

Freie Universität Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie und Pharmazie

Bachelorarbeit

im Studiengang
„Biochemie Bachelor of Science“

Herstellung und Evaluation von Transduktionskonstrukten für die Etablierung eines ADCC-Assays für SIV/SFV

Erstgutachter: PD Dr. Norbert Bannert
Zweitgutachter: Dr. Jens Peter Fürste

angefertigt am Robert Koch-Institut Berlin

vorgelegt von: Julia Assmann

Berlin, den 15.10.2012

Inhalt

I.	Abbildungsverzeichnis.....	III
II.	Tabellenverzeichnis	IV
III.	Abkürzungsverzeichnis.....	V
1.	Einleitung.....	1
2.	Zielsetzung.....	9
3.	Material und Methoden.....	10
3.1.	Material.....	10
3.2.	Methoden.....	16
3.2.1.	DNA-analytische Methoden.....	16
3.2.1.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	16
3.2.1.2.	Restriktionsverdau	18
3.2.1.3.	Dephosphorylierung von Plasmiden	19
3.2.1.4.	Ligation	19
3.2.1.5.	Transformation.....	19
3.2.1.6.	Aufreinigung von Plasmid-DNA	19
3.2.1.7.	Glycerolstock	20
3.2.1.8.	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	20
3.2.1.9.	Agarosegelelektroporese.....	20
3.2.1.10.	Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel	20
3.2.1.11.	Sequenzierung.....	20
3.2.1.12.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	21
3.2.2.	Zellkultivierung.....	21
3.2.2.1.	Zellkultur.....	21
3.2.2.2.	Bestimmung der Zellzahl	22
3.2.2.3.	Platinum Retroviral Expression System	22
3.2.2.4.	Transfektion von Plat-GP-Zellen mit PEI.....	22
3.2.2.5.	Transfektion von 293T-, Plat-GP- und CEM-NK ^R -Zellen mit HEKfectin	23
3.2.2.6.	Zellyse.....	23
3.2.2.7.	Ultrazentrifugation zur Aufkonzentrierung von Virusüberständen.....	23
3.2.2.8.	Infektion von Zellen.....	24
3.2.3.	Proteinanalytische Methoden	24
3.2.3.1.	Konfokale Laserscanning-Mikroskopie(cLSM)	24
3.2.3.2.	Durchflusszytometrie (FACS).....	25
3.2.3.3.	Immunperoxidase Assay (IPAP-Assay)	26
3.2.3.4.	Western Blot.....	26

3.2.3.5.	Strippen einer PVDF-Membran	27
3.2.3.6.	Cavidi-Assay	27
4.	Ergebnisse	28
4.1.	Klonierung von <i>SIVmac293env</i> in den pMXs-Puro-Vektor:	28
4.2.	Klonierung von <i>SFVenv</i> in den pMXs-Vektor:	30
4.3.	Titration der Puromycinkonzentration.....	33
4.4.	Expressionskontrolle	34
4.5.	Transduktion	37
4.6.	Spinoculation	40
5.	Diskussion.....	42
6.	Zusammenfassung.....	47
7.	Quellenangaben.....	48
A.	Anhang.....	50
A.1	Primer	50
A.2	Sequenzen der verwendeten Konstrukte.....	51
A.3	Beispielhaftes Klonierungsschema für <i>SIV</i> :.....	54

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 schematische Darstellung eines retroviralen Partikels	1
Abb. 2 Aufbau des Genoms von HIV-1	2
Abb. 3 Aufbau des Envelope-Proteins von HIV-1	2
Abb. 4 schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus	5
Abb. 5 schematische Darstellung der ADCC-Immunantwort	7
Abb. 6 Testverdau von SIVenv in pDisplay	28
Abb. 7 Kolonie-PCR der Klone von SIVenv in pMXs	29
Abb. 8 Testverdau von SIVenv in pMXs.....	29
Abb. 9 Kontrolle der Gradienten-PCR	31
Abb. 10 Agarosegel nach Einfügen der PacI-Schnittstelle mittels PCR	31
Abb. 11 Kolonie-PCR nach Ligation von SFVenv in pMXs.....	32
Abb. 12 Kontrollverdau der Ligation von SFVR289env in pMXs	32
Abb. 13 Titration der optimalen Puromycinkonzentration.....	33
Abb. 14 Fluoreszenzmikroskopaufnahme nach erfolgter Transfektion	34
Abb. 15 cLSM-Aufnahmen transfizierter Zellen	35
Abb. 16 Auswertung der FACS-Analyse transfizierter Zellen.....	36
Abb. 17 Fluoreszenzaufnahme nach Transduktion	37
Abb. 18 RT-Standard des Cavid-Assays	38
Abb. 19 grafische Auswertung des Cavid-Assays	39
Abb. 20 grafische Auswertung der FACS-Analyse transduzierter CEM-NK ^R	39
Abb. 21 Ergebnisse des IPAP-Assays nach Infektion mit SIVmac293.....	40
Abb. 22 grafische Auswertung der qPCR 24 h nach Infektion	41
Abb. 23 grafische Auswertung der qPCR 48 h nach Infektion	41

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Geräte	10
Tab. 2 Chemikalien.....	11
Tab. 3 Puffer	12
Tab. 4 Kits	13
Tab. 5 Enzyme und ihre Puffer.....	14
Tab. 6 Antikörper.....	14
Tab. 7 verwendete Zelllinien	15
Tab. 8 Materialien der Zellkultur	15
Tab. 9 verwendete Konstrukte.....	16
Tab. 10 PCR-Ansatz	16
Tab. 11 Cycler-Programm	16
Tab. 12 Temperaturprofil zum Einfügen einer Schnittstelle	17
Tab. 13 Gradienten-PCR-Programm	17
Tab. 14 Ansatz der Kolonie-PCR	17
Tab. 15 Temperaturprofil der Kolonie-PCR.....	18
Tab. 16 Ansatz der qPCR	18
Tab. 17 Temperaturprofil der qPCR	18
Tab. 18 Sequenzierungsansatz.....	21
Tab. 19 Temperaturprofil für Sequenzierungen.....	21
Tab. 20 Ergebnis des Cavid-Assays	38

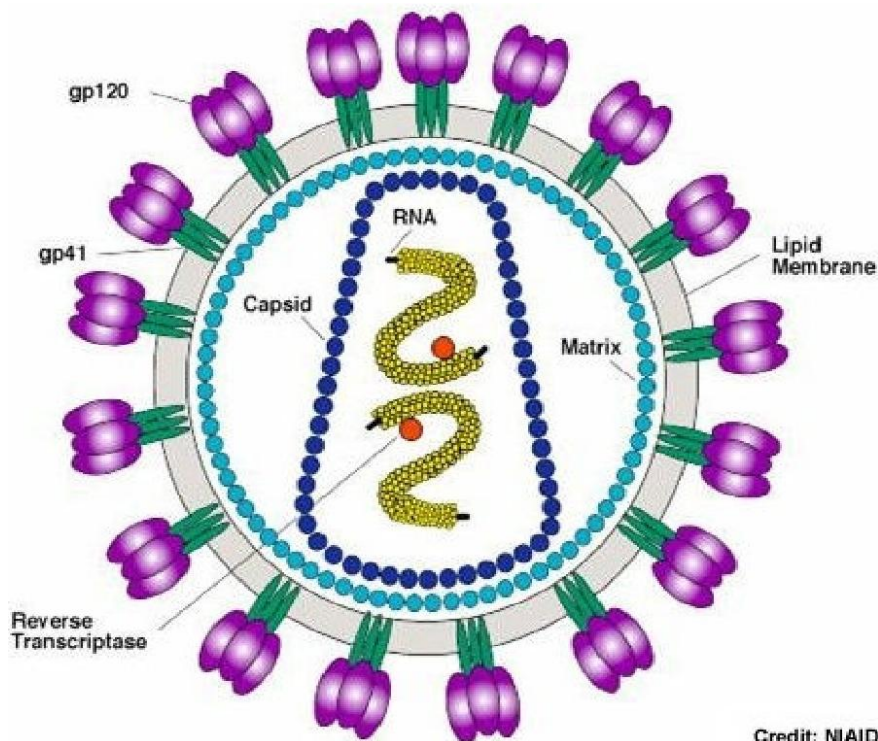
III. Abkürzungsverzeichnis

2F5	Epitop des HIV mit der Sequenz NEQELLELDK-WASLWN
ADCC	Antikörper-vermittelte zellabhängige Zytotoxizität
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	erworbenes Immunschwächesyndrom
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CCR5	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5
CD4	Differenzierungscluster 4
cLSM	Konfokale Laserscanningmikroskopie
CMV	Zytomegalie-Virus
CxCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Eagle's minimal essential medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetatsäure
Env	für engl. Envelope = Hülle
ESE	Exon Splicing Enhancer
FACS	Durchflusscytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Gag	Gruppenspezifische Antigene
GFP	Grünfluoreszierendes Protein
HA	humanes Influenzahemagglutinin
HIV	humanes Immundefizienzvirus
IgG	Immunoglobulin G
IPAP-Assay	Immunperoxidase Assay
LB-Amp-Medium	Lysogeny broth-Medium
LB-Medium	Lysogeny broth-Medium mit Ampicillin
MMLV	moloney murine leukemia virus
NP-40	Nonylphenoxypolyethoxylethanol
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
pol	Polymerase/Reverse Transkriptase/RNaseH
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	Quantitative Polymerasekettenreaktion
Rev	Regulator der viralen Expression

RIPA	Radioimmunopräzipitationsassaypuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNaseH	Ribonuklease H
RPMI	H Roswell Park Memorial Institute medium
RRE	Rev Responding Element
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SFV	Simianes Foamy Virus
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
SOC	Super Optimal Broth + 20 mM Glucose
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TSG	Twisted Gastrulation Protein
UV	Ultraviolett
VSV-G	Glykoprotein G des Vesicular-Stomatitis-Virus

1. Einleitung

Retroviren werden aufgrund ihrer genetischen und morphologischen Unterschiede in sieben Klassen, die α -, β -, γ -, δ -, ϵ -, Lenti- und Spumaretroviren, unterteilt. Auch die von ihnen ausgelösten Infektionen und die damit verbundenen Krankheiten unterscheiden sich. Der grundlegende Aufbau der Viruspartikel ist jedoch bei allen retroviralen Gruppen gleich und in Abb. 1 gezeigt. Die Partikel sind etwa 100 nm groß und von einer Membran umgeben, die von trans-membranen Glycoproteinen (gp), die auch Envelope-Proteine genannt werden, durchsetzt ist. Von der Membran umschlossen verschiedene Matrixproteine und das Capsid, das das als Ribonukleinsäure (RNA)–vorliegende Erbgut beinhaltet.



Credit: NIAID

Abb. 1 schematische Darstellung eines retroviralen Partikels

Der von einer Hüllmembran umgebene Virus besitzt auf seiner Oberfläche Glycoproteine, die sich in SU und TM unterteilen lassen. Das in der Abbildung blau gehaltene Capsid umschließt das als RNA vorliegende Erbgut.

(http://www.grin.com/object/external_document.239641/34afdc0c718252cd960c2cfe7068d2f6 aufgerufen am 9.10.2012)

Alle Retroviren haben den Aufbau ihres Genoms gemeinsam. Die in Abb. 2 gezeigt ist Sequenz lautet 5'-gag-pol-env-3'.

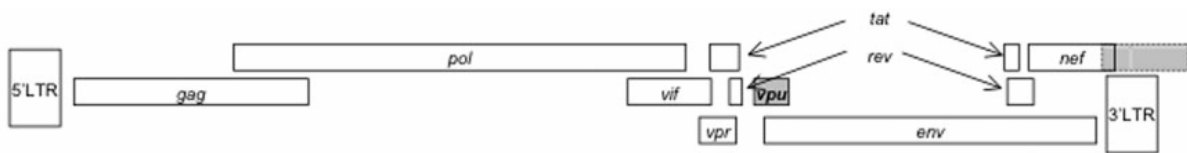


Abb. 2 Aufbau des Genoms von HIV-1

Das retrovirale Genom ist von zwei Long Terminal Repeat-Sequenzen flankiert. Am 5'-Ende beginnt die Sequenz mit den gruppenspezifischen Antigenen (*gag*), die von der *pol*-Sequenz überlappt wird. In diesem Bereich codieren die Gene für die virale Enzyme, Reverse Transkriptase, Protease und Integrase. 3'-Terminal folgt die Codierung der glykolysierten Hüllproteine (*env*). Da es sich bei HIV-1 um ein komplexes Retrovirus handelt, enthält das dargestellte Genom akzessorische Proteinsequenzen wie *tat* und *rev*. (Woude S. et al, 2006)

Bei *gag* handelt es sich um die Kodierung für die Matrix- und Kapsidproteine. Sie werden auch als gruppenspezifische Antigene bezeichnet. Die *pol*-Region kodiert die verschiedenen Enzyme, die für die Replikation eines Retrovirus nötig sind. Zu diesen Enzymen zählt unter anderem die Protease, die für die proteolytische Spaltung der Gag-Vorläuferproteine verantwortlich ist. Die Reverse Transkriptase sorgt dafür, dass die virale RNA in einen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Doppelstrang umgeschrieben wird. Sie besitzt sowohl eine Polymerase- als auch eine Ribonuklease H (RNaseH)-Aktivität. Die hohe Mutationsrate und die damit einhergehende genetische Variabilität vieler Retroviren erklärt sich durch die fehlende proofreading-Funktion der Transkriptase. Die Integrase integriert die virale DNA in das Erbgut der Wirtszelle. Diese Integration erfolgt zufällig an transkriptionsaktiven Bereichen und kann deshalb verschiedenste Auswirkungen auf den Wirt haben.¹

Aus der *env*-Region des retroviralen Genoms gehen durch Splicing die glykolysierten Hüllproteine der Viren hervor. Das Env-Vorläuferprotein bindet das Signalerkennungspartikel und wird in das endoplasmatischen Retikulum (ER) eingeführt. Das Vorläuferprotein wird im ER geschnitten und über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Im Golgi-Apparat erhalten die Proteine ihre N-Glykolysierungen. Diese posttranslationalen Modifikationen sorgen für die Spezifität mit der die Viren an ihre Rezeptoren auf den Oberflächen ihrer Wirtszellen binden können.² Der Aufbau des Hüllproteins ist in Abb. 3 gezeigt.

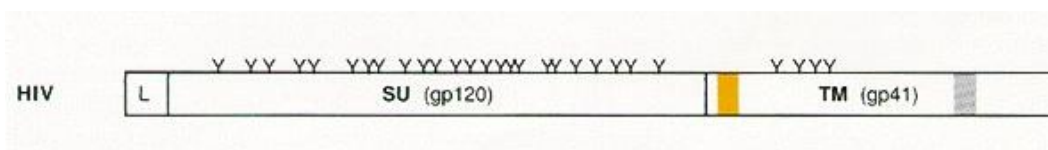


Abb. 3 Aufbau des Envelope-Proteins von HIV-1

Das Hüllprotein wird an zahlreichen Stellen posttranslational durch N-Glykosylierungen modifiziert. In Anlehnung an Coffin et al.

Zur Gruppe der Retroviren zählen unter anderem die Foamy Viren, die verschiedene Säugerarten infizieren, darunter auch Primaten. Foamy Viren gehören zu den Spumaviren. Dieser Name ist auf die schwammartige Zersetzung von Geweben *in vitro* zurückzuführen, die durch einen schnellen Ablauf von Synzytien- und Vakuolenbildung und anschließenden Zelltod ausgelöst wird. Weshalb die Gewebezersetzung nicht auch *in vivo* auftritt, ist nicht bekannt.³ Jeder Foamy Virus ist wirtsspezifisch. Dies lässt auf eine Co-evolution von Virus und Wirt schließen. Die These wird dadurch gestützt, dass Infektionen mit Foamy Viren weitverbreitet und apathogen sind. Trotz seiner Wirtsspezifität kann das simiane Foamy Virus (SFV) auf den Menschen übertragen werden. Dies geschieht bei besonders engem Kontakt zwischen Mensch und Affe, so z.B. bei Tierpflegern in Zoos oder durch die Jagd auf Affen. Dabei erfolgt die Ansteckung vermutlich über Bisse, da im Speichel von Affen eine besonders hohe Konzentration an Viren nachgewiesen wurde. Eine solche Infektion ist apathogen. Es gibt keinen Hinweis dafür, dass eine weitere Übertragung der Viren von Mensch zu Mensch stattfindet.⁴

Der erste scheinbar humane Foamy Virus wurde 1971 in Kenia isoliert. Nachdem zu Beginn angenommen wurde, dass es sich um einen neuen Spumavirusstamm handeln könnte, stellte sich bald heraus, dass der Virus eng mit den Simianen Foamy Viren, die in Schimpansen nachgewiesen wurden, verwandt ist.

In freier Wildbahn ist die Verbreitung von Spumaviren deutlich geringer als bei in Gefangenschaft lebenden Tieren. So sind beinahe alle Afrikanischen Grünen Meerkatzen in Zoos mit dem Virus infiziert, während ihre freilebenden Artgenossen nicht einmal zu 40% infiziert sind.³

Foamy Viren sind nicht die einzigen Retroviren, die insbesondere Affen infizieren.

Es wurden in 36 Primatenarten Lentiviren nachgewiesen, die jeweils für ihre Art spezifisch sind. Man spricht bei ihnen von simianen Immundefizienz Viren (SIV). Die Übertragung dieser Viren erfolgt auf sexuellem Weg aber auch eine Ansteckung durch Bissverletzungen z.B. im Rahmen von Kämpfen ist möglich.

Natürlich infizierte Tiere leiden trotz einer sehr hohen Viruslast nicht an einer AIDS (erworbenes Immunschwächesyndrom)-ähnlichen Erkrankung.

Anders ist dies bei asiatischen Affenarten, die mit SIV infiziert wurden. Diese entwickeln Symptome die sich mit dem humanen AIDS vergleichen lassen und bilden auf diesem Weg ein wichtiges Modell für die Erforschung des humanen Immundefizienzvirus (HIV). Die Immunreaktion natürlicher Wirte auf SIV ist sehr gering. Möglicherweise ist es diese herunterregulierte Antwort des Immunsystems, die die Affen vor einem pathogenen Krankheitsverlauf schützt. Diese Anpassung des Immunsystems erfolgte vermutlich über einen sehr langen Zeitraum, in dem sich Virus und Wirt aneinander anpassen konnten.⁵

Der Mensch zählt nicht zu den natürlichen Wirten von SIV. Allerdings ist es dem Virus auf zwei verschiedenen Wegen gelungen, die Speziesbarriere zwischen Mensch und Affe zu überwinden. Sowohl von Schimpansen als auch von Rauchmangabern sprang ihr jeweils spezifischer SIV-Stamm auf den Menschen über und passten sich derart an ihren neuen Wirt an, dass ihnen, im Gegensatz zu SFV, eine weitere Verbreitung von Mensch zu Mensch möglich wurde. Diese Zoonose lässt sich auf den Verzehr von Buschfleisch und die Jagd auf verschiedene Affenarten in weiten Teilen Afrikas zurückführen.

Aufmerksam wurde man auf die bis dahin unbekannte Erkrankung, die bald als AIDS bezeichnet wurde, als immer mehr homosexuelle Männer bereits in jungen Jahren an seltenen Krebserkrankungen litten und vermehrt von opportunistischen Erregern befallen wurden. Auslöser dieser Krankheit ist ein Retrovirus, welches als HIV bezeichnet wurde.⁶ Die frühe oder akute Phase einer Infektion mit HIV zeichnet sich durch Symptome aus, die einer Grippe oder auch dem Pfeiffischen Drüsenfieber ähneln. Dazu zählen Fieber, Ausschläge, Geschwüre im Mund und Gewichtsverlust. In den ersten sieben bis maximal vierzehn Tagen nach der Exposition mit dem Erreger verringert sich die Zahl der CD4+ T-Zellen und die Viruslast steigt an. Sobald das Immunsystem auf die Viren reagiert beginnt die Viruslast zu sinken und die Anzahl der CD4+-Zellen wieder zu steigen. Nach der akuten Phase folgt die chronische Phase der Infektion, die ohne weitere Symptome verläuft. Die Viruslast sinkt weiter, was sich auf die Reaktion der Immunabwehr zurückführen lässt und mit Mechanismen wie Antigen-spezifischer-Zytotoxizität und der Antikörper-abhängigen-zellulären-Zytotoxizität (ADCC) einhergeht. Letztere wird im späteren Verlauf genauer beschrieben. Im Verlauf der chronischen Phase nimmt die Replikation der HI-Viren wieder zu, da die Viren beginnen die antiviralen Mechanismen des Körpers zu umgehen. Dies geschieht durch verschiedensten Mutationen. Mit Hilfe dieser Fluchtmutationen gelingt es den HI-Viren der Immunantwort durch B-Zellen zu entkommen. Außerdem ist es den Viren möglich sich in das lymphoide Gewebe zu integrieren. Die Konzentration an CD4+-Zellen nimmt kontinuierlich wieder ab und das lymphoide Gewebe wird allmählich zerstört. Hat die Zahl an CD4+-Zellen ein bestimmtes Level unterschritten, steigt die Wahrscheinlichkeit an opportunistischen Infektionen durch Bakterien, Pilze und andere Viren zu erkranken. Außerdem steigt das Risiko einer Tumorerkrankung. Diese chronische Phase zeichnet sich durch geschwollene Lymphknoten, Fieber und einen rapiden Gewichtsverlust aus.⁷

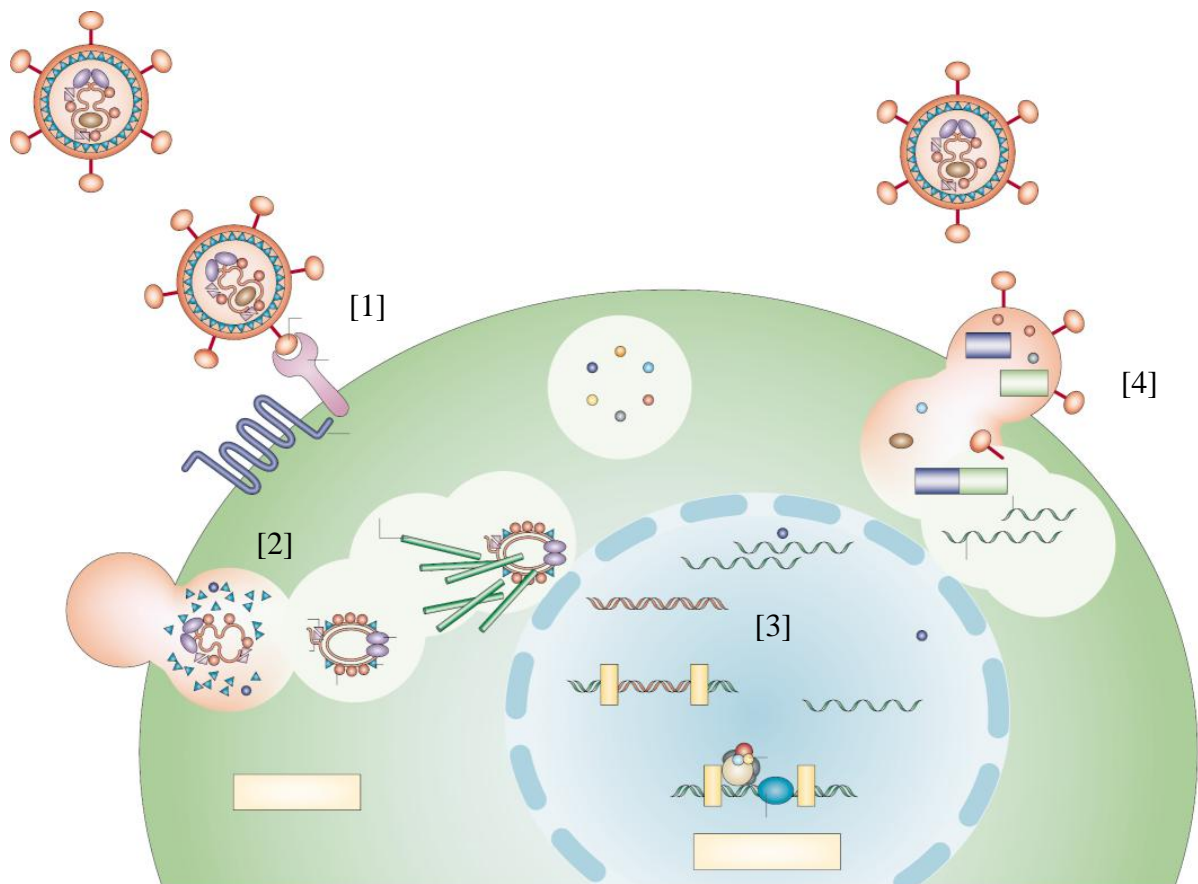


Abb. 4 schematische Darstellung des retroviralen Replikationszyklus

Nach der Bindung des Env-Proteins an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle folgt die Fusion von Virus- und Zellmembran [1]. Durch das „uncoating“ wird das virale Erbgut freigesetzt und durch die Reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben [2]. Die DNA wird in das Erbgut der Zelle integriert und die viralen Proteine produziert [3]. Mit dem Abschnüren neuer viraler Partikel ist der Replikationszyklus abgeschlossen [4]. Peterlin and Trono (2003)

Alle Retroviren haben den prinzipiellen Aufbau ihres Lebenszyklus gemein. Dieser ist in Abb. 4 dargestellt. Er kann in zwei große Phasen unterteilt werden, die frühe und die späte Replikationsphase. Die frühe Phase des Replikationszyklus beginnt mit der Bindung des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle. Im Falle von HIV interagieren die Hüllproteine des Virus mit dem CD4-Rezeptor auf der Zielzelle. In diesen Prozess sind je nach Virus Co – Rezeptoren, wie CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5 (CCR5) oder CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4), involviert. Die Untereinheit gp120 des Env-Proteins von HIV und der gebundene CD4-Rezeptor vollziehen eine Konformationsänderung, durch die die Affinität für die Co-Rezeptoren steigt. Die Co-Rezeptoren lösen eine weitere Konformationsänderung im Env-Protein aus. Als Folge davon löst sich die extrazellulär gelegene gp120 Einheit und ermöglicht es der intrazellulären gp41 Untereinheit mit der Zielmembran zu fusionieren.

HIV-1 kann auf zwei verschiedene Arten in seine Wirtszellen gelangen. Erstens durch eine direkte, pH-abhängige Fusion mit der Plasmamembran oder durch Clathrin-vermittelte Endozytose.⁸

Einmal im Cytoplasma der Wirtszelle angelangt beginnt der Prozess des „uncoating“. Dabei werden die Proteine und die RNA des Retrovirus freigesetzt. Die Reverse Transkriptase schreibt die virale RNA in eine doppelsträngige DNA um. Eine Ausnahme bilden in diesem Punkt die Foamy Viren, die ihr Erbgut erst während der späten Phase des Replikationszyklus revers transkriptieren.

Es ist dem Virus nicht möglich sich im Cytoplasma durch freie Diffusion zu bewegen. Aus diesem Grund machen sich die Viren intrazelluläre Mechanismen und Strukturen zu Nutze, wie z.B. das Cytoskelett. Retroviren können entlang der Mikrotubuli in Richtung des Mikrotubuliorganisationszentrums wandern und somit zum Zellkern gelangen. In intakter Form kann die Kernhülle von den meisten Retroviren nicht überwunden werden. Sie gelangen nur während der Mitose in sich teilende Zellkern. Eine Ausnahme bilden Lentiviren, zu denen auch HIV zählt, die die Kernmembran aktiv passieren können. Nachdem das Virus in den Kern gelang ist, erfolgt die Integration seines Erbguts in das Genom der Wirtszelle. Viele Fragen zu der Integration der retroviralen Erbanlagen in das Genom ihrer Wirtszellen sind noch offen. Die Integration wird durch das Enzym Integrase vermittelt und erfolgt zufällig in die transkriptionsaktiven Bereiche der DNA.⁹

Ist die virale DNA in das Wirtsgenom integriert, beginnt die Transkription viraler RNAs. Die produzierten Proteine bilden mit zwei Kopien der gesamten viralen Erbanlagen die Bestandteile der nächsten Virengeneration.⁸

Retroviren sind aufgrund der Integration ihres Erbgutes in das Genom ihres Wirtes von großem Interesse für die Forschung. Dies gilt insbesondere für Foamy Viren, die nicht pathogen sind, ein großes Wirtsspektrum haben, eine Resistenz gegen neutralisierende Antikörper und ein großes Genom besitzen.³

Da die Integration allerdings zufällig in transkriptionsaktive Bereiche erfolgt und nicht kontrolliert werden kann, ist der Einsatz z.B. in der Gentherapie schwierig. In der Forschung spielen Retroviren jedoch bereits jetzt eine Rolle. Die meisten antiretroviralen Medikamente greifen an bestimmten Schritten des Replikationszyklus ein oder inhibieren die viralen Proteine. Bei regelmäßiger, konsequenter Einnahme der Medikamente lässt sich der Ausbruch von AIDS lange Zeit hinauszögern. Im Gegensatz zu der medikamentösen Behandlung einer HIV-Infektion gibt es bei der Impfung nur minimale Fortschritte. Die meisten Studien scheitern schon in früheren Phasen der Entwicklung oder zeigen in klinischen Studien keine signifikante Wirkung. So gelang es beispielsweise nicht durch das Hüllprotein einen effektiven Schutz für

Risikogruppen zu erzielen. Der Schutz durch neutralisierende Antikörper ist nicht möglich, weil die Mutationsrate von HIV sehr hoch ist und die daraus resultierenden Variationen der Oberflächenproteine einen Langzeitschutz durch für sie spezifische Antikörper verhindert.¹⁰

Die Forschung konzentriert sich aus diesem Grund auf verschiedene Wirkungsweisen von Antikörpern, zu denen unter anderem die Komplementaktivierung, die Fc-Rezeptor-vermittelte Endozytose aber auch ADCC gehören.¹¹

Es handelt sich bei letzterer um einen grundlegenden Mechanismus des Immunsystems, um Tumorzellen und anderweitig von Pathogenen betroffene Zellen zu eliminieren. Die Antikörper-abhängige-zellulär-vermittelte-Zytotoxizität (ADCC) setzt sich aus drei Komponenten, die in Abb. 5 dargestellt sind, zusammen. Zum einen die Zielzelle, die ein pathogenes Antigen, wie z.B. ein virales Protein, auf ihrer Oberfläche exprimiert und zum anderen die Effektorzelle, bei der es sich um Natürliche Killerzellen (NK) oder Macrophagen handeln kann und einem Antikörper, der die Verbindung zwischen diesen beiden Zellen herstellt. Er bindet das auf der Zielzelle exprimierte Antigen und rekrutiert die Effektorzelle. Diese bindet den Fc-Teil des Antikörpers und setzt Perforine und Granzyme frei, die die Lyse der Zielzelle zur Folge haben. Des Weiteren können auch Chemokine und Cytokine sekretiert werden, die eine andere Immunantwort auslösen.¹²

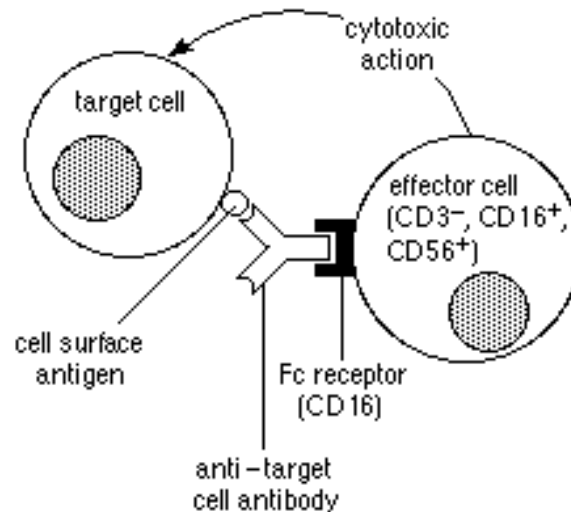


Abb. 5 schematische Darstellung der ADCC-Immunantwort

Die das Antigen präsentierende Zielzelle wird von dem ADCC-vermittelnden Antikörper gebunden. Der Fc-Teil dieses Antikörpers wird von einer Effektorzelle erkannt und die Lyse der Zielzelle ausgelöst. Nelson et al. (2001)

Während einer HIV-Infektion nimmt die Konzentration an ADCC-vermittelnden Antikörpern stetig ab. Lediglich bei Untersuchungen von long-term-non-progressors von HIV stellte sich

heraus, dass sie eine besonders hohe Konzentration von ADCC-vermittelnden Antikörpern in sich trugen.¹³

Diese Untersuchungen werden mit ADCC-Assays durchgeführt. Die Zielzellen werden meist mit dem radioaktiven Chromisotop ⁵¹Cr gelabelt. Diese Methode wird als Standard Chrom-Abgabe-Assay (CRA) bezeichnet. Nach Zugabe der Effektorzellen und Antikörper wird die Lyse der Zellen anhand der veränderten Radioaktivität gemessen. Neben dem Umgang mit radioaktivem Material ist auch die geringe Sensitivität dieser Messmethode, die hohe Rate an spontan freigesetztem Chrom und der damit einhergehende hohe Hintergrund ein Nachteil.

Durch die Abwandlung des FATAL-Assays, der entwickelt wurde um die T-Zell-Antwort zu untersuchen, wurde die bestehende Methode zum Nachweis der ADCC-Immunantwort verbessert. Zu diesem Zweck wurden die Zielzellen mit PKH-26, einem Membranmarker und CFSE, einem Lebend-Tot-Farbstoff, markiert. Mittels FACS-Analyse konnte die Zelllyse durch den Verlust von CFSE aus den Zellen nachgewiesen werden. Diese Methode wird als RFADCC (schneller und fluorometrischer ADCC-Assay) bezeichnet. Der Nachteil des RFADCC ist, dass die Ziel- und Effektorzellen entweder zu Beginn des Versuchs gecoatet oder infiziert werden müssen. Durch diese Schritte ergeben sich Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen, die durch verschiedene Vorversuche ausgeglichen werden müssen.¹⁴

Der Arbeitsgruppe Alpert et al. transfizierte CEM-NK^R-CCR5-Zellen mit der Firefly Luziferase, die transkriptionell von dem SIV LTR Promotor reguliert wurde. Bevor ein ADCC-Assay mit diesen Zielzellen durchgeführt werden konnte, mussten die Zellen mit SIV infiziert werden. Da sich die Infektion von CEM-NK^R-Zellen als schwierig gestaltet, wurde das Verfahren der Spinoculation genutzt, bei dem durch Zentrifugation von Zellen und Virus die Infektionsrate gesteigert werden kann.¹⁵ Die infizierten Zielzellen und die als Effektorzellen fungierenden KHYG-1-Zellen, bei denen es sich um Natürliche Killerzellen handelt, wurden mit Plasma oder Serum inkubiert und nach acht Stunden wurde die relativen Lichteinheiten gemessen. Durch eine Negativkontrolle ohne Serum/Plasma konnte ein Nullwert für den Assay festgesetzt werden. Auf diese Weise war es möglich einen relativen Wert für die ADCC-Antwort der Proben zu bestimmen. Mit diesem Ansatz sollte die ADCC-Antwort in Rhesus Makaken gemessen werden, die vor der Infektion mit SIV durch einen „live-attenuated“ Virus geimpft wurden. Es konnte bereits im Rahmen anderer Studien eine Korrelation zwischen dem ADCC-vermittelnden Antikörpertiter und einem Schutz gegen SIV festgestellt werden.¹⁶

2. Zielsetzung

Diese Bachelorarbeit hatte das Ziel ein Expressionssystem für die Oberflächenproteine (Env-Proteine) gp140 des simianen Immundefizienzvirus (SIV) und des simianen Foamyvirus (SFV) zu etablieren. Dieses System sollte anschließend für die Transduktion einer Zelllinie genutzt werden, die die Env-Expression auf den Zellen zur Folge hat. Die Env-exprimierende Zelllinie kann dann in einem sogenannten „Antikörper-abhängigen zellulärvermittelten Zytotoxizitätsassay (ADCC-Assay)“ als Zielzelle eingesetzt werden.

Zunächst müssen die entsprechenden Gene, die die Oberflächenproteine kodieren, in einen Expressionsvektor kloniert werden. Es handelt sich bei diesem Vektor um den pMXs-Puro-Vektor, der Bestandteil eines retroviralen Expressionssystems zur Erzeugung stabil transfizierte Zellen ist. Da für den Versuchsaufbau nur der extrazelluläre Teil der Oberflächenproteine von Bedeutung ist, konnte auf die Signalsequenz und auch auf die endogenen Transmembrandomäne verzichtet werden. Diese Sequenzen wurden über eine Zwischenklonierung in pDisplay, einem speziell für die Oberflächenexpression von Proteinen konzipierten Vektor, an die Konstrukte angefügt.

Nach erfolgreicher Klonierung sollen die pMXs-Konstrukte zur Transfektion einer Verpackungszelllinie des retroviralen Expressionssystems eingesetzt werden, welche daraufhin virale Partikel produzieren. Diese werden zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt.

Nach der Klonierung der Vektoren sollen die Konstrukte auf ihre Funktionalität überprüft werden. Auf der Sequenzebene erfolgte die Kontrolle durch Sequenzierungen. Die Expression der Proteine auf der Zelloberfläche ist für die weitere Anwendung von entscheidender Bedeutung, deshalb soll die Expression durch einen Western Blot überprüft werden. Die Funktionalität der Proteine soll mittels IPAP, FACS und Laser Scanning Mikroskopie überprüft werden.

Parallel zu diesen Versuchen soll die Transduktion der im ADCC-Assay zu nutzenden Zielzellen erfolgen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tab. 1 Geräte

Gerät	Hersteller
Beckman Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Beckman Optima L-100K Ultra-centrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, USA
C24 Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific, Edison, USA
CO2-Inkubator HeraCell 150	Thermo Scientific, Logan, USA
Entwicklermaschine Curix 60	Agfa, Köln, Deutschland
Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Flexcycler	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
GelDoc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gene Pulser XCell + Shock Pod	BioRad, Hercules, USA
Inkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Inverses Lichtmikroskop ID03	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Microplate Reader Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Mini-Protean 3 Electrophoresis	BioRad, Hercules, California, USA
Multifuge 1S-R	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Mx3000P Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
Mx3005P Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop, Wilmington, USA

Neubauer-Zählkammer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
PTC-200 Thermo Cycler	MJ Research, St. Bruno, Canada
Sterilbank Thermo HeraSafe	Kendro, Langenselbold, Deutschland
Sub-Cell GT Agarose Gel Electrophoresis System	BioRad, Hercules, California, USA
Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad, Hercules, California, USA
UV-Transilluminator TFX-20.M	Vilber Lourmat, Paris, Frankreich

Tab. 2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
100xPenicillin/Streptomycin	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
30% Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
7-AAD Viability Dye	Beckman Coulter, Fullerton, USA
AEC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
APS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BSA 100x	New England Biolabs Inc., Beverly, USA
DMF	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
dNTPs	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GelRed (10000x)	Biotium, Hayward, USA
Generuler 1kb Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Canada

HEKfectin	BioRad, Hercules, California, USA
Isoton R II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Magermilchpulver	Sucofin, TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Logan, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
PEI	Laborintern angesetzt
Pierce ECL Plus Western Blot Substrat	Thermo Scientific, Logan, USA
Polybren	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Protease-Inhibitor (Tabletten)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypan-Blau	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid, 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

Tab. 3 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
1x-TAE	40mM Tris; 1mM EDTA; 20mM Acetat, pH 8,0
4x-Laemmli-Probenpuffer	200mM Tris-CL; 8% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 40% (v/v) Glycerol; 400mM DTT

6x-DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-Acetat; 50 mM EDTA; 10 % Ficoll-400 (w/v) (Serva); 0,4 % Orange-G (w/v) (Sigma) in H ₂ O
Blockingpuffer für IPAP-Analyse	2% Milchpulver in PBS
Blockingpuffer für Western Blot	20% Milchpulver; 0,1% Tween 20 in PBS
FACS-PBS	1% BSA; 0,1% Natriumazid in PBS
Isoton R II Diluent	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
LB-Agar	LB-Medium mit 20 g/l Agar-Agar
LB-Medium	1% Trypton; 0,5% Bacto Hefe Extrakt; 1% NaCl, pH 7,5
NP-40-Puffer	50mM Tris; 150mM NaCl; 1% NP-40
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KaCl; 8,8mM Na ₂ HPO ₄ ; 0,7mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
RIPA-Puffer	50mM Tris; 0,1% SDS; 0,5% Natrium-deoxycholat; 1% Triton-X
SOC-Medium	20g/l Bacto-Tryptone; 5g/l Bacto-Yeast-Extract; 4g/l Glucose; 2,5mM KCl; 10mM NaCl; 5mM MgCl ₂ , pH 7,0
Strippingpuffer	2% SDS; 62,5 mM TrisHCl; 100 mM β-Mercaptoethanol (Frisch zugegeben)
Waschpuffer	0,1% Tween 20 in PBS

Tab. 4 Kits

Kits	Hersteller
HS-Mg RT Activity Kit	Cavidi, Uppsala, Schweden
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
GeneJET™ PCR Purification Kit	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Fermentas International Inc., Burlington, Canada

Tab. 5 Enzyme und ihre Puffer

Enzym/Puffer	Hersteller
10x Fast Digest Buffer	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
10x Puffer für Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA bzw. Fermentas International Inc., Burlington, Canada
10x-Puffer für PCR	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
10x-T4-DNA-Ligase-Puffer	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Alkaline Phosphatase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
AmpliTaq Gold	Applied Biosystems, Foster City, USA
Big Dye	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dream Taq Polymerase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Pfu-Polymerase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada
Restriktionsenzyme	New England Biolabs Inc., Beverly, USA bzw. Fermentas International Inc., Burlington, Canada
T4-DNA-Ligase	Fermentas International Inc., Burlington, Canada

Tab. 6 Antikörper

Antikörper	Firma
AlexaFluor 488 anti-human	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
AlexaFluor 568 anti-mouse	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Anti-c-myc	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
anti-HA	Cell Signaling, Boston, USA
anti-human IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
anti-mouse IgG	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

anti-VSV-G	Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, USA
APC-labeled CD4	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
hmAk C2F5	Thermo Scientific, Logan, USA

Des Weiteren wurden ein Rh41-Plasmapool, ein SIV-Plasmapool und HIV-Pool-Plasma als Antikörper eingesetzt. Bei beiden handelt es sich um laborinterne Pools, die zum Nachweis von SIV und HIV eingesetzt werden und bereits auf ihre Reaktivität getestet wurden.

Verwendete Primer:

Alle Primer wurden von der Firma Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA, synthetisiert. Ihre Sequenzen sind in A.A.1 im Anhang aufgelistet.

Tab. 7 verwendete Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Bezogen von
C8166	Humanes T cell-Leukämie Tumorgewebe	ATCC
CEM-NK ^R	Humane T-Lymphozyten	NIC
CEM-NKR- CCR5	Humane T-Lymphozyten	NIC
HEK 293T	Humanes embryonales Nierenkarzinom	ATCC
Plat-GP	Humanes embryonales Nierenkarzinom (von HEK 2393T abgeleitet)	Cell Biolabs, inc., San Diego, USA

Tab. 8 Materialien der Zellkultur

Material	Hersteller
6-Well-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
24-Well-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
100mm-Platten	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Filter für Spritzen, 0,45 µm	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Zählkammer Neubauer Improved	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Spritzen, Injekt 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen UZ	Beckman Coulter, Inc., Fullerton, USA
Zellkulturflaschen, 75 cm ²	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkulturflaschen, 151 cm ²	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellschaber	TPP/Biochrom, Berlin, Deutschland

Tab. 9 verwendete Konstrukte

Konstrukt	Bereitgestellt durch/Hersteller
pCMV-VSV-G	Cell Biolabs, inc., San Diego, USA
pMXs-GFP Kontrollvektor	Cell Biolabs, inc., San Diego, USA
pMXs-Puro Retrovirus Expressionsvektor	Cell Biolabs, inc., San Diego, USA
pDisplay	Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA

3.2. Methoden

3.2.1. DNA-analytische Methoden

3.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die durchgeführten PCRs wurde der in Tab. 10 aufgeführte Reaktionsansatz und das in Tab. 11 gezeigte Cyclers-Programm verwendet.

Tab. 10 PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen in μ l
10xPfu-Puffer	2,5
dNTPs	0,63
forward Primer	0,5
Pfu-Polymerase	0,2 = 1 U
revers Primer	0,5
Template	Variabel
Wasser	Ad 25

Tab. 11 Cyclers-Programm

Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	<<
Annealing	30 s	52 °C	29
Elongation	2 min 30 s	72 °C	>>
Elongation	10 min	72 °C	

Zum Einfügen einer Schnittstelle in ein Konstrukt wurde aufgrund des langen zu amplifizierenden Abschnittes das in Tab. 12 gezeigte Temperaturprofil gewählt.

Tab. 12 Temperaturprofil zum Einfügen einer Schnittstelle

Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	<<
Annealing	1 min	53 °C	24
Elongation	6,45 min + 2 s je Zyklus	72 °C	>>
Elongation	15 min	72 °C	

Gradienten-PCR:

Zur Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur eines Primerpaares wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Der Ansatz wurde ebenso wie in Tab. 10 pipettiert und das Temperaturprofil lässt sich Tab. 13 entnehmen.

Tab. 13 Gradienten-PCR-Programm

Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	<<
Annealing	100 s	50-65 °C	24
Elongation	210 s + 3 s	72 °C	>>
Elongation	15 min	72 °C	

Kolonie-PCR:

Am Folgetag wurden die gewachsenen Klone gepickt und in 10 µl Bidec aufgenommen. 5 µl dieser Suspension dienten als Template für eine Kolonie-PCR und die anderen 5 µl wurden zum Animpfen einer Maxi verwendet. Der vollständige Ansatz lässt sich Tab. 14 entnehmen und das Temperaturprofil Tab. 15. Die Primer richten sich nach dem eingesetzten Vektor. Die Kolonie-PCR diente der Überprüfung der durch Transformation erhaltenen Klone.

Tab. 14 Ansatz der Kolonie-PCR

Reagenz	Volumen in µl
dNTPs	0,63
Dream Tag Polymerase	0,2 = 0,5 U
Klon-Template	5
Primer forward	0,5
Primer reverse	0,5
10x Puffer	2,3
Wasser	Ad 25

Tab. 15 Temperaturprofil der Kolonie-PCR

Denaturierung	3 min	95 °C	
Denaturierung	30 s	95 °C	<<
Annealing	30 s	57 °C	19
Elongation	3 min	72 °C	>>

Quantitative PCR (qPCR):

Zur Durchführung einer qPCR wurde der in Tab. 16 zu sehende Ansatz pipettiert und die PCR mit dem in Tab. 17 gezeigten Programm durchgeführt. Es wurde die Δ nef Sonde eingesetzt, die Tib Molbiol, Berlin, Deutschland, synthetisiert wurde.

Tab. 16 Ansatz der qPCR

Reagenz	Menge in μ l
10xPuffer	2,2
dNTPs	0,63
Forward Primer	0,5
AmpiTaqGold	0,2 = 1 U
Reverse Primer	0,5
Sonde	0,5
Template	3
Wasser	Ad 25

Tab. 17 Temperaturprofil der qPCR

Denaturierung	8 min	95°C	
Denaturierung	1 min	95°C	<<
Annealing	1 min	55°C	50
Elongation	30 min	72°C	>>

3.2.1.2. Restriktionsverdau

Es wurden sowohl Restriktionsenzyme der Firma New England Biolabs als auch Fermentas verwendet. Die zugehörigen Puffer, Temperaturprofile, Inkubationszeiten und Enzymmengen richteten sich nach dem Protokoll der Hersteller, bei dem 10 U Enzym eingesetzt wurden.

3.2.1.3. Dephosphorylierung von Plasmiden

Da es bei der unten erwähnten Ligation auch zu der Verknüpfung der 3'- und 5'-Enden des Vektors kommen kann, wurde der Vektor für 1 h bei 37°C mit einer Alkalinen Phosphatase inkubiert. Es wurden zwei Units des Enzyms direkt nach dem Restriktionsverdau zum Reaktionsansatz gegeben.

3.2.1.4. Ligation

Die Ligationen wurden mit fünf Units der T4-Ligase von Fermentas durchgeführt. Das Enzym und sein zugehöriger Puffer wurden nach Herstellerangaben eingesetzt.

Bei den Ligationsansätzen wurde das Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1 bis 1:6 variiert um das Ergebnis zu verbessern. Des Weiteren wurde die Menge des eingesetzten Vektors in einigen Fällen von 100 ng auf 25 ng gesenkt und die Temperatur von 4°C bis 22°C variiert. Die Ligationen erfolgten stets über Nacht.

3.2.1.5. Transformation

Zur Transformation wurden 20 ng DNA aus den jeweiligen Ligationsansätzen zu 50 µl elektrisch-kompetenten TOP10 E.coli gegeben und eine Spannung von 2,5 kV angelegt. Anschließend wurden 200 µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien bei 37°C für 1 h geschüttelt. Es wurden jeweils 50 µl der Bakterien auf LB-Platten mit Ampicillin ausgestrichen. Die weitere Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C über Nacht.

3.2.1.6. Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte aus einer 5 ml Übernachtskultur in LB-Amp-Medium. Die Übernachtskulturen wurden mit den in der Kolonie-PCR positiv getesteten Klonen angeimpft. Die Einzelkolonien wurden dazu in 5 ml Lb-Amp gegeben und bei 37°C über Nacht angeschüttelt. Es wurde ein QIAGEN MiniPrep Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Ein Teil der Mini wurde in einigen Fällen dazu genutzt einen Glycerolstock anzufertigen oder eine Maxi anzuimpfen.

3.2.1.7. Glycerolstock

Um Bakterien dauerhaft bei -80°C lagern zu können wurde ein Glycerolstock angefertigt. Dazu wurden 500 μl einer Übernachtskultur mit 500 μl 50%igem Glycerin versetzt.

3.2.1.8. Aufreinigung von PCR-Produkten

Mit dem Fermentas PCR-Purification-Kit erfolgte die Aufreinigung von PCR-Produkten. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers verwendet und die DNA in 30 μl Wasser eluiert.

3.2.1.9. Agarosegelelektroporese

Es wurden 1%ige Agarosegele in 60-120 ml 1xTAE gegossen um durch einen Restriktionsverdau erhaltene DNA-Fragmente aufzutrennen oder anhand der erhaltenen Bandenmuster Rückschlüsse auf den Vektor ziehen zu können. Zu diesem Zweck wurde zu den eingesetzten Proben 6x DNA-Ladepuffer gegeben. Die Agarose-TAE-Lösung wurde mit 0,4x GelRed versetzt und die Gele bei 90 V für 45-60 min laufen gelassen. Als Marker wurden 6 μl der GeneRuler 1kb DNA Ladder aufgetragen. Zur Dokumentation wurde unter UV-Licht Aufnahmen mit dem UV-Transilluminator TFX-20.M gemacht.

3.2.1.10. Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Die jeweilige Bande wurde unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend mit einem Fermentas GelExtractionKit aufgereinigt. Dabei wurden die Herstellerangaben beachtet. Die Elution erfolgte in 25 μl Wasser.

3.2.1.11. Sequenzierung

Die erhaltenen Konstrukte wurden auf ihre genaue Sequenz hin mittels Sequenzierung untersucht. Dazu wurde der in Tab. 18 aufgeführte Ansatz pipettiert. Das dazugehörige Temperaturprofil lässt sich Tab. 19 entnehmen.

Tab. 18 Sequenzierungsansatz

Reagenz	Volumen in μl
DNA (max.)	7 (~200ng)
BigDye	1
Primer	0,5
5xABI-Puffer	2
ddH2O	Ad 10

Tab. 19 Temperaturprofil für Sequenzierungen

Denaturierung	1-2 min	96 °C	
Denaturierung	10 s	96 °C	<<<<
Annealing	5 s	45-60 °C	25x
Elongation	4 min	60 °C	>>>>
Elongation	∞	4 °C	

3.2.1.12. Bestimmung der DNA-Konzentration

Nach den verschiedenen DNA-Aufreinigungs und -Isolationsschritten wurde die DNA-Konzentration jeweils im Photometer (NanoDrop) bestimmt. Es wurde 1 μl DNA-Lösung aufgetragen und die Absorption bei 260 nm gegen die optische Dichten gemessen. Für die Nullwertmessungen wurde Wasser eingesetzt.

3.2.2. Zellkultivierung

3.2.2.1. Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden im Falle der adhärennten 293T und Plat-GP-Zellen in DMEM-Vollmedium (DMEM-Medium mit 10% FCS und 1xPenicillin/Streptavidin) und die Suspensionszellen C8166 und CEM-NK^R-Zellen in RPMI1640-Vollmedium (RPMI1640-Medium mit 10% FCS und 1xPenicillin/Streptavidin). Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert und den SIVmac infizierten C8166 wurden regelmäßig naive Zellen zugegeben. Die adhärennten Zellen wurden nach dem Abziehen des Mediums zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Die Inkubation mit Trypsin erfolgte über 2 min bei 37 °C. Die Arbeiten erfolgten alle unter einer sterilen Werkbank.

3.2.2.2. Bestimmung der Zellzahl

Um eine definierte Menge Zellen aussäen zu können, musste zuvor die Anzahl der lebenden Zellen bestimmt werden. Für 293T-, Plat-GP- und C8166-Zellen war dies mit dem Beckman Coulter-Counter Z2 möglich. Zu 10 ml der isotonen Lösung wurden 10 µl Zellsuspension gegeben. Im Coulter wurde die Zellzahl je ml bestimmt.

Die CEM-NK^R-Zellen mussten mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau versetzt. Bei Trypanblau handelt es sich um einen Farbstoff der lediglich die Membran toter Zellen überwinden kann. Es wurden 10 µl der Zell-Trypanblau-Lösung zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben und die vier Großquadrate der Zählkammer unter dem Mikroskop die lebenden Zellen ausgezählt. Der Mittelwert der vier Quadrate liefert eine Zellzahl, die multipliziert mit dem Kammerfaktor von 10000 und der Verdünnung durch Trypanblau, die in diesem Fall 2 betrug, die Zellzahl je ml lieferte.

3.2.2.3. Platinum Retroviral Expression System

Die Firma Cell Biolabs, inc., San Diego, USA bietet z.B. ein retrovirales Expressionssystem an, das auch in dieser Arbeit Verwendung fand. Das System besteht aus drei Vektorkomponenten, einem VSV-G-Vektor (vesicular stomatitis virus), der die Sequenz des Env-Proteins dieses Virus trägt und auf diese Weise die Infektion von Säuger- und Nichtsäugerzellen ermöglicht, einem pMXs-Puro-Vektor, der auf dem MMLV (moloney murine leukemia virus) basiert und in den die Sequenz des Zielgens kloniert wird, sowie einem GFP-Vektor, der als Transfektions-, Infektions- und Expressionskontrolle im Verlauf des Experiments mitgeführt werden kann. Nachdem die Klonierung in den pMXs-Vektor erfolgt ist, wird die auf 293T-Zellen basierende Verpackungszelllinie (Plat-GP) transfiziert. Der dadurch erhaltene Virusüberstand kann zur Infektion einer Zielzelle genutzt werden.

3.2.2.4. Transfektion von Plat-GP-Zellen mit PEI

Bei der Transfektion wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe von PEI, beginnend mit 2,3 µl PEI auf 60 µl einer 150 mM NaCl-Lösung, eingesetzt um die optimalen Bedingungen zu ermitteln. Auch die eingesetzten DNA-Mengen von VSV-G, GFP-pMXs und SIV_{env}-pMXs wurden 1:2 verdünnt. Im Fall von VSV-G wurde mit 766 ng begonnen und von den pMXs-Konstrukte wurden im

ersten Schritt 1532 ng eingesetzt. Die Lösungen wurden zusammengegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte das Versetzen der Zellen mit der Lösung.

3.2.2.5. Transfektion von 293T-, Plat-GP- und CEM-NK^R-Zellen mit HEKfectin

Die Transfektion sowohl von 293T- und Plat-GP- als auch von CEM-NK^R-Zellen erfolgte weiterhin mit dem Transfektionsreagenz HEKfectin der Firma BIORAD. Dazu wurde serumfreies Medium mit HEKfectin bzw. der verwendeten DNA versetzt. Die jeweiligen Ansätze und die sich daraus ergebenden DNA- und auch HEKfectin-Mengen richteten sich nach den eingesetzten Zellzahlen. Es wurde von 0,001 ng DNA je Zelle ausgegangen. Die beiden Lösungen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen auf die verwendeten Zellen gegeben und kurz geschwenkt um das Reagenz zu verteilen. Die weitere Inkubation erfolgt bei 37°C im Brutschrank. Es stellte sich im Laufe des Versuches heraus, dass ein Verhältnis von 1:8 an DNA zu HEKfectin die besten Transfektionsergebnisse liefert.

3.2.2.6. Zellyse

Zur Lyse adhärenter Zellen wurde der Zellüberstand vorsichtig abgenommen, die Zellen in PBS gewaschen und für 3 min bei 200 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50-100µl Lysepuffer gelöst. Bei den Puffern handelte es sich entweder um RIPA oder NP-40. Die Suspension wurde 30 min bei 4°C geschüttelt und anschließend bei 4°C und 16200 g zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden getrennt und bei -20°C aufbewahrt.

3.2.2.7. Ultrazentrifugation zur Aufkonzentrierung von Virusüberständen

Es wurden 5 ml einer vorgekühlten 20%igen Sucroselösung mit Zellüberständen von mit VSV-G- und pMX-Vektoren transfizierten Zellen in Ultrazentrifugenröhrchen überschichtet. Bei den Transfektionsansätzen handelte es sich um die pMX-SIV_{env}-Konstrukte und um die GFP-Kontrolle.

Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C und 175000 g für 3 h. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig abdekantiert, das Viruspellet in 100 µl Medium resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Die transfizierten Zellen wurden in PBS aufgenommen und abzentrifugiert. Anschließend folgte die Lyse in einer den Zellen entsprechenden Menge RIPA-Puffer. Die Zellen wurden als Kontrollen eingefroren.

3.2.2.8. Infektion von Zellen

Die Infektion von CEM-NK^R- und 293T-Zellen erfolgte mit dem Virusüberstand. Es wurde ein 20 µl Aliquot aus der Ultrazentrifugation auf eine 10 cm-Zellkulturschale eingesetzt. Wurde der Virusüberstand ohne Aufkonzentration eingesetzt, wurde auf die Zellen frisches und virushaltiges Medium in einem 1:1-Verhältnis gegeben. Dem Ansatz wurde Polybren in einer 1:1000-Verdünnung zugesetzt. Polybren ist ein kationisches Polymer, das die Infektion verschiedener Zelltypen durch Retroviren erleichtern kann. Dieser Effekt kommt vermutlich durch die Beeinflussung der elektrostatischen Wechselwirkungen bei der Interaktion von Virus und Zelle zustande. Durch die Anlagerung des positivgeladenen Polymers an die negative geladene Lipiddoppelschicht von Zelle und Virus, wird die Anlagerung der beiden aneinander erleichtert.¹⁷

Um die Infektionseffektivität für CEM-NK^R-Zellen zu steigern, wurde eine Infektion durch Spinoculation durchgeführt.¹⁵ Dazu wurden 2×10^5 CEM-NK^R-Zellen in 150 µl Medium in jedes Well einer 96-Loch-Platte ausgesät. Anschließend wurde eine 1:3-Verdünnungsreihe, beginnend mit unverdünntem SIV239mac, in jeweils 50 µl Medium zu den Zellen pipettiert. Es folgte die Zentrifugation bei 1200 g für zwei Stunden.

3.2.3. Proteinanalytische Methoden

3.2.3.1. Konfokale Laserscanning-Mikroskopie(cLSM)

In Chamberslides wurden 80000 293T-Zellen in 200 µl Medium ausgesät und am Folgetag mit HEKfectin transfiziert. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Fixierung der Zellen mit 800 µl Paraformaldehyd (PFA) für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 800 µl einer 0,5%igen Triton X-100-Lösung permeabilisiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blockingpuffer inkubiert. Dieser Puffer setzte sich aus 5% Magermilchpulver und 1% Tween-20 in PBS zusammen. Es folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Dabei handelte es sich um einen anti-HA- und den 2F5-Antikörper. Der anti-HA-Antikörper wurde 1:100 und der 2F5-Antikörper 1:2000 eingesetzt. Die Verdünnungen wurden in Blockingpuffer in PBS mit 1% Milchpulver angesetzt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgte die Markierung mit den Sekundärantikörpern AlexaFluor 488 anti-human und AlexaFluor 568 anti-mouse. Beide wurden in einer 1:200-Verdünnung eingesetzt. Diese und weitere Schritte erfolgten unter Abdunkelung um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Im Anschluss an die Inkubation folgte das Staining mit einer 0,2 ng/ml DAPI-Lösung. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden die

Kammern auf dem Deckglas entfernt, die Zellen mit Mowiol überschichtet und mit einem Deckgläschen verschlossen.

3.2.3.2. Durchflusszytometrie (FACS)

Mittels FACS-Analyse wurde die Expression von SIV_{env} auf 293T- und CEM-NK^R-Zellen überprüft.

Das Medium wurde vorsichtig von den Zellen abgezogen und diese dann in kaltem FACS-PBS aufgenommen. Es folgte die Zentrifugation der Zellen in Eppis bei 4°C und 200g für drei Minuten. Ab diesem Schritt wurden die Zellen stets auf Eis gehalten. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in FACS-PBS mit 5% Fc-Block resuspendiert. Bei diesem Block handelt es sich um Rhesus-Plasma eines uninfizierten Tieres. In einer 96-well-Platte folgte die Zugabe der Primärantikörper.

Bei dem Primärantikörper handelte es sich um Rhesus 41-Plasma in einer Verdünnung von 1:50. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte für 30 min bei 4°C. Im Anschluss wurden 150 µl FACS-PBS zu den Zellen gegeben. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C und 500 g für 5 min. Der Überstand wurde abgekippt und erneut das mit Fc-Block versetzte FACS-PBS zupipettiert. Als Sekundärantikörper diente ein FITC-gekoppelter anti-humaner IgG-Antikörper. Die Inkubation fand für 20 min auf Eis statt. Anschließend wurden 150 µl PBS zugegeben und die Zellen zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit FACS-PBS und die Zellen wurden erneut in FACS-PBS aufgenommen und in Micronics überführt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo der Firma Tree Star, Inc. Das Gatingschema unterschied sich für die beiden Zelllinien. Im Falle der 293T-Zellen wurden zunächst Dupletten ausgeschlossen indem einmal Forward- gegen Forward-Scatter und anschließend Sideward- gegen Sidewardscatter im Diagramm aufgetragen wurde. Darauf folgte die Auswertung der Auftragung von Forwardscatter gegen den Lebend-Tot-Farbstoff und im letzten Schritt gegen das Rh41-Serum.

Für die CEM-NK^R-Zellen wurde zunächst der Forwardscatter gegen den Lebend-Tot-Farbstoff aufgetragen um auf die lebenden Zellen zu selektieren. Dann wurde der CD4-Marker gegen den Rh41-Antikörperpool gegattet um die Env-positiven Zellen zu erhalten. Um zu analysieren ob auch unter den toten Zellen Env-positive Zellen vorhanden waren, wurde das Gate für die toten Zellen nach oben beschriebenem Muster gegattet.

3.2.3.3. Immunperoxidase Assay (IPAP-Assay)

Der IPAP-Assay dient dem Nachweis von Proteinen in und auf Zellen. Das Protein wird mit Antikörpern detektiert. Als Sekundärantikörper dient ein Peroxidase-gekoppelter-Antikörper, der nach Zugabe der Substratlösung zu einer rot-braunen Verfärbung der positiven Zellen führt. Der IPAP-Assay wurde in diesem Versuch genutzt um Env auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Vor Beginn des Assays wurde eine 96-well-Platte mit Polylysin gecoatet. Dazu wurden 100 µl 0,1 mg/ml Polylysin je Well bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag folgte das dreimalige Waschen mit PBS. Auf die gecoateten Platten wurden 100.000 Zellen gegeben und für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und 100 µl auf -20°C gekühltes Methanol zugegeben. Die Fixierung der Zellen erfolgte bei -20°C für 20 min. Es schlossen sich drei Waschschritte mit PBS an und daraufhin folgte die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit einer 2%igen Milchpulverlösung in PBS. Nach 30 min wurde der Blockingpuffer abgenommen und durch 100 µl einer Lösung mit Primärantikörper ersetzt. Als Primärantikörper diente sowohl Rhesus41- in einer 1:1000-Verdünnung und 2F5-Antikörper in einer 1:20000-Verdünnung. Nach 60 min bei 37°C wurden die Zellen dreimal gewaschen und ein mit anti-human IgG-Antikörper versetzter Blockingpuffer hinzupipettiert. Die Verdünnung betrug 1:1000. Nach 30 min wurden die Zellen gewaschen und 50 µl der Substratlösung zugegeben. Die Substratlösung setzte sich aus 4 mg AEC, 1 ml DMF und 20 µl H₂O₂ gelöst in 19 ml einer Natriumacetatlösung zusammen. Der pH-Wert der Natriumacetatlösung betrug 5,7. Das Substrat wurde vor seiner Verwendung sterilfiltriert. Nach 30 min wurden die Zellen unter dem Mikroskop auf eine rötliche Verfärbung untersucht.

3.2.3.4. Western Blot

Für einen Western Blot wurde zunächst die SDS-PAGE gegossen. Das Sammelgel wurde erst auf das 8%ige Trenngel gegeben, wenn dieses vollständig auspolymerisiert war. Die Proben wurden in 6x Laemmli-Puffer für 10 min bei 95°C aufgekocht und anschließend abzentrifugiert. Das Gel wurde zu Beginn bei 100 V für 10 min laufen gelassen und dann die Spannung auf 180 V für 30 min erhöht. Nachdem das Gel für 20 min in Western Blot Transferpuffer geschwenkt wurde, wurde es für 42 min bei 20 V auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde für 1 h in Blockingpuffer geschwenkt. Dann folgte die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers bei 4°C über Nacht. Bei diesem handelte es sich um anti-HA-Antikörper und dem Rh41-Plasma-Pool, die 1:1000 eingesetzt wurden und dem anti-c-myc-Antikörper, der in einer Verdünnung von 1:500 verwendet wurde. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in Waschpuffer geschwenkt und anschließend für 1 h bei Raumtemperatur mit dem

Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper diente für die beiden gegen die Tags gerichteten Primärantikörper der anti-Maus-IgG und für das Rhesusplasma der anti-human-IgG, die beide in einer 1:2000-Verdünnung verwendet wurden. Es folgte erneut ein dreimaliger Waschschrift. Als Entwicklerreagenz dienten das Pierce ECL Plus Western Blot Substrat von Thermo. Es wurde laut Herstellerangaben verwendet. Es folgte die Entwicklung der Filme. Die Belichtungsdauer wurde je nach Bandenintensität variiert.

3.2.3.5. Strippen einer PVDF-Membran

Durch den Vorgang des Strippons wird eine PVDF-Membran nach durchgeführtem Western Blot von den Antikörpern befreit, ohne dass die Proteine gelöst werden. Zu diesem Zweck wurde der Strippingpuffer frisch mit 10% β -Mercaptoethanol versetzt und die Membran mit dem Puffer in ein Glastube gegeben. Der Deckel wurde fest mit Parafilm verschlossen und das Tube für 30 min bei 50 °C im Hybridisierungsofen inkubiert. Es folgten drei zehnmütige Waschschrift mit Waschpuffer. Direkt an den letzten Waschschrift schloss die Inkubation mit dem neuen Primärantikörper an. Nach dem Strippon wurde der Primärantikörper bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Es folgte die weitere Behandlung der Membran laut Protokoll des Western Blots.

3.2.3.6. Cavid-Assay

Um Rückschlüsse auf den Virusgehalt einer Probe gewinnen zu können, wurde ein Cavid-Assay nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Mit diesem Assay wird die Aktivität der Reversen Transkriptase bestimmt und die Ergebnisse mit Hilfe eines Photometers aufgezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1. Klonierung von SIVmac293env in den pMXs-Puro-Vektor:

Im ersten Schritt zur Etablierung eines ADCC-Assays für SIV, mussten die Sequenz des extrazellulären Teils des SIVmac293-Proteins in den pMXs-Puro-Vektor des retroviralen Expressionssystems kloniert werden. Zuvor sollte jedoch die trans-Membrandomäne und das Signalpeptid des Proteins durch die des pDisplay-Vektors ersetzt werden. Des Weiteren wurden über diesen Zwischenschritt ein HA- und ein myc-Tag an das Protein angefügt. Das vollständige Klonierungsschema ist im Anhang zu finden.

Zunächst wurde das SIVmac293env-Template, bei dem es sich um ein wildtypisches SIVmac293 handelte.

Nach dem Verdau des Amplifikats und des pDisplay-Vektors mit BglII und SalI war es möglich die entstehenden Produkte zu ligieren. Das Ligat wurde über einen Testverdau mit EcoRI und NotI, bei dem sich Fragmente der Längen 2422 bp und 4980 bp ergeben sollten, und XmaI und SacII, die zu Fragmentlängen von 2088 bp und 5314 bp führen sollten, überprüft. Das Ergebnis dieses Verdau ist in Abb. 6 zu sehen. Das erwartete Bandenmuster ergab sich bei Klon 8 und 25.

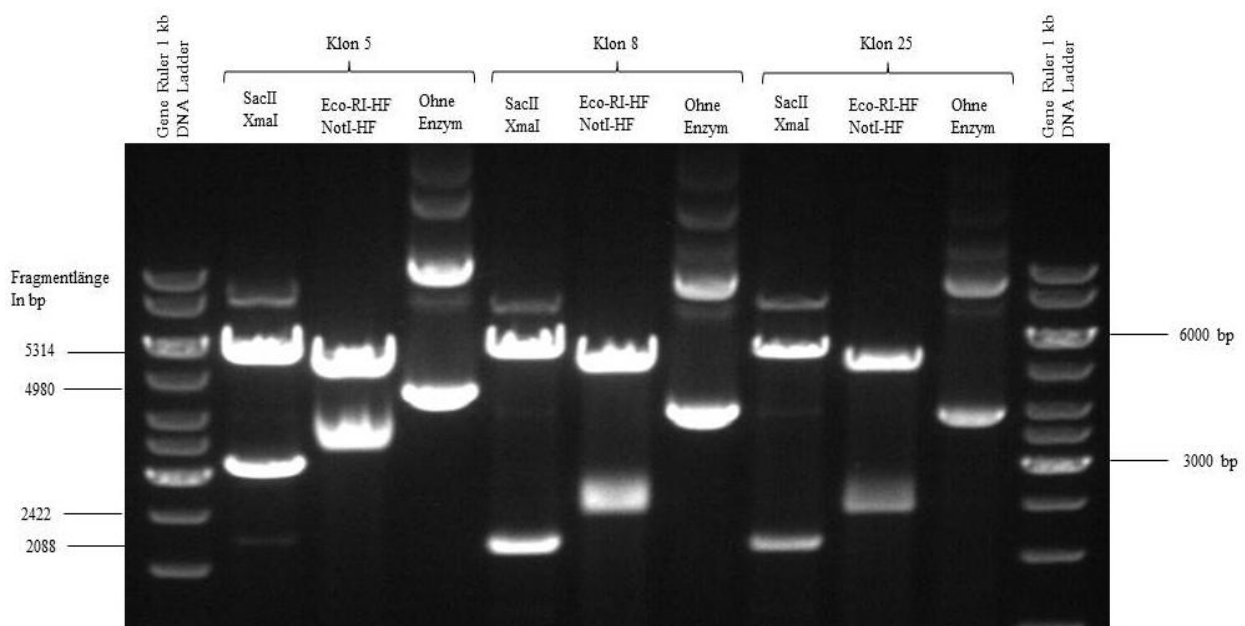


Abb. 6 Testverdau von SIVenv in pDisplay

In dieser Abbildung ist der Restriktionsverdau einer Miniprep gezeigt. Es handelt sich um den Verdau von SIVenv in pDisplay mit EcoRI/NotI und SacII/XmaI und im Agarosegel aufgereinigt.

Das erhaltene pDisplay-Konstrukt wurde ebenso wie der pMXs-Vektor mit BamHI und XhoI verdaut. Nach erfolgter Ligation wurde das für die Transfektion benötigte Endprodukt erhalten.

Die Überprüfung erfolgte zum einen mittels Kolonie-PCR, die in Abb. 7 zu sehen ist, und zum anderem durch einen Testverdau mit EcoRI und NotI, der in Abb. 8 gezeigt ist.

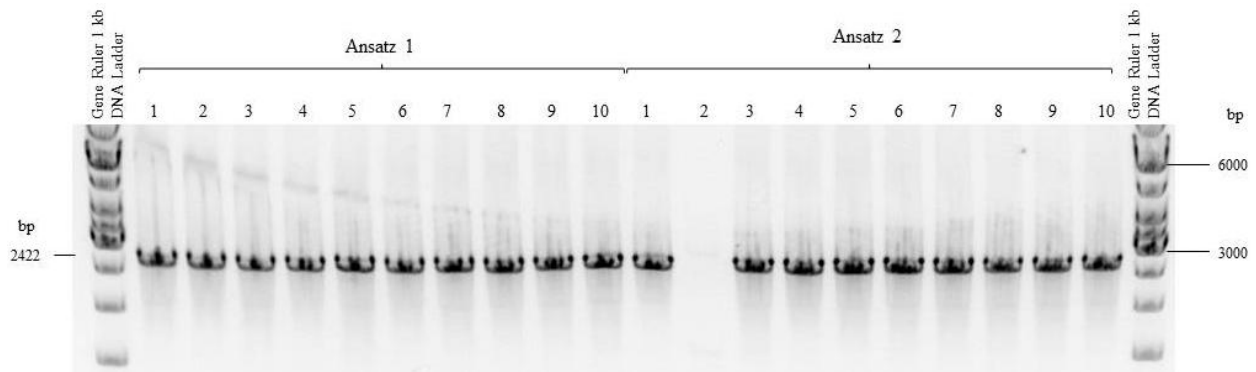


Abb. 7 Kolonie-PCR der Klone von SIVenv in pMXs

Die Abbildung zeigt die invertierte Aufnahme eines Agarosegels nach erfolgter Kolonie-PCR.

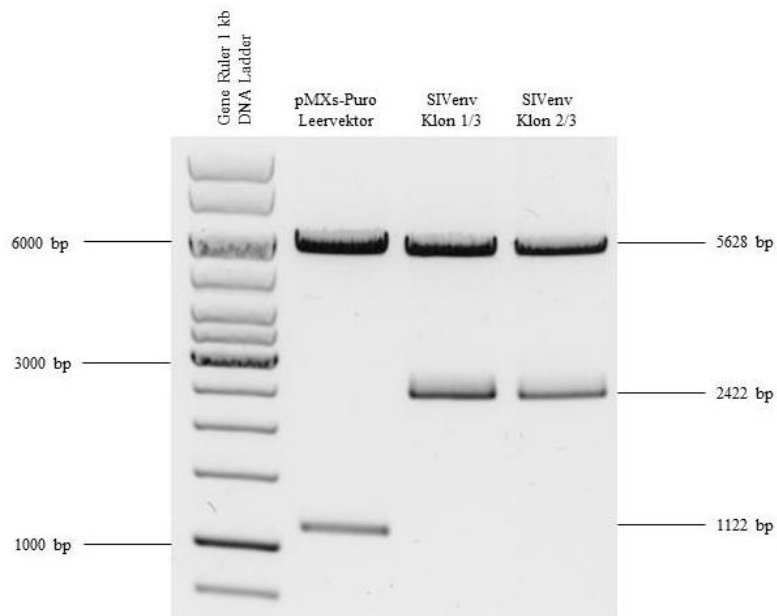


Abb. 8 Testverdau von SIVenv in pMXs

Der Testverdau von SIVmac293env aus einer Miniprep wurde mit EcoRI und NotI durchgeführt.

Die Kolonie-PCR zeigt bis auf einen Klon die erwartete Bande bei 2422 bp, die durch die Amplifikation des SIVmac293env-Inserts in dem pMXs-Puro-Vektor entsteht. Der Testverdau, der mit zwei Klonen durchgeführt wurde, bestätigt das positive Ergebnis der Kolonie-PCR. Das erwartete Fragment für den Leervektor mit 123 bp war in seiner Intensität nicht stark genug und war deshalb nicht auf dem Gelbild zu erkennen. Die Sequenz wurde weiterhin durch Sequenzierung bestätigt.

4.2. Klonierung von SFVenv in den pMXs-Vektor:

Ebenso wie das SIVenv musste auch das SFVenv vor der Transfektion in den pMXs-Vektor kloniert werden. Es wurde mit zwei Varianten des SFVR289env gearbeitet. Zum einen wurde das wildtypische Hüllprotein des Virus kloniert und zum anderen das des sogenannten SFVR289hybAGM. Es handelt sich bei diesem Virus vermutlich um eine Rekombinationsmutante aus Makaken, die im Rahmen eines Projektes der Arbeitsgruppe entdeckt wurde.¹⁸

Nach erfolgter Amplifikation der beiden Templates sowohl des wildtypischen SFVR289env als auch der SFVR289hybAGMenv-Mutante mittels PCR und anschließendem Verdau mit XmaI und SacII folgte die Ligation in pDisplay. Der Ligationsansatz musste für das wildtypische SFVenv variiert werden. Bei einem Verhältnis Vektor zu Insert von 1:6 gelang die Ligation.

Die weitere Klonierungsstrategie konnte nicht übernommen werden, da SFVR289env über eine interne Schnittstelle für BamHI verfügt. Eine Religation dieses Inserts konnte nicht umgesetzt werden, da die Verluste durch die mehrmalige Aufreinigung über ein Agarosegel zu hoch waren.

Aus diesem Grund wurde eine PacI-Schnittstelle mittels PCR in das SFVenv-pDisplay-Konstrukt eingefügt. Ebenso wurde mit der SFVR289hybAGMenv-Mutante verfahren. Für die PCR wurden Primer designt, die sowohl an die Sequenz des Wildtyps als an die der Mutante binden und in einem Übergang über die PacI-Schnittstelle verfügen. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur des verwendeten Primerpaares wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt, bei der die Annealingtemperatur in einem Thermocycler von 50°C bis 65°C variierte. Es folgte die Kontrolle des Ansatzes im Agarosegel, das in Abb. 9 gezeigt ist. Es wurde auch das Einfügen der PacI-Schnittstelle in zwei Klone von SFVR289env in pDisplay und SFVR289hybAGMenv in pDisplay überprüft. Dies ist in Abb. 10 gezeigt. Die deutlichen Banden zeigen, dass das Einfügen funktioniert hat.

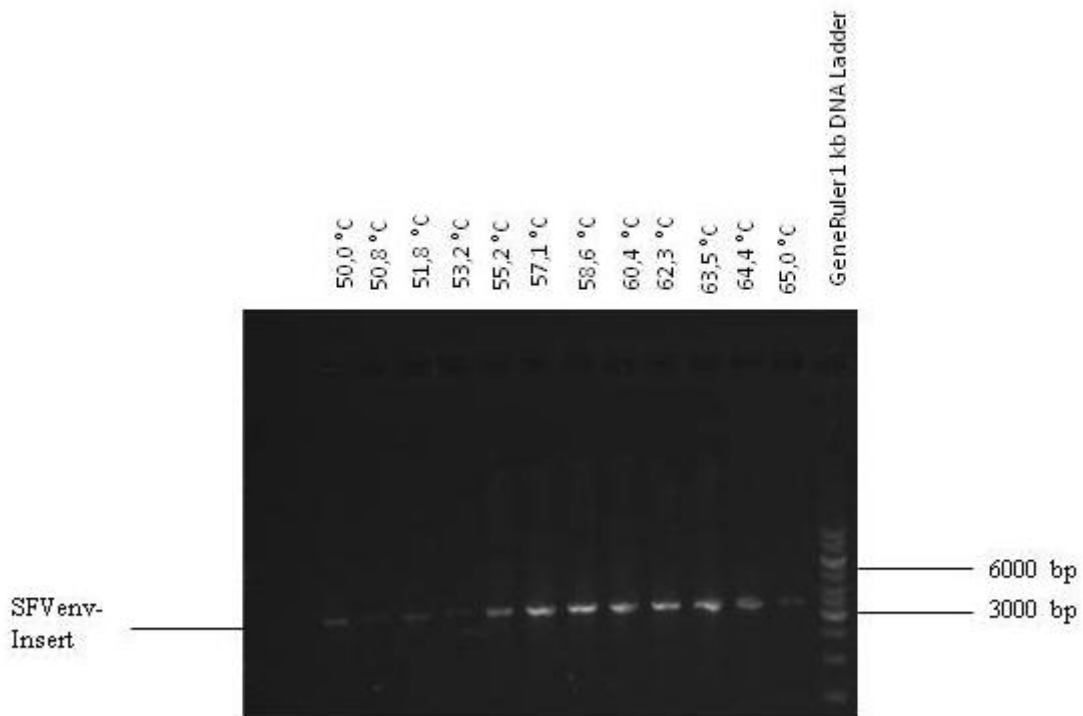


Abb. 9 Kontrolle der Gradienten-PCR

Die Gradienten-PCR wurde mit SFVR289HyAGM und den Primern zum Einfügen einer PacI-Schnittstelle durchgeführt.

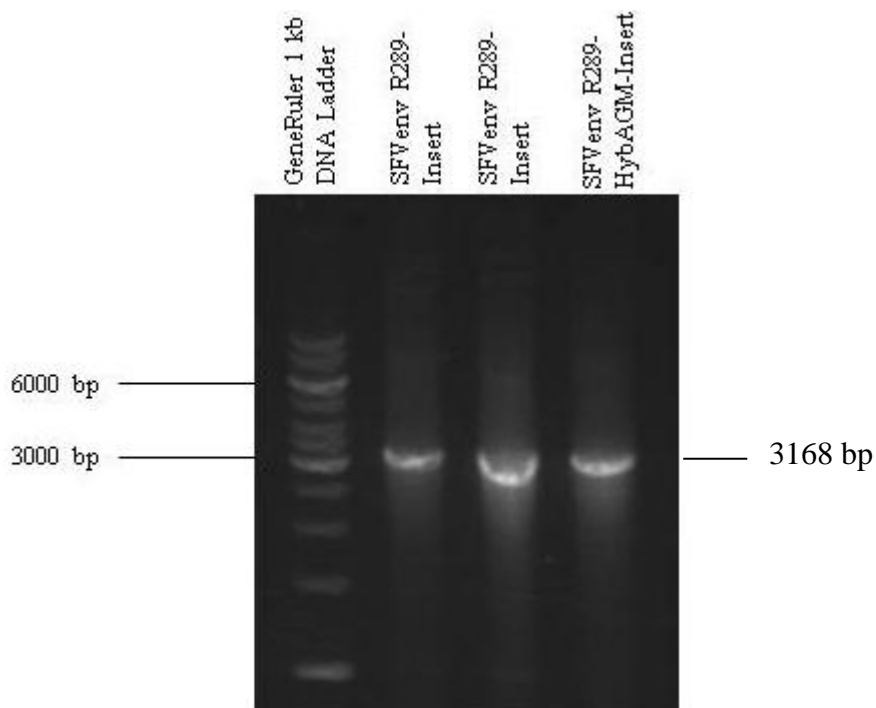


Abb. 10 Agarosegel nach Einfügen der PacI-Schnittstelle mittels PCR

Das Agarosegel zeigt die entstandenen Fragmente nach erfolgter PCR zum Einfügen der PacI-Schnittstelle.

Die weiteren PCRs wurden mit einer Annealingtemperatur von 55 °C durchgeführt.

Nach dem Verdau mit *PacI* und *XhoI* von *pMXs* und den beiden *SFVenv*-Varianten wurde eine Ligation durchgeführt. Die Transformation der TOP10 *E.coli* wurde zunächst durch eine Kolonie-PCR überprüft. Das Ergebnis dieser PCR ist in Abb. 11 gezeigt. Die Klone 1 und 7 von *SFVR289env* in *pMXs* wurden in einer Mini angeschüttelt und am folgenden Tag aufgereinigt. Es folgte ein Testverdau mit *PacI* und *XhoI*. Das Ergebnis dieser Kontrolle ist in Abb. 12 zu sehen.

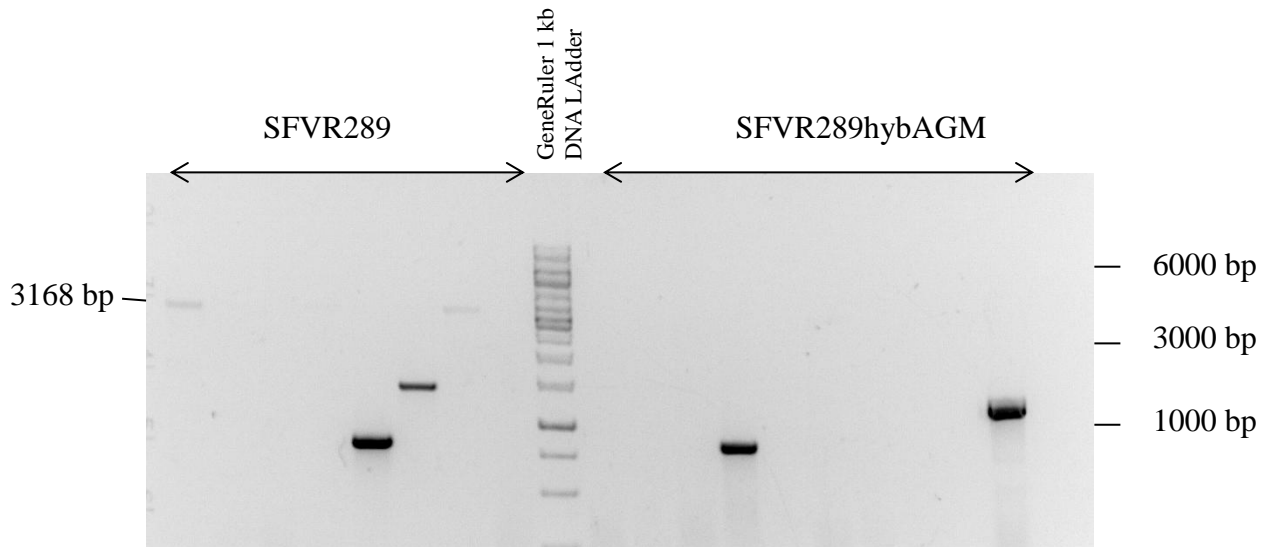


Abb. 11 Kolonie-PCR nach Ligation von *SFVenv* in *pMXs*

Die invertierte Aufnahme des Agarosegels zeigt die Kolonie-PCR nach der Transformation von TOP10 *E.coli* mit den beiden *SFVR289*-Varianten in *pMXs*

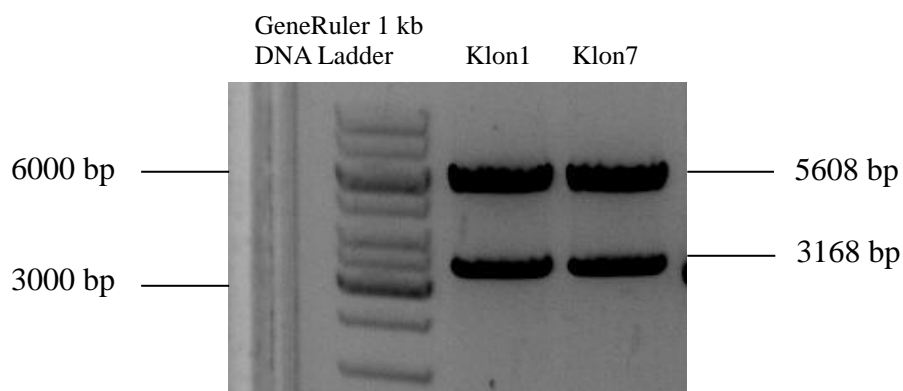


Abb. 12 Kontrollverdau der Ligation von *SFVR289env* in *pMXs*

Der Restriktionsverdau einer Miniprep von *SFVR289env* mit *PacI* und *XhoI* bestätigt die Integration des Inserts.

Mittels einer Sequenzierung wurde das Ergebnis der Ligation abgesichert und bestätigt. Von Klon 1 wurde ein Glycerolstock und eine Maxi angefertigt. Dieser Klon wurde für die folgenden Transfektionsversuche genutzt.

Die Ligation von SFVR289hyAGMenv in den pMXs-Puro-Vektor gelang auch nach weiteren Variationen des Ligationansatzes in Bezug auf Dauer der Ligation, Temperatur und Verhältnis von Vektor zu Insert, nicht.

4.3. Titration der Puromycinkonzentration

In einem Vorversuch wurde zunächst die optimale Puromycinkonzentration zur Selektion der zutransduzierenden CEM-NK^R-Zellen ermittelt. Die ausgesäten Zellen wurden am ersten, zweiten, fünften und sechsten Tag gezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde über die einzelnen Tage aufgetragen. Die erhaltene Grafik lässt sich Abb. 13 entnehmen.

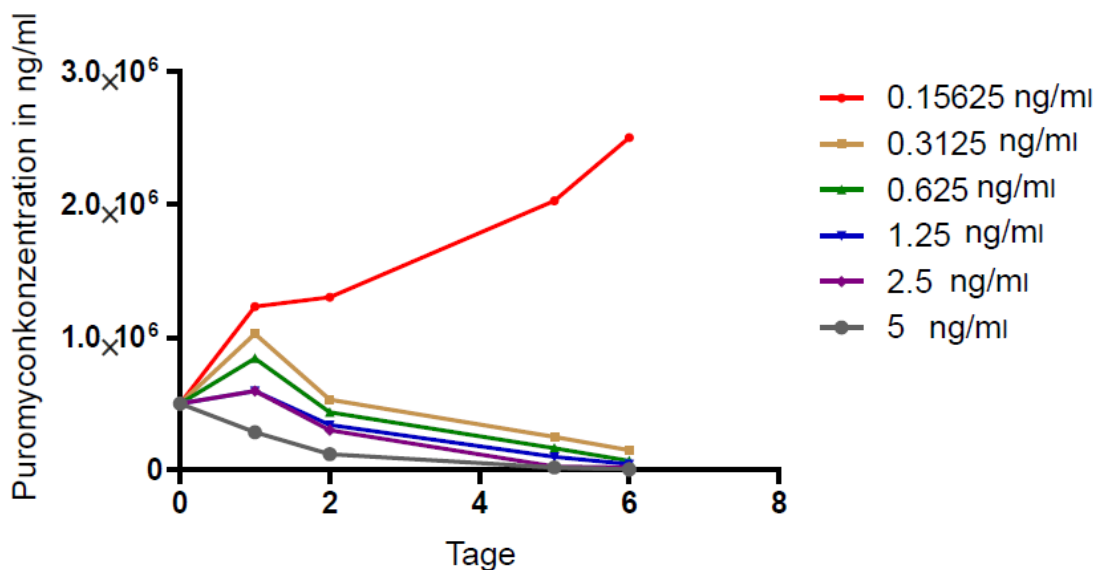


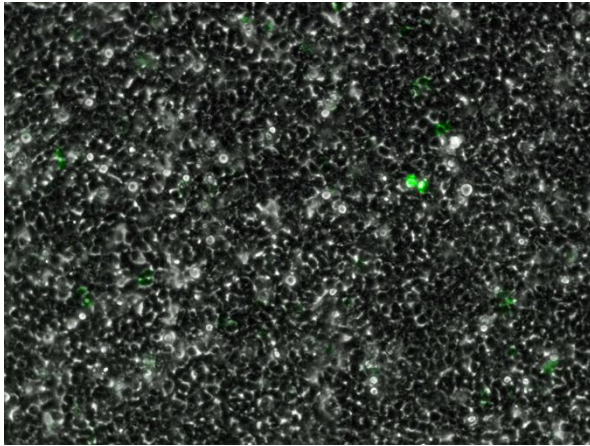
Abb. 13 Titration der optimalen Puromycinkonzentration

Durch Auftragen der Zellzahlen über den Tagen lässt sich die optimale Puromycinkonzentration zur Selektion von CEM-NK^R-Zellen ermitteln.

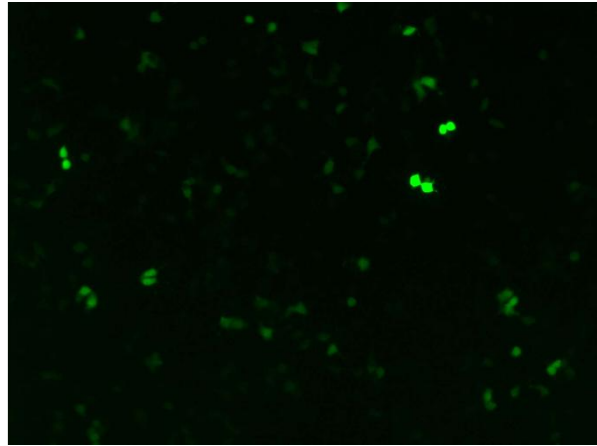
Die transduzierten CEM-NK^R-Zellen wurden im Folgenden in 0,3 ng/ml Puromycin kultiviert.

4.4. Expressionskontrolle

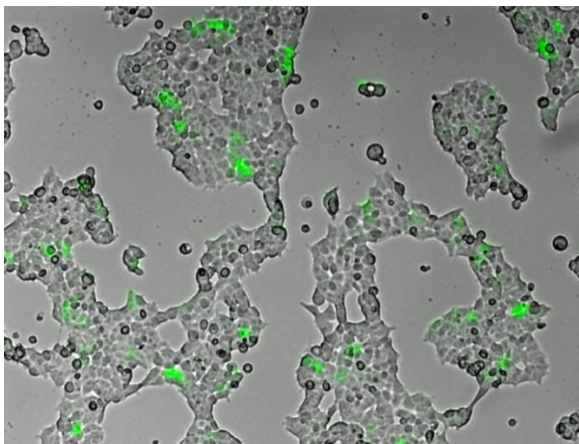
Bei jeder Transfektion wurden die Zellen zur Kontrolle mit einem GFP-pMXs-Puro-Konstrukt transfiziert um Rückschlüsse auf den Erfolg der Transfektion ziehen zu können. Die beispielhaften Aufnahmen sind in Abb. 14 zu sehen.



(a)



(b)



(c)

Abb. 14 Fluoreszenzmikroskopaufnahme nach erfolgter Transfektion

Die Plat-GP-Zellen wurden mit 0,001 ng DNA pro Zelle für zwei Tage transfiziert. Das Bild (a) zeigt das Durchlicht der Zellen, die in (b) in einer Aufnahme im FITC-Kanal zu sehen sind. Bei den in (c) gezeigten Zellen handelt es sich um einen anderen Transfektionsansatz.

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie sollte die Expression des Hüllproteins von SIV durch den hinzugefügten HA-Tag nachgewiesen werden. Die Expression des SFV_{env} konnte an dieser Stelle noch nicht nachgewiesen werden, da die Klonierung in den pMXs-Vektor noch nicht abgeschlossen war. Die Aufnahmen sind in Abb. 15 zu sehen. Mit Hilfe des AlexaFluor568-Antikörpers wurde der HA-Tag von SIV-Env detektiert. Sowohl bei der 24-stündigen Transfektion der 293T-Zellen mit 40 ng als auch mit 100 ng DNA ließ sich Env nachweisen.

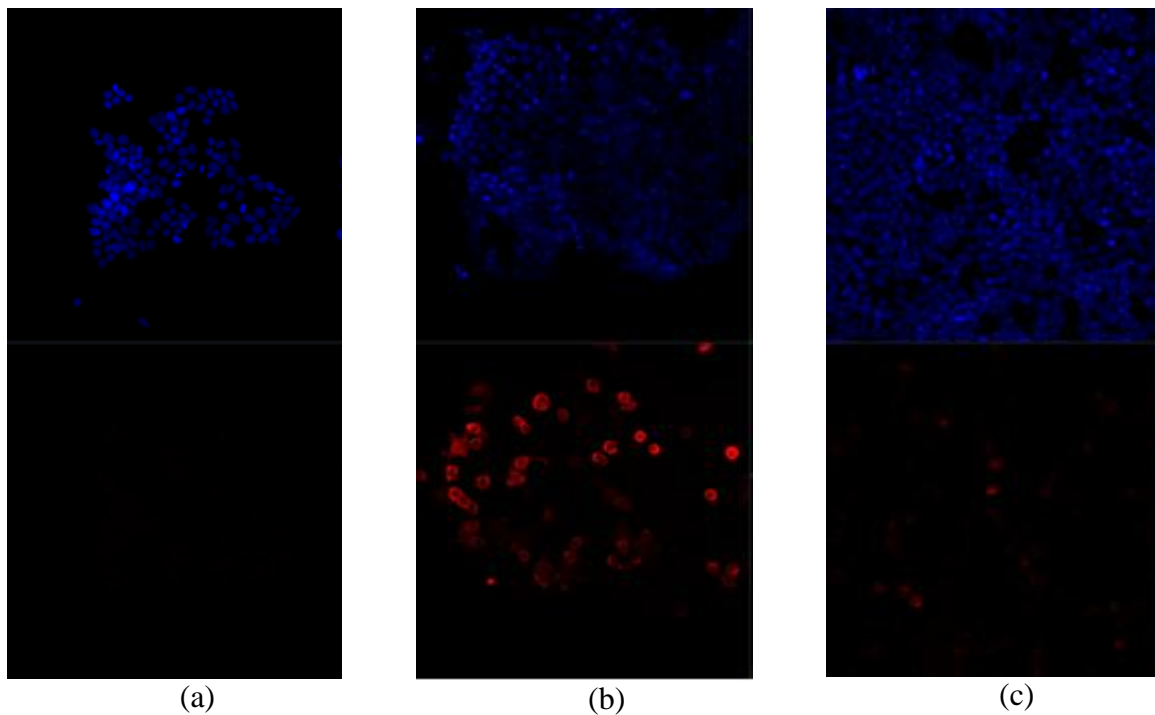


Abb. 15 cLSM-Aufnahmen transfizierter Zellen

In dieser Abbildung sind die cLSM-Aufnahmen untransfizierter (a), TSG-transfizierter (b) und *SIVenv*-transfizierter (c) 293T-Zellen zu sehen. Die Transfektion erfolgte über 24 h. Zur Detektion der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung (blau) vorgenommen. Die Detektion des HA-Tags erfolgte über einen anti-HA-Antikörper, der mit dem AlexaFluor568-Antikörper (rot) detektiert wurde.

Es wurden Western Blot mit Zelllysaten *SIVenv*-transfizierter Zellen durchgeführt. Dazu wurden zwei Transfektionsansätze angefertigt um die Expression nach 24 h und nach 48 h zu überprüfen. Die Blots wurden zunächst mit anti-HA- und anti-myc-Antikörper inkubiert, um die über pDisplay angefügten Tags des Proteins nachzuweisen. In diesem Blot zeigten sich in allen Proben scheinbar unspezifische Banden. Nach dem Strippen der Membran folgte die Inkubation mit Rh41-Plasma, um die viralen Proteine von SIV nachzuweisen. Lediglich die Positivkontrolle zeigte ein Signal.

Um auszuschließen, dass es sich um einen Fehler in dem pDisplay-Vektor handelt, wurde der gesamte Vektor sequenziert. Die Sequenz stimmte, bis auf wenigen Ausnahmen, die nicht versuchsrelevant waren, mit der vorgegebenen Sequenz überein.

Des Weiteren wurde eine FACS-Analyse, der *SIVenv*-transfizierten 293T-Zellen durchgeführt. Nach Abzug des Hintergrunds von den Proben ergaben sich die in Abb. 16 gezeigten Werte Env-positiver Zellen.

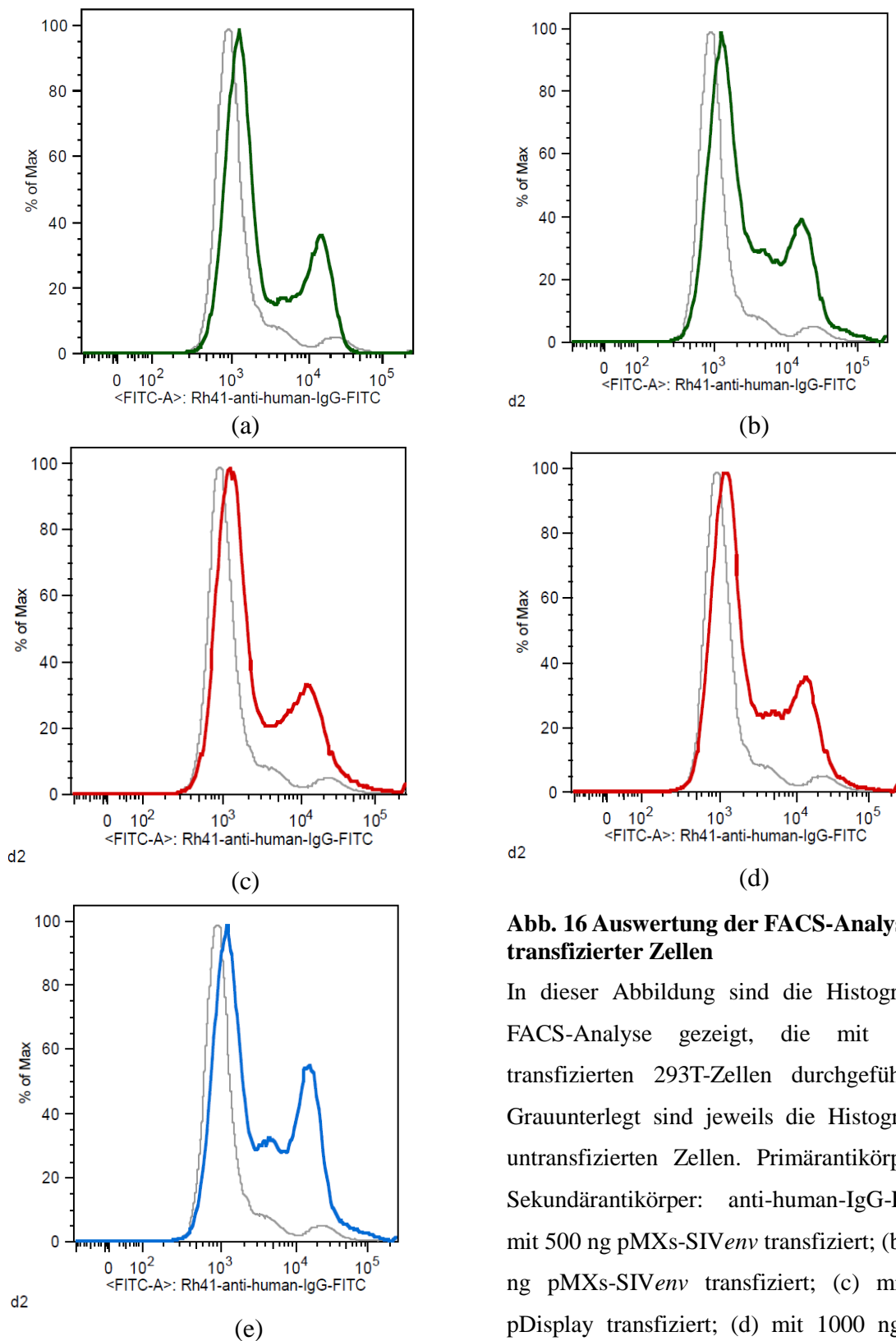


Abb. 16 Auswertung der FACS-Analyse transfizierter Zellen

In dieser Abbildung sind die Histogramme der FACS-Analyse gezeigt, die mit *SIVenv*-transfizierten 293T-Zellen durchgeführt wurde. Graunterlegt sind jeweils die Histogramme der untransfizierten Zellen. Primärantikörper: Rh41; Sekundärantikörper: anti-human-IgG-FITC; (a) mit 500 ng pMXs-*SIVenv* transfiziert; (b) mit 1000 ng pMXs-*SIVenv* transfiziert; (c) mit 500 ng pDisplay transfiziert; (d) mit 1000 ng pDisplay transfiziert, (e) mit 1000 ng RTSHIV transfiziert

In den Grafiken lässt sich erkennen, dass alle Transfektionen in ihren Zielzellen die Expression von Env zur Folge hatten. Dabei ließ sich eine maximale Ausbeute von 25% Env-exprimierender Zellen für die Transfektion mit 1000 ng des *SIVenv*-Konstrukts in pMXs erzielen. Mit etwa 12%

Env-exprimierenden Zellen liegt die Transfektionseffizienz mit dem RT-SHIV-Moleklarklon deutlich unter der der anderen Konstrukte. Die unterschiedlichen verwendeten DNA-Mengen von 500 ng und 1000 ng auf 5×10^5 Zellen gleichen sich in ihrer Transfektionseffizienz.

4.5. Transduktion

Nach einer 48-stündigen Transfektion von GP-Plat-Zellen mit verschiedenen DNA-Mengen wurde viraler Überstand gewonnen. Diese Überstände wurde zur Transduktion von 293T- und CEM-NK^R-Zellen eingesetzt. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der transduzierten Zellen sind in Abb. 17 zu sehen. Die Transduktionseffizienz war für keine der beiden Zelllinien sonderlich hoch.

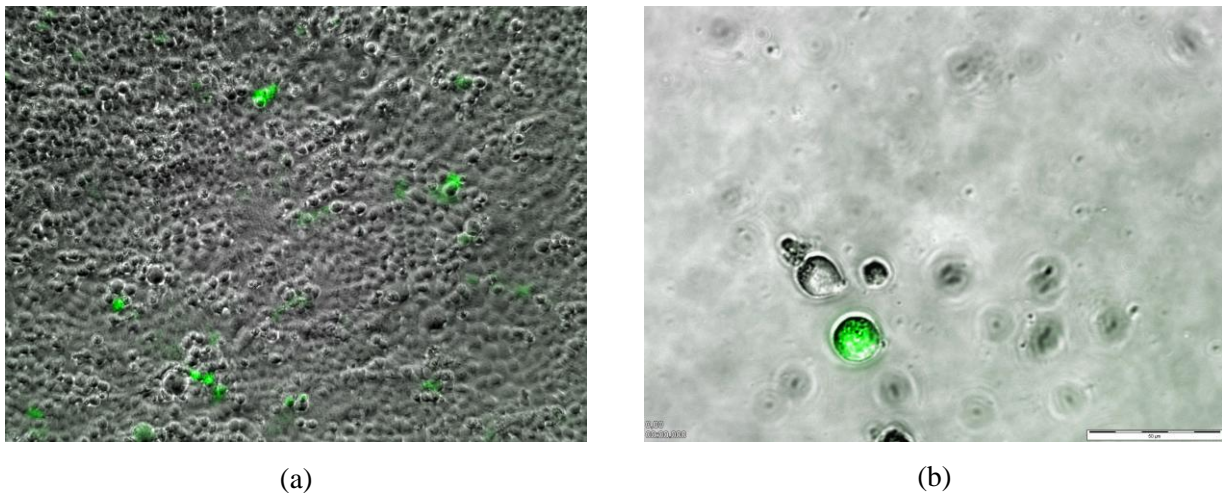


Abb. 17 Fluoreszenzaufnahme nach Transduktion

Die Transduktion erfolgte über zwei Tage. Hier sind die GFP-Kontrollen gezeigt, die mit dem aus der Transfektion mit 800 ng GFP-pMXs-Vektor erhaltenen Überstände, transduziert wurden. In Abbildung (a) sind 293T-Zellen in 10x Vergrößerung zusehen und in Abbildung (b) CEM-NK^R-Zellen in 40x Vergrößerung.

Mit den transduzierten Zellen wurde ein IPAP-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse dieses Assay sind an dieser Stelle nicht gezeigt, da in keiner der Proben rotgefärbte Zellen gefunden werden konnten. Die Infektion war weder für die 293T- noch für die CEM-NK^R-Zellen erfolgreich.

Um die Produktion retroviraler Partikel durch die Verpackungszelllinie zu überprüfen wurde in einem Cavid-Assay die Aktivität der Reversen Transkriptase, der Virusüberstände der GP-Plat-Zellen, bestimmt. Die Auswertung der erhaltenen Absorptionwerte erfolgte anhand eines HIV-1 rRT-Standards, der in dem Assay mitgeführt wurde. Die erhaltene Geradengleichung ist in Abb. 18 zusehen.

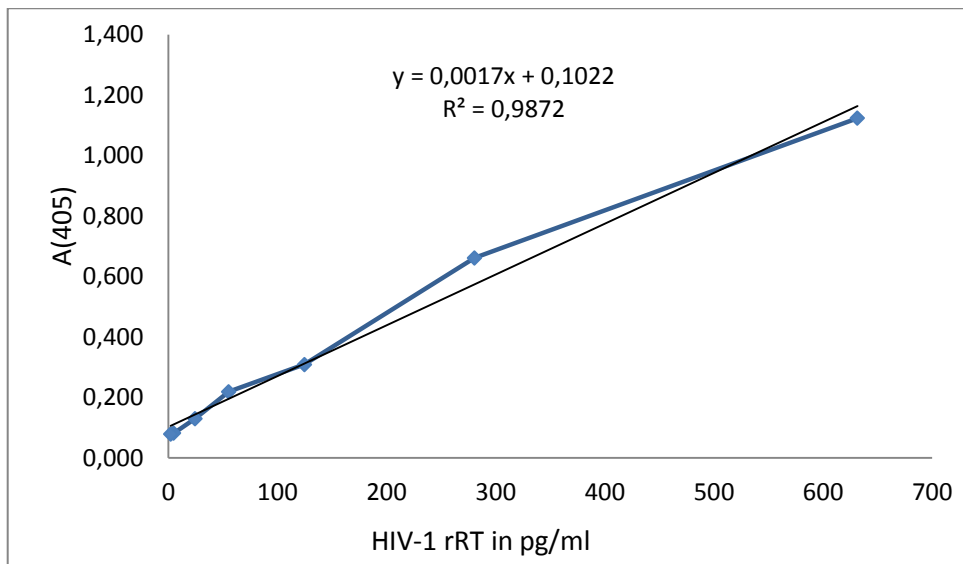


Abb. 18 RT-Standard des Cavid-Assays

Durch Auftragung der Absorptionen des mitgeführten RT-Standards gegen den jeweiligen RT-Wert ließ sich die in der Abbildung gezeigte Geradengleichung ermitteln auf die sich die Berechnung der RT-Werte der einzelnen Proben stützte.

Durch die Geradengleichung ergab sich folgende Formel zur Berechnung der RT-Werte:

$$x = \frac{y - 0,1022}{0,0017}$$

Die berechneten RT-Werte sind in Tab. 20 und die grafische Auswertung ist in Abb. 19 zusehen. Für alle Proben ließen sich RT-Werte über 270 pg/ml nachweisen.

Tab. 20 Ergebnis des Cavid-Assays

	A(405)	RT in pg/ml
SIV (800 ng)	0,810	416,16
SIV (1600 ng)	0,781	399,1
GFP (800 ng)	0,875	454,78
GFP (1600 ng)	0,732	370,27
SFV (800 ng)	1,099	586,35
SFV (1600 ng)	0,688	344,39
pMX (800 ng)	0,803	412,24
pMX (1600 ng)	0,569	274,39

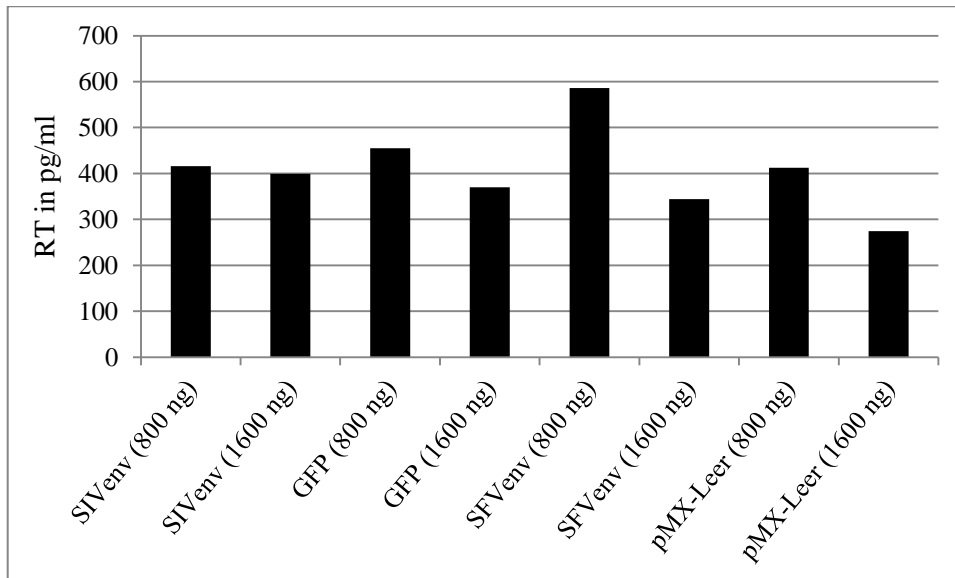


Abb. 19 grafische Auswertung des Cavid-Assays

Die grafische Auswertung des Cavid-Assays erfolgte durch Auftragung der berechneten RT-Werte für die einzelnen Proben.

Eine weitere FACS-Analyse wurde durchgeführt um die Transduktion von CEM-NK^R-Zellen genauer zu überprüfen. Die grafische Auswertung dieser Analyse ist in Abb. 20 gezeigt. Erst durch die Zugabe von Polybren zu dem Infektionsansatz ließ sich eine Env-positive Population von Zellen nachweisen. Sie umfasste lediglich 0,35% aller Zellen.

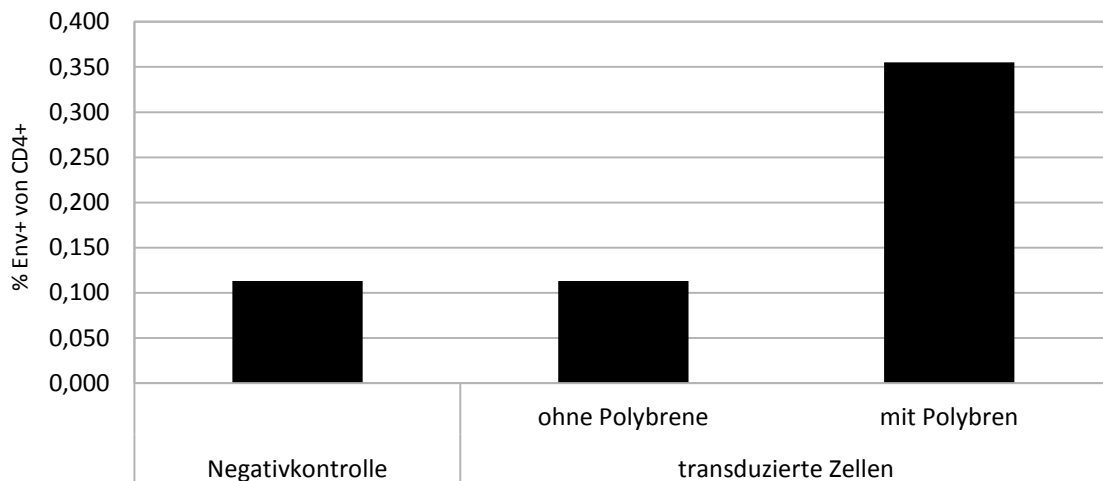


Abb. 20 grafische Auswertung der FACS-Analyse transduzierter CEM-NK^R

Das Diagramm zeigt den Anteil an Env-positiven CEM-NKR-Zellen im Vergleich zwischen einem untransduzierten Ansatz, einem Transduktionsansatz ohne Zugabe von Polybren und einem Ansatz mit Polybren.

4.6. Spinoculation

Durch die Zentrifugation von Viren und Zellen lässt sich die Infektionseffizienz erhöhen. Der in der Ultrazentrifugation aufkonzentrierte Virenüberstand eines Transfektionsansatzes mit GFP-pMXs-Puro wurde mit CEM-NK^R-Zellen zentrifugiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich jedoch keine grün leuchtenden Zellen nachweisen.

Da die Transduktion der Zielzellen nicht erfolgreich war, wurden Versuche unternommen CEM-NKR-Zellen mit SIVmac293 zu infizieren um diese Zellen später als Zielzellen in einem ADCC-Assay einsetzen zu können. Mit Hilfe eines IPAP-Assays sollte die Effektivität der Infektion durch Spinoculation überprüft werden. Dazu wurden Proben auf normalem Wege mit SIVmac infiziert und auch mittels Spinoculation. Die Ergebnisse des IPAP-Assays lassen sich Abb. 21 entnehmen. Die gesteigerte Infektionseffizienz lässt sich deutlich erkennen. Auch bei der Infektion mit einem 1:26244-verdünntem Virus waren im Falle der Spinoculation noch infizierte Zellen zu finden.

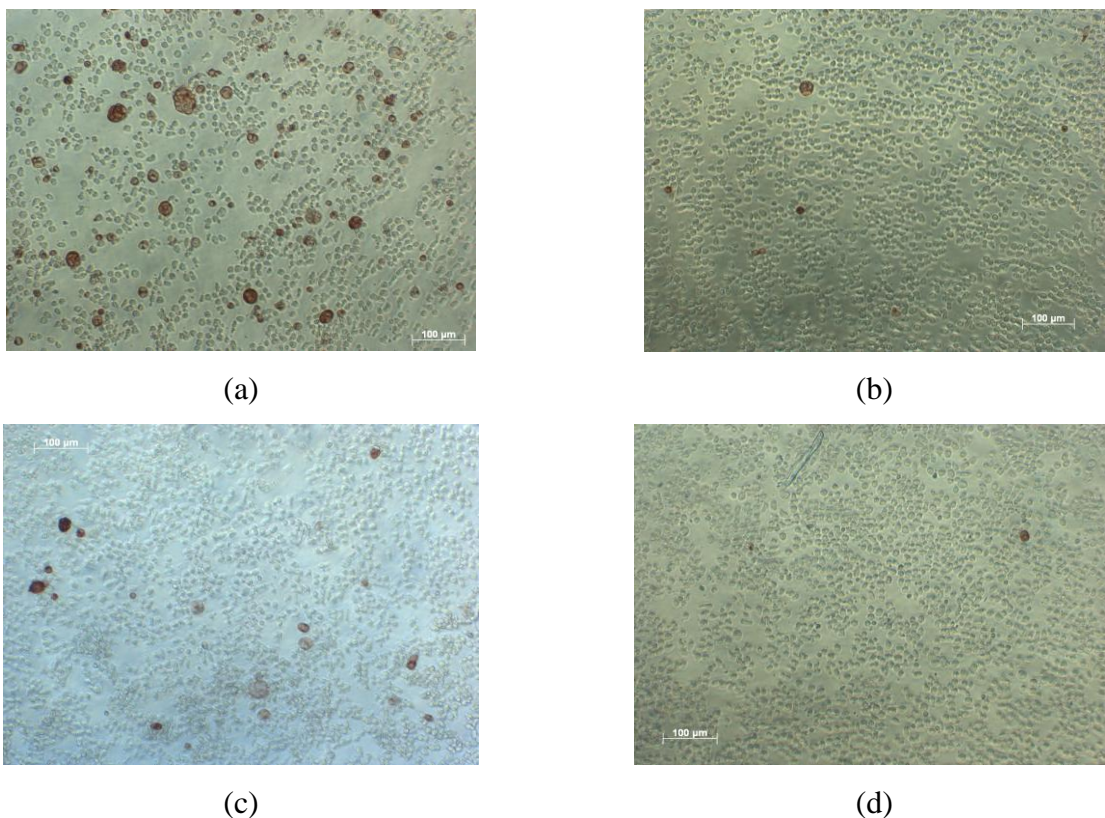


Abb. 21 Ergebnisse des IPAP-Assays nach Infektion mit SIVmac293

Die Infektion der CEM-NK^R-Zellen erfolgte mit 1:4-verdünntem SIVmac293 im Falle der Abbildungen (a) und (b). In (a) ist die Infektion mittels Spinoculation gezeigt und in (b) die normale Infektion. Die den Abbildung (c) und (d) ist die Infektion mit einem 1:36-verdünntem Virus gezeigt. Die Spinoculation ist mit den in (c) abgebildeten Zellen durchgeführt worden und die Zellen in (d) wurden nicht zentrifugiert.

Eine weitere Methode um die Effektivität der Spinoculation beurteilen zu können ist die qPCR. Es lässt sich in Abb. 22 und Abb. 23 erkennen, dass in beiden Fällen die Kopienanzahl der zentrifugierten Proben höher ist als die der unbehandelten. Die Infektion war demzufolge effektiver.

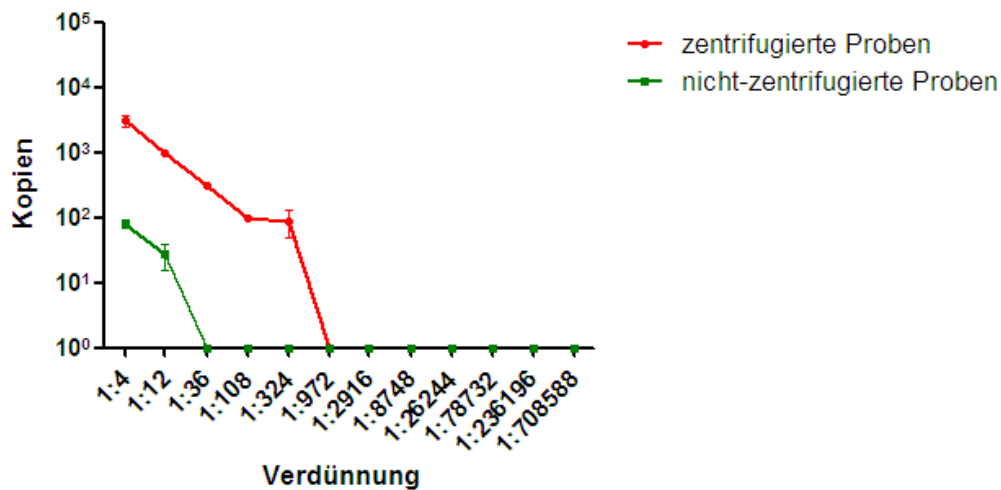


Abb. 22 grafische Auswertung der qPCR 24 h nach Infektion

Der Vergleich einer normalen Infektion und eine Infektion durch Spinoculation mit SIVmac293 ist anhand der Auftragung der Kopienzahl über den Verdünnungen möglich. Die qPCR wurde 24 h nach der Infektion der CEM-NK^R-CCR5-Zellen durchgeführt.

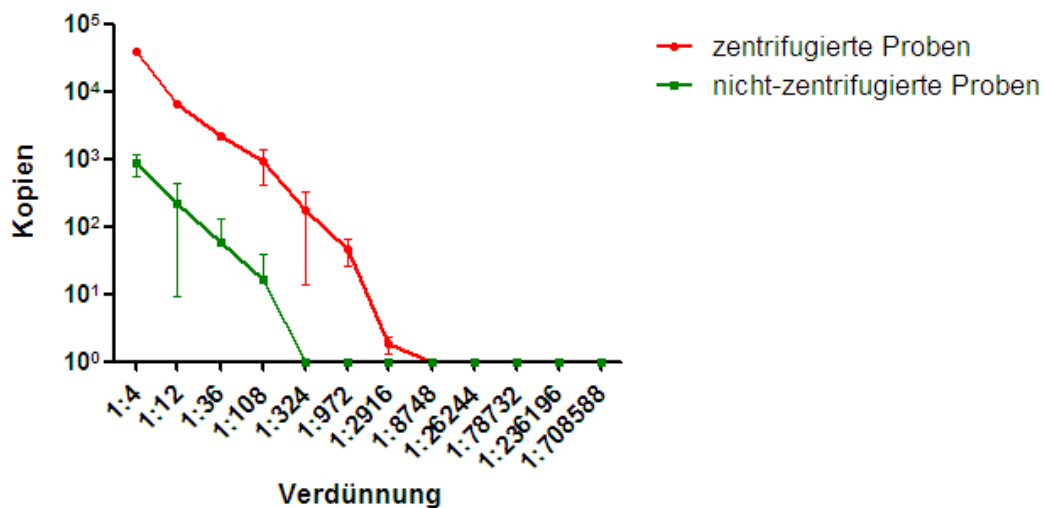


Abb. 23 grafische Auswertung der qPCR 48 h nach Infektion

Der Vergleich einer normalen Infektion und eine Infektion durch Spinoculation mit SIVmac293 ist anhand der Auftragung der Kopienzahl über den Verdünnungen möglich. Die qPCR wurde 48 h nach der Infektion der CEM-NK^R-CCR5-Zellen durchgeführt.

5. Diskussion

Diese Arbeit hatte das Ziel einen ADCC-Assay für SIV und SFV zu etablieren um im Rahmen eines anderen Versuchs die ADCC-Antworten verschiedener Rhesus Makaken zu messen. Bevor die Arbeit an dem Assay beginnen konnte mussten jedoch die *env*-Sequenzen von SIV und zwei verschiedenen SFVR289-Klonen in einen retroviralen Expressionsvektor kloniert werden. Dieser Vektor war Bestandteil eines retroviralen Expressionssystems, das die stabile Transduktion von Zellen ermöglicht. Eine Verpackungszelllinie bildet nach Transfektion retrovirale Partikel, die das Zielgen tragen. Durch Infektion von CEM-NKR-Zellen sollte eine Zelllinie entstehen, die über einen langen Zeitraum hinweg die Oberflächenproteine von SIVmac293, SFVR289 und SFVR289hybAGM auf ihrer Oberfläche exprimiert. Der der HybAGM-Variante des Virus handelt es sich um eine in der Arbeitsgruppe entdeckte Mutante, die vermutlich durch Rekombination zweier in einer Affengruppe zirkulierender SFVs entstanden ist.¹⁸

Die Klonierung konnte im Falle von SFVR289*env* und SIVmac293*env* mit Hilfe gängiger Klonierungsmethoden durchgeführt und überprüft werden.

Es ist in dieser Arbeit nicht gelungen, die Sequenz für das Hüllprotein der Rekombinationsmutante SFVR289hybAGM*env* in den für die Transfektion nötigen pMXs-Expressionsvektor zu klonieren. Deshalb ist es nötig die Klonierungsstrategie erneut zu überdenken. Mit Hilfe einer sogenannten blunt-end-Klonierung könnte die Ligation gelingen. Dabei werden Vektor und Insert mit stumpfen Enden ligiert.

Die Transfektion mit Hilfe von HEKfectin gelang und wurde mit dem GFP-pMXs-Vektor als Kontrolle überprüft, wie in der Fluoreszenzaufnahme in den Abb. 14 zu erkennen ist. Mit Hilfe dieser GFP-Kontrollen lassen sich Rückschlüsse auf die Transfektion mit den SIV*env*- und SFV*env*-Konstrukten ziehen. Es lässt sich auch für diese beiden Vektoren eine ähnliche Transfektionseffizienz wie für die Kontrollen annehmen. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass GFP unter Umständen eine höhere Expressionsrate hat. Da die Zellen bei dem Einsatz von DNA-Mengen über 1000 ng in einem schlechten Zustand waren, muss in weiteren Versuchen mit einer geringeren DNA-Menge gearbeitet werden. Dass die Transfektion erfolgreich war, lässt sich auch aus dem durchgeführten Cavid-Assay ableiten, der für alle Proben RT-Werte über 270 pg/ml ergab. Allerdings sind die errechneten RT-Werte für die unverdünnten Proben und einen solch sensitiven Assay relativ niedrig. Der Virusüberstand ist demzufolge niedrig konzentriert. Der Cavid-Assay bestätigt, dass eine hohe DNA-Menge für die Zellen schädlich ist, da die RT-Werte dieser Proben geringer waren als die der mit einer geringeren DNA-Menge versetzten Proben. Der Cavid zeigt weiterhin, dass die

Verpackungszelllinie ihre Funktion erfüllt hat und Viren produzierte. Die Produktion der retroviralen Partikel ist für die mit 1600 ng DNA transfizierten Proben im Vergleich zu den mit 800 ng versetzten Proben geringer. Es sollte ein Versuch durchgeführt werden in dem betrachtet wird, ob die hohen RT-Werte allein auf die Transfektion zurückzuführen sind oder ob die Plat-GP-Zellen auch ohne die Transfektion virale Partikel produzieren, die die Reverse Transkriptase enthalten und somit in einem Cavid-Assay gemessen werden können. Der Cavid-Assay allein bietet keinen Hinweis auf das Infektionspotenzial der entstandenen Partikel. Die Infektionseffizienz wurde mit Hilfe der GFP-Kontrollen nach der zweitägigen Transduktion der CEM-NK^R- und 293T-Zellen überprüft. Um die Infektion durch die retroviralen Partikel zu verstärken wurde Polybren zu dem Medium dazugegeben. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme der beiden GFP-Ansätze lässt sich erkennen, dass die Transduktion keiner der beiden Zelllinien mit einer hohen Infektionsrate verbunden war. Im durchgeführten IPAP waren weder Env-positive 293T- noch CEM-NK^R-Zellen zu finden. Die von der Verpackungszelllinien produzierten retroviralen Partikel sind nicht infektiös oder konzentriert genug um die Zellen infizieren zu können.

Mit Hilfe der konfokalen Laserscanningmikroskopie sollte für die Transfektion, nachgewiesen werden, ob das Env-SIVmac293 wirklich in den Zellen produziert wird. Dazu sollte der HA-Tag des Proteins detektiert werden. Die Detektion erfolgte mit einem im roten Bereich des sichtbaren Lichts fluoreszierenden Antikörpers für den HA-Tag.

Es ließ sich der HA-Tag, den das SIV_{env} durch die Klonierung in den pDisplay-Vektor trägt, nachweisen. Allerdings kann in diesem Versuch nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein innerhalb der Zelle detektiert wurde, da die Zellen auch bei der cLSM permeabilisiert werden. Eine Expression von Env auf der Zelloberfläche ist durch diesen Versuchsaufbau nicht eindeutig zu bestätigen. Aus diesem Grund wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem SIV-pDisplay-Konstrukt transfiziert. Dabei zeigte sich in der grafischen Auswertung, dass zwischen 20 und 25% der transfizierten Zellen Env exprimieren. Mit etwa 12% lag die Transfektionseffizienz des RT-SHIV-Moleklarklons deutlich unter der der eingesetzten Konstrukte. Die unterschiedlichen eingesetzten DNA-Mengen zeigten in ihren Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede. Bei SIVmac293_{env} in pMXs-Puro liegt die Transfektionsrate für die größere DNA-Menge höher als bei der niedrigeren. Im Falle von SIVmac293_{env} in pDisplay ist es genau umgekehrt. Eine weitere Steigerung der Transfektionseffizienz durch die weitere Erhöhung der zugegebenen DNA-Menge ist scheinbar nicht möglich und würde durch die damit einhergehende erhöhte HEKfectin-Menge den gegenteiligen Effekt haben, da die Zellen einem größeren Stress ausgesetzt wären.

Die Ergebnisse des Western Blot ließen nicht die erwarteten Rückschlüsse auf die Expression des Oberflächenproteins zu. Die Blots, die mit dem HA- und dem myc-Antikörper inkubiert wurden, um die beiden Tags zu detektieren, zeigten unspezifische Banden, die auch in der Negativkontrolle zu finden waren. Dies lässt auf eine unspezifische Bindung eines Antikörper schließen. Um ausschließen zu können, dass das Problem am verwendeten Expressionsvektor pDisplay liegt, wurde der gesamte Vektor sequenziert. Seine Sequenz stimmte weitestgehend mit der ursprünglichen Sequenz überein. Die Abweichungen waren jedoch nicht versuchsrelevant.

Im Blot, der mit Rh41-Plasma, zur Detektion von SIV-Proteinen, inkubiert wurde, lässt sich nur die Positivkontrolle in Form eines SIV-Plasma-Pools nachweisen. Auch über diesen Antikörper ist also kein Nachweis der Expression möglich. Diese Ergebnisse müssen nicht zwingend ein Hinweis darauf sein, dass die Konstrukte in keinem der Fälle exprimiert werden. Die Rate der exprimierten Proteine könnte unter der Nachweisgrenze des Western Blots liegen.

Um die Transfektionseffektivität und damit einhergehend auch die Transduktionseffizienz auf die 90% Env-exprimierenden CEM-NK^R-Zellen zu steigern, die für die Durchführung eines ADCC-Assays nötig sind, könnte eine Co-Transfektion mit Rev durchgeführt werden. Das Rev-Protein des HIV-1 ist dafür bekannt, die Expression viraler Proteine auf der Zelloberfläche zu unterstützen.¹⁹ Es spielt eine wichtige Rolle bei der Expression von Gag und Env. In der *env*-Sequenz ist eine RRE (Rev-responding element) genannte Bindungsstelle für Rev enthalten. Rev bindet an an das RRE im Zellkern und fördert den Export der mRNA in das Zytoplasma. Es wird davon ausgegangen, dass es durch die Bindung von Rev zu einer Stabilisation der mRNA kommt, die bei HIV-1 einen hohen Anteil an Adenin und Uracil enthält. Durch die zwei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Adenin und Uracil ist die Stabilität dieses Elements niedriger als es bei einer guanin- und cytosinreichen Verbindung der Fall wäre.²⁰ Ergebnisse der Gruppe um Mangeot zeigten, dass die Verfeinerung von SIV-basierten Vektoren auf molekularer Ebene zu einer Transfektionseffizienz von beinahe 100% führen kann. In diesem Versuchsaufbau wurden Dendritische Zellen mit einem SIV-basierten Vektor transfiziert, der mit einem ESE (exon splicing enhancers) ausgestattet wurde. Bei dieser Struktur handelt es sich um eine RNA-Sequenz, die ebenfalls von Rev erkannt wird und auf diesem Weg den Export der RNA aus dem Zellkern weiter verstärkt.²¹ Das Einbringen eines RRE und einer ESE könnte auch im Falle der hier verwendeten Vektoren die Transfektionseffizienz steigern, wenn die pMXs-Puro-Konstrukte zusammen mit Rev co-transfiziert werden.

In diesem Versuchsaufbau wurde kein codon-optimiertes Oberflächenprotein verwendet. Von einem codon-optimierten Gen spricht man, wenn artfremde Gene so in Bezug auf einen Zielorganismus verändert werden, dass sie körpereigen erscheinen. Dabei werden solche Basentriplets für eine Aminosäure gewählt, die besonders häufig von stark replizierenden Zellen

genutzt werden. Durch eine Codon-Optimierung lassen sich die Translationsraten um das 10-fache erhöhen.²² Für die weitere Verbesserung des Versuchsaufbaus würde sich die Nutzung dieses Konstrukts anbieten. In diesem Fall könnte auf den Einbau eines RRE oder ESE verzichtet werden. Auch die Co-Transfektion mit Rev würde entfallen. Dies bietet den Vorteil, dass die eingesetzte DNA-Menge allein auf die pMXs-Konstrukte und VSV-G verteilt werden kann.

In der Transduktion mit dem im Cavidu getesteten Zellüberstand ließ sich weder in der Kontrolle der GFP-Zellen, die in Abb. 17 gezeigt ist, noch im IPAP eine erfolgreiche Infektion der Zellen nachweisen. Die Konzentration des viralen Überstandes war nicht ausreichend.

Die Transduktion von Zellen wurde auch mit einem mittels Ultrazentrifugation aufkonzentrierten Virusüberstand von transfizierten Plat-GP-Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse eines durchgeführten IPAP-Assays sind in dieser Arbeit nicht gezeigt, ließen allerdings auf eine äußerst geringe Infektionseffizienz schließen. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass die retroviralen Partikel durch die Ultrazentrifugation beschädigt wurden und an Infektiosität verloren.

Die geringe Infektionseffizienz, die bei der Behandlung der CEM-NK^R-Zellen mit dem aus der Transfektion erhaltenen Virusüberstand erzielt wurde, könnte sich mit einer nicht ausreichenden Transfektionseffizienz erklären. Wenn nur wenige der Verpackungszellen transfiziert werden, so bilden auch nur einige Zellen virale Partikel. Die Konzentration des Virusüberstandes ist gering.

Da CEM-NK^R-Zellen sich ohnehin besonders schwer infizieren lassen, wäre es sinnvoll die Infektion mit einer Spinoculation zu wiederholen, da in den späteren Versuchen gezeigt werden konnte, dass die Infektion deutlich effektiver ist, wenn Virus und Zielzelle miteinander zentrifugiert werden. Um die Infektion weiter zu erhöhen, könnte diesem Zentrifugationsansatz Polybren zugegeben werden. Es bleibt zu überprüfen, ob die erhöhte Infektionsrate nicht nur bei nativen Viren erzielbar ist, sondern auch bei von einer Verpackungszelllinie produzierten, veränderten retroviralen Partikeln.

Mit Hilfe einer Infektion durch Spinoculation lässt sich die Infektionsrate von CEM- NK^R-CCR5-Zellen erhöhen. Mit Hilfe dieser Methode sollte in dieser Arbeit ein ADCC-Assay an infizierten Zellen durchgeführt werden, da es durch Transfektion und Transduktion nicht möglich war eine ausreichende Expression von Env auf der Oberfläche von CEM-NK^R-Zellen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde Spinoculation mit CEM-NK^R-CCR5-Zellen und einer Verdünnungsreihe von SIVmac293 durchgeführt.

Die Effektivität dieser Methode wird deutlich, da auch die Infektion mit einem 1:26244-verdünntem SIVmac293 nachgewiesen werden konnte. Allerdings ließen sich auch mit diesem Versuchsansatz, selbst mit unverdünntem Virus nicht die für einen ADCC-Assay nötigen 90% infizierter Zellen präparieren.

Um dieses Rate erreichen zu können müssen die Versuchsbedingungen, unter denen die Spinoculation durchgeführt wurde optimiert werden. So wurde eine relativ große Zahl an Zellen für die Infektion ausgesät. Es gilt das Verhältnis von Zellen und Virus zu optimieren. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Virus und Zellen sich während der Zentrifugation treffen.

Es könnte weiterhin helfen, die CEM-NK^R-CCR5-Zellen erneut aufzutauen, da sich diese schon für geraume Zeit in Kultur befanden. Mit einer langen Kultivierung geht unter Umständen die Veränderung der Morphologie der Zellen einher. Betrifft dies den exprimierten CCR5-Rezeptor hat es einen unmittelbaren Einfluss auf die Infektionseffizienz durch SIV. Die Infektion durch SIV ist ohne diesen Co-Rezeptor nicht mit vollständiger Effizienz möglich.²³ So ist z.B. in Rauchmangaben die Expression des CCR5-Rezeptors auf CD4+-Zellen sehr gering und wird durch eine Infektion mit SIV auch nicht gesteigert. Auf diese Weise ist es dem SIV nur beschränkt möglich in die Zellen einzudringen. Anders ist dies in Tieren wie den Rhesus Makaken, die nicht zu den natürlichen Wirten von SIV gehören. In diesen Tieren können die Viren mit Hilfe ihres hauptsächlichen Co-Rezeptors in die Zellen eindringen.²⁴

Auch die bereits im oberen Teil erwähnte Anwendung von Polybren könnte zu einem verbesserten Ergebnis führen und sollte in Verbindung mit der Spinoculation zu einer weiter erhöhten Infektionsrate führen.

6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte ein Expressionssystem für die Oberflächenproteine von SIV und SFV etabliert werden und die Funktionalität dieser Proteine sichergestellt werden.

Diese Arbeiten dienen als Vorbereitungen für einen ADCC-Assay für SIV und SFV, da die eingesetzten Zielzellen so verändert werden, dass sie die Env-Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Die Sequenzen der Hüllproteine sollten in den pMXs-Puro-Vektor des verwendeten retroviralen Expressionssystems kloniert werden, die Signalsequenz und die Transmembrandomäne der Konstrukte wurde durch die des pDisplay-Vektor ersetzt. Die Klonierung der Oberflächenproteine gelang nur für die beiden wildtypischen *env*-Varianten SIVmac293 und SFVmac289 und konnte durch Sequenzierung abgesichert werden.

Die Expression der Hüllproteine auf den Zellen wurde durch verschiedene Versuche überprüft. Es gelang im cLSM (konfokale Laserscanningmikroskopie) die Produktion des SIV Env nach Transfektion von 293T-Zellen nachzuweisen. Um abzusichern, dass die Expression auf der Oberfläche stattfindet, wurde eine FACS-Analyse (Durchflusszytometrie) durchgeführt, in der eine Population von bis zu 25% Env-positiven Zellen nachgewiesen werden konnte. Es stellte sich in einer weiteren FACS-Analyse heraus, dass lediglich 0,35% aller CEM-NKR-Zellen, bei denen es sich um NK-resistente Zellen handelt die innerhalb des ADCC-Assays als Zielzellen eingesetzt werden sollten, nach erfolgter Transduktion Env exprimieren. Der von den Verpackungszellen produzierte virale Überstand wurde durch einen reverse Transkriptase Assay, mit dem die reverse Transkriptase im Zellüberstand quantifiziert werden kann, untersucht. Es zeigte sich, dass retrovirale Partikel nur in geringem Maße gebildet werden. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurden Versuche mit Spinoculation durchgeführt. Dabei werden Zellen und Viren zusammen zentrifugiert, was bei verschiedenen Zelllinien zu einer erhöhten Transduktionsrate führt. Es zeigte sich, dass ein hochkonzentrierter Virus für diese Infektion eingesetzt werden muss.

Die Herstellung der Transduktionskonstrukte bedarf weiteren Optimierungen um einen ADCC-Assay durchführen zu können.

Als alternativer Ansatz neben der Generierung einer Zelllinie, die Env stabil exprimiert, wurde Versuche zur Spinoculation mit SIVmac293 durchgeführt.

7. Quellenangaben

- 1 Modrow S, Falke, D., Truyen, U. Molekulare Virologie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 2003: 391-405
- 2 Coffin JM HS, Varmus HE. Retroviruses. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press 1997
- 3 Meiering CD, Linial ML. Historical perspective of foamy virus epidemiology and infection. *Clinical microbiology reviews* 2001, 14: 165-176
- 4 Liu W, Worobey M, Li Y, Keele BF, Bibollet-Ruche F, Guo Y, Goepfert PA, *et al.* Molecular ecology and natural history of simian foamy virus infection in wild-living chimpanzees. *PLoS pathogens* 2008, 4: e1000097
- 5 Silvestri G, Paiardini M, Pandrea I, Lederman MM, Sodora DL. Understanding the benign nature of SIV infection in natural hosts. *The Journal of clinical investigation* 2007, 117: 3148-3154
- 6 Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS Pandemic. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2011, 1: a006841
- 7 Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoi B, Butto S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto superiore di sanita* 2010, 46: 5-14
- 8 Checkley MA, Luttge BG, Freed EO. HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation. *Journal of molecular biology* 2011, 410: 582-608
- 9 Nisole S, Saib A. Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology* 2004, 1: 9
- 10 Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler JL, Michael NL. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Current opinion in HIV and AIDS* 2010, 5: 428-434
- 11 Reynell L, Trkola A. HIV vaccines: an attainable goal? *Swiss medical weekly* 2012, 142: w13535
- 12 Pollara J, Hart L, Brewer F, Pickeral J, Packard BZ, Hoxie JA, Komoriya A, *et al.* High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 2011, 79: 603-612
- 13 Lambotte O, Ferrari G, Moog C, Yates NL, Liao HX, Parks RJ, Hicks CB, *et al.* Heterogeneous neutralizing antibody and antibody-dependent cell cytotoxicity responses in HIV-1 elite controllers. *Aids* 2009, 23: 897-906
- 14 Gomez-Roman VR, Florese RH, Patterson LJ, Peng B, Venzon D, Aldrich K, Robert-Guroff M. A simplified method for the rapid fluorometric assessment of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Journal of immunological methods* 2006, 308: 53-67
- 15 O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *Journal of virology* 2000, 74: 10074-10080
- 16 Alpert MD, Harvey JD, Lauer WA, Reeves RK, Piatak M, Jr., Carville A, Mansfield KG, *et al.* ADCC Develops Over Time during Persistent Infection with Live-Attenuated SIV and Is Associated with Complete Protection against SIV(mac)251 Challenge. *PLoS pathogens* 2012, 8: e1002890
- 17 Davis HE, Rosinski M, Morgan JR, Yarmush ML. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal* 2004, 86: 1234-1242
- 18 Blochmann R, Curths, C., Kurth, R., Norley, S.G. and Fiebig, U. Sequence analysis of a foamy virus isolate from rhesus macaque 289. ed. unpublished 2012
- 19 Cullen BR. Cullen, B. R. *Virology* 1998, 249: 203-210
- 20 Schneider R, Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K., Pavlakis, G.N. Inactivation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibitory Elements Allows Rev-Independent Expression of Gag and Gag/Protease and Particle Formation. *Journal of virology* 1997, 71: 4892-4903

- 21 Mangeot PE, Duperrier K, Negre D, Boson B, Rigal D, Cosset FL, Darlix JL. High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2002, 5: 283-290
- 22 Kotsopoulou E, Kim VN, Kingsman AJ, Kingsman SM, Mitrophanous KA. A Rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 gag-pol gene. *Journal of virology* 2000, 74: 4839-4852
- 23 Hunter Z, Smyth HD, Durfee P, Chackerian B. Induction of mucosal and systemic antibody responses against the HIV coreceptor CCR5 upon intramuscular immunization and aerosol delivery of a virus-like particle based vaccine. *Vaccine* 2009, 28: 403-414
- 24 Paiardini M, Cervasi B, Reyes-Aviles E, Micci L, Ortiz AM, Chahroudi A, Vinton C, *et al.* Low levels of SIV infection in sooty mangabey central memory CD(4)(+) T cells are associated with limited CCR5 expression. *Nature medicine* 2011, 17: 830-836

A. Anhang

A.1 Primer

Primer	Sequenz
Sequenzierungsprimer pDisplay:	
AmpR-3'-For	GCGACACGGAAATGTTGA
AmpR-3'-Rev	TCAACATTTCCGTGTCGC
AmpR-5'-Rev	CGCTGAGATAGGTGCCT
AmpR-mid-Rev	GCTGAATGAAGCCATACCA
BGH-PolyA-3'-For	GCATTGTCTGAGTAGGTGTC
BGH-PolyA-3'-Rev	CCAGCATGCCTGCTATTG
CMV-3'-For	GGCGGTAGGCGTGTA
CMV-5'-For	GCGTTGACATTGATTATTGACT
CMV-5'-Rev	CGGAACTCCATATATGGGCT
Col E1 ori-Rev	TCAAGAACTCTGTAGCACC
NeoR-3'-For	ATAGCCTCTCCACCCAAG
NeoR-5'-For	TTGCCGTCATAGCGC
NeoR-5'-Rev	AACTGAAACACGGAAGGAG
SV40-Prom-5'-Rev	CAGAAGTAGTGAGGAGGCT

SIV PCR-Primer:

gp130 BENR (high)	TTCCCGCGGCTGTTGTATATACTTTATCC
gp130 BENF (low)	TTACCCGGGAATGGATGTCTTGGGAATCAGC

SIV Sequenzierungsprimer:

SIV _{env} BG pMXs-for	TGAACAAGGGAATAACACTGG
SIV _{env} BG pMXs-rev	TGCTATGAGACTGGTCACTG

SFV PCR-Primer:

pMXs 1 for	GCT TGG ATA CAC GCC GCC
pMXs 5 rev	GGG ACT TTC CAC ACC CTA AC

SFV Sequenzierungsprimer:

SFV _{env} ISP-F1	TAGGGTAGAACATGCTACAG
SFV R289 pDis-F	TCTTTAATTAAATAGGGAGACCCAAGCTTGG
SFV R289 pDis-R	GCAAACAACAGATGGCTGGCAA

A.2 Sequenzen der verwendeten Konstrukte

TGGAGGAATGCGACAATTCCCCTCTTCTGTGCAACCAAGAATAGGGATACTTGGG-
GAACAACCTCAGTGCCTACCAGATAATGGTGATTATTCAGAATTGGCCCTTAATGTTA-
CAGAAAGCTTTGATGCTTGGGAGAATACAGTCACAGAACAGGCAATAGAGGATGTAT-
GGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAGCCTTGTGTA AAAATTATCCCCATTATGCATTACTAT-
GAGATGCAATAAAAAGTGAGACAGATAGATGGGGATTGACAAAATCATCA-
ACAACAACAGCATCAACAACAACAATGGCACCATCAACAAAGCCAATAGACGTGGTCAAT-
GAGACTAGTTCTTGTATAACTCATGATAATTGCACAGGCTTGGAACAAGAGCAAAT-
GATAGGCTGTAAATTCAACATGACAGGGTTAAAAAGAGACAAGACAAGGAGTACAAT-
GAACTTGGTACTCTACAGATTTGGTTTGTGAACAAGGGAATAGCACTGATAATGAAAGTA-
GATGTTACATGAATCACTGTAACACTTCTATCATCCAAGAGTCTTGTGACAAGCATTATT-
GGGATACTATTAGATTTAGGTATTGTGCACCTCCAGGTTATGCTTTGCTTAGATGTAAT-
GACACAAATTATTCAGGCTTTATGCCTAAATGTTCTAAGGTGGTGGTCTCTTCAT-
GCACAAGGATGATGGAGACACAGACTTCTACTTGGTTTGGCTTTAATGGAAGTAG-
AGCAGAAAATAGA ACTTATATTTACTGGCATGGTAGGGATAATAGGACTATAATTAGTT-
TAAATAAGTATTATAATCTAACAATGAAATGTAGAAGACCAGGAAATAAGACAGTTTTAC-
CAGTCACCATTATGTCTGGATTGGTTTTCCACTCACACCAGTCAATGATAGGCCAAACCA-
GGCATGGTGTGGTTTGGAGGAAATTGGAAGGATGCAATAAAAAGAGGTGAAGCAGACCA-
TTGTCAAACATCCCAGATATACTGGAACATAACAATACTGATAAAAATCAATTT-
GACGGCTCCTAGAGGAGGAGATCCGGAAGTTACCTTCATGTGGACAAATTGCAGAG-
GAGAGTTTCTCTACTGTAAAATGAATTGGTTTCTAAATTGGGTAGAAGATAGG-
GATCTAACTACCCAGAGGCCAAAGGAACGGCATAGAAGGAATTACGTGCCATGTCATAT-
TAGACAAATAATCAACACTTGGCATAAAGTAGGCAAAAATGTTTATTT-
GCCTCCAAGAGAGGGAGACCTCACGTGTA ACTCCACAGTGACCAGTCTCA-
TAGCAAACATAGATTGGACTGATGGAAACCAGACTAATATCACCATG

Abb. A 1 Sequenz des SIVmac293env

Aus Nucleotide JF741546.1

ATGGCACCTCCAATGACCTTGGAAACAATGGCTCCTGTGGAAGAAGATGAACCAGGCTCACCA
AGCTCTTGAGAATGTGACTGTGTTAACTGAAGAACAAAAACAACAAGTTATTGTGGATATACA
ACAAGAAGAAGTTGTACCAACTAGAATGGACAAATTGAAATACCTAGCATATTCATGTTGTGC
TACTAGTACACGTGTATTGTGTTGGATAGTGTTAATTTGTGTATTATTATTAGTTGTGTTTATATC
CTGCTTTGTGACTATGTCTAGGATACAATGGAATAAGGATATTGCTGTTTTAGGCCCAGTCATA
GACTGGAATGTTAGTCAACAAGCTGTGATTCAGCAAATCAGAGCTAAAAGATTAGCAAGGTC
ACTTAGGGTAGAACATGCTACAGAGACATATATAGAAATTAATATGACTAGCATACCTCAAGGA
GTATTATATGTACCCCATCCAGAACCATAATTCTCAAGGAGAGGGTTCTTGGTTTGTACAGG
TTATTATGATAAATTCTGAAAATATAGCTAATACTGCTAACCTCACCCAAGAACTAAGGTATTA
TTAGCTGACATGATTAATGAAGAAATGACTGATTTGGCTAGTCAGATGATTGATTTTGTAGATTC
CTTTAGGGGATCCTAGAGATCAGAAACAATATCAACATCAGAAATGTTTTCAAGAATTTGCAC
ATTGTTATTTGGTTAAATATAAACTGCCAAAGGCTGGCCTAGTTCTACAGTAATAGCAGATCA
ATGTCCATTGCCTGGAAATCATCCAACAGTACAATATGCTCATCAGAGCATATGGGATTATTATA
TCCCATTTGAACAAATTAGGCCAGAGGGATGGACCTCTAAAACCTTATTATGAAGAAGCTAGGG
TAGGAGGATTCTACATTCCAAAATGGCTTAGAAATGAGTCATATACTCATGTGTTATTTTGTTC
GATCAGATTTATGGAAAATGGTATAATATAGATCTCACTGCCCAGGAGAGGGAGAAGTTATTAG
TACAAAATTAATAAATCTAACTAAAGGAAATTTCTTCACAACTTAAAGATAGGGCTATGCCATC
TGAATGGGATAAACAAAGGGAAAGCTAATCTGTTTAGACGAATTAATCCTTTGGATGTTTGTAA
AGGCCAGAAATGGTTTTCTGCTAAATTCCTCTTATTATGAATTCTCCTTGTGGGAAGGAGATT
GTGGTTATACTAGACAAAATGCTACTTTAGCTAATTCATTATGCAAAGATTTTATAATAACTCA
AAGTGGAAGAATCTGCATCCCTATTCATGTAGATTCTGGAGGTACAAACAAGAAAAGGAGGA
AACAAAATGTAGTAATGGAGAGAAGAAAAGATGTCTCTATTACCCACAATGGGATAGTCCTGA
AGCTTTATATGATTTTGGATTCTTGGCATATTTGAATGCCTTTCCATCTCCTATATGTATAAAGAA
TCAGACAGTAAGAGAACCAGAATACGAAATTAGCTCTTTATATTTAGAATGTATGAATGCTTCT
AATATATATGGGATTGATAGTGCTTTGTTAGCACTTAAAACATTTCTGAATTTTACTGGTCAATC
TGTAATGAAATGCCACTAGCCAGGGCCTTTGTAGGCCTTACTGATCCTAAATTTCTCCTACA
TATCCCAAGATTACCAGAGAAGCTTCTGGTTGTGATAATAACAAAAGGCAACGCAGAAGCATT
ACAATTATGAAAGAATTAGGTCTATGGGATATGCATTAACAGGAGCTGTTCAAACCTTTATCTC
AAATATCTGATATTAATGATGAGAGGCTGCAACAAGGAGTATATTTACTCCGGGATCATGTGGT
AACCTTGATGGAGGCTGCTCTCCATGATGTTTCAATTATGGAAGGAATGTTGGCAATCCAACAT
GTGCATACTCATCTTAACCATCTTAAGACTATGCTCTTGATGAGGAAAATAGACTGGACATTTA
TTAAAAGTGACTGGATAACAACAATTACAAAATCTGAAGATGAAATGAAGTTAATAAGA
AGAAGTCAAAAAGCCTAGTGTATTATGTCACCCAGACTTCTAGCTCTCCTACTGCAACTTCTT
GGGAGATAGGAATATATTATGAAATAACTATCCCAAACATATATATTTAAATAATTGGCAGGTG
ATCAATATAGGTCATCTAGTAGAGTCAGCTGGGCATCTGACTCATGTGAAGGTCAAACATCCTT
ATGAAGTAATTAATAAAGAATGCAGTAATACTCAATACTTACATCTTGAAGAATGCATCAGAGA
AGATTATGTGATTTGTGACATAGTACAAATAGTACAACCATGTGGAAATGCAACAGAACTAAG
TGATTGTCCAGTCACTGCTCTTGAGGTGAAGTCTCCATATATTCAAGTTTCTCCCTTAAAGAAT
GGAAGTACTTAATTTTGTCTAGTACTAAGGACTGTTCTATACCAGCATATGTGCCTAGTGTGG
TCACAGTCAATGAAACAGTTAAGTGCTTTGGAGTAGAGTTTCATAAACCCTCTACGCTGAAA
CAAAAACCAGCTATGAACCACAGGTTCCACATTTGAAGCTTCGTTTACCCCACTTACTGGGA
TTATTGCCAGCTTGCAATCACTGGAAATAGAGATTACTTCAACTCAAGAGAATATAAAAGACC
AGATTGAAAGAGCTAAAGCACAGCTTCTCCGGCTGGACATCCACGAAGGAGACTTTCCTGAC
TGGCTCAAGCAAGTGGCCTCTGCAACTAAGGACGTGTGGCCTGCAGCAGCTTCATTTCTACA
AGGAGTAGGTAACCTTCTATCTAACACTGCTCAAGGGATATTCGGATCAGCGGTAAGCCTCCTA
TCTTACGCCAAGCCCATCTTGGTAGGAATAGGAGTTATTCTGCTTATTGCCCTTCTTTTAAAGAT
TATATCATGGCTTCTTGGGAAGATCAAGAAGAATTA

Abb. A 2 Sequenz des SFV_{macR289env}

Aus Nucleotide M33561.1

ATGGCACCTCCAATGACTTTGGAACAATGGCTCCTGTGGAAGAAGATGAACCAAGCTCATCA
AGCTCTTGAGAATGTGACTGTGTTAACTGAAGAACAGAAACAGCAAGTCATAGTGGATATTC
ACAAGAAGAAGTTATACCAACTCGGATGGACAAATTGAAGTACCTAGCATATTCATGTTGTG
CTACTAGCACACGTGTATTGTGTTGGATAGTGTGATTTGTGTATTATTATTAGTTGTGTTTATAT
CTTGCTTCGTAACTATGTCTAGGATAACAATGGAATAAGGATATCGCTGTTTTAGGTCCAGTCATA
GACTGGAATGTTAGTCAACAAGCTGTGATTCAGCAAATTAAGAGCTAAGAGATTAGCAAGGTC
ACTTAGGGTAGAACATGCTACAGAAACATATGTAGAAATTAATATGACCAGTATACCTCAAGGA
GTGTTATATGTACCTCATCCTGAGCCAATAATTCTCAAGGAGAGGGTCCCTTGGCCTCTCACAAG
TTATTATGATAAATTCTGAAAATATAGCTAACGCTGCTAATCTCACCCAAGAACTAAGGTATTA
TTGACAGACATGATTAATGAAGAAATGACTGATTTGGCTAATCAAATGATTGATTTTGGAGATTC
CTTTAGGAGATCCTAGAGATCAGAAACAATATCAACATCAAAAATGTTTTCAAGAATTCGCAC
ATTGTTATTTAGTGAAATACAAAAACCTATGCCTTGGAAAACCTGAGGGAATTATTGTGGACC
AATGTCCTCTACCCGGCTTACATTCTCCTACATATTATCAATACCAAGCCATTTGGGACTATTATT
TAAAAATATATAACATTAGACCTAAAGATTGGAATCAAAGATCATTTTGGTTCAGCAAGAAT
GGGAAGTTTCTATATTCCCTCAGGGTTAAGGAATGCAACCTACACTCATGTCTTATTCTGTTCT
GATCAGTTATATGGCAAATGGTATAATGCTAAAAACACGATGAAAAGAAAATGAAGAATTATTAG
TAACCAAATTACAAAACCTAACTAATGGAAGTAGGTTAAAAAACAGGAGTTTACCTAAAGAAT
GGAATAAACAAGGTAGTAATAGATTATTTAGGAGCTTTCACCCTTTAGATATTTGTAATAGACCT
GAAGCTGTTATCTTACTCAATACCACTTATTATACATATTCATTATGGGAAGGAGACTGTAATTAT
ACACAACAACATATTCAGAACCTTTCAGAATGTAAGAATTTAAATAGGTTGAAAACATCCTTATG
CTTGTAGATTTTGGAGATATAAGGAAGGACAGGAGGAGGTTAAATGTTTAGGAAATGAGCAG
AAAAGGTGTTTGTATTATTCTGAATACTCTAGCCCAGAGGCTCAATTTGATTTTGGATTTCTGG
CATATCTTAATTCTTTTCTGGATTAAGATGCATTGAAAATCAAACCTATTAGAGATCCAGATTAT
GAGGTATATTCCTTATATATGGAATGTATGAATGCTTCTGAAACACATGGCATAAGATAGTCTTT
GTTAGCACTTAAACATTTCTGAATTTTACTGGTCAATCTGTGAATGAACTGCCATTAGCTAGG
GCCTTCGTAGGCCTCACTGATCCTAAATTTCTCCACATATCCCAATATTACAAGAGAGACTT
CTGGCTGTAATAACAACAAAAGACAACGCAGAAATTAATAATTATGAAAAAATTAGGTCTA
TGGGATATGCATTGACAGGGGCTGTTCAAACCTTATCTCAAATATCTGATATTTATGATGAGAG
GCTGCAACAAGGAGTATATTTACTCCGGGATCATGTGGTAACCCTGATGGAAGCTGCACTTCA
TGATGTTTCAATTATGGAAGGAATGTTGGCAATTC AACATGTGCATACTCATCTTAACCATCTC
AAGACTATGCTTTTAAATGAGAAAAATAGATTGGACCTTTATTAGAAGTGACTGGATACAACAA
CAATTACAAAATCTGAAGATGAAATGAAGTTAATAAGAAGAACTGCAAAAAGCCTGGTGTA
CTATGTCACCCAAACTTCCAGCTCTCCTACTGCAACTTCCTGGGAGATAGGAATATATTATGAG
ATAACTATCCCTAAACATATATATTTAAACAATTGGCAGGTGATCAATATAGGTCATCTAGTAGA
GTCAGCTGGACATCTGACTCATGTAAGGTTAAACATCCTTATGAGATAATTAATAGAGAATGC
AGTAATACTCAATATTTACATCTTGAGGAATGCATCAGAGAAGATTATGTGATTTGTGACATAGT
AAAAATAGTACAACCATGTGGAAATGCAACAGAAATTAAGTGATTGCCAGTCACTGCTCTCAA
GGTGAAGTCTCCATATATTCAAGTTTCTCCCTTAAAGAATGGAAGTTACTTGATTTTATCTAGTG
CTAAAGACTGCTCTATACCAGCATATGTGCCTAGTGTGGTCCACAGTCAATGAAACAGTTAAGT
GCTTTGGAGTAGAGTTTCATAAACCACTCTACGCTGAAACAAAACCAGCTATGAACCACAG
GTTCCACATTTGAAGCTTCGTTTACCCCACTTGACTGGGATTATTGCCAGCTTGCAATCACTGG
AAATAGAGATTACTTCAACTCAAGAGAATATAAAAGACCAGATTGAAAGAGCCAAAGCACAG
CTTCTCCGGCTGGACATCCACGAAGGAGACTTTCCTGACTGGCTCAAGCAAGTGGCCTCTGC
AACTAAGGACGTGTGGCCTGCAGCAGCTTCATTTCTACAAGGAGTAGGTAACCTTCTATCTAA
CACTGCTCAAGGGATATTCGGATCAGCGGTAAGCCTCCTATCCTACGCCAAGCCCATCTGGTA
GGAATAGGAGTTATTCTGCTTATTGCCCTTCTTTTTAAGATTATATCATGGCTTCTGGGAAGAT
CAAGAAGAATTAA

Abb. A 3 Sequenz des SFVmacR289hybAGMenv

Aus Nucleotide JN801175.1

A.3 Beispielhaftes Klonierungsschema für SIV:

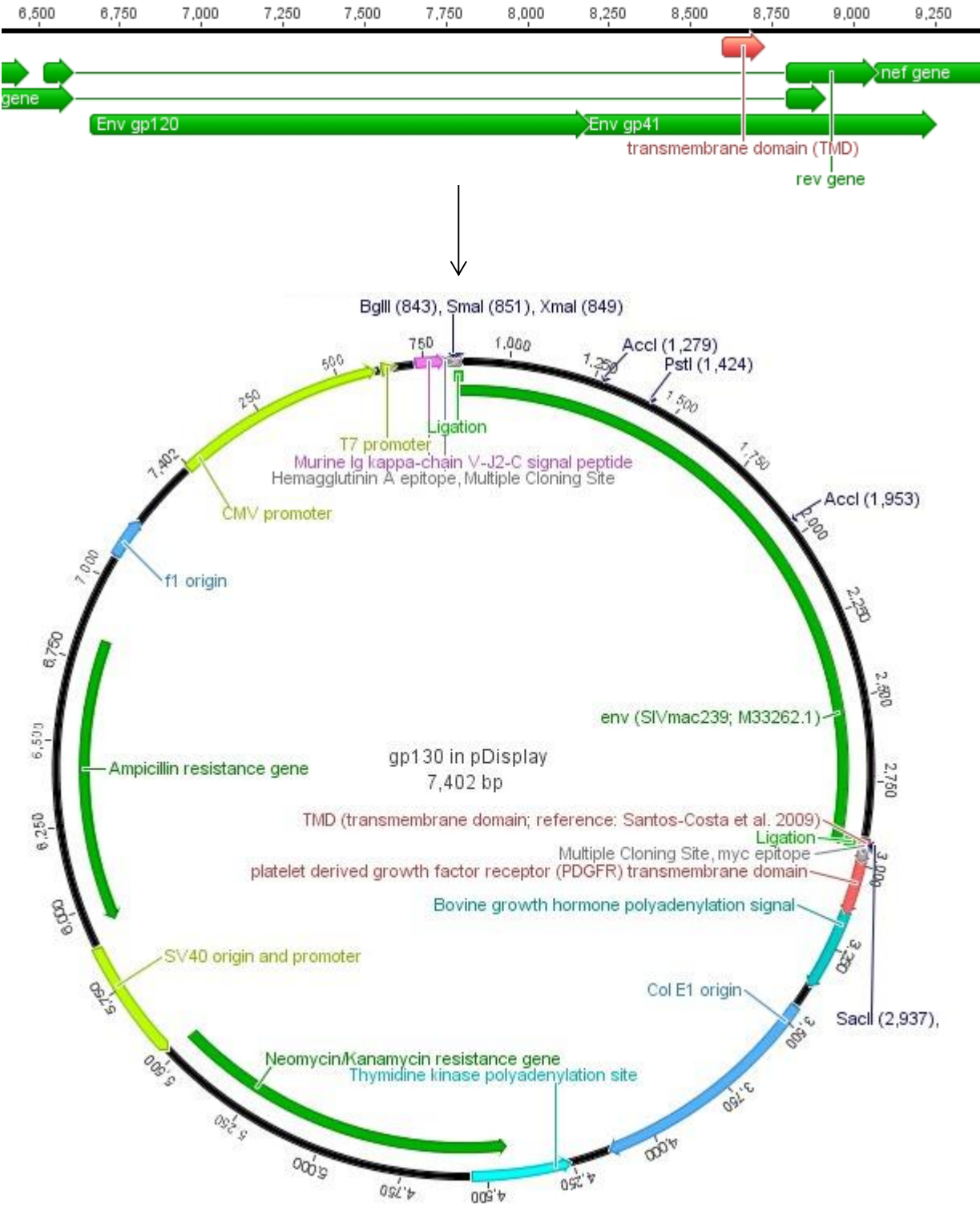


Abb. A 4 SIVenv in pDisplay

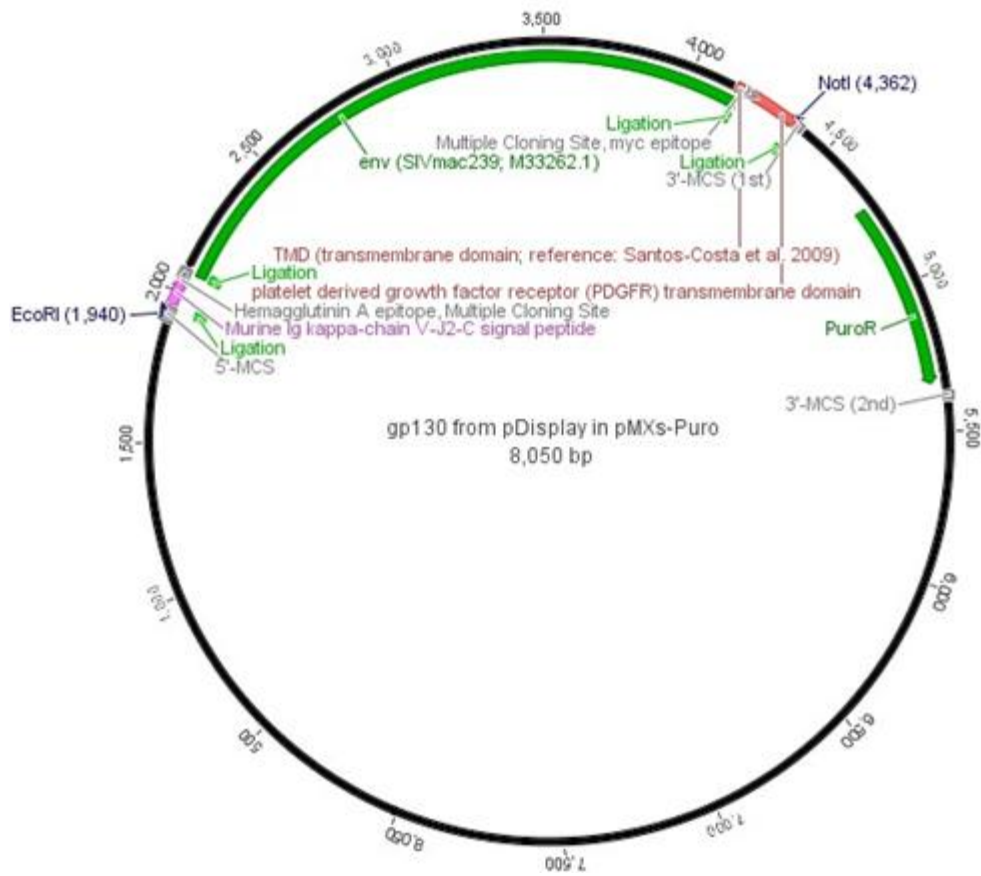


Abb. A 5 SIVenv in pMXs-Puro

.....
Name

Vorname

Matrikel- Nr.

Eidesstattliche Erklärung zur Bachelorarbeit

Ich versichere, die Bachelorarbeit selbstständig und lediglich unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Ich erkläre weiterhin, dass die vorliegende Arbeit noch nicht im Rahmen eines anderen Prüfungsverfahrens eingereicht wurde.

Berlin, den