Veränderung der Fluoreszenzen können akkumulierenden PCR-Produkte während der PCR detektiert werden und Aussagen getroffen werden. Hauptanwendungsgebiet sind hier die Quantifizierung der eingesetzten Menge an DNA durch z.B. den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBER® Green oder der Nachweis bestimmter Sequenzen in der Probe durch sequenzspezifischen Sonden.

Die verwendete Quantifizierungen durch die real-Time PCR mittels sequenzspezifischer Sonden beruhen auf der 5'→3'-Nuklease-Aktivität der *Taq*-Polymerase (im Gegensatz zu der

Korrekturlesefähigkeit der *Pfu*, die 3' → 5'-Exonukleaseaktivität) und der Doppelmarkierung der Sonde mit einem 5'- und einem 3'-gebundenen Fluoreszenzfarbstoff (Holland *et al.*, 1991). Am 5'-Ende der Sonde, also dem Primer zugewandt, befindet sich ein angehängter Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein (= 6-FAM) als Reporter, während 3' sich als Quencher fungierendes Rhodaminderivat (= TAMRA) befindet. Liegen diese in unmittelbarer Nachbarschaft, d. h. durch wenige Basen getrennt vor, emittiert der Reporter nach Anregung keine Fluoreszenz, da die Energie auf den Quencher übertragen wird. Man spricht von einem Fluoreszenz-Resonanz-Emissions-Transfer (FRET). Kommt es während der Verlängerung des Forward-Primers im Amplifikationsschritt der PCR zu einem Auftreffen der *Taq*-Polymerase auf die Sonde, so wird diese beim Ablösen vom Template in kleinere Stücke gespalten. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher und somit der FRET-Effekt wird aufgehoben und FAM emittiert nach Anregung ein bestimmtes Fluoreszenzspektrum. Dabei ist die Emission proportional zur Anzahl der entstandenen Amplikons, da pro Neusynthese ein Sondenmolekül hydrolysiert wird. In den real-Time PCR-Geräten wird die Fluoreszenz in jedem Zyklus gemessen und aufgezeichnet. Anhand der Kurven ist ersichtlich, in welchem Zyklus der PCR die Fluoreszenz für eine bestimmte Probe zum ersten mal über das Hintergrund-Signal steigt. So definiert sich der C_T -Wert einer Probe. PCR-Ansätze mit einer hohen Kopienzahl als Ausgangsmaterial haben einen niedrigen C_T -Wert, da schon in frühen Zyklen viele Sondenmoleküle, welchen an viele Ausgangs-Templates gebunden haben gespalten werden. Der Schwellenwert für Überschreiten des Hintergrundsignals ist durch Wasserkontrollen festlegbar. Zur statistischen Absicherung werden die Proben in drei bis fünf Replikaten eingesetzt.

Hier wurde eine FAM/ TAMRA Sonde eingesetzt, die in einer hoch konservierten Region von *SIVmac gag* bindet. Ebenso sind die Primer gewählt, die zu einem 137 Basenpaar langen Amplifikat führen. Eingesetzt wurde wie oben bereits beschreiben der OneStep-RT-PCR-Kit, um Kontaminationen oder Verfälschung der Quantifizierung durch Übertragung von Template von Gefäß zu Gefäß (Carry-over) zu vermeiden. Zusätzlich mußte der Fluoreszenzfarbstoff ROX hinzugegeben werden, der bei dem real-Time PCR Gerät ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Weiterstadt) als interne Referenz benutzt wird. Die PCR selbst ist eine Zwei-Schritt PCR, bei der das Primer Annealing als auch die Elongation in einem Temperaturschritt ablaufen. Dazu müssen die verwendeten Primer einen hohen T_M -Wert besitzen, damit die *Taq*-Polymerase in dieser Temperatur auch effektiv arbeitet. Zwei-Schritt PCR sind nur für kleinere Amplifikate empfehlenswert, liefern aber speziell in der real-Time PCR schnellere Ergebnisse.

Der eingesetzte Plasmid-Standard wurde erzeugt durch photometrische Bestimmung der Konzentration einer Isolation des RTSHIV-Moleklarklons und Berechnung der Kopienzahl über die Molmasse des Plasmids. Der RNA-Standard wurde über Aufreinigung von Viruspartikeln aus dem Zellkulturüberstand von mit RTSHIV infizierten C8166-Zellen. Nach RNA-Isolation wurde die Menge ebenfalls über das Photometer bestimmt. Beide Standards wurden in nukleasefreien Wasser auf 10^9 , 10^8 usw. bis 10^1 Kopien in 10 μ l eingestellt.

real-Time PCR-Mix :		Thermocycler-Profil :		
dNTPs	à 10 pmol	Schritt	Temp.	Zeit
For/Rev Primer	à 15 pmol	RT-Reaktion	50°C	30 min
Sonde	7,5 pmol	Denaturierung/Aktivierung	95°C	15 min
MgCl ₂	175 nmol	Denaturierung	95°C	30 sec
ROX	100 pmol	Annealing/Elongation	60°C	1 min
One Step 5x Puffer	1x			} 45x
Rnase Inhibitor	20 U			
Enzym Mix	2 μ l / Ansatz			
RNA-Template	1 pg - 2 μ g			

2.4.4.5 Touchdown PCR

Die Touchdown-PCR stellt gegenüber der Standard- bzw. Fusions-PCR nur eine Abwandlung des Thermocycler-Profiles dar. In einigen der eigentlichen PCR vorgeschalteten Zyklen wird sich der Primer Annealing-Temperatur von einer hohen Temperatur ausgehend angenähert und nur einige wenige Amplifikate gebildet. Diese Methode soll bewirken, dass die Primer in den ersten Runden mit der höchsten Spezifität binden und weniger Nebenprodukte durch Fehlanlagerung entstehen. In der eigentlichen PCR liegen dann wenige neu erzeugte Template-DNAs vor, die amplifiziert werden. Die Touchdown-PCR wurde eingesetzt, um die 40 bp- bzw. 80 bp-Oligonukleotide in der ersten Runde zu längeren Fragmenten zu verschmelzen.

PCR-Mix :		Thermocycler-Profil Touchdown :			
dNTPs	à 5 nmol	Schritt	Temp.	Zeit	
For/Rev Primer	à 15 pmol	Denaturierung	95°C	2 min	
MgCl ₂	50 - 100 nmol	Denaturierung	92°C	10 sec	
Polymerase-Puffer 10x	1x	Primer-Annealing	70°C	20 sec	
PfuTurbo®	2,5 U		- 0,5°C / Zyklus	} 20x	
DNA-Template	500 pg - 100 ng	Denaturierung	92°C		30 sec
		Anneal./Elongation	60°C		30 sec
				+ 1 sec/Zyklus	} 30x

2.4.4.6 *in vitro*-Mutagenese PCR

Die site-directed Mutagenese PCR erlaubt es, innerhalb eines Plasmids an spezifischen Positionen gezielte Modifikation der DNA-Sequenz vorzunehmen, ohne zusätzliche Klonierungsschritte. Somit können *in vitro* durch wenige Schritte Basenaustausche sowie Insertionen und Deletionen bis zu einer gewissen Größe vorgenommen werden. Es wurde die *in vitro*-Mutagenese PCR verwendet, um Fehler in der aus Oligonukleotiden zusammengesetzten Sequenz zu korrigieren. Dazu wird mit der *PfuTurbo*-Polymerase (Stratagene) der komplette Vektor neu amplifiziert, dabei dienen als Primer Oligonukleotide, welche die neue, einzufügende Sequenz enthalten mit 20-30 Basen Vektorsequenz vor und nach der Mutationsstelle. Die For- und Reverse-Primer binden dabei an derselben Position auf Plus- und Minusstrang des Plasmids. Nach der PCR erfolgt direkt im 50 µl-PCR Ansatz der Verdau des Template-Vektors (1 h bei 37°C) mit 20 Units *Dpn* I, welches nur die methylierte DNA aus *E.coli* erkennt. Dadurch werden nur die Template-vektoren fragmentiert. Bei der folgenden Elektroporation von 1 µl des PCR/Restriktionsansatzes in TOP10-Zellen kann somit prinzipiell nur der unverdaute, mutierte Vektor in den Bakterien replizieren.

PCR-Mix :		Thermocycler-Profil :		
dNTPs	à 5 nmol	Schritt	Temp.	Zeit
For/Rev Primer	à 10 pmol	Denaturierung	95°C	2 min
MgCl ₂	-	Denaturierung	95°C	30 sec
Polymerase-Puffer 10x	1x	Primer-Annealing	55°C	1 min
PfuTurbo®	2,5 U	Elongation	68°C	2 min pro kb
DNA-Template	20 ng	Finale Elongation	-	-

} 25x

2.4.4.7 Direkte-Lyse PCR

Um kurzfristig mittels PCR die genomische DNA von eukaryontischen Zellen auf bestimmte Sequenzen wie z.B. Provirus-Integration zu analysieren kann die Direkte-Lyse PCR benutzt werden. Dabei wird auf eine DNA-Aufarbeitung aus den Zellen verzichtet, durch einen der PCR vorgeschalteten Lyse-Schritt wird DNA freigesetzt und kann amplifiziert werden. Wichtig ist bei der Direkten-Lyse PCR die richtigen Pufferbedingungen, um einen Abbau der DNA zu vermeiden. Auch arbeitet die *Taq*-Polymerase nur in bestimmten Salzkonzentrationen und pH-Werten. Zur Direkten-Lyse PCR aus eukaryontischen Zellen wird folgender 20 µl Lyse-Ansatz pro 100 µl PCR-Ansatz eingesetzt :

Direkte-Lyse Reaktion:		
max. 5×10^5 cells	PBMC oder Zelllinie, in Auqa bidest. resuspendier	
1x	10x PCR Puffer	Applied Biosystems
0,1 μ g	Proteinase K (aus Stock 10mg/ml, in Auqa bidest gelöst)	Promega
700 nM	SDS	Sigma
Inkubation 50°C / 4 h, dann Inaktivierung 95°C / 10 min.		

Dasselbe Prinzip kann auch zur Analyse von transformierten Bakterienkulturen benutzt werden. Vor Plasmid-DNA Präparation kann in einer PCR mit einem für das klonierte Insert spezifischen Primer geprüft werden, ob der enthaltene Vektor auch das Insert in der korrekten Länge trägt. Bei dem Einsatz von Bakteriensuspension in die PCR (1 μ l der Über-Nacht-Kultur in 50 μ l-Ansatz) wird die Lyse durch einen 10 min / 95°C-Schritt zu Beginn des Thermocycler-Programms erreicht.

2.4.5 Nukleinsäuren Extraktion und Reinigung

2.4.5.1 DNA Isolation aus Zellen

Um infizierte Zellen auf provirale Integration zu untersuchen, wurde genomische DNA aus eukaryontischen Zellen (PBMC oder Zell-Linien) isoliert. Dazu wurde laut Anleitung des DNA-Isolierungs-Kit QIAamp Blood Kit, (Qiagen) verfahren. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Adsorption der durch Zell-Lyse freigesetzte DNA an eine Silica-Membran, die in einer Mini-Säule zum Einsatz in Eppendorf-Gefäße enthalten ist. Anschließend wurden Proteine, Salze und andere Verunreinigungen durch Waschen entfernt und die DNA konnte mit Aqua Bidest eluiert werden. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C gelagert.

2.4.5.2 Plasmid-DNA Isolation aus Bakterien

Die einzelnen Fragmente der codon-optimierten Gene wurden in bakterielle High-Copy Plasmide geklont, um durch transformierte *E.coli*-Übernachtskulturen ausreichenden Mengen an Plasmid-DNA für die Sequenzierungsreaktionen zu gewinnen. Das RTSHIV-Genom sowie der Immunisierungsvektor stammen ebenfalls von Standard-Vektoren ab. Die Plasmid-Isolation aus den LB/Amp-Kulturen erfolgte mittels des QIAprep[®] Miniprep bzw. QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden), abhängig vom Volumen der Übernachtskultur. Für die Präparation der fertigen Immunisierungsvektoren zum *in vitro* und *in vivo* Einsatz wurde der Endofree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) eingesetzt. Allen oben genannten Varianten liegt ebenfalls das Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterien und die Bindung der Plasmid-DNA an eine Silica-Membran zugrunde. Es wurde laut Anleitung des Herstellers verfahren und die

Plasmid-DNA in einem geeigneten Volumen Aqua Bidest. (pyrogen-frei) aufgenommen. Die Menge an isolierter DNA wurde ebenfalls photometrisch bestimmt. Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.4.5.3 Isolierung retroviraler RNA

Bei Detergenz-Lyse setzen SIV/HIV-Viruspartikel aus Plasma oder Zellkulturüberstand virale RNA frei. In Anwesenheit von chaotropen Salzen (Guanidin-HCl) bindet virale RNA selektiv an das Glassfieber spezieller Zentrifugenröhrchen. Die gebundene RNA bleibt im Gegensatz zu Kontaminationen zellulärer Komponenten während der folgenden Waschschriffe gebunden. Eluiert wird mit niedrigen Salzkonzentrationen. Eingesetzt wurde der High Pure Viral RNA Kit (Roche, Mannheim) und es wurde laut Protokoll des Herstellers verfahren. Es wurden $200\ \mu\text{l}$ Zellkulturüberstand eingesetzt und mit $50\ \mu\text{l}$ nukleasefreien Wasser eluiert. Anschließend wurde die RNA-Konzentration photometrisch bei Wellenlänge $280\ \text{nm}$ bestimmt und aus der Ratio zwischen A_{260}/A_{280} die Reinheit ermittelt.

2.4.5.4 PCR-Produkt Aufreinigung

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Dazu wird der gesamte PCR-Ansatz in einem Puffer aufgenommen und auf eine Silica-Membran enthaltende Mini-Säule gegeben. Durch die Pufferbedingungen, die Ausschlußgröße der Membran und durch Waschen werden die Polymerase, dNTPs, Primer und Salze entfernt und die DNA kann wieder in einem geeigneten Volumen Wasser eluiert werden.

2.4.5.5 Gelaufreinigung

Um mit DNA-Fragmenten von nur einer bestimmten Größe weiterarbeiten zu können, erfolgte die Auftrennung der DNA im Agarosegel und die anschließende Extraktion der gewünschten Bande aus dem Gel. Aus der mit einem sterilen Skalpell auf dem UV-Transilluminator ausgeschnittene Bande wurde die DNA mittels dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers wiedergewonnen. Dazu wird das Agarose-Stück in einem Solubilisierungs- und Bindepuffer bei 50°C aufgelöst, bei Bedarf mit Isopropanol versetzt und dann auf die Mini-Säule gegeben. Weitere Schritte folgen dem Prinzip der Aufreinigung von DNA aus Zellen oder der Aufreinigung von PCR-Produkten. Die DNA wurde in $30\ \mu\text{l}$ Aqua Bidest. eluiert.

2.4.6 Klonierung

2.4.6.1 Subklonierung zur Sequenzierung der einzelnen Fragmente

Einzelne, unterschiedlich lange Fragmente der Codon-optimierten Gene wurden subkloniert, d.h. zunächst mit einem möglichst geringen Zeitaufwand in einen Klonierungsvektor eingefügt, um diese relativ kurzen Stücke auf Fehler sequenzieren zu können. So konnte an verschiedenen Teilen des kompletten Gens gleichzeitig gearbeitet werden und bei ausreichender Länge schon Fehler in der Sequenz korrigiert werden. Auch wurde so bei schwierigeren Verschmelzungen der einzelnen Oligonukleotiden zu längeren Fragmenten sicher gestellt, daß für den nächsten Fusions-PCR Schritt ausreichend Template als Plasmid-DNA zur Verfügung steht. Ebenso wurden Teile des RTSHIV-Genoms subkloniert, um in einem überschaubareren Konstrukt Deletionen einzufügen.

Die Subklonierung wurde mittels des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) oder des Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit (Invitrogen) durchgeführt, bei dem es keine Modifikation des *Pfu*-generierten PCR-Produktes bedarf. Die Verknüpfung des PCR-Produktes (Insert) mit dem offenen Vektor durch die kovalent gebundene TOPO-Isomerase ist schneller als eine T4-Ligase getriebene Ligation. Es wurde bei der Ligation und Hitzeschock-Transformation in *E.coli*-TOP10-Zellen (im Kit enthalten) laut Anleitung des Herstellers verfahren. Die notwendige Menge an in die Ligation eingesetztem Volumen des PCR-Ansatzes wurde bei unterschiedlichen Klonierungen in mehreren Versuchen ermittelt.

2.4.6.2 Restriktion mit Endonukleasen

Endonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA spezifisch spalten können. Die verwendeten Typ-2-Restriktionsendonukleasen erkennen jeweils eine palindromartige Sequenz und erzeugen Enden mit 5'-Überhang. Um DNA-Fragmente in den RTSHIV-Vektor oder den Immunisierungsvektor pTH einzuführen, mußte über Restriktionsschnittstellen kloniert werden. Dazu wurde das Insert aus einem Subklonierungsvektor herausgeschnitten oder PCR-Produkte mit durch Primer angehangene Restriktionsschnittstellen entsprechend an den Enden geschnitten. Der designierte Vektor wurde analog verdaut. Die Reaktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers der Enzyme (New England Biolabs, Schwalbach/Ts.), Richtwert ist 2,5 U Enzym pro eingesetztem µg DNA. Die Menge an eingesetzter DNA hing von der Verfügbarkeit ab. Vektoren sind 2 h und PCR-Produkte über Nacht verdaut worden. Anschließend sind die geschnittenen Vektoren 1 h bei 37°C mit 10 Units im Restriktionsansatz mit Alkalischer Phosphatase (NEB) behandelt worden, welche die Phosphatgruppen am 5'-Ende entfernt, um Selbstligationen des Vektors zu vermeiden.

Analyse des Verdau erfolgte im Agarosegel. Die Restriktionsansätze wurden über die beschriebenen Methoden von den Enzymen gereinigt bzw. die gewünschten Fragmente durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert.

2.4.6.3 Ligations-Reaktion

Um DNA-Fragmente nach Verdau in einen Vektor einzufügen wird die T4-Ligase verwendet. Dieses Enzym verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-OH-Enden mit 5'- Phosphatresten unter Ausbildung von Phosphodiesterbindungen. Entscheidend für die Ligation ist das molare Verhältnis von Insert zu Vektor. Nach folgender Formel läßt sich die ein zusetzende Menge an Insert anhand gemessener DNA-Konzentrationen und bekannten Fragmentgrößen ermitteln :

$$\text{Masse Insert [ng]} = F \times \text{Masse Vektor [ng]} \times \text{Länge Insert [bp]} / \text{Länge Vektor [bp]}$$

F = Verhältnis-Faktor

Grundsätzlich eingesetzt : 3-fache Menge Insert (F=3) bei 100 ng Vektor

Die Insert- und Vektor DNA wurden mit 400 Units Ligase, 1x Ligasepuffer und H₂O bidest. zu einem 20 µl Ligationsansatz vermischt und bei Raumtemperatur 2 Stunden inkubiert. Der Ligationsansatz konnte direkt transformiert werden oder bei -20°C gelagert werden.

2.4.6.4 Transformation

Um die vollständigen Plasmid-Vektoren in Bakterienzellen einzuschleusen wurde die Hitzeschock-Methode als auch die Elektroporation verwendet. TOP10-*E.coli*-Zellen (Invitrogen) sind als chemokompeten oder elektrokompent erhältlich, TB1-*E.coli*-Zellen (NEB) sind ausschließlich elektrokompent. Bei der Hitzeschock-Transformation sind die mit den Klonierung-Kits mitgelieferten Bakterienzellen in einen kompetenten Zustand, der es ermöglicht, durch Inkubation der Bakterien mit der DNA auf Eis, kurzer Erhitzung auf 42°C und anschließender Aufnahme in SOC-Medium selektierbare Klone zu erhalten. Es wurden jeweils 30 µl, 50 µl und die restliche Bakteriensuspension auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank (Heraeus) inkubiert.

Bei der Elektroporation wird DNA in Bakterienzellen eingeführt, indem durch ein elektrisches Feld in der Küvette die Bakterienmembran von elektrokompenten Zellen kurzfristig durchgängig für die Plasmide wird. Die Elektroporation besitzt gegenüber der Hitzeschock-Methode eine höhere Transformationseffizienz. In eine gekühlte Küvette (BioRad) mit 0,2 cm Spaltbreite wurde das auf Eis aufgetaute Aliquot kompetenter Zellen

zusammen mit 5-20 ng Plasmid bzw. Ligationsansatz gegeben. Die Transformation erfolgte im Gene Pulser II (BioRad) bei 2,5 kV, 25 μ F und 200 Ω . Nach Aufnahme der Bakterien in 1 ml SOC-Medium (Gibco-Life Technologies) und 1 h Inkubation bei 37°C unter Schütteln wurden je Transformationsansatz 50 μ l und 100 μ l Bakteriensuspension auf LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.4.7 Transfektion

Eine Transfektion bedeutet das Einbringen von DNA, speziell Expressionsvektoren in eukaryontische Zellen. Genauso wie bei der Transformation muß die DNA die Zellmembran passieren und kann dann aber unabhängig von der Transfektionsmethode in den Zellkern gelangen. Dort wird die Information der DNA in RNA umgesetzt, und es kann zu einer Expression der im Vektor codierten Gene kommen. Zu den moderneren Methoden gehört die Lipofektion, die Transfektion mittels kationischer Liposomen. Dabei wird die DNA in Lipidpartikel eingeschlossen, die dann mit der Zellmembran fusionieren und so die DNA in die Zelle einbringen. Bei manchen Systemen wird die DNA in einem vorgehenden Schritt noch verdichtet (hier durch das Enhancer-Reagent), um die Transfektions-Effizienz zu erhöhen. Es wurden die Systeme Effectene (Qiagen) und Gene-Jammer (Stratagene) nach Vorgaben der Hersteller verwendet, die beide auf dem oben genannten Prinzip beruhen.

Für eine Transfektion mit Effectene wurde am Vortag eine 6-Loch Zellkulturplatte mit 4×10^5 Cos7-Zellen pro Loch ausgesät. Bei 293T-Zellen wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt und die Platte bei langsamem Wachstum für zwei Tage inkubiert. Pro Loch wurden 0,4 μ g DNA eingesetzt, bei 3,2 μ l Enhancer- und 10 μ l Effectene-Reagenz. Nach 6 h wurde das Medium mit den DNA/Lipidkomplexen abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 2 ml neues Medium pro Loch hinzugegeben. Bei längeren Inkubationszeiten mit dem Transfektionssansatz konnte eine zelltoxische Wirkung beobachtet werden. Die Zellen und/oder die Zellkulturüberstände wurden nach 24-48 Stunden wie beschrieben in die Nachweisverfahren eingesetzt. Eine Ko-Transfektion bedeutet, dass im selben Transfektionsansatz zwei verschiedene DNA enthalten sind. Es kann davon ausgegangen werden, dass für beide DNA, wenn sie nicht extrem in Größe des Plasmids oder Reinheit der Präparation differieren die Transfektionsbedingungen gleich sind. Das heißt, wenn eine bestimmte Anzahl von Zellen Plasmid 1 aufnimmt, wird auch dieselbe Menge an Plasmid 2 aufgenommen. Bei Ko-Transfektion mit einem Reporter-Gen-Konstrukt und dem in der Stärke der Expression zu testenden Vektor kann so die Transfektionseffizienz überprüft werden. Es

wurden für die Ko-Transfektionen beide zu transfizierende Vektoren 1:1 gemischt und mit 0,4 μg oder 1,0 μg DNA insgesamt pro Loch eingesetzt.