Rekombinations-basiertes Verfahren zur Herstellung chimärer Lentiviren aus SIVmac239 und HIV-1

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DER WÜRDE DES DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN DES FACHBEREICHS BIOLOGIE, DER FAKULTÄT FÜR MATHEMATIK, INFORMATIK UND NATURWISSENSCHAFTEN, DER UNIVERSITÄT HAMBURG

vorgelegt von Silke Germann-Notka (geb. Germann) aus Aichach

Hamburg im Mai 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg auf Antrag von Professor Dr. T. DOBNER Weiterer Gutachter der Dissertation: Professor Dr. R. WAGNER Tag der Disputation: 23. März 2012

Hamburg, den 08. März 2012

614 <0

Professor Dr. J. Fromm Vorsitzender des Promotionsausschusses Biologie

1	Zus	Zusammenfassung		
2	Ein	Einleitung		
2.1	Die	Lentiviren SIV und HIV - ein Vergleich	3	
	2.1.1	Entstehung und Verbreitung	3	
	2.1.2	Infektiosität und Pathogenität	5	
	2.1.3	Diversität und Variabilität von HIV-1	7	
	2.1.4	Korezeptor-Verwendung	9	
2.2	Die	HIV-1 Vakzineentwicklung	10	
	2.2.1	Herausforderungen an die Vakzineentwicklung	10	
	2.2.2	Aktuelle Ansätze zur Entwicklung einer HIV Vakzine	10	
2.3	Tier	modelle für die Evaluierung von HIV-1 Vakzinekandidaten	14	
	2.3.1	Das SIV-Rhesusaffen-Modell	15	
	2.3.2	Das SHIV-Rhesusaffen-Modell	15	
2.4	BAC	-Technologie	17	
	2.4.1	Historie der viralen BAC-Vektoren	17	
	2.4.2	BAC-Mutagenese über homologe Rekombination	18	
2.5	Ziel	setzung	21	
3	Mat	erial und Methoden	. 22	
3.1	Mate	erial	22	
	3.1.1	Zellen	22	
	3.1.2	DNA	23	
	3.1.3	Viren	27	
	3.1.4	Antikörper	28	
	3.1.5	Größen- und Molekulargewichtsstandards	28	
	3.1.6	Kommerzielle Kits	29	
	3.1.7	Reagenzien und Verbrauchsmaterial	29	
3.2	Met	hoden	31	
	3.2.1	Mikrobiologische Techniken	31	
	3.2.2	Molekularbiologische Techniken	33	
	3.2.3	Rekombinations-Verfahren	34	
	3.2.4	Proteinbiochemische Methoden	39	
	3.2.5	Zellkulturtechniken	41	
4	Erg	ebnisse	. 45	
4.1	Her	stellung lentiviraler BAC-Vektoren über Red-Rekombination	46	
	4.1.1	Herstellung eines SIVmac239 BAC-Vektors über 3-Stufen-Rekombination	47	
	4.1.2	Herstellung weiterer BAC-Proviren	51	
	4.1.3	Rekombinations-Effizienzen	52	
	4.1.4	Generierung zellfreier Virusüberstände	52	

4.2	BAC	-Mutagenese53
4.	2.1	Das Selektions- und Gegenselektionssytem <i>rpsLNeo</i> zur Herstellung von SIV-BAC-Varianten
4.	2.2	Reduktion der Rekombinationseffizienz durch LTR-Rekombination56
4.	2.3	Optimierung des Recombineering-Systems zur Steigerung der Effizienz
4.	2.4	Einfügen des trfA Gens zur Steigerung der Plasmid-Kopienanzahl60
4.	2.5	Herstellung erster SHIV-Konstrukte basierend auf SHIV-89.6P62
4.	2.6	Restriktionsanalyse der hergestellten BAC-Vektoren
4.	2.7	In vitro Infektiosität und Replikation der generierten Virusvarianten
4.	2.8	Herstellung funktionell unterschiedlicher SHIV-Varianten67
4.	2.9	Applikation des etablierten Systems zur Herstellung zweier Subtyp C SHIV-Panel
5	Disk	ussion 83
5.1	Hers	tellung lentiviraler BAC-Vektoren über Red-Rekombination
5.2	BAC	-Mutagenese unter Verwendung von <i>rpsLNeo</i> 84
5.	2.1	Optimierung des rpsLNeo Systems durch Reduktion des Hintergrunds
5.	2.2	Stabilisierung des Virusgenoms durch einen <i>en passant</i> entfernbaren Selektionsmarker
5.	2.3	Steigerung der BAC-Kopienanzahl durch Insertion von trfA
5.3	Hers	tellung verschiedener SHIV-Varianten über BAC-Mutagenese87
5.	3.1	"Rückbau" des passagierten HIV-1 Bereichs von SHIV-89.6P (Klon KB9)87
5.	3.2	Generierung von SHIV V3-Varianten mit unterschiedlichem Korezeptor-Tropismus
5.	3.3	Herstellung zweier Subtyp C SHIV-Panel90
5.4	Aust	olick95
6	Anh	ang 97
6.1	Über	sicht aller hergestellten Konstrukte97
6.2	Sequ	ienzen Transferkonstrukte98
6.3	Abki	irzungsverzeichnis104
6.4	Oligo	onukleotide für Sequenzierung, Kolonie-PCR und Standard Klonierung106
Lite	raturv	/erzeichnis
Dan	ksag	ung121

1 Zusammenfassung

Die positiven Ergebnisse der RV144 Phase III HIV-1 Vakzinestudie sowie die Isolierung und Charakterisierung zahlreicher breit-neutralisierender Antikörper haben der Entwicklung eines HIV-1 Impfstoffes, der auf die Induktion humoraler Immunantworten abzielt, neue Impulse gegeben. Zur Validierung neuer HIV-1 Vakzinekandidaten, die auf dem viralen Hüllprotein Env basieren, wurde das SHIV-Rhesusaffen-Modell entwickelt, das auf der Immunisierung und kontrollierten Infektion von Makaken (Challenge) beruht. SHIVs sind chimäre Viren auf Basis des pathogenen Isolats SIVmac239, die ein HIV-1 Hüllprotein tragen und eine Infektion diverser Makakenspezies ermöglichen. Aufgrund von Speziesbarrieren ist eine direkte Infektion von Rhesusaffen mit HIV-1 nicht möglich. Nur sehr wenige der bisher verfügbaren SHIVs weisen nach einer Passagierung in Makaken pathogene Eigenschaften auf. Allerdings konnte bisher nicht geklärt werden, wodurch dieses pathogene Potential bestimmt wird. Das am besten charakterisierte Challenge Virus ist SHIV-89.6P, das eine Subtyp B HIV-1 env-Sequenz enthält. Weltweit wird jedoch mehr als die Hälfte der HIV-Infektionen von Viren vom Subtyp C verursacht. Daher wurde in den letzten Jahren der Fokus auf die Entwicklung von pathogenen SHIVs mit Sequenzen von Subtyp C Viren gelegt. Diese sollten möglichst viele verschiedene, repräsentative Isolate darstellen und eine natürliche HIV-1 Infektion im Menschen widerspiegeln. Für die breite Analyse neuer env Vakzinekandidaten sind daher eine Vielzahl neuer replikationskompetenter und pathogener SHIVs erforderlich. Die Herstellung neuer SHIV-Proviruskonstrukte über konventionelle Klonierungsmethoden ist aufgrund überlappender Leserahmen im env-Bereich und der großen Diversität der HIV-1 Isolate stark restringiert. So basieren neue SHIVs meist auf etablierten Konstrukten, bei denen über zur Verfügung stehende Restriktionsschnittstellen nur der zentrale env-Bereich ausgetauscht wird. Daher war es Ziel dieser Arbeit, eine Restriktions-unabhängige Methode zur Herstellung neuer SHIV-Konstrukte zu etablieren.

So wurde im ersten Teil dieser Arbeit zunächst ein System zur Herstellung und Mutagenese lentiviraler SHIV-BACs (aufgrund der geringen Kopienanzahl besonders geeignet) etabliert, das auf der Red-Rekombinationstechnologie in *E. coli* basiert. Diese Methode erlaubt die gezielte Herstellung neuer DNA-Konstrukte durch spezifische homologe Rekombinationen über sehr kurze homologe Sequenzbereiche (35 - 50 bp). Es wurden zunächst BACs kodierend für die vollständigen Virusgenome von SIVmac239 und SHIV-KB9 hergestellt, die anschließend durch den Einsatz einer Selektions- und Gegenselektionskassette weiter über Rekombination verändert wurden. Die Mutagenese erfolgte dabei rückstandslos, d. h. durch die Verwendung des Selektionsmarkers blieb keine "Narbe" im Virusgenom zurück. Als Nebenreaktion wurde allerdings eine LTR-Rekombination, die zur Entfernung des kompletten Virusgenoms aus dem BAC-Vektor führte, beobachtet. Die Insertion einer zusätzlichen,

en passant entfernbaren Selektionskassette führte zu einer Stabilisierung der rekombinanten Konstrukte. Im zweiten Teil der Arbeit wurde dieses neu etablierte, mehrstufige Rekombinationssystem zur Herstellung neuer SHIV Proviruskonstrukte eingesetzt.

(1) Der durch in vivo Passagierung mutierte HIV-1 Bereich von SHIV-KB9 wurde in das ursprüngliche SIVmac239 backbone rekombiniert. (2) Auf Basis des dualtropen SHIV-KB9 wurden durch Veränderung der V3-Sequenz im env-Bereich neue Virusvarianten mit einem veränderten Korezeptor-Tropismus hergestellt. Drei von vier dieser neuen, stärker CCR5abhängigen SHIVs zeigten eine Replikation in humanen PBMC und könnten nach in vivo Inokulation das Repertoire an R5-tropen Challenge Viren bedeutend erweitern. (3) Das etablierte System wurde schließlich zur parallelen Herstellung zweier unterschiedlicher neuer Subtyp C SHIV-Panel, bestehend aus je 12 Konstrukten mit Subtyp C vpu/env-Sequenzen, eingesetzt. Diese primären Virussequenzen wurden sowohl in das Genom von SHIV-KB9 als auch in das Genom von SIVmac239 über Rekombination eingefügt. Aus diesem Pool an Proviruskonstrukten wurde ein Virus identifiziert (SHIV-89.6C.12), das sich als replikationskompetent in humanen PBMC erwies. Eine Analyse des RNA-Genoms zeigte, dass dieses Virus im gp41 C-Terminus noch Sequenzen des pathogenen SHIV-KB9 beinhaltet, die wahrscheinlich während der Red-Rekombination, aufgrund einer teilweisen Homologie der verwendeten Subtyp B und Subtyp C env-Sequenzen im Virusgenom von SHIV-89.6C.12 verblieben sind. Somit konnte ein neues, in vitro replikationsfähiges Subtyp C SHIV, kodierend für ein primäres, R5-tropes Env über Rekombination hergestellt werden. In weiteren Analysen soll ermittelt werden, ob dieses Virus auch in Makaken infektiös und replikationskompetent ist.

2 Einleitung

2.1 Die Lentiviren SIV und HIV - ein Vergleich

2.1.1 Entstehung und Verbreitung

Seit der Entdeckung von HIV-1 *(human immunodeficiency virus)* als Ursache von AIDS *(acquired immunodeficiency syndrome)* im Jahr 1983 ^{2,3} wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, die Herkunft und die natürliche Entwicklungsgeschichte dieses Virus aufzuklären. HIV-1 bildet zusammen mit HIV-2 und SIV *(simian immunodeficiency virus)* die Untergruppe der Primaten-Lentiviren innerhalb der Gattung Lentiviren, die zur Familie der Retroviren *(Retroviridae)* gehören. Für die weltweite Pandemie ist hauptsächlich HIV-1 verantwortlich, während HIV-2 nur endemisch in Westafrika und Indien vorkommt und eine abgeschwächte Pathogenität aufweist ⁴.

SIV infiziert natürlicherweise nicht-humane Primaten (NHP) in Afrika und ist trotz einer hohen Virusreplikation meist nicht pathogen. Bis heute wurden über 40 verschiedene SIV Spezies beschrieben, die phylogenetisch in sechs Hauptgruppen unterteilt werden können. Diese Gruppen werden repräsentiert durch (1) SIVcpz aus dem Schimpansen (*chimpanzee; Pan troglodytes*) (2) SIVsmm aus Rußmangaben (*sooty mangabey; Cercocebus atys;* SM) (3) SIVagm aus afrikanischen grünen Meerkatzen (*african green monkey; Chlorocebus sp.;* AGM) (4) SIVsyk aus der Weißkehlmeerkatze (*Sykes' monkey; Cercopithecus albogularis*) (5) SIVlhoest aus der östlichen Vollbartmeerkatze (*I'Hoest monkey; Cercopithecus lhoesti*) und (6) SIVcol aus dem Mantelaffen (*mantled guereza; Colobus guereza*).

Aufgrund ihrer Genomausstattung mit akzessorischen Genen können die Primaten-Lentiviren in drei Subklassen unterteilt werden (siehe Bild 2.1): (1) SIVcpz-ähnliche Viren, die für Vpr und Vpu kodieren und die Viren der Gruppe HIV-1 einschließen, (2) SIVagm-ähnliche Viren, die nur *vpr* als akzessorisches Gen aufweisen und (3) SIVsmm- oder SIVmac-ähnliche Viren, die zusätzlich zu Vpr für Vpx kodieren und zu denen die Viren der Gruppe HIV-2 gehören. *Vpx* hat eine ausgeprägte Homologie mit dem benachbarten *vpr* Gen und ist vermutlich durch eine Genduplikation aufgrund nicht-homologer Rekombination entstanden ⁵. Auch *vpu* scheint über eine Rekombination ins Virusgenom integriert worden zu sein.



Bild 2.1: Genomorganisation der Primaten-Lentiviren. Einteilung der Primaten-Lentiviren anhand ihrer akzessorischen Gene. Gruppe a. kann basierend auf der Überlappung der *env* und *nef* Gene (grau schraffiert) in zwei weitere Untergruppen eingeteilt werden (nach Gordon *et al.*)⁶.

Genomanalysen führten zu der Hypothese, dass HIV-1 um 1930 von SIV-infizierten Schimpansen auf den Menschen übertragen wurde. Das älteste HIV Isolat mit vollständig bekannter Sequenz stammt aus dem Jahre 1959 aus der Republik Kongo in Zentralafrika ⁷. HIV-2 ging aus einer unabhängigen zoonotischen Übertragung von SIVsmm-infizierten Rußmangaben hervor. Insgesamt muss es mindestens sieben unabhängige Übertragungen von SIV auf den Menschen mit erfolgreicher Manifestation einer Infektion gegeben haben. Drei dieser Übertragungen waren ursächlich für die Entstehung der HIV-1 Gruppen M *(major),* N *(non-major)* und O *(outlier)*, die vier weiteren führten zur Entwicklung von HIV-2.

Es gibt verschiedene Theorien, warum es trotz häufiger Übertragungen von SIV auf andere Spezies erst Ende des letzten Jahrhunderts zu einer globalen Ausbreitung von HIV-1 in der menschlichen Population kam. Ursprünglich hat man angenommen, dass veränderte sozioökonomische Aspekte dafür verantwortlich sind, neueste Analysen gehen davon aus, dass der erfolgreiche Antagonismus des Restriktionsfaktors BST2 die weltweite Verbreitung des Virus möglich machte^{8,9}. BST2 (Tetherin) ist ein zelluläres Protein, das die Freisetzung von Viruspartikeln aus infizierten Zellen blockiert und strikt Spezies-spezifisch wirkt. Erst nach erfolgreicher Überwindung dieser Restriktion durch die Funktion des viralen Proteins Vpu der Gruppe M Viren von HIV-1, scheint es möglich geworden zu sein, die Spezies-Barriere dauerhaft zu überwinden.

Obwohl HIV im Menschen und SIV in nicht-natürlichen Wirten die Immunschwäche AIDS bzw. SAIDS (*simian AIDS*)¹⁰ verursacht, wird SIV im natürlichen Wirt traditionell als nichtpathogen beschrieben. Man geht davon aus, dass es im natürlichen Wirt zu einer evolutionären Anpassung von Virus und Wirt über mehrere Hunderttausend, wenn nicht Millionen Jahre kam ¹¹, so dass die Inkubationszeit der Erkrankung die Lebenszeit des Wirts überdauert. Kürzlich wurde jedoch berichtet, dass SIVcpz in Schimpansen pathogen ist ¹², so dass eine Infektion im natürlichen Wirt besser als nicht-progressiv bezeichnet wird. Die exakten molekularen Mechanismen und Unterschiede einer progressiven, pathogenen Infektion im nicht-natürlichen Wirt und einer nicht-progressiven Infektion im natürlichen Wirt sind derzeit Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Nachforschungen ^{13,14}. Hierfür wurden bereits zahlreiche Studien mit SIV im nicht-natürlichen Wirt v. a. den Rhesus Makaken durchgeführt ¹⁵.

2.1.2 Infektiosität und Pathogenität

HIV-1, HIV-2 und SIV teilen zunächst sehr ähnliche antigene und biologische *in vitro* Eigenschaften. So infizieren sie CD4-tragende Zellen (T-Zellen, dendritische Zellen und Makrophagen) des Immunsystems, wirken gleichermaßen zytopathisch ¹⁶ und zeigen prinzipiell einen ähnlichen Infektionsverlauf (siehe Bild 2.2).



Bild 2.2: Schematischer Verlauf einer HIV-1 Infektion. Veränderungen der mukosalen und peripheren CD4⁺ T-Zellzahlen, der Virämie und des relativen Levels der Immunaktivierung (nach Grossmann *et al.*)¹⁷.

Während der Primärinfektion mit HIV-1 (akute Phase) kommt es zunächst zu einer lokalen Ausbreitung der Viren im mukosalen Gewebe. Diese erste Phase der Infektion ist durch eine sehr hohe Viruslast im Blut (bis zu 10⁸ RNA Kopien/ml Plasma) charakterisiert ¹⁸. Ähnlich hohe Level der Virusreplikation konnten auch bei der akuten Infektion mit SIV im natürlichen Wirt (SM oder AGM) beobachtet werden ¹⁹. Es kommt zur Induktion einer zellulären und humoralen Immunantwort, die zunächst eine partielle Kontrolle der Infektion bewirkt. Während der chronischen, meist asymptomatischen Phase kommt es im Menschen zu einer Abnahme der Viruslast im Blut, die jedoch sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann und als prognostischer Marker für den Verlauf einer HIV-1 Infektion dient ²⁰. HIV-1 infizierte Menschen zeigen dabei eine deutlich geringere Viruslast im Plasma als SIV infizierte Makaken ²¹. Dies zeigt, dass eine hohe Virusreplikation allein für ein pathogenes Fortschreiten der Infektion und der Ausbildung von AIDS nicht ausreicht.

Zahlreiche Studien konnten bisher belegen, dass es sowohl bei der angeborenen als auch bei der erworbenen Immunantwort bedeutende Unterschiede zwischen einer progressiven Infektion im Menschen oder Makaken und einer nicht-progressiven Infektion in SM oder AGM gibt. So kommt es bei einer pathogenen Infektion zu einer dauerhaften Immunaktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie B-Zellen. Diese Immunaktivierung kann bei der nicht-pathogenen Infektion von SIV im natürlichen Wirt nur während der akuten Infektion beobachtet werden, nicht jedoch während der chronischen Phase ^{22,23}. Als ein Grund für die dauerhafte Aktivierung des Immunsystems wird die starke Depletion von TH17-Zellen im Gastrointestinaltrakt (GI-Trakt) verantwortlich gemacht. TH17-Zellen sind für die Regeneration von Epithelien in mukosalen Geweben essentiell. Ihr Verlust führt zu einer geringeren strukturellen und immunologischen Integrität der mukosalen Barriere im GI-Trakt, was eine gesteigerte mikrobielle Translokation und damit eine Stimulierung des Immunsystems zur Folge hat. Bei einer chronischen SIV Infektion im natürlichen Wirt konnte diese Abnahme an TH17-Zellen nicht beobachtet werden und damit auch keine gesteigerte mikrobielle Translokation ²⁴.

Eines der Charakteristika einer fortschreitenden HIV-1 Infektion ist die massive Depletion von CD4⁺ T-Zellen, besonders von mukosalen, CCR5-tragenden Gedächtniszellen, deren Zahl im Verlauf der Infektion stetig abnimmt ^{25,26}. Diese Zellen können direkt durch das Virus, über Apoptose oder durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) zerstört werden. Die Abnahme der Gesamtmenge an CD4⁺ T-Zellen im Blut kann unterschiedlich schnell erfolgen, wird jedoch ein Wert von 200 Zellen/µl Blut erreicht, so kommt es zum gehäuften Auftreten von opportunistischen Infektionen und der Ausbildung von AIDS. Auch während der akuten Phase einer SIV Infektion im natürlichen Wirt zeigen sich Veränderungen in der Anzahl an CD4⁺ T-Zellen ²⁷, jedoch bleibt die Zahl der mukosalen T-Zellen hierbei in der chronischen Phase stabil oder kann sogar wieder ansteigen ²⁸. Die natürlichen Wirte einer SIV Infektion exprimieren dabei generell weniger CCR5 auf CD4⁺ T-Zellen als die nicht-natürlichen Wirte. Auch sind sie teilweise in der Lage bei Aktivierung die Menge an CD4- (AGM) oder CCR5-(SM) Rezeptor auf ihrer Oberfläche zu verringern, was zu einer Reduktion der potentiellen Zielzellen einer Infektion führt. Das Immunsystem von natürlichen Wirten einer SIV Infektion scheint sich daher in eine Richtung evolviert zu haben, so dass Infektions-resistente T-Zellen die Funktionalität des Immunsystems, trotz eines hohen Levels an Virusproduktion, aufrecht erhalten können 14.

6

Der Induktion von SIV-spezifischen CTL und neutralisierenden Antikörpern konnte bislang keine bedeutende Rolle für ein Verhindern des Fortschreitens einer SIV Infektion im natürlichen Wirt zugesprochen werden ^{29,30}, obwohl diese adaptiven Immunantworten im Menschen und Makaken eine entscheidende Rolle spielen. So gibt es beim Menschen bestimmte HLA *(human leucocyte antigen)* Allele, wie z. B. B57 oder B27, die zur Kontrolle der Virusreplikation über CTL führen ³¹. In gleicher Weise wirken bestimmte MHC *(major histocompatibility)* I Allele (Mamu-A*01 oder Mamu-B*08) im Makaken ³² protektiv. Neben dieser genetischen Prädisposition, führt in seltenen Fällen die Bildung von breitneutralisierenden Antikörpern zur Kontrolle einer HIV-1 Infektion ^{33,34}. Bei einer SIV Infektion im natürlichen Wirt spielen Antikörperantworten jedoch keine wichtige Rolle. So hat bei infizierten AGM die vollständige Depletion ihrer B-Zellen in Blut, Lymphknoten und Darm keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf ³⁵.

Die Zahl der identifizierten Wirts-spezifischen, zellulären Restriktionsfaktoren, die eine Resistenz oder Suszeptibilität für eine Infektion vermitteln können, steigt stets weiter an. APOBEC3G *(apolipoprotein B mRNA-editing enzyme C)* ist ein zelluläres Protein, das mit in die Viruspartikel verpackt wird und bei erneuter Infektion einer Zielzelle zur Desaminierung des Minus-Stranges der DNA während der reversen Transkription führt. Dadurch kommt es zu G nach A Hypermutationen, was den Abbau des viralen Genoms zur Folge hat ³⁶. Die Bindung des viralen Proteins Vif an APOBEC3G kann jedoch dessen Degradation vermitteln und somit diesen Hypermutationen entgegen wirken ³⁷. HIV-1 Vif kann an humanes APOBEC3G binden und SIVagm Vif an APOBEC3G von AGM, nicht jedoch umgekehrt. Der zelluläre Restriktionsfaktor TRIM5α *(tripartite motif 5α)* kann die virale Replikation durch Bindung an Gag und Disassemblierung des Kapsids ebenfalls Spezies-spezifisch inhibieren. So kann Rhesus TRIM5α restriktiv gegen HIV-1, jedoch nicht gegen SIVmac wirken. Das homologe humane Protein zu TRIM5α dagegen kann andere Retroviren wie MLV (Moloney leukemia virus) inhibieren, nicht jedoch HIV-1 und SIV ^{38,39}.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das Fehlen einer progressiven Infektion im natürlichen Wirt nicht auf eine bessere Kontrolle der Virusreplikation durch das Immunsystem zurückzuführen ist. Vielmehr scheinen sich Mechanismen entwickelt zu haben, die nachteilige Auswirkungen einer hohen Virusreplikation auf das Immunsystem verhindern und eine dauerhafte, funktionelle T-Zell Immunfunktion aufrecht erhalten ⁴⁰. Ziel eines erfolgreichen Impfstoffs zur Prävention einer HIV-1 Infektion muss es daher sein, eine protektive anti-HIV Immunantwort zu generieren, die natürlicherweise nicht vorkommt.

2.1.3 Diversität und Variabilität von HIV-1

Laut aktuellem Stand der Weltgesundheitsorganisation (WHO) leben derzeit (Stand Ende 2010) rund 34 Millionen Menschen mit einer HIV Infektion. Seit 1999 ist die Zahl der Neuinfektionen um 19 % gesunken und die Anwendung der hochaktiven, antiretroviralen

Zahl weiter zunehmen wird.

Therapie (HAART) sorgt für eine sinkende Anzahl an AIDS-verursachten Todesfällen. Dennoch haben immer noch rund 53 % der Infizierten in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen keinen Zugang zu einer Behandlung. HIV-1 hat eine weltweite Pandemie verursacht, wobei die meisten HIV-positiven Menschen in Afrika südlich der Sahara leben (22,5 Millionen) und zu bestimmten Risikogruppen, wie z. B. Drogenabhängigen, Prostituierten oder homosexuellen Männern gehören. Der häufigsten Übertragungen finden über den Genitaltrakt durch ungeschützten Geschlechtsverkehr statt. Trotz intensiver wissenschaftlicher Forschungen und der Durchführung zahlreicher klinischer Studien gibt es immer noch keine wirksame Impfprophylaxe gegen HIV. Eine Ursache für die Schwierigkeit der Entwicklung einer globalen, prophylaktischen Vakzine ist die große Diversität und Variabilität des Virus. So gibt es nicht nur die zwei Virustypen, HIV-1 und HIV-2 (siehe 2.1.1) mit den Gruppen M, N und O bei HIV-1 sondern auch noch weitere Virus Subtypen, die innerhalb der Gruppe M von A - K klassifiziert werden. Darüber hinaus wird das Spektrum an Virusvarianten durch das Auftreten sog. circulating recombinant forms (CRF) erweitert. Diese entstehen durch Rekombination bei gleichzeitiger Infektion einer Zielzelle mit mehreren Subtypen. HI-Viren vom Subtyp A, D und C kommen hauptsächlich in Afrika vor, in West-Europa, Amerika und Australien treten gehäuft Viren vom Subtyp B auf. Weltweit werden derzeit die meisten Infektionen (48 %) von Viren des Subtyps C verursacht⁴¹. Subtyp E ist eigentlich eine rekombinante Form (CRF A/E) und kommt besonders in Asien und Osteuropa vor. Derzeit sind 51 CRFs der Gruppe M bekannt, die Sequenzen von bis zu sieben unterschiedlichen Subtypen tragen ⁴². Durch die derzeitige schnelle Verbreitung von HIV-1 in Asien und Osteuropa ist davon auszugehen, dass diese

Zusätzlich zu dieser Diversität, weisen HI-Viren eine große Variabilität auf. Diese ist zum einen begründet durch die Ungenauigkeit der viruseigenen Reversen Transkriptase, die nach erfolgreicher Infektion einer Zielzelle das ssRNA Genom des Virus in dsDNA umschreibt. Zun anderen kann das zelluläre Protein APOBEC3G (siehe 2.1.1) zu der Entstehung neuer Virusvarianten beitragen. Durch den Selektionsdruck des Immunsystems, der besonders durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen und neutralisierende Antikörper aufgebaut wird, kommt es dabei stets zur Selektion neuer Virusvarianten, die vom ursprünglichen *Founder* Virus abweichen und sich der induzierten Immunantwort entziehen können. Dies führt zur Bildung einer sog. viralen Quasispezies in einem infizierten Individuum ⁴³.

Im Verlauf einer Infektion können so auch Virusvarianten mit neuen phänotypischen Eigenschaften entstehen, wie z. B. der Verwendung eines zusätzlichen Korezeptors, was die Infektion eines neuen Spektrums an Zielzellen ermöglichen kann.

2.1.4 Korezeptor-Verwendung

Für die erfolgreiche Infektion einer CD4⁺ Zelle benutzen alle drei Primaten-Lentiviren HIV-1, HIV-2 und SIV hauptsächlich den Chemokin Rezeptor CCR5⁴⁴. Eine Ausnahme innerhalb der SIV Spezies stellt SIVrcm dar, das Rotkappenmangaben, die eine 24 bp Deletion im CCR5 Gen tragen, hauptsächlich über die Verwendung von CCR2 infiziert⁴⁵. Generell ist das *in vitro*, in Korezeptor-transfizierten Zelllinien und PBMCs, das Spektrum der verwendeten Korezeptoren bei SIV deutlich größer ist als bei HIV-1. So kann SIV neben CCR5 auch CCR3, CCR4, CCR8, Bonzo (STRL33) und G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie Bob (GPR15) für die Infektion einer Zielzelle verwenden ⁴⁶. Ob diese alternativen Korezeptoren auch *in vivo* und bei der Pathogenese von SIV eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht geklärt. Es gibt jedoch erste Studien, die darauf hindeuten, dass SIV auch *in vivo* alternative Korezeptoren zu CCR5 verwendet ^{47,48}.

Für HIV-1 ist neben CCR5 die Verwendung von CXCR4 als alternativer Korezeptor beschrieben. Viren, die CCR5 als Korezeptor benutzen werden als R5-trop bezeichnet, Viren, die CXCR4 benutzen als X4-trop und Viren, die beide Korezeptoren benutzen als R5X4- oder dualtrop. Dual- oder X4-trope Viren werden nur selten übertragen. Jedoch kommt es bei rund 50 % der Viren des Subtyps B im Verlauf der Infektion zu einem Korezeptor Wechsel hin zu CXCR4, was in der Regel mit dem Beginn von AIDS assoziiert ist ^{49,50}. Für den Wechsel in der Korezeptor Präferenz spielt die Aminosäure Sequenz der V3-Region (variable Region 3) im gp120-Bereich von HIV-1 Env eine wichtige Rolle. Von besonderer Bedeutung sind hier die Aminosäuren an Position 11, 24 und 25 (11/24/25-Regel) ⁵¹. Veränderungen an diesen Positionen, die eine Erhöhung der absoluten Netto-Ladung der V3-Region zur Folge haben, führen dabei zu einer gesteigerten Verwendung von CXCR4. Diese Regel konnte durch Vorhersage und anschließende experimentelle Bestimmung des Korezeptor Tropismus von 217 Virusisolaten zu 94 % bestätigt werden ⁵¹.

Der evolutionäre Prozess, der zur Bildung von X4-tropen Viren führt, scheint ein Ergebnis des Versagens des Immunsystems zu sein. Da X4-trope Viren besser neutralisiert werden können als ihre ursprünglichen R5-tropen Vorläufer^{52,53}, ist eine Schwächung des Immunsystems eine Voraussetzung für ihre Entstehung. Mutationen in der V3-Region führen dabei zunächst zu einer mehr "offenen" Konformation von gp120, die das Einfügen weiterer Mutationen, die zu einem Korezeptor-Wechsel führen können, erleichtern, ohne dass es zu Fitnessdefiziten für das Virus kommt^{54,55}. Während v. a. naive CD4⁺ Gedächtniszellen CXCR4 stark exprimieren, wird CCR5 *in vivo* hauptsächlich auf aktivierten CD4⁺ Gedächtniszellen exprimiert. Diese sog. *effector memory* Zellen (T_{EM}) stellen damit den Hauptanteil der Zielzellen einer HIV-1 Infektion dar⁵⁶.

Warum es bei Viren vom Subtyp C nur selten zu einem Korezeptor Wechsel kommt, ist derzeit noch nicht geklärt. Ein Grund könnte sein, dass bei Subtyp C Viren hierfür mehr

Mutationen notwendig sind als bei Viren vom Subtyp B, was jedoch häufig auch mit einem Verlust der Virusfitness assoziiert ist und sich daher seltener durchsetzen kann ⁵⁷.

2.2 Die HIV-1 Vakzineentwicklung

2.2.1 Herausforderungen an die Vakzineentwicklung

In den 28 Jahren seit der Entdeckung von HIV ist es zwar gelungen, zahlreiche antiretrovirale Medikamente zu entwickeln, jedoch gibt es immer noch keine präventive Impfprophylaxe. Bis heute wurden zwar bereits über 35 HIV-1 Impfstoff Kandidaten in rund 150 klinischen Phase I und Phase II Studien gestestet ⁵⁸, jedoch konnten diese bisher keinen ausreichenden Schutz vor einer Infektion vermitteln. Trotz wirksamer Therapie ist eine HIV-1 Vakzine jedoch absolut erstrebenswert. So ist eine HAART Therapie sehr teuer und für viele infizierte Menschen in Ländern der dritten Welt nicht zugänglich. Auch leiden HAART Patienten oft unter ernsthaften Therapie Nebenwirkungen und das Auftreten von Resistenzen erfordert eine ständige Überwachung und Anpassung der Medikation. Um die weitere Ausbreitung der HIV-1 Pandemie mit weltweit rund 7500 Neuinfektionen pro Tag einzuschränken, ist eine prophylaktische Vakzine daher immer noch im Fokus der Wissenschaft und von hohem gesellschaftlichen Interesse.

Die Gründe, warum die bisher getesteten Vakzinekandidaten noch keine durchschlagenden Erfolge erzielen konnten, sind vielfältig. Zum Einen weisen HI-Viren eine große Diversität und Variabilität (siehe 2.1.3) auf. Zum Anderen ist noch immer kein Korrelat einer schützenden Immunantwort bekannt ⁵⁹, d. h., dass es trotz einer Vakzine-vermittelten Bildung von neutralisierenden Antikörpern und HIV-1 spezifischen CTL Antworten in einem Individuum zu einer Infektion kommen kann. Außerdem kann das Virus eine Latenz etablieren, während der es für das Immunsystem nicht sichtbar ist. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Verwendung eines geeigneten Tiermodells für die Testung von Vakzinekandidaten dar. Als am besten geeignetes Tiermodell hat sich bisher die Infektion von Rhesus Makaken mit SIVmac oder chimären Viren aus SIV und HIV erwiesen (siehe 2.3), jedoch sind auch die Ergebnisse aus diesen Studien manchmal nur bedingt auf den Menschen übertragbar ⁶⁰.

2.2.2 Aktuelle Ansätze zur Entwicklung einer HIV Vakzine

Eine optimale Vakzine sollte sicher, in großen Mengen verfügbar und gut tolerierbar sein. Darüber hinaus sollte sie eine effektive, lang-anhaltende und möglichst breite Immunantwort, bestehend aus neutralisierenden Antikörpern, und polyfunktionalen CTL, die möglichst viele Virus Subtypen erkennen, hervorrufen. Neutralisierende Antikörper könnten dabei protektiv an potentiellen Eintrittspforten, beispielsweise in den mukosalen Geweben des Genitaltrakts wirken und so die Etablierung einer systemischen Infektion verhindern. CTL könnten einen therapeutischen Effekt auf eine Infektion haben, indem sie zwar keine Infektion verhindern, aber die Viruslast deutlich senken, und damit das Pathogenitätsrisiko und die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung minimieren.

2.2.2.1 Induktion protektiver CTL Antworten

Erste humane Studien für die Entwicklung einer protektiven HIV-1 Vakzine zielten auf die Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch rekombinantes gp120 oder gp160 Protein ab. Dieser Ansatz zeigte zunächst jedoch wenig Erfolg^{61,62}. So verlagerte sich der Fokus auf die Entwicklung einer T-Zell Vakzine, die Virus-spezifische zytotoxische CD8⁺ T-Zellen hervorrufen kann. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass CTLs die Virusreplikation kontrollieren können, und so zu einer nicht-progressiven Infektion führen ^{63–65}. Dabei spielen v. a. T-Zellen, die konservierte Epitope von HIV-1 Gag oder Pol erkennen eine wichtige Rolle ⁶⁶.

Eine erfolgreiche T-Zell Vakzine sollte möglichst früh starke und breite, polyfunktionale CD8⁺ Effektor Gedächtniszellen hervorrufen ⁶⁷. Hierzu werden derzeit hauptsächlich verschiedene heterologe Prime - Boost Immunisierungsstrategien unter der Verwendung unterschiedlicher DNA- oder viraler Vektor-Systeme eingesetzt. Dabei kommen entweder atteniuerte oder Replikations-inkompetente rekombinante virale Vektoren, die meist von Pockenviren oder Adenoviren abgeleitet sind, zum Einsatz ^{68,69}. Solche Vakzineansätze konnten in Studien mit nicht-humanen Primaten bereits deutliche CD8⁺ Antworten generieren und nach Challenge mit dem pathogenen SIVmac die Viruslast während der chronischen Phase der Infektion deutlich senken sowie zu einem längeren Überleben führen ^{70–72}. Entsprechende humane klinische Phase I und Phase II Studien zeigten jedoch nur mäßige Erfolge⁷³. Besonders der Abbruch der Phase IIb STEP Studie von Merck im September 2007 bedeutete einen herben Rückschlag für die Entwicklung einer erfolgreichen T-Zell Vakzine. Nach Immunisierung mit einem Replikations-inkompetenten Ad5-Vektor (Expression von HIV-1 Gag, Pol und Nef), konnte trotz der Detektion von HIV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in 73 % der Probanden kein Vakzine vermittelter Schutz vor Infektion und keine gesteigerte Kontrolle der Replikation nachgewiesen werden ^{74,75}. Post hoc wurde sogar ein erhöhtes Infektionsrisiko bei unbeschnittenen, Ad5-seropositiven Männern festgestellt.

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die genetische Ausstattung eines Menschen mit unterschiedlichen HLA-Typen für die Art und Anzahl der über MHC I präsentierten Epitope und damit der Erkennung durch CTL äußerst wichtig ist. Es gibt bestimmte HLA-B Typen, die günstig für die Kontrolle der Viruslast sind. Dies ist besonders bei den sog. *Elite Controller* der Fall, die ihre Viruslast sogar bis unter die Nachweisgrenze senken können⁷⁶.

Durch den Selektionsdruck des Immunsystems und der ständigen Entstehung neuer Virusmutanten, kann es jedoch immer wieder zu neuen *Escape* Mutanten kommen, die nicht

mehr sensitiv für die bestehenden Immunantworten sind. Die Entwicklung einer sog. Mosaik-Vakzine, die möglichst breite Immunantworten induzieren soll, versucht diesem Phänomen entgegenzutreten. Auch soll auf diese Weise das Problem der Sequenzdiversität von HIV-1 in den Griff bekommen werden ^{77,78}.

Da es mittlerweile als sicher gilt, dass bei einer mukosalen Übertragung die Infektion durch ein *Founder* Virus hervorgerufen wird, gibt es neue Ansätze zur Entwicklung einer T-Zell Vakzine, die bereits während dieser frühen Phase in den Infektionsprozess eingreift ⁷⁹. Diese Ansätze fokussieren sich, durch die Verwendung von persistierenden Vektoren, die zu einer lang anhaltenden Antigen Produktion auf niedrigem Level führen, auf die Induktion von aktivierten, CD8⁺ Effektor Gedächtniszellen (T_{EM}). Diese T_{EM}-basierten Antworten sind typisch bei persistierenden Pathogenen und konnten bereits durch die Verwendung eines Rhesus CMV-Vektors in NHP Studien induziert werden und vor einer Infektion mit dem pathogenen SIVmac239 schützen ^{80,81}.

2.2.2.2 Induktion breit-neutralisierender Antikörper

Eine protektive Immunantwort, die eine systemische Infektion verhindert, könnte durch die Induktion von neutralisierenden Antikörpern durch das HIV-1 Hüllprotein Env vermittelt werden. In NHP Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch die passive Administration von neutralisierenden Antikörpern in der genitalen Mukosa eine Infektion mit pathogenem SHIV verhindert werden kann^{82–84}.

Obwohl HIV-1 effizient Antikörperantworten hervorrufen kann, wirken diese Antikörper meist nicht neutralisierend oder sie sind gegen variable Regionen von Env gerichtet und das Virus kann sich der Antikörperantwort durch Mutation entziehen ^{85,86}. Konservative, neutralisationssensitive Epitope sind dagegen oft nicht stark immunogen, da sie entweder durch die räumliche Konformation des gp120 Trimers oder durch Glykosylierungen abgeschirmt werden oder nur transient während der Fusion mit einer Zielzelle zugänglich sind ^{87–89}.

Bei ca. 20 % der chronisch HIV-1 infizierten Individuen kommt es dennoch zur Ausbildung von neutralisierenden Antikörpern, die in 2 - 4 % der Individuen sogar breit-neutralisierend wirken ⁹⁰, d.h. gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Isolaten diverser HIV-1 Subtypen gerichtet sind. Breit-neutralisierende Antikörper treten jedoch häufig erst Jahre nach der Primärinfektion auf und können daher nicht vor dem Fortschreiten einer Infektion schützen ⁹¹. In den letzten Jahren konnten mittels intensiver *Screening* Verfahren einige breit-neutralisierende, monoklonale Antikörper isoliert und im Anschluss rekombinant hergestellt werden ^{92–95}. Durch zahlreiche Strukturanalysen wurden die Interaktionen des Env Proteins mit einigen dieser Antikörper sehr genau charakterisiert ^{95–98}. So konnte festgestellt werden, dass alle bisher bekannten breit-neutralisierenden Antikörper entweder an die konservierte CD4-Bindestelle in gp120, an die MPER *(membrane proximal external region)* von gp41, bestimmte Quartärstrukturen der V2 bzw. V3 *loops* oder an Karbohydrate des Glykanschilds

binden (siehe Bild 2.3) ⁹⁹. Diese Erkenntnisse sollen nun das rationale Design von Env Immunogenen ermöglichen, die *in vivo* zur Induktion dieser breit-neutralisierenden Antikörper in hohen Titern führen.

Da viele breit-neutralisierende Antikörper erst eine umfangreiche Affinitätsreifung durchlaufen müssen und ungewöhnliche Charakteristika, wie z. B. eine besonders lange CDR3 Region in der schweren Kette oder eine Polyreaktivität mit zellulären Lipiden aufweisen, bleibt dies eine Herausforderung.



Bild 2.3: Modell des HIV-1 Env Trimers und Epitope von bekannten, neutralisierenden Antikörpern. Die Kernstruktur von gp120 (braun) im Elektronendichtebild (grau) des Trimers. Variable loops sind als Ovale dargestellt (hellgrün und hellblau). Glykane sind grün und blau dargestellt (nach Burton und Weiss ¹⁰⁰).

Die RV144-Studie in Thailand konnte zeigen, dass es durchaus möglich ist, mit Hilfe eines Impfstoffs eine anti-HIV-1 Immunität hervorzurufen. Für diese Studie wurden über 16.000 Probanden mit relativ geringem Infektionsrisiko mit einem *Canarypox* Virus (ALVAC-HIV) als *Prime* und einem gp120 Protein (AIDSVAX B/E) als *Boost* immunisiert ¹⁰¹. ALVAC-HIV von Sanofi-Pasteur kodiert für Subtyp B Gag und Pro sowie Subtyp E gp120 und Subtyp B gp41. Im Vergleich zur Placebo Gruppe konnte dabei in der Vakzine Gruppe eine Reduktion der Neuinfektionsrate um 31 % beobachtet werden. Es konnten starke, wenn auch nur transiente Antikörper- und CD4⁺-Antworten generiert werden, jedoch keine CD8⁺-Antworten. In vakzinierten Probanden, die eine Neuinfektion aufwiesen, konnte keine Reduktion der Viruslast beobachtet werden. Obwohl die immunologischen Korrelate, die zu einem partiellen Schutz vor Infektion geführt haben noch nicht exakt bestimmt werden konnten, geht man davon aus, dass Antikörper-vermittelte Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Bei den induzierten Antikörpern handelt es sich zwar nicht um Breit-Neutralisierer, jedoch können sie eine ADCC *(antibody-mediated cell cytoxicity)* vermitteln. Dies steht in Einklang mit einer Reihe kürzlich veröffentlichter Publikationen, die andere Antikörper-vermittelte Mechanismen

als eine breite Virusneutralisation für eine antivirale Aktivität verantwortlich machen. Hierzu zählen neben der bereits erwähnten ADCC, die ADCVI *(antibody-dependant cell-mediated viral inhibition)*, das Antikörper-vermittelte Festhalten von Virionen in mukosalen Geweben und die Inhibition viraler Translokation durch Epithelien ^{102,103}.

Obwohl derzeit an der Entwicklung sehr unterschiedlicher Vakzinestrategien gearbeitet wird, von denen noch keine zu einem durchschlagenden Erfolg in klinischen Studien geführt hat, ist es durchaus möglich, dass es durch die Kombination der unterschiedlichen, voneinander unabhängigen Ansätze zu einem synergistischen Anstieg der Effizienz einer Vakzine kommt ⁴⁰. Für die präklinische Evaluierung der verschiedenen Vakzineansätze, wahlweise in Kombination mit diversen Adjuvantien, unter der Verwendung unterschiedlicher Immunisierungsstrategien ist es unerlässlich geeignete Tiermodelle einzusetzen.

2.3 Tiermodelle für die Evaluierung von HIV-1 Vakzinekandidaten

Eine weitere Herausforderung stellt die Neu- und Weiterentwicklung geeigneter Tiermodelle zur präklinischen Evaluierung von möglichen HIV-1 Vakzinekandidaten dar. Aufgrund der Spezies-Spezifität, konnten bisher nur Schimpansen, Gibbons und Hasen mit HIV-1 infiziert werden, jedoch zeigte keine dieser Tierspezies die Entwicklung einer Immunschwäche vergleichbar mit AIDS¹⁰⁴. Es konnten zwar einige Tiermodelle mit humanisierten Mäusen, wie z. B. NOD/SCID- oder Rag2-/-yc-/- Mäusen entwickelt werden, die sich zur Studie der HIV-1 Pathogenese eignen, jedoch ließen sich in Vakzine Studien nur unzureichende HIV-spezifische Immunantworten nachweisen^{105,106}. Außerdem ist es im Mausmodell nicht möglich einen eventuellen Vakzine-vermittelten Impfschutz durch ein *Challenge* Virus zu testen.

Ein optimales Tiermodell sollte nach Infektion eine pathologische Immunreaktion zeigen, die der im Menschen sehr ähnlich ist. Auch sollten die Übertragungswege, betroffene Zellen und Gewebe sowie der Krankheitsverlauf möglichst vergleichbar sein. Da Schimpansen phylogenetisch sehr nahe mit dem Menschen verwandt sind, ein dem Menschen ähnliches Immunsystem aufweisen ¹⁰⁷ und HIV-1 Schimpansen infizieren kann, würden sie sich gut als Tiermodell eignen. Jedoch entwickeln Schimpansen nur selten mit AIDS vergleichbare Krankheitssymptome ^{108,109}. Weitere Nachteile der Verwendung von Schimpansen als Tiermodell, sind die hohen Kosten sowie ethische Bedenken beim Einsatz dieser hoch entwickelten Primaten.

Da SIVmac, ähnlich HIV-1 im Menschen, in diversen Makakenspezies replizieren und SAIDS verursachen kann ¹¹⁰ und Makaken relativ gut in Gefangenschaft zu halten sind, hat sich das SIV-Rhesusaffen-Modell zur Studie der viralen Pathogenese durchgesetzt.

2.3.1 Das SIV-Rhesusaffen-Modell

Dieses nicht-humane Primatenmodell eignet sich neben der Studie der Pathobiologie von HIV-1 auch zur Analyse von Virus – Zell Interaktionen, Immunreaktionen und der Effektivität antiretroviraler Wirkstoffe¹¹¹. Auch können bereits sehr frühe Stadien der Infektion untersucht werden, was im Menschen bisher nur sehr eingeschränkt möglich war. Die Möglichkeit zur Entnahme größerer Gewebemengen und der Durchführung vergleichender Studien zwischen natürlichem und nicht-natürlichem Wirt einer SIV Infektion, sind weitere Vorteile dieses Tiermodells¹⁴. Der zeitliche Verlauf der Virusreplikation und des Krankheits-Fortschritts ist jedoch deutlich schneller als in HIV-infizierten Menschen und die immunologischen und virologischen Phänomene in Rhesus Makaken spiegeln nicht immer eine humane Infektion wieder (siehe 2.1.2). Auch scheint eine Infektion mit SIVmac basierten *Challenge* Viren deutlich aggressiver zu sein als eine typische klinische Infektion mit HIV-1, da es zu einem früheren Maximum der primären Virämie und deutlich erhöhten (10 -100fach) Replikationsleveln kommt⁴⁰.

Klinische Studien wie die STEP Studie oder die RV144 Studie können im NHP Modell wiederholt und nachvollzogen werden und ermöglichen so die Bestimmung weiterer Details und Korrelate der hervorgerufenen Immunantwort^{112,113}. Jedoch hat die STEP Studie gezeigt, dass die derzeit verwendeten NHP Modelle, so wie sie bisher angewandt wurden, zu irreführenden oder nicht übertragbaren Schlussfolgerungen führen können⁶⁰. Auch haben abweichende Ergebnisse bei der Verwendung unterschiedlicher SIV Subtypen (z. B. SIVmac251 und SIVsmE660) Zweifel an der Aussagekraft beobachteter Immunantworten aufkommen lassen⁴⁰. Diese Erkenntnisse haben einen neuen Fokus auf wiederholte, niedrig-dosierte mukosale Belastungsinfektionen in NHP gelegt, wie sie z. B. bereits für die Evaluierung einer RhCMV/SIV Vakzine angewandt wurden.

2.3.2 Das SHIV-Rhesusaffen-Modell

Aufgrund einiger genetischer und struktureller Unterschiede der SIV und HIV-1 Hüllproteine sowie verschiedener MHC-Typen, ist die Übertragung von Ergebnissen aus SIV Vakzinestudien auf den Menschen nur bedingt möglich ¹¹⁴. Dies wurde durch den Misserfolg der STEP Studie, der eine vielversprechende homologe Ad5-SIVgag Studie in Makaken vorausging ¹¹⁵, verdeutlicht. Auch zeigt die limitierte Kreuzreaktivität und das Fehlen einer Kreuzneutralisation von Antikörpern, dass SIV und HIV-1 Env deutlich unterschiedliche antigene Eigenschaften aufweisen ¹¹⁶. Um HIV-1 Env Vakzinekandidaten im Rhesus Makaken Modell testen zu können, wurden sog. SHIVs *(chimeric simian/human immunodeficiency viruses)* konstruiert, die sowohl SIV als auch HIV-Sequenzen tragen (siehe Bild 4.10). Auf Basis des pathogenen SIVmac239 konnten so Viren hergestellt werden, die HIV-1 *tat, rev, env* und *vpu* anstelle der analogen SIV Gene kodieren und eine Infektion von Primaten, bei gleichzeitiger Analyse von HIV-1 *env* Eigenschaften ermöglichen ^{117,118}. Hierzu zählen neben der Korezeptorverwendung besonders die Virus-Persistenz und Pathogenese ¹¹⁹. Pathogene SHIVs können als *Challenge* Viren für die *in vivo* Analyse von HIV-1 *env* Vakzinekandidaten eingesetzt werden. Da die meisten natürlichen Übertragungen von HIV-1 durch R5-trope Viren verursacht werden (siehe 2.1.4), sollten pathogene SHIVs bevorzugt CCR5 als Korezeptor verwenden und über mukosale Gewebe übertragbar sein.

Es konnten bisher zahlreiche X4-, dual- und R5-trope Subtyp B SHIVs ^{1,118,120-126} sowie Varianten, die env-Sequenzen von HIV-1 Subtyp C¹²⁷⁻¹³¹, A oder E tragen ^{132,133}, hergestellt werden. Diese Viren wurden auf ihre Infektiosität, Replikationsfähigkeit, ihren Zell- und Gewebstropismus sowie ihre induzierten Immunantworten und ihr pathogenes Potential untersucht. Dabei zeigte sich, dass sie initial zu keinem Krankheitsbild ähnlich dem durch SIVmac induzierten SAIDS führten. Erst nach serieller in vivo Passagierung und damit möglicher Adaption, kam es zur Entstehung von pathogenen Viren, die eine zu AIDS vergleichbare Krankheit in infizierten Makaken auslösen konnten ^{123,134–136}. Die meisten und am besten untersuchten dieser pathogenen SHIVs sind X4-trop oder dualtrop und tragen Subtyp B *env*-Sequenzen, wie z. B. SHIV-89.6P ^{123,137,138}. Es zeigte sich, dass diese Viren sowohl intravenös, intrarektal als auch intravaginal übertragen werden können und es somit keine Barriere für die mukosale Übertragung gibt ¹³⁹. Jedoch weicht der klinische Verlauf einer X4-tropen SHIV Infektion stark von der HIV-1 Infektion des Menschen ab. So kommt es zu einer schnellen, starken Depletion der CXCR4-tragenden Zielzellen im Blut und sekundären lymphatischen Organen wie den Lymphknoten und dem Thymus. Dies ist begleitet von einer sehr hohen Viruslast im Blut und dem schnellen Auftreten erster Krankheitszeichen innerhalb von 12 – 30 Wochen nach Infektion ^{123,140,141}. Im Gegensatz dazu kommt es bei R5-tropen, pathogenen SHIVs, ähnlich einer HIV-1 Infektion im Menschen, nur zu einer graduellen und weniger starken Abnahme der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut und den sekundären lymphatischen Organen, bei gleichzeitiger starker Depletion der Effektor Gedächtniszellen im GI-Trakt und den Lungen^{142,143}. Es kann dabei auch zu einem Wechsel des verwendeten Korezeptors kommen, wofür vergleichbar zu HIV-1 Sequenzveränderungen in der V3-Region verantwortlich sind ^{54,55,144}. Weitere analoge Veränderungen in der env-Sequenz von HIV-1 und diversen SHIVs sprechen dafür, dass diese Viren einem ähnlichen Selektionsdruck in vivo ausgesetzt sind ¹⁴⁵ und zeigen die Validität des SHIV-Rhesusaffen-Modells auf.

Da bisher nur wenige pathogene, R5-trope SHIVs zur Verfügung stehen, ist es für die aussagekräftige Evaluierung neuer *env* Vakzinekandidaten in homologen und heterologen *Challenge* Modellen in Rhesus Makaken sehr wichtig, dass weitere, neue SHIVs hergestellt werden, die die Diversität der HIV-1 Subtypen und Isolate widerspiegeln. Kürzlich konnten

SHIV-Varianten generiert werden, die auf demselben HIV Isolat basieren, sich jedoch bezüglich ihrer Neutralisations-Sensitivität unterscheiden und so eine genauere Charakterisierung einer Env-vermittelten Protektion ermöglichen, als dies mit nur einem 146 Virus möglich ist Darüber hinaus bieten SHIVs zahlreiche zusätzliche Anwendungsmöglichkeiten, wie z. B. die Evaluierung des Schutzes von NHP vor pathogener Infektion nach Verabreichung monoklonaler breit-neutralisierender Antikörper oder einer Präexpositionsprophylaxe mit Tenofovir^{83,84,147}.

Für die Bewertung von HIV-1 *env* Vakzinekandidaten sollten zukünftig möglichst verschiedene homologe und heterologe pathogene SHIVs in wiederholten niedrig-dosierten, mukosalen *Challenges* verwendet werden. In Kombination mit der Auswahl bestimmter Makaken mit einer möglichst breiten genetischen Ausstattung an MHC-I Allelen könnte so das SHIV-Rhesusaffen-Modell auch in Zukunft wertvolle Ergebnisse in Hinblick auf die Effektivität einer HIV-1 Vakzine ermöglichen.

2.4 BAC-Technologie

2.4.1 Historie der viralen BAC-Vektoren

Die Möglichkeit, vollständige virale DNA-Genome als Bacterial Artificial Chromosomes (BACs) zu klonieren, hat seit Ende der 1990er Jahre die genetische Manipulation von Herpesviren stark vereinfacht. BACs sind Plasmid-Vektoren auf Basis des Fertilitäts-Faktors von Escherichia coli (E. coli), replizieren stabil in einer geringen Kopienanzahl (ca. 1-2 Kopien/Zelle) und ermöglichen die Insertion von großen DNA-Fragmenten¹⁴⁸. Mittlerweile konnten bis auf das humane Herpesvirus 7 (HHV-7), alle humanen Herpesviren und einige bedeutende tierpathogene Herpesviren als BAC hergestellt werden ¹⁴⁹. Dazu zählen Herpes simplex virus 1 und 2 (HSV-1 und HSV-2), Varizella zoster Virus (VZV), Epstein-Barr-Virus (EBV), das humane Cytomegalievirus (HCMV), das Kaposi Sarkom-assoziierte Herpesvirus (KSHV) sowie das murine Cytomegalievirus (mCMV), Pseudorabies Virus (PrV) und Herpesvirus saimiri (HVS). Ebenso konnte das Baculovirus Genom ¹⁵⁰, sowie die Kuhpockenviren (CPXV)¹⁵¹ und das Modified Vaccinia Ankara Virus (MVA)¹⁵² als BAC hergestellt werden. Allen diesen Konstrukten ist gemeinsam, dass die BAC-Vektorkassette, basierend auf dem MiniF Plasmid von E. coli, ins Virusgenom integriert wurde. Da dies zu genetischen und phänotypischen Veränderungen des Virus führen kann, wurden Systeme zur Entfernung der Vektorsequenzen nach erfolgreicher Mutagenese entwickelt ^{153–155}.

Kürzlich wurde auch die Herstellung von ersten BAC-HIV-Konstrukten beschrieben ¹⁵⁶. Diese wurden über Cre - loxP Rekombination hergestellt und bisher nicht weiter über Mutagenese verändert.

Virale BACs sind in *E. coli* sehr stabil und können über Transposonmutagenese oder über homologe Rekombination verändert werden ^{157,158}. Während über Transposonmutagenese

aufgrund zufälliger Insertion eine breite Vielfalt an Mutanten hergestellt werden kann, erlaubt die Anwendung der homologen Rekombination eine sehr präzise, zielgerichtete Mutagenese. Es können sowohl spezifische Insertionen, Deletionen als auch Punktmutationen in das virale Bacmid eingebracht werden.

2.4.2 BAC-Mutagenese über homologe Rekombination

Zur zielgerichteten BAC-Mutagenese über homologe Rekombination in Bakterien können prinzipiell zwei verschiedene Rekombinationssysteme verwendet werden. Das bakterielle *RecA* System ^{159,160} benötigt sehr große homologe DNA-Bereiche und eignet sich daher eher zur Einführung von kleinen Mutationen, die nur wenige Nukleotide umfassen, z. B. das Einfügen von neuen Restriktionsschnittstellen. Im Gegensatz dazu benötigt das Red-System des Bakteriophagen λ nur sehr kurze homologe Bereich von ca. 35 - 50bp ^{161–163} und stellt eine wesentlich effizientere Möglichkeit dar, größere Insertionen oder Deletionen in BACs einzufügen. Es wird daher heute meist dem *RecA* System vorgezogen, wobei auch eine Kombination der beiden Systeme zur Steigerung der Häufigkeit einer homologen Rekombination möglich ist ¹⁶⁴.

2.4.2.1 Das Red-Rekombinationssystem des Bakteriophagen λ

Das λ Red-System basiert auf dem ET-System des Rac Prophagen ¹⁶⁵. Da es jedoch aufgrund einer zusätzlichen Proteinfunktion deutlich effizienter ist als das ET Cloning System und überdies auch in recBC⁺ Bakterienstämmen verwendet werden kann, hat es sich als (recombination-mediated genetic Standard Recombineering engineering) System durchgesetzt ^{166,167}. Für die Red-Rekombination werden die drei Gene exo, bet und gam des λ Phagen verwendet. λ exo kodiert für eine 5'-3' Exonuklease, die lineare dsDNA abbaut. Bet kodiert für das β Protein, das an die entstehenden einzelsträngigen DNA-Überhänge bindet und die Bindung an komplementäre DNA-Sequenzen vermittelt, wobei es nicht Stranginvasiv wirkt wie das bakterielle RecA. Das durch gam kodierte y Protein schließlich inhibiert die Aktivität der bakteriellen Nukleasen RecBCD und schützt somit lineare dsDNA-Fragmente vor dem Abbau¹⁶⁸. Zur Proteinexpression kann ein in das *E. coli* Genom stabil integrierter, defekter Prophage unter der strikten Kontrolle eines temperatur-sensitiven Repressors, kodiert durch das cl857 Allel, verwendet werden ¹⁶¹. Die erforderlichen Rekombinationsproteine werden hierbei durch einen kurzen Hitzeshift der Bakterienkulturen von ca. 15 min auf 42 °C exprimiert und es kommt zu einer homologen Rekombination unabhängig von RecA. Bekannte DH10B-basierte Rekombinationsstämme, die dieses System integriert haben, sind DY331, DY380 sowie deren Abkömmlinge EL250, EL350 oder GS1783. Alternativ können die drei λ Gene exo, bet und gam auch auf einem low-copy Plasmid unter der Kontrolle des durch L-Arabinose induzierbaren ParaB Promotors exprimiert werden, wie z. B. in pKD46¹⁶⁹. Ein Nachteil dieses Systems ist jedoch, dass es durch eine

leaky Proteinexpression von λ gam zu einem RecBCD Defekt kommen kann, was zu Plasmidinstabilitäten und zu einem Verlust der Zellviabilität führen kann ¹⁶². Von Court *et. al.* wurde ein System entwickelt, das die beiden oben geschilderten Systeme kombiniert und die Expression der Phagenproteine auf einem Plasmid unter der Kontrolle des temperatursensitiven Repressors CI857 ermöglicht ¹⁷⁰.



Bild 2.4: Schema zur Funktionsweise der Red-Rekombination des Bakteriophagen λ . Lambda Exo bindet an lineare dsDNA und degradiert diese in 5' - 3' Richtung. Lambda Beta bindet an die entstehenden ssDNA-Überhänge, stabilisiert diese und vermittelt die Bindung an komplementäre DNA-Sequenzen. Lambda Gam inhibiert die bakteriellen Nukleasen RecBCD.

Da eine homologe Rekombination auf Basis des Red-*Recombineering* ein sehr seltenes Ereignis ist, müssen geeignete Selektionsverfahren angewendet werden, um positive, rekombinante Klone identifizieren zu können.

2.4.2.2 Selektionssysteme zur Identifikation positiver Rekombinanten

Zur Selektion von positiven Rekombinanten können sowohl positive als auch negative Selektionsmarker (Sm) verwendet werden. Im einfachsten Fall wird eine Expressionskassette für einen positiven Sm über PCR amplifiziert und über entsprechende Oligonukleotide werden kurze homologe Sequenzen zum Zielvektor angefügt. Diese PCR Produkte können direkt über Elektroporation in Red-induzierte Bakterien eingebracht werden. Auf diese Weise können jedoch nur Deletionsmutanten hergestellt werden. Alternativ dazu kann der positive Sm auch über PCR mit einer neu einzubringenden DNA-Sequenz gekoppelt werden. Für größere DNA-Bereiche ist hier jedoch oft eine Subklonierung erforderlich. Als positive Selektionsmarker werden v. a. die Antibiotika-Resistenzkassetten für Chloramphenicol, Kanamycin, Ampicillin oder Tetrazyklin verwendet.

Diese erlauben eine einfache Selektion rekombinanter Klone durch Verwendung der entsprechenden Antibiotika. Die erfolgreiche Integration der Kassetten kann zudem über PCR nachgewiesen werden. Durch die Flankierung eines positiven Sm mit *FRT*- oder *loxP*-Erkennungssequenzen kann der Sm in speziellen Flp- oder Cre-Rekombinase exprimierenden Bakterienstämmen wieder aus dem BAC-Vektor entfernt werden. Dabei bleibt jedoch eine kurze (34bp) *FRT*- oder *loxP*-Sequenz als "Wunde" oder "Narbe" im Vektor zurück, was für manche Anwendungen ungünstig sein kann.

Für das Einfügen von sog. "seamless" Mutationen eignet sich die Verwendung von negativen Sm, gegen deren Integration gegenselektioniert werden kann. Diese Systeme benötigen zwei Rekombinationsschritte: Im ersten wird der negative Sm, gekoppelt an einen positiven Sm, in den zu verändernden BAC integriert; im zweiten Rekombinationsschritt kann diese doppelte Selektionskassette durch eine beliebige gewünschte Sequenz ersetzt werden. Die Gegenselektion gegen den negativen Sm ermöglicht dabei das Überleben und die Isolierung der gewünschten Klone. Beispiele hierfür sind das sacB-Neo System oder das rpsL-Neo System ^{171–173}. SacB aus Bacillus subtilis kodiert für das Enzym Levansucrase, das in Gegenwart von Saccharose die Bildung eines Bakteriotoxins bewirkt. RpsL dagegen kodiert für die wt-Sequenz des S12 Proteins der 30S ribosomalen Untereinheit und vermittelt eine Sensitivität gegen das Translations-hemmende Antibiotikum Streptomycin. Voraussetzung für den Ensatz von rpsL-neo ist die Verwendung von E. coli Stämmen mit mutiertem rpsL Gen, das eine Streptomycin-Resistenz bedingt. Da eine Gegenselektion meist weniger effizient ist als eine positive Selektion und es durch Punktmutationen im Gen des negativen Sm zu einem hohen Hintergrund kommen kann, sind hier geeignete Screening Methoden anzuwenden.

Andere Sm wie z. B. *GalK*, *ThyA* und *TolC* erlauben bei Verwendung geeigneter Minimalmedien mit entsprechenden Zusätzen sowohl eine positive als auch eine negative Selektion ^{174–176}. Für die Anwendung der *thyA* und *tolC* Selektion werden jedoch spezielle *Knockout* Bakterienstämme benötigt ¹⁷⁷.

Die Entwicklung der *en passant* Technologie ermöglicht sogar eine quasi "markerlose" Rekombination. Hierbei wird ein Sm, flankiert von einer beliebigen Sequenzduplikation und einer Erkennungsstelle für die *Homing* Endonuklease *I-Scel* verwendet ^{178,179}. Die Arabinose-Induktion von *I-Scel* (kodiert durch pBAD-*I-Scel* oder *E. coli* GS1783) führt zu einem Doppelstrangbruch *in vivo* und nach Induktion der Red Proteine kommt es zu einer intramolekularen Rekombination über die flankierenden Sequenzen und dadurch zu einer spurlosen Entfernung des positiven Selektionsmarkers (siehe auch Bild 4.7).

2.5 Zielsetzung

Die positiven Ergebnisse der RV144 Studie sowie zahlreiche neue Erkenntnisse über die Struktur und Erkennungsmechanismen von breit-neutralisierenden Antikörpern haben für neue Impulse bei der Entwicklung einer protektiven HIV-1 Vakzine gesorgt. Die Stimulation der humoralen Immunantwort wird bei einer HIV-1 Infektion hauptsächlich durch das virale Hüllprotein Env vermittelt. Zur möglichst genauen Validierung neuer Env Vakzinekandidaten in nicht-humanen Primaten ist eine Weiterentwicklung des SHIV-Rhesusaffen-Modells zwingend erforderlich. Hierfür ist es notwendig neue pathogene SHIVs herzustellen, deren Immunpathogenese die von HIV-1 im Menschen möglichst exakt widerspiegelt. Auf Basis der bisherigen Erkenntnisse, die aus diesem Tiermodell gewonnen werden konnten, ist ein rationales Design eines SHIVs mit spezifischen *in vivo* Eigenschaften noch nicht oder nur eingeschränkt möglich.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, ein rekombinations-basiertes Verfahren zur vereinfachten Herstellung von neuen SHIV-Varianten im großen Maßstab zu etablieren. Durch die Anwendung der Red-Rekombination in Kombination mit der BAC-Technologie sollten SHIVs generiert werden, die für ein HIV-1 Env Protein vom Subtyp C kodieren, da Viren dieses Subtyps derzeit für rund die Hälfte aller HIV-1 Infektionen weltweit verantwortlich sind. Durch die gezielte, parallele Herstellung von mehreren SHIV-Varianten, die sich nur in ihrer *env*-Sequenz unterscheiden, sollte ein Pool an Viren generiert werden, der die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer replikationsfähigen Variante erhöht. Außerdem sollten neuartige SHIVs unterscheiden und so eventuell schneller und/oder öfter zu replikationskompetenten Viren führen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellen

3.1.1.1 Prokaryotische Zellen

Zur Klonierung rekombinanter DNA und zur Amplifikation von Plasmiden wurden die Bakterienstämme *E. coli* DH10B, OmniMAX[™]2-T1^R, Library Efficiency® DB3.1[™] (alle Life Technologies) und StrataClone SoloPack[™] (Agilent Technologies) verwendet. Für die Red-Rekombination kamen die Stämme TransforMax[™] Epi300[™]-T1^R (Epicentre), MAX Efficiency® Stbl2[™] (Life Technologies) und GS1783 (Gregory Smith, Northwestern Universität, Chicago, USA; zur Verfügung gestellt von Bernd Karsten Tischer, FU Berlin) zum Einsatz.

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten	prokaryotischen Zellen
--	------------------------

Bezeichnung	Genotyp
DH10B	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80d <i>lac</i> ZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1araD139 Δ(ara,leu)7649 galU galK rspL nupG
OmniMAX	F´ {proAB laclq lacZΔM15 Tn10(TetR) Δ (ccdAB)} mcrA Δ (mrr hsdRMS-mcrBC) Φ 80(lacZ)ΔM15 Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD
Stbl 2	F ⁻ mcrA Δ (mcrBC-hsdRMS-mrr) recA1 endA1lon gyrA96 thi supE44 relA1 λ ⁻ Δ (lac-proAB)
Epi300	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> -hsdRMS- <i>mcr</i> BC) Φ80d <i>lac</i> ZΔM15 Δ <i>lac</i> X74 <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ(ara,leu)7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K λ- <i>rspL nup</i> G <i>trf</i> A dhfr
GS1783	DH10B λ cl857 Δ(cro-bioA)<>araC-P _{BAD} I-Scel
SoloPack	<i>lac</i> ZΔM15, <i>rec</i> A- , <i>end</i> A- ,Cre-Recombinase, <i>lac</i> Z´α- Komplementations-Kassette
DB3.1	F– gyrA462 endA1 Δ (sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB–, mB–) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ – leu mtl1

3.1.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3-2: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung
HEK 293T	humane Ad5/SV40 (T) -transformierte Nierenepithelzellen (ATCC)
CEMx174.5.25.M7	SIV-permissive T-/B-Zelllinie, stabil transfiziert mit einem HIV-1 LTR hGFP-Konstrukt; CD4 ⁺ /CCR5 ⁺ /CXCR4 ⁺ (Nathaniel Landau, NYU School of Medicine, New York, USA; zur Verfügung gestellt von Thomas Gramberg, Universität Erlangen)

TZM-bl	HELA-abgeleitete Zelllinie, exprimiert CD4, CCR5 und CXCR4, stabil transfiziert mit einem HIV-1 LTR <i>firefly</i> Luciferase- und ß-Galaktosidase-Konstrukt (J. C. Kappes und X. Wu; NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program)
CHO-wtTat	Von Flp-In [™] -CHO <i>(Chinese hamster ovary)</i> abgeleitete Zelllinie, stabil transfiziert mit einem konstitutiv exprimierten HIV-1 Tat- Konstrukt (Alexander Kliche, Institut für med. Mikrobiologie & Hygiene, AG Wagner, Regensburg)

3.1.2 DNA

3.1.2.1 Oligonukleotide

Die folgenden linearen dsDNA-Transferkonstrukte für die Red-Rekombination wurden unter Verwendung der *TaqPlus Precision* DNA-Polymerase (Agilent Technologies) oder der *Phusion*® DNA-Polymerase (Finnzymes) mittels PCR hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$
Rek wtrNSce fwd	<i>CAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAG<u>TAGG</u> <u>GATAACAGGGTAAT</u>GGCCTGGTGATGATGGCGGGATC</i>
Rek wtrNCeu fwd	<i>CAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAG<mark>TAAC</mark> <u>TATAACGGTCCTAAGGTAGCGA</u>GGCCTGGTGATGATGGCGGGATC</i>
Rek rN rev	<i>CTACAACTATATAAACTCCATATTGTATATACTTTATCCAAGAAGCAAGGT</i> TCA GAAGAACTCGTCAAGAAG
Rek dsRed fwd	<i>CAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAG<mark>TAGG</mark> <u>GATAACAGGGTAAT</u>GCGCAACGCAATTAATGTGAG</i>
Rek dsRed rev	<i>CTACAACTATATAAACTCCATATTGTATATACTTTATCCAAGAAGCAAGGT</i> TTA CAGAAACAGGTGATGACGGC
Rek envK fwd	CAGAACAGGCAATAGAGGATG
Rek envK rev	CTACAACTATATAAACTCC
Rek cam fwd	GATGAGGAAGATGATGACTTGGTAGGGGTATCAGTGAGGCCAAAAGTTCCCCTA AGAACAATGAGTTACAAATTGGCAATAGACATGTCTCATTTTATAA <u>TAGGGATA</u> <u>ACAGGGTAAT</u> TTACGCCCCGCCCTGCCACTCATCA
Rek cam rev	<i>TTATAAAATGAGACATGTCTATTGCCAATTTGTAACTCATTGTTCTTAGG</i> GTTG ATACCGGGAAGCCCTG
Rek KB9 fwd	<i>ACCTGGGGGGGGAGAATCCTCTCTCAGCTATACCGCCCTCTAGAAGCATGC</i> TGTA GAGCAAGAAATGGAGC
Rek KB9 rev	CTCCAGACGGCCTGGACC
Rek trfA fwd	<i>TGGATTGCTGCTGTGTCCTGCTTATCCACAACATTTT</i> GCGCACGGTTATG
Rek trfA rev	CAGTTAATTAAGATATCGGCGCG
Rek rNV3 fwd	<i>GCCAGTGGTGTCAACTCAACTGCTGTTAAATGGCAGTCTAGCAGAAGAAG<mark>TAAC</mark> <u>TATAACGGTCCTAAGGTAGCGA</u>GGCCTGGTGATGATGGCGGGATC</i>
Rek rNV3 rev	<i>TGTGCATTACAATTTCTGGGTCCCCTCCTGAGGATTGATT</i>

Tabelle 3-3: Oligonukleotide zur	Herstellung von linearen	Transferkonstrukten
rabelle 5-5. Oligoliukieotiue zui	nerstenung von intearen	I I ansiel konsti ukten

Rek rNKB9 fwd	<i>CTATTATGGGGTACCTGTGTGGAGAGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTG</i> <u>TAAC</u> <u>TATAACGGTCCTAAGGTAGCGA</u> GGCCTGGTGATGATGGCGGGGATC
Rek rNKB9 rev	<i>GTCTGTGTAATTGTCAATTTCTCTTTCCCACTCCATCCAGGTCATGTTATTC</i> TC AGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG

Kursiv: homologe Bereiche; Unterstrichen: Schnittstellen; Normal: hybridisierende Sequenz bei der PCR-Amplifikation

Die linearen Transferkonstrukte zur Herstellung der Subtyp C env-Varianten wurden mit Hilfe

der Phusion® DNA-Polymerase (Finnzymes) über PCR hergestellt.

Bezeichnung	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$
SIV1 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV2 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV3 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV4 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV5 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV6 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV7 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV8 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV9 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV10 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV11 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SIV12 fwd	<i>CTCCGAAAAAGGCTAAGGCTAATACATCTTCTGCATCAAACAAGTAAGT</i>
SHIV1 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV2 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV3 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV4 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV5 fwd	CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA

Tabelle 3-4: Olig	onukleotide zur	Herstellung der	Subtyp C env	Fransferkonstrukte

SHIV6 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV7 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV8 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV9 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV10 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV11 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
SHIV12 fwd	<i>CAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAAGCAGTAAGTA</i>
Dc1 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAGCA GATTAATAGCCCTCC
Dc2 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAACA AACTAATAGCACTCTTT
Dc3 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAACA GATTAATAGCACTTCTT
Dc4 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAGCA GATTAATAGCACTCTG
Dc5 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAGCA GACTAATAGCACTCT
Dc6 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAGCA GACTAATAGTACTCTT
Dc7 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> CAGCA AATTAATAGCACTCTC
Dc8 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAACA GACTAATAGCACTCTT
Dc9 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> TAACA GATTAATAGCACTTCTT
Dc10 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAACA GATTAATGGCACTCTT
Dc11/12 rev	<i>GATCTCCAGACGGCCTGGACCGCCTCATGGAAATAGCTCCACCCATATTG</i> AAGCA GATTAATAGCACTCTT

Kursiv: homologe Bereiche; Normal: hybridisierende Sequenz bei der PCR-Amplifikation

Punktmutationen wurden über ortsspezifische Mutagenese via Standard-PCR unter Verwendung Mutationen-beinhaltender Oligonukleotide eingefügt.

Bezeichnung	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$
NF-κB2x fwd	ACTCGCTGAAACAGCAGGGACTTTCCACAA AGGGACTTTCCACAA GGGGATGTT ACGGGGAGG
NF-ĸB2x rev	CCTCCCCGTAACATCCCC TTGTGGAAAGTCCCT TTGTGGAAAGTCCCTGCTGTT TCAGCGAGT
SIVenvK fwd	GGCTTTAATGG T AC C AGAGCAGAAAATAG
SIVenvK rev	GGCTTTAAT G GT A CCAGAGCAGAAAATAG
3'IGK fwd	GGACCAGGGAGAGCATTTTATGCAA T A G GAAA G ATAATAGGAGATATAAG
3'TGD_IGK rev	TGTGCATTACAATTTCTGGGTC
3'TGD fwd	GGACCAGGGAGAGCATTTTATGCAA CGG GA G ACATAATAGGAGATATAAG
5'KR_KS fwd	GCCAGTGGTGTCAACTCAAC
5'KR rev	AATGCTCTCCCTGGTCCTATAGATAACCTTT T CTTGTATTGTTGTTGGG
5'KS rev	AATGCTCTCCCTGGTCCTATAGATAA GCTTT TCTTGTATTGTTGTTGGG
E	

Tabelle 3-5: Oligonukleotide zur Einführung von Punktmutationen

Fett gedruckt: mutierte Base

3.1.2.2 Vektoren und Proviren

Tabelle 3-6: Übersicht der verwendeten Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung / Quelle
pMX-RBX	Klonierungsvektoren (pMA-RBB, pMA-RBZ, pMZ-RBA) als Basis zur Herstellung von linearen Transferkonstrukten für die Rekombination in pCCT (zur Verfügung gestellt von M. Arnold, Geneart)
рССТ	Red-Rekombinations-Bacmid (zur Verfügung gestellt von M. Arnold, (Geneart) auf Basis von pCC1 (Epicentre)
pSIM5	Red-Rekombinations-Plasmid (zur Verfügung gestellt von D.L. Court, NCI, Frederick, USA)
pGA18-dsRed	Vektor kodierend für ein auf <i>E. coli</i> Kodongebrauch optimiertes <i>dsRed</i> unter Kontrolle des lac Promotors (synthetisiert durch Geneart)
pMK-rpsL	Vektor kodierend für wt rpsL inkl. Promotor (synthetisiert durch Geneart)
= -DN(A + A(x))	
pcDNA3.1(+)	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen)
pCR4-egfp	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen) Expressionsplasmid kodierend für EGFP unter Kontrolle des <i>E. coli</i> Rhamnose Operons (zur Verfügung gestellt von H.J. Linde, Uniklinik Regensburg)
pCR4-egfp pSC-A	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen) Expressionsplasmid kodierend für EGFP unter Kontrolle des <i>E. coli</i> Rhamnose Operons (zur Verfügung gestellt von H.J. Linde, Uniklinik Regensburg) Kloniervektor für Topoisomerase I-basierte UA-Klonierungen mit Hilfe des <i>"StrataClone PCR Cloning Kits"</i> (Agilent Technologies)
pCR4-egfp pSC-A pNL4-3	Eukaryotisches Expressionsplasmid (Invitrogen) Expressionsplasmid kodierend für EGFP unter Kontrolle des <i>E. coli</i> Rhamnose Operons (zur Verfügung gestellt von H.J. Linde, Uniklinik Regensburg) Kloniervektor für Topoisomerase I-basierte UA-Klonierungen mit Hilfe des <i>"StrataClone PCR Cloning Kits"</i> (Agilent Technologies) Provirus-Plasmid kodierend für das Volllänge Virusgenom des laboradaptierten HIV-1 Subtyp B Isolats NL4-3

p239SpE3' nef open	3' Hälfte des SIVmac239 proviralen Genoms (<i>tat, rev, env, nef</i> , 3'LTR) mit intaktem <i>nef</i> ORF (R. Desrosiers; NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program)
pSHIV-KB9 5'	5' Hälfte des SHIV-KB9 proviralen Genoms (nt 215-6706 von SIVmac239) (J, Sodroski; NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program)
pSHIV-KB9 3'	3' Hälfte des SHIV-KB9 proviralen Genoms (HIV-1 Teil) (J. Sodroski; NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program)

Die Expressionsvektoren für die Subtyp C *vpu/env-*Sequenzen zur Herstellung von SHIV-*Panels* (siehe 4.2.9.3 und 4.2.9.4) sind Bestandteil des *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* (NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program) ¹⁸⁰.

Tabelle 3-7: Wichtigste Informationen zum "Subtype C HIV-1 Reference Panel"

Env Klon	Vektor	Bezeichnung in dieser Arbeit	Quelle*	GenBank Zugangs Nummer
Du156.12	pcDNA3.1	C env 1	А	DQ411852
Du172.17	pcDNA3.1	C env 2	А	DQ411853
Du422.1	pcDNA3.1	C env 3	В	DQ411854
ZM197M.PB7	pcDNA3.1	C env 4	С	DQ388515
ZM214M.PL15	pcDNA3.1	C env 5	С	DQ388516
ZM233M.PB6	pcDNA3.1	C env 6	С	DQ388517
ZM249M.PL1	pcDNA3.1	C env 7	С	DQ388514
ZM53M.PB12	pCR3.1	C env 8	D	AY423984
ZM109F.PB4	pCR3.1	C env 9	D	AY424138
ZM135M.PL10a	pCR3.1	C env 10	D	AY424079
CAP45.2.00.G3	pcDNA3.1	C env 11	Е	DQ435682
CAP210.2.00.E8	pcDNA3.1	C env 12	Е	DQ435683

- * A = D. Montefiori, F. Gao, S.A. Karim und G. Ramjee
 - B = D. Montefiori, F. Gao, C. Williamson und S.A. Karim
 - C = E. Hunter und C. Derdeyn
 - E = L. Morris, K. Mlisana und D. Montefiori

3.1.3 Viren

Tabelle 3-8: Übersicht verwendeter, nicht selbst hergestellter Viren

Bezeichnung	Quelle
SHIV-1157ipd3N4	NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program
SHIV-SF162P3	NIH, AIDS Research and Reference Reagent Program (J. Harouse, C. Cheng-Mayer, R. Pal)

3.1.4 Antikörper

3.1.4.1 Primärantikörper

Tabelle 3-9: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller / Quelle
HIV-1 gp120 #42 (CHO) (ARP422)	Kaninchen, polyklonal, Erkennung HIV-1 Hüllprotein (Verdünnung Western Blot 1:5.000)	EVA Center for AIDS Reagents (S. Ranjbar)
Anti-Human CD4 APC-Cy7	Maus, monoklonal, Erkennung humane CD4 Rezeptoren (Verdünnung FACS 1:100)	BD Pharmingen
Anti-Human CD195 AlexaFluor488	Ratte, monoklonal, Erkennung humane CCR5 Rezeptoren (Verdünnung FACS 1:100)	Biozol GmbH
Anti-Human CD184 PE	Maus, monoklonal, Erkennung humane CXCR4 Rezeptoren (Verdünnung FACS 1:25)	Biozol GmbH
Makaken Serum 2BR	Makake, polyklonal, Erkennung SIVmac239 Proteine (Verdünnung Western Blot 1:500)	Biomedical Primate Research Centre, Rijswijk (W. Bogers)

3.1.4.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3-10: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller
Anti-Kaninchen HRP	Ziege, polyklonal, Erkennung Kaninchen IgG (Verdünnung Western Blot 1: 5.000)	Thermo Fisher Scientific
Anti-Affe HRP	Ziege, polyklonal, Erkennung Makaken IgG (Verdünnung Western Blot 1: 5.000)	Santa Cruz Biotechnology

3.1.5 Größen- und Molekulargewichtsstandards

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Molekülen mittels Gelelektrophorese wurde ein 100 bp DNA-Marker (NEB) oder ein 1 kB DNA-Marker (NEB) verwendet. Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde der *PageRuler™ Plus Prestained* Protein Standard (Fermentas) verwendet.

3.1.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 3-11: Übersicht der verwendeten kommerziell	en Kits
---	---------

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Bacmid DNA-Isolierung	QIAGEN GmbH
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Plasmid DNA-Isolierung	QIAGEN GmbH
CompactPrep Plasmid Midi Kit	Plasmid DNA-Isolierung	QIAGEN GmbH
QIAquick Gel Extraction Kit	Gelextraktion von DNA- Fragmenten	QIAGEN GmbH
QIAquick PCR Purification Kit	Aufreinigung von DNA- Fragmenten	QIAGEN GmbH
QIAamp Viral RNA Mini Kit	Isolierung viraler RNA	QIAGEN GmbH
Superscript III First-Strand Synthesis System for RT PCR	Reverse Transkription viraler RNA in cDNA	Life Technologies
SIV p27 Antigen ELISA	Bestimmung p27 Menge in Zellkulturüberständen	Zeptometrix Corporation
RetroSys™ RT Activity Kit	Bestimmung der reverse Transkriptaseaktivität in Zellkulturüberständen	Innovagen AB
Strata Clone PCR Cloning Kit	Klonierungen	Agilent Technologies

3.1.7 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Chemikalien von den Firmen Sigma, Roche und Merck, Zellkulturmaterialen von den Firmen Falcon, GibcoBRL und PAN und sonstiges Plastikmaterial von den Firmen Falcon, Sarstedt, Greiner und Eppendorf bezogen. Für Restriktionsendonukleasen und übrige Enzyme wurden, soweit nicht anders angegeben, Produkte der Firma New England Biolabs verwendet.

3.1.7.1 Korezeptor-Antagonisten

rabelle o 12. obeloicht der Verweindeten Korezeptor Antagonisten			
Bezeichnung	Verwendung	Quelle	
AMD3100	Synthetischer, nicht-peptidischer CXCR4-Antagonist (Bizyklam)	Sigma	
TAK-779 (ARP968)	Synthetischer, nicht-peptidischer CCR5- Antagonist	NIBSC; EVA Centre for AIDS Reagents	
PSC-RANTES (ARP973)	Amino-terminal modifizierte Variante des CCR5-Antagonisten RANTES	NIBSC; EVA Centre for AIDS Reagents (O. Hartley)	

Tabelle 3-12: Übersicht der verwendeten Korezeptor-

3.1.7.2 Puffer

Tabelle 3-13: Übersicht der verwendeten Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
DNA-Probenpuffer (10x)	0.001 % Bromphenolblau (w/v) 0.001 % Xylencyanol (w/v) 50 mM EDTA pH 8.0 30 % Glycerin (w/v)	Agarose-Gelelektrophorese
TBE Puffer (10x)	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8.0	Agarose-Gelelektrophorese
Trypanblau Reagenz	0.5 % Trypanblau in PBS	Zellfärbung
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 0,1 % SDS (w/v) 1 % Nonidet-40 (w/v) 0,5 % Na-Deoxycholat (w/v)	Zellaufschluß
SDS-Probenpuffer (5x)	312,5 mM Tris/HCl pH 6,8 5 % (w/v) SDS 25 % β-Mercaptoethanol 2,5 mM EDTA 25 % (v/v) Glycerin 0,0125 % (w/v) Bromphenolblau	SDS-PAGE
Blockier-Puffer	TBS 0,05 % Tween-20 5 % (w/v) Magermilchpulver	Blockierung Nitrocellulaose Membranen
Regenerierungspuffer	62,5 mM Tris/HCl pH 6,7 100 mM ß-Mercaptoethanol 2 % SDS	Regeneration Nitrocellulose Membranen
FACS Puffer	1 mg/ml NaN₃ 1 % FKS EDTA in PBS	FACS Analyse
RF1-Puffer	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM KAc 10 mM CaCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin	Herstellung chemisch- kompetenter Bakterien
RF1-Puffer	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ , 15 % (v/v) Glycerin	Herstellung chemisch- kompetenter Bakterien
PBS	7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM NaH ₂ PO ₄ 130 mM NaCl	Diverse Anwendungen
TBS	20 mM Tris-HCl pH 7,5 500 mM NaCl	Diverse Anwendungen

3.2 Methoden

3.2.1 Mikrobiologische Techniken

3.2.1.1 Anzucht und Selektion von Bakterien

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in Luria Bertani (LB-) Flüssigmedium bzw. auf LB-Agarplatten über Nacht (ÜN) bei 37 °C bzw. für *E. coli* GS1783 bei 32 °C. Zur Selektion positiver Transformanten wurde entsprechend dem verwendeten Plasmid oder Bacmid und dessen Kopienanzahl ein geeignetes Selektionsmedium eingesetzt. Die Induktion des *low-copy* Replikationsursprungs im Vektor pCCT erfolgte durch Zugabe von 1 % L-Arabinose. Die Induktion des Rhamnose Operons in pCCT abgeleiteten Vektoren erfolgte durch Zugabe von 1 M L-Rhamnose.

Antibiotikum	Konzentration (<i>low-copy</i> Vektor)	Konzentration (<i>high-copy</i> Vektor)
Ampicillin	50 µg/ml	100 µg/ml
Zeocin	25 µg/ml	-
Kanamycin	30 µg/ml	50 µg/ml
Chloramphenicol	12,5 µg/ml	34 µg/ml
Streptomycin	30 µg/ml	-

Tabelle 3-14: Übersicht der verwendeten Antibiotikakonzentrationen

3.2.1.2 Antibiotika-Resistenz- bzw. -Sensitivitäts-Test

Zum Test von Antibiotika-Sensitivitäten wurden Einzelkolonien in einem Zug auf unterschiedlichen LB-Agarplatten ausgestrichen (Replikaplattierung).

3.2.1.3 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Chemisch-kompetente Bakterien wurden nach der RbCl-Methode hergestellt ¹⁸¹. Dafür wurde der gewünschte Bakterienstamm bei geeigneter Temperatur in SOC-Selektionsmedium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD₆₀₀ 0,4-0,5). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension geerntet, 10 min bei 3200 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Bakterienpellet in eiskaltem RF1-Puffer aufgenommen. Die eingesetzte Puffermenge entsprach dabei einem Drittel des Volumens der Bakterienkultur. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut 10 min bei 3200 x g und 4 °C abzentrifugiert und das Pellet in eiskaltem RF2-Puffer aufgenommen. Die eingesetzte Puffermenge entsprach dabei einem Zwölftel des Volumens der Ausgangskultur. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.1.4 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

100 µl chemisch-kompetente Bakterien (siehe 3.2.1.3) wurden auf Eis aufgetaut, mit 10 - 100 ng Ligations-Ansatz oder Plasmid-DNA gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde bei 42 °C für 45 s ein Hitzeschock durchgeführt und der Transformations-Ansatz umgehend für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und unter Schütteln 1 h bei 37 °C bzw. 32 °C inkubiert. Zuletzt wurde die Bakteriensuspension auf einem geeigneten Selektionsagar ausplattiert und ÜN bei der erforderlichen Temperatur inkubiert. Nach ca. 12 h bis 16 h wurden Einzelkolonien gepickt und analysiert.

3.2.1.5 Herstellung elektro-kompetenter Bakterien

Elektro-kompetente Bakterien wurden nach einem adaptierten Protokoll der Methode von Dower ¹⁸² hergestellt. Dafür wurde der gewünschte Bakterienstamm bei geeigneter Temperatur und in geeignetem LB-Selektionsmedium bis zur frühen exponentiellen Wachstumsphase angezogen (OD_{600} 0,4 - 0,5). Nach Erreichen der optimalen Zelldichte wurde die Zellsuspension geerntet, 10 min auf Eis inkubiert, und anschließend 10 min bei 3200 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde zweimal mit eiskaltem, sterilem H₂O gewaschen, wobei das Volumen auf ¼ der eingesetzten Bakterienkultur eingeengt wurde. Nach einem weiteren Waschschritt mit 10 % igem, eiskaltem und sterilen Glycerin wurde das Zellpellet in 500 µl 10 % igem Glycerin aufgenommen. Elektro-kompetente Bakterien wurden stets frisch hergestellt und nicht gelagert.

3.2.1.6 Elektroporation von Bakterien

Für die Elektroporation wurden 50 µl elektro-kompetente Bakterien mit 100 - 500 ng DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (PeqLab) mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Die Bakterien wurden in der Küvette mit Hilfe eines Elektroporationssystems (Gene Pulser, BioRad) bei Standardeinstellungen (2,5 kV, 200 Ω und 25 µF) gepulst. Nach dem Puls wurde sofort 1 ml LB-Medium zugegeben, die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und unter Schütteln 2 h bis 5 h bei 37 °C bzw. 32 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf geeignetem LB-Selektionsagar ausplattiert und ÜN inkubiert. Nach ca. 12 h bis 16 h wurden Einzelkolonien gepickt und analysiert.

3.2.1.7 Anlegen von Glycerinkulturen

5 mL einer ÜN gewachsenen Bakterienkultur wurden für 10 min bei 4 °C und 3800 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 600 µl LB-Flüssigmedium resuspendiert, mit 300 µl sterilem Glycerin (87 %) gemischt und anschließend bei -80 °C gelagert.
3.2.2 Molekularbiologische Techniken

3.2.2.1 Klonierung

Soweit nicht anders vermerkt, wurden für Klonierungen in *E. coli* Standardmethoden angewendet ¹⁸³. Alle Klonierungen wurden mittels DNA-Sequenzierung, durchgeführt bei Life Technologies (Geneart) nach der Methode von Sanger ¹⁸⁴ überprüft.

3.2.2.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA aus einem Kulturvolumen bis 5 ml wurde gemäß dem Protokoll der alkalischen Schnelllyse präpariert ¹⁸³.

Die präparative Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen erfolgte über Anionenaustauscher-Säulen *Qiagen-tip 100* (QIAGEN) nach Anweisungen des Herstellers. Die Konzentration der aufgereinigten DNA wurde photometrisch ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1 OD_{260} = 47,5 µg dsDNA/ml) berechnet.

3.2.2.3 Aufreinigung von BAC-DNA

Die Präparation von BAC-DNA erfolgte mit Hilfe des "Qiaprep Spin Mini Kit" (QIAGEN) nach einem modifizierten Protokoll. Es wurden 12 ml einer ÜN gewachsenen Bakterienkultur geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl Puffer P1 resuspendiert, die Zellen mit 500 µl Puffer P2 lysiert und der Ansatz mit 500 µl Puffer N3 neutralisiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 4000 x g und 4 °C erfolgte die weitere Aufreinigung der DNA laut Protokoll des Herstellers. Die Bacmid-DNA wurde mit 50 µl warmen Elutionspuffer EB von der Säule eluiert, die Konzentration photometrisch ermittelt und nach dem Lambert-Beerschen Gesetz (1 OD₂₆₀= 47,5 µg dsDNA/ml) berechnet. Zur weiteren Analyse wurden je 500 ng Bacmid-DNA mit Hilfe von 20 U geeigneten Restriktionsendonukleasen nach Angaben des Herstellers spezifisch geschnitten, mit 10x DNA-Auftragspuffer versetzt und mittels Gelelektrophorese auf einem Ethidiumbromid-haltigen TBE-Agarosegel analysiert.

3.2.2.4 Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberständen

Die Isolierung viraler RNA aus den Überständen infizierter humaner PBMC erfolgte mittels des "QIAamp Viral RNA Mini Kit" (QIAGEN) nach Herstellerangaben. Es wurde pro Ansatz 140 µl zellfreier Kulturüberstand eingesetzt. Die RNA wurde mit 60 µl Elutionspuffer AVE von der Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.2.5 Standard-PCR / Analytische-PCR

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Vervielfältigung oder Analyse von Plasmid oder Bacmid-DNA erfolgte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ¹⁸⁵. Soweit nicht anders angegeben wurden die PCRs unter Standardbedingungen (primäre Denaturierung 95 °C, 5 min; Denaturierung 95 °C, 30 s; Annealing 50 °C, 30 s; Extension 72 °C, 60s/1,0 kb, 30 Zyklen; finale Elongation 72 °C, 15 min) unter Verwendung der *Phusion® High Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes) oder des 2 x *GoTaq® Green Master Mix* (Promega) durchgeführt. Bei Einsatz der *Phusion®* Polymerase wurde die Temperatur zur Denaturierung auf 98 °C erhöht. Als *Template* wurde entweder zuvor aufgereinigte DNA oder direkt eine Bakterienkolonie (*Colony-PCR*; C-PCR) verwendet. Die Sequenzen der hierfür verwendeten Oligonukleotide sind unter 6.4 aufgelistet.

3.2.2.6 Overlap Extension-PCR

Die Herstellung der funktionalen Rekombinationskassetten *wtrpsLNeo* und *rha-trfA* (siehe Tabelle 3-15) beruhte auf der Methode der "*Overlap Extension PCR*" nach Ho¹⁸⁶, die eine Fusion verschiedener Leserahmen aus unterschiedlichen DNA-Quellen (Plasmid oder genomische DNA) ermöglicht. Diese PCR Reaktionen wurden mit der *PfuUltra II Fusion Hot Start* DNA-Polymerase (Agilent Technologies) nach Standard Protokoll durchgeführt.

3.2.2.7 Reverse Transkription viraler RNA

Virale RNA wurde mit Hilfe des *"SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT PCR*" (Life Technologies) nach Herstellerangaben unter Verwendung von Oligo(d)T Primern in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Es wurden 3 µl RNA eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

Durch Einsetzen von je 1 µl der generierten cDNA in eine Standard-PCR konnten die viralen Sequenzen vervielfältigt werden, was eine anschließende Sequenzierung ermöglichte.

3.2.3 Rekombinations-Verfahren

Die Herstellung von Bacmiden kodierend für die Volllänge Virusgenome von SIVmac239 und SHIV-KB9 sowie deren weitere Modifizierung erfolgte mittels unterschiedlichen Systemen der Red-Rekombinationstechnologie.

3.2.3.1 Herstellung linearer Transferkonstrukte

Die exakten Nukleotidsequenzen der zur Rekombination verwendeten Transferkonstrukte sind unter 6.2 angegeben.

3.2.3.1.1 Transferkonstrukte für die BAC-Herstellung

Zum Einbringen vollständiger retroviraler Virusgenome in den BAC-Vektor pCCT, wurden die Virusgenome zunächst in drei überlappenden (50 bp) Fragmenten mittels PCR amplifiziert (siehe Bild 4.2) und in die Vektoren pMX-RBX kloniert. Hierfür wurden die unter 3.1.2.2 beschriebenen Provirus-Plasmide als *Template* für die viralen Sequenzen verwendet. Die PCR Amplifikation erfolgte mit Hilfe der *Phusion® High Fidelity* DNA-Polymerase (Finnzymes), der *PfuUltra II Fusion Hot Start* DNA-Polymerase oder der *TaqPlus Precision* DNA-Polymerase (beide Agilent Technologies) nach Hersteller Angaben unter Verwendung

optimaler *Annealing* Temperaturen. Durch Klonierung über Ascl und Xhol in die *multiple cloning site* der Plasmide pMX-RBX (siehe Tabelle 3-6; Bild 3.1), entstanden die Vektoren pMA-SIVB, pMA-SIVC und pMZ-SIVA bzw. pMA-KB9B, pMA-KB9C und pMZ-KB9A. Nach anschließender Restriktion mit der *Blunt* schneidenden Endonuklease EcoRV und Aufreinigung über ein Agarosegel erhielt man lineare dsDNA-Transferkonstrukte. Diese bestehen jeweils aus einem anderen Abschnitt des Virusgenoms, einer unterschiedlichen Selektionskassette, einer Schnittstelle für eine *Homing Endonuklease* (I-Scel oder PI-Scel) sowie homologen Bereichen (HG, DG, BR) zum BAC-Vektor pCCT, die der gerichteten Integration über Red-Rekombination dienen (siehe Bild 4.2).



Bild 3.1: Schematische Darstellung eines der drei pMX-RBX Plasmide. HG/DG: Homologe Sequenzen zu pCCT KanaR: Kanamycin-Resistenzkassette AmpR: Ampicillin-Resistenzkassette colE1 ori: prokaryotischer Replikationsursprung ccdB: Selbstmordgen (nicht in *E. coli* DB3.1) P(ccdB): Promotor des ccdB Gens I-Scel: Schnittstelle für eine Homing Endonuklease

3.2.3.1.2 Transferkonstrukte für die BAC-Modifizierung

Alle weiteren linearen dsDNA-Transferkonstrukte zur Modifizierung der lentiviralen Bacmide pCCT-SIV, pCCT-SIV+N und pCCT-SHIV-KB9 wurden unter Verwendung der in Tabelle 3-1 aufgeführten Oligonukleotide über PCR unter Verwendung der Phusion® High Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes) hergestellt. Geeignete homologe Seguenzen zur Integration in den Zielvektor und gegebenenfalls erforderliche Schnittstellen wurden über entsprechende Oligonukleotide an die PCR Produkte fusioniert. Durch Aufreinigung der PCR Produkte über ein Agarosegel und anschließende Gelextraktion konnten schließlich lineare Transferkonstrukte für die zielgerichtete Integration in das entsprechende provirale Bacmid gewonnen werden.

Die Selektions- und Gegenselektionskassette *rpsLNeo* sowie die *rha-trfA*-Kassette wurden mittels Fusions-PCR unter Verwendung der *TaqPlus Precision* DNA-Polymerase (Agilent Technologies) hergestellt. Als *Template* für *rpsLNeo*-Kassetten dienten die Plasmide pMK-rpsL sowie pcDNA3.1(+) (siehe Tabelle 3-6). Die Sequenzen für die *rha-trfA*-Kassette wurden aus pCR4-egfp und *E. coli* Epi300 amplifiziert. Über Klonierung in das Plasmid pMZ-RBA wurde an das PCR Produkt weiterhin eine Ampicillin-Resistenzkassette fusioniert.

Analog dazu wurde auch der *dsRed* Leserahmen aus pGA18-dsRed kloniert, was in einer *amp-rha-dsRed*-Kassette resultierte.

Die mutierte SIVmac239-Sequenz *envK* wurde durch ortsspezifische Mutagenese PCR nach Klonierung von SIV *env* in den Vektor pSC-A generiert. Der resultierende Vektor pSC-envK diente als *Template* für die PCR-Amplifikation des linearen dsDNA-Transferkonstruktes SIV-envK.

Für die Herstellung der *env* V3-Varianten KS-IGK, KS-TGD, KR-IGK und KR-TGD wurde zunächst der 362 bp große Sequenzabschnitt von SHIV-KB9 *env*, der später durch *rpsLNeo* ersetzt wurde aus dem Plasmid pSHIV-KB9 3' (siehe Tabelle 3-6) über PCR amplifiziert und mit Hilfe des *"StrataClone PCR Cloning Kits"* in das Plasmid pSC-A kloniert. Das resultierende Plasmid pSC-envV3 diente als *Template* zur Herstellung der V3 Transferkonstrukte für die Rekombination. Die erforderlichen Basenaustausche wurden durch *Overlap Extension* PCR (3.2.2.6) unter Verwendung entsprechender Oligonukleotide (siehe Tabelle 3-5) eingefügt.

Bezeichnung	Beschreibung / Verwendung
Sce-wtrpsLNeo	Integration <i>rpsLNeo</i> -Kassette in zentralen <i>env</i> -Bereich von pCCT-SIV und pCCT-SIV+N in <i>E. coli</i> Epi300
Ceu-wtrpsLNeo	Integration <i>rpsLNeo</i> -Kassette in zentralen <i>env</i> -Bereich von pCCT-SIV und pCCT-SIV+N zur weiteren Rekombination in <i>E. coli</i> GS1783
Sce-dsRed	Bestimmung Rekombinations-Effizienzen bei der Substitution der <i>rpsLNeo</i> -Kassette
SIV-envK	Herstellung einer ersten SIV-BAC-Variante mit zusätzlicher Kpn I Restriktionsschnittstelle
Sce-camR-EnP	Einfügen einer <i>en passant</i> entfernbaren Chloramphenicol- Resistenz in pCCT-SIV und pCCT-SIV+N
Sce-KanR-EnP	Ersatz Ampicillin-Resistenzgen in pCCT-SIV und pCCT-SIV+N durch <i>en passant</i> entfernbare Kanamycin-Resistenz
Amp-rha-trfA	Integration des <i>trfA</i> ORF unter Kontrolle des Rhamnose Operons in pCCT-SIV und pCCT-SIV+N
Amp-rha-dsRed	Kontrolle zur Überprüfung der Funktionalität des Rhamnose Operons
Ceu-wtrpsLNeo-V3	Integration <i>rpsLNeo</i> -Kassette in <i>env</i> V3-Bereich von pCCT-SHIV-KB9
Ceu-wtrpsLNeo-KB9	Integration <i>rpsLNeo</i> -Kassette in zentralen <i>env</i> -Bereich von pCCT-SHIV-KB9wt und pCCT-SHIV-KB9wt+N
SHIV-KB9wt	Integration des kompletten HIV-1 Teils von SHIV-KB9 in pCCT- SIV und pCCT-SIV+N
V3-KS-IGK	Integration einer mutierten env V3-Region in pCCT-SHIV-KB9
V3-KS-TGD	Integration einer mutierten env V3-Region in pCCT-SHIV-KB9

Tabelle 3-15: Übersicht der über PCR generierten Transferkonstrukte

V3-KR-IGK	Integration einer mutierten env V3-Region in pCCT-SHIV-KB9
V3-KR-TGD	Integration einer mutierten env V3-Region in pCCT-SHIV-KB9

3.2.3.2 Rekombination mit dem Plasmid pCCT

Für die Herstellung der proviralen Bacmide pCCT-SIV und pCCT-SIV+N, kodierend für das Virusgenom von SIVmac239 (mit einer bzw. zwei NF-κB Bindestellen im 3' LTR) sowie pCCT-SHIV-KB9, wurden die für die Red-Rekombination erforderlichen Proteine vom Zielvektor pCCT selbst, in *E. coli* Epi300 exprimiert (siehe Bild 3.2).

Für das Einbringen von linearen dsDNA-Fragmenten wurden elektrokompetente Bakterien wie unter 3.2.1.5 beschrieben hergestellt, jedoch wurden die Kulturen bereits bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 mit 0,2 % L-Arabinose versetzt. Die Zugabe von L-Arabinose diente der Induktion der Expression der gbx-Kassette in pCCT, die für die Proteine Exo, Beta und Gam des Bakteriophagen λ kodiert. Für die Elektroporation wurden 50 µl Rekombinations-kompetente Bakterien zusammen mit 50 ng bis 100 ng linearem Transferkonstrukt eingesetzt. Zur Bestimmung der Rekombinationseffizienz wurden Verdünnungen der Bakteriensuspension hergestellt und auf LB₀-Agar ausplattiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf einem geeigneten Selektionsagar ausplattiert und ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach 12 h wurden Einzelkolonien mittels Kolonie-PCR und geeigneten Selektionsverfahren analysiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz der eingesetzten Bakterien wurde stets auch ein Ansatz mit dem Plasmid pUC19 (100 pg) elektroporiert.



Bild 3.2: Schematische Darstellung des Vektors pCCT.

HG/DG/BR: Sequenzen zur Integration von Transferkonstrukten in pCCT Rosa: Gene notwendig für die Red-Rekombination (AraC, gbx, recA) CamR: Chloramphenicol-Resistenzkassette OriV: induzierbarer *low-copy* Replikationsursprung Ori2: *single-copy* Replikationsursprung Dunkelblau: Gene notwendig für die Erhaltung des *single-copy* Status von pCCT

(parA, parB, parC, repE, redF)



Für die Modifikation der lentiviralen Bacmide bzw. das Einbringen der Transferkonstrukte Sce-wtrpsLNeo, Sce-dsRed und SIVenvK (siehe Tabelle 3-15) wurde das Rekombinationsplasmid pSIM5 (siehe Bild 3.3), über Elektroporation in BAC-tragende *E. coli* Epi300 eingebracht, da im letzten Schritt der BAC-Herstellung (siehe 4.1.1) die gbx-Kassette von pCCT durch den viralen Genomabschnitt A ersetzt worden war. pSIM5 kodiert ebenso wie pCCT für die Proteine Exo, Beta und Gam des λ Phagen, und besitzt überdies einen Temperatur-sensitiven Replikationsursprung, so dass die Kultivierung pSIM5 tragender Bakterien stets bei 30 °C erfolgte. Die Expression der gbx-Kassette wurde durch einen Temperaturshift der Kulturen (bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4) für 15 min auf 42 °C induziert. Im Anschluss daran wurden die Bakterien wie unter 3.2.1.5 beschrieben elektrokompetent gemacht und mit den entsprechenden linearen Transferkonstrukten wie unter 3.2.3.2 beschrieben elektroporiert und ausplattiert. Um nach erfolgter Rekombination aus den erhaltenen Bakterienkolonien reine Bacmid-DNA aufreinigen zu können, musste das Plasmid pSIM5 durch Kultivierung bei 37 °C ausgedünnt werden. Durch zweimaliges Überimpfen (1:5.000) einer Flüssigkultur und anschließendes Ausplattieren auf geeignetem Selektionsmedium wurden Einzelkolonien gewonnen, die in einer Kolonie-PCR (siehe 3.2.2.5) auf das Vorhandensein des Plasmids pSIM5 untersucht wurden. Reine Kolonien dienten als Startkultur für die Präparation von BAC-DNA (siehe 3.2.2.3).



Bild 3.3: Schematische Darstellung des Plasmids pSIM5.

HG/DG/BR: Sequenzen zur Integration von Transferkonstrukten in pCCT

Rosa: Gene notwendig für die Red-Rekombination (gbx, cl857)

CamR: Chloramphenicol-Resistenzkassette

ori101: temperatur-sensitiver Replikationsursprung

Dunkelblau: Gene notwendig für die Temperatur-Sensitivität des Replikationsursprungs (repY, Excl1)

3.2.3.4 Rekombination mit E. coli GS1783

Die Herstellung aller weiteren SIV-BAC-Varianten erfolgte in Kombination mit der en passant Methode von Tischer et al.¹⁷⁸, die auf Verwendung des E. coli Stammes GS1783 basiert. Dieser Bakterienstamm wurde abgeleitet von dem Rekombinationsstamm EL250, welcher alle für die Red-Rekombination essentiellen Gene stabil integriert hat. Zusätzlich tragen E. coli GS1783 ein Gen kodierend für die Homing Endonuklease I-Scel unter einem Arabinose-induzierbaren Promotor. Die Bacmide pCCT-SIV, pCCT-SIV+N und pCCT-SHIV-KB9 wurden über Hitzeschocktransformation in E. coli GS1783 eingebracht und unter Verwendung der im Bakteriengenom stabil integrierten gbx-Kassette modifiziert. Die Induktion der Expression der Red Proteine erfolgte wie unter 3.2.3.3 beschrieben durch einen Temperaturshift der Bakterienkultur auf 42 °C. Die Kultivierung von GS1783 Kulturen erfolgte stets bei 32 °C.

Bezeichnung	Beschreibung	Red-Induktion	Kultivierung
рССТ	gbx-Kassette in single-copy BAC	Zugabe von 0,02% L-Arabinose	37 °C in <i>E. coli</i> Epi300
pSIM5	gbx-Kassette auf <i>low-copy</i> Plasmid	Temperaturshift auf 42 °C	30 °C vor Rekombination 37 °C nach Rekombination
<i>E. coli</i> GS1783	gbx-Kassette stabil im Bakteriengenom	Temperaturshift auf 42 °C	32 °C

Tabelle 3-16: Übersicht der verwendeten Rekombinationsverfahren

3.2.3.5 Interne en passant Rekombination

Für die Deletion der im Bereich des SIVmac239 nef ORF integrierten Chloramphenicol-Resistenz wurde die en passant Methode von Tischer et al. ¹⁷⁸ verwendet. Diese Methode basiert auf der Verwendung der Homing Endonuklease I-Scel in E. coli GS1783, deren Expression durch Arabinose Zugabe induziert wird. Das Enzym führt in vivo einen Doppelstrangbruch im Bacmid mit entsprechender Erkennungssequenz von 18 bp ein und ermöglicht dadurch eine interne homologe Rekombination zwischen den entstandenen linearen dsDNA-Enden. die zu einer rückstandsfreien Ausrekombination des Selektionsmarkers führt. Dies wurde durch das Anfügen der spezifischen Erkennungssequenz für I-Scel sowie einer internen Sequenzduplikation bei der PCR Amplifikation der Chloramphenicol-Resistenz ermöglicht (siehe Bild 4.7).

Hierfür wurden nach erfolgreicher Substitution der rpsLNeo-Kassette, Streptomycin und Chloramphenicol resistente Klone in 5 ml LB Flüssigselektionsmedium ohne Chloramphenicol überimpft und ÜN bei 32 °C geschüttelt. 100 µl der Vorkultur wurden in 2 ml LB Selektionsmedium überführt und 2 h bei 32 °C unter Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml vorgewärmten Selektonsmedium mit 2 % L-Arabinose und weiterer Inkubation bei 32 °C für 60 min wurde die Expression des I-Scel Enzyms induziert. Anschließend erfolgte durch einen Temperaturshift auf 42 °C (für 30 min) das Anschalten des Rekombinationssystems, worauf eine Regenerationsphase von weiteren 2 h Schütteln bei 32 °C folgte. Es wurden je 100 µl einer 1:1.000 und 1:5.000 Verdünnung (in LB₀-Medium) auf frisch hergestellten Selektionsplatten mit 1 % L-Arabinose ausplattiert und für 16 h bei 32 °C inkubiert. Chloramphenicol sensitive Klone wurden durch Replikaplattierung auf Platten mit und ohne Chloramphenicol ermittelt und durch PCR-Analyse auf Entfernung der Resistenzkassette hin überprüft.

3.2.4 Proteinbiochemische Methoden

3.2.4.1 Probenaufbreitung und Bradford Proteinbestimmung

Transfizierte eukaryotische Zellen wurden geerntet, einmal mit kaltem PBS gewaschen (300 x g; 5 min; 4 °C) und in einem geeigneten Volumen RIPA-Puffer mit einer Tablette

Proteaseinhibitor/10 ml (cOmplete[™]; Roche) aufgenommen. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zelllysate 10 min bei 20800 x g und 4 °C abzentrifugiert. Die Überstände wurden in frische Reaktionsgefäße überführt und bei -20 °C gelagert. Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Proben erfolgte nach der Methode von Bradford ¹⁸⁷ mit dem *BioRad Protein Assay* Reagenz (BioRad) nach Herstellerangaben. Die Proteinmenge wurde relativ, bezogen auf eine BSA-Standardgerade, bestimmt.

3.2.4.2 SDS-PAGE und Western Blot Analyse

Zur Analyse von spezifischer Proteinexpression wurden definierte Proteinmengen (60 µg bis 120 µg Gesamtprotein) mit 5 x SDS Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und über ein SDS-Polyacrylamidgel entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt ¹⁸⁸. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend im *"SemiDry* Verfahren" unter Verwendung einer *BlueFlash Blotting*-Apparatur (Serva) nach Herstellerangaben aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran (0,45 µm bzw 0,21 µm; Schleicher & Schuell) transferiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran ÜN bei 4 °C in Blockierungspuffer geschüttelt. Anschließend wurden die Zielproteine mit Hilfe eines spezifischen primären Antikörpers (in TBS + 1 % (w/v) Magermilchpulver) und einem HRP-konjugierten, sekundären Antikörper (in TBS + 3 % (w/v) Magermilchpulver; siehe Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10) nach Standard Methoden detektiert und analysiert ¹⁸³. Die Antikörper-Antigen Komplexe auf der Membran wurden mit Hilfe des *SuperSignal West Pico* Substrates (Thermo Fisher Scientific) über ECL- (*enhanced chemiluminescence*) Detektion im Geldokumentationssystem *ChemiLux Imager* (Intas) detektiert.

3.2.4.3 Quantifizierung der reversen Transkriptaseaktivität

Das "*RetroSys™ Reverse Transcriptase Activity Kit"* (Innovagen) ermöglicht die quantitative Bestimmung der viralen RT-Aktivität in Zellkulturüberständen aller Subtypen von HIV-1, HIV 2, SIV und FIV. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Verwendung von Mikrotiterplatten mit immobilisierten PolyA-Molekülen und Oligo-dT Primern zur Synthese eines komplementären DNA-Stranges. Bei Vorhandensein einer aktiven reversen Transkriptase baut diese das dTTP Analogon Brom-desoxyuridin-triphosphat (BrdUTP) in den Zweitstrang ein. Ein gegen BrdUTP gerichteter, monoklonaler, an alkalische Phosphatase- (AP-) gekoppelter Antikörper bindet an den neu synthetisierten DNA-Strang und ermöglicht über eine Farbreaktion eine Quantifizierung der AP-Aktivität, die proportional zur RT-Aktivität in der eingesetzten Probe ist.

Der Aktivitätstest wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei für die exakte Bestimmung der RT-Aktivität nach Transfektion von 293T-Zellen das Protokoll A mit mehreren Verdünnungen (1:5, 1:25, 1:125, 1:625) der zu untersuchenden Probe verwendet wurde. Für die semi-quantitative Bestimmung der RT-Aktivität in den Überständen von Replikationsstudien wurde das Protokoll B angewandt, wobei je 10 µl unverdünnte Probe eingesetzt wurden. Der Schritt der eigentlichen RT-Reaktion wurde jeweils ÜN durchgeführt. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 415 nm nach 30 min und 60 min im Plattenphotometer (Biorad) gemessen.

3.2.4.4 Quantifizierung der p27 Menge (p27 ELISA)

Die produzierte p27 Menge im Überstand von SIVmac239 transfizierten Zellen wurde mit Hilfe des "SIV p27 Antigen ELISA" *(enzyme-linked immunosorbent assay;* Zeptometrix) bestimmt. Der Test basiert auf der Verwendung von Mikrotiterplatten, die mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für das SIV p27 Protein gekoppelt sind. Virales Antigen in Zellkulturüberständen wird von diesem immobilisierten Antikörper gebunden und schließlich über einen polyklonalen, Biotin-konjugierten anti-SIV Antikörper detektiert. Der ELISA wurde nach Herstellerangaben mit je 200 µl Probe/Verdünnung (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) durchgeführt. Die in den verwendeten Zellkulturüberständen enthaltenen Viren wurden zuvor mit 0,5 % TritonX-100 inaktiviert. Über ein Streptavidin-Peroxidase Konjugat erfolgte die Detektion von gebundenem p27, gemessen im Plattenphotometer (Biorad) über die Absorption bei 450 nm.

3.2.4.5 Quantifizierung der Luciferase-Aktivität

Die quantitative Bestimmung der Luciferase-Expression in infizierten TZM-bl Zellen erfolgte unter Verwendung des "ONE-Glo™ Luciferase Testsystems" (Promega) nach Herstellerangaben. Die Zugabe des Test-Reagenz zu den infizierten Zellen führt dabei sowohl zu einer Zelllyse als auch zu einer Aktivierung der Luciferase durch Luciferin, was wiederum eine Lichtreaktion bedingt. Die Messung der Lichtemission erfolgte 5 min nach Substratzugabe für 1 s im Wallac 1420 Victor3[™] (PerkinElmer).

3.2.5 Zellkulturtechniken

3.2.5.1 Kultivierung von Zellen

Eukaryotische Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in kommerziellem Flüssignährmedium kultiviert (siehe Tabelle 3-17). Adhärente Zellen wurden bei Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:10 bis 1:20 subkultiviert. Suspensionszellen wurden bei einer Zelldichte von 3-5*10⁶ Zellen/ml ebenfalls im Verhältnis 1:10 bis 1:20 subkultiviert.

Zellen	Medium
HEK 293T	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i> (DMEM, Invitrogen), 10 % inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Invitrogen), 100 μg/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin (1 % P/S, PAN Biotech)
CEMx174.5.25.M7	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S, 200 µg/ml G418 (Invivogen), 200 µg/ml Hygromycin (Invivogen), 0,5µg/ml Puromycin (Invivogen)

Tabelle 3-17: Übersicht der verwendeten Zellkulturmedien (Standard Medium)

TZM-bl	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S		
CHO-wtTat	Ham's F12, GlutaMAX™ (Life Technologies), 10 % FKS, 1 % P/S, 600 µg/ml Hygromycin		
PBMC	RPMI 1640, 10 % FKS, 1 % P/S, 20 U/ml Interleukin-2 (IL-2, Roche)		
Die Inaktivierung von FKS erfolgte durch Inkubation bei 56 °C für 30 min.			

3.2.5.2 Generierung und Stimulierung von PBMC aus Vollblut

Die für Replikationsstudien verwendeten primären *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) wurden entweder aus gesunden menschlichen Spendern oder aus Rhesus Makaken (*Macaca mulatta*; Deutsches Primatenzentrum, Göttingen, bereitgestellt durch Dr. Stahl-Hennig) durch Zentrifugation von Vollblut über Ficoll-Paque[™] PLUS (GE Healthcare) gewonnen. Die Stimulierung der humanen PBMC erfolgte durch Zugabe von 3 µg/ml Phytohemagglutinin (PHA-L, Roche) für 48 h. Rhesus PBMC wurden durch Zugabe von 5 µg/ml Concanavalin A (ConA, Sigma) für 24 h stimuliert.

3.2.5.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Das Einbringen von DNA in HEK293T Zellen erfolgte mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI, Polysciences). Hierfür wurden 24 h vor Transfektion 4*10⁵ Zellen/*well* in 6-*well* Platten ausgesät. Unmittelbar vor DNA-Zugabe wurde das Medium durch DMEM ohne Zusätze ersetzt. Je Konstrukt wurden 0,21 pmol DNA in 100 µl DMEM verdünnt, mit 10 µl PEI vermischt und nach 10 min Inkubation bei RT auf die Zellen getropft. Nach 4 h bis 6 h Inkubation bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel zu Vollmedium. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion geerntet und weiter aufbereitet (siehe 3.2.4.1).

3.2.5.4 Herstellung von Virusstocks aus Bacmid-DNA

Zur Generierung von Viren aus Bacmid-DNA wurden HEK293T-Zellen mittels PEI transfiziert (siehe 3.2.5.3). Es wurde standardmäßig 0,21 pmol Bacmid-DNA pro *6-well* verwendet. Für größere Ansätze wurde die Menge an Zellen, DNA und PEI proportional zur Fläche des verwendeten Kulturgefäßes angepasst. Die Zellüberstände wurden 24 h bis 72 h nach Transfektion geerntet, Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 500 x g abgetrennt, die Überstände aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.5.5 Aufkonzentrierung von Viruspartikeln über Ultrazentrifugation

Zur Anreicherung von Viruspartikeln wurden Zellüberstände zunächst bei 500 x g zentrifugiert, in ein neues Gefäß überführt und kurzfristig bei 4 °C gelagert. Im Anschluss wurden sie auf ein 20 %iges (w/v) Saccharose-Kissen in Ultrazentrifugenröhrchen aufgetragen und bei 30.000 rpm für 2,5 h bei 4 °C (TH-641, Thermo Scientific) durch Sedimentation angereichert. Die Pellets wurden in 100 µl RIPA-Lysepuffer mit Proteaseinhibitor gelöst und bei -20 °C gelagert.

3.2.5.6 Bestimmung der in vitro Infektiosität

Die Bestimmung der Infektiosität verschiedener Virusvarianten erfolgte unter Verwendung der TZM-bl Indikatorzelllinie. Für die Infektion dieser CD4-, CCR5- und CXCR4-positiven Zelllinie, die *firefly*-Luciferase unter der Kontrolle des durch Tat aktivierbaren LTR-Promotors exprimiert, wurden virushaltige Zellüberstände transfizierter 293T-Zellen zunächst über die RT-Aktivität normalisiert (siehe 3.2.4.3). 24 h vor Infektion wurden 1,5*10⁴ Zellen/*well* in 96-*well* Platten ausgesät und diese folglich mit 1 ng RT-Äquivalent in einem Volumen von 100 - 500 µl für 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu 110 µl Standard Medium. Die Quantifizierung der Luciferase Expression erfolgte 48 h nach Infektion unter Verwendung des "ONE-Glo™ Luciferase Testsystems" (siehe 3.2.4.5).

3.2.5.7 Bestimmung der in vitro Replikationsfähigkeit

Virushaltige Zellüberstände transfizierter 293T-Zellen wurden über die RT-Aktivität normalisiert (siehe 3.2.4.3). Zur Infektion von CEMx174.5.25.M7 Zellen wurden 0,5 - $1*10^6$ Zellen mit 1 ng RT-Äquivalent in einem Volumen von 500 µl für 6 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu 5 ml RPMI 1640 + Zusätze. Für die Infektion von PBMC wurden $1*10^5$ Zellen/*well* in 48-*well* Platten in einem Volumen von 150 - 500 µl mit 100 pg RT-Äquivalent virushaltigen Überständen inkubiert. Je nach Versuch wurde dem Medium 10 ng/ml TNF- α (Miltenyi Biotec) zugegeben. Alle zwei Tage wurden Proben entnommen und der RT-Gehalt in den Kulturüberständen bestimmt.

3.2.5.8 Bestimmung der in vitro Korezeptor-Verwendung

Zur Charakterisierung des Korezeptor-Gebrauchs einzelner Virusvarianten wurden CD4-, CCR5- und CXCR4-exprimierende TZM-bl Zellen, in Gegenwart und Abwesenheit von spezifischen Korezeptor-Antagonisten infiziert (siehe Tabelle 3-12). Hierfür wurden 24 h vor Infektion 1,5 *10⁴ TZM-bl Zellen/*well* in 96-*well* Platten ausgesät. 2 h vor Infektion wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend DMEM ohne Zusätze mit verschiedenen Konzentrationen der Korezeptor-Antagonisten AMD3100 (500 nM - 1 µM), TAK-779 (5 µM - 10 µM) und PSC-RANTES (50 nM - 100 nM) zugegeben. Nach 1,5 h Inkubation bei 37 °C wurde 50 µl Virussuspension (entsprechend 1 ng RT) auf die Zellen gegeben und weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Inhibitorund Virushaltigen Überstände abgesaugt und durch 100 µl DMEM + Zusätze ersetzt. Die Quantifizierung der Luciferase Expression erfolgte 48 h nach Infektion unter Verwendung des "ONE-Glo[™] Luciferase Testsystems"</sup> (siehe 3.2.4.5).

3.2.5.9 Bestimmung des fusogenen Potentials von HIV-1 env

Zur Bestimmung des fusogenen Potentials von HIV-1 gp160-Varianten wurden zunächst 3,0*10⁴ CHO-wtTat Zellen/*well* in 96-*well* Platten ausgesät und 24 h später mit *env*-kodierenden Plasmiden transfiziert. Unmittelbar vor DNA-Zugabe wurde das Medium durch 30 µl DMEM ohne Zusätze ersetzt. Je Ansatz wurden 200 ng DNA in 30 µl DMEM verdünnt, mit 0,8 µl PEI vermischt und nach 10 min Inkubation bei RT auf die Zellen getropft. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel zu Ham's F12 Medium. Weitere 20 h später wurde das Medium komplett abgesaugt und pro *well* 3*10⁴ TZM-bl Zellen in DMEM Standard Medium zugegeben. Nach 24 h Kokultur wurde die Luciferase-Aktivität der TZM-bl Zellen vermessen (siehe 3.2.4.5).

3.2.5.10 Durchflusszytometrische Analyse

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde zum Einen zur Bestimmung der dsRed Expression in Flüssigkulturen von *E. coli* verwendet. Hierfür wurden Bakteriensuspensionen pelletiert und in PBS resuspendiert.

Zum Anderen erfolgte die Expressionsanalyse des CD4 Rezeptors sowie der HIV-1 Korezeptoren CXCR4 und CCR5 auf CEMx174.5.25.M7 Zellen mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden die Zellen pelletiert, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, in den entsprechenden Verdünnungen der verwendeten Antikörper (siehe 3.1.4.1) resuspendiert und 60 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt. Die Zellen wurden in einer adäquaten Menge FACS-Puffer aufgenommen und mit dem Durchflusszytometer FACS-Canto II (Becton Dickinson) vermessen.

4 Ergebnisse

Die Etablierung eines Infektionsmodells von Rhesus Makaken mit chimären SHIVs als präklinisches Tiermodell seit Anfang der 90er Jahre hat einen großen Fortschritt bei der Validierung von Env-Vakzinekandidaten im Tiermodell möglich gemacht (siehe 2.3.2). Es hatte sich gezeigt, dass SHIVs *in vitro* biologische Eigenschaften ihres parentalen HIV-1 *env* Isolats aufweisen ^{122,121}, und so war die Hoffnung entstanden, dass diese Viren auch *in vivo* immunologische und antigene Eigenschaften vergleichbar zu HIV-1 im Menschen haben.

Die ersten replikationsfähigen chimären Viren waren SHIV-4 ¹¹⁸, SHIV-vpu+ ¹¹⁷ und SHIV-NM3rN ¹⁸⁹. SHIV-4 kodiert für HIV-1 *tat, rev* und *env* des Isolats HXBc2 und ist *vpu* negativ. SHIV-vpu+ basiert auf SHIV-4, kodiert jedoch zusätzlich für HIV-1 *vpu* vom Isolat BH10. SHIV-NM3rN kodiert für HIV-1 *tat, rev, env, vpu* und *vpr* vom Isolat NL4-3. Bei all diesen HIV-1 Isolaten handelt es sich um T-Zell-trope, Labor-adaptierte (*T cell line-adapted*; TCLA) Stämme. Diese ursprünglichen SHIVs konnten in Makaken (*M. fascicularis* bzw. *M. mulatta*) eine Infektion manifestieren und erfolgreich replizieren.

Durch die Aufteilung des 5' und 3' Teils dieser SHIV Proviren auf zwei Plasmide und das Einfügen gewünschter Schnittstellen wurden im Folgenden zahlreiche SHIV-Varianten über konventionelle Klonierungsmethoden hergestellt ^{121,124,136,140}. Die Aufteilung des Virusgenoms in zwei Teile hat sich als vorteilhaft erwiesen, da eine Klonierung mit Volllänge Virusgenom aufgrund des AT-Reichtums und repetitiver Sequenzen innerhalb des Genoms sowie der flankierenden long terminal repeats (LTRs) oft schwierig ist. Die Klonierungsmöglichkeiten waren dabei jedoch aufgrund der überlappenden Leserahmen von tat, rev, vpu und env sehr eingeschränkt. Daher wurde hauptsächlich der zentrale env-Bereich durch die Sequenzen von anderen primären HIV-1 Isolaten ersetzt. Die resultierenden SHIV Proviren tragen HIV-1 Sequenzen von bis zu drei verschiedenen Isolaten, sowohl von TCLA als auch von primären Stämmen, wobei zunächst nur Subtyp B Sequenzen verwendet wurden. Initial zeigte kein SHIV einen pathogenen Effekt in nicht-humanen Primaten. Jedoch konnte mehrfach beobachtet werden, dass SHIVs durch wiederholte in vivo Passagierung ein pathogenes Potential erwerben können ^{123,140,190–192}. Das am besten charakterisierte und am häufigsten als Challenge Virus eingesetzte, pathogene chimäre Virus ist SHIV-89.6P ^{137,138,193-197}. Dieses kodiert für das Env Protein des dualtropen, TCLA-Stammes 89.6 vom Subtyp B. Es konnte festgestellt werden, dass es durch in vivo Passagierung hauptsächlich zu Nukleotidaustauschen in env, tat und den LTR-Bereichen kam. Die meisten Mutationen waren in der env-Sequenz zu finden, was in 12 AS Austauschen in den extrazellulären Domänen von gp120 und gp41 resultierte. Zusätzlich konnte eine 140 bp Deletion in env identifiziert werden, die zu einer Substitution des HIV-1 gp41 C-Terminus durch SIVmac-Sequenzen führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Veränderungen im 3' Teil des

Virusgenoms ausreichen, um eine Depletion von Lymphozyten in Makaken zu verursachen. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen korreliert dabei nicht zwangsweise mit dem Level der Virusreplikation. Diese Veränderungen führten zu einer Veränderung der funktionalen Eigenschaften von Env *in vitro* (bessere Chemokin-Rezeptorbindung, gesteigerte Syncytienbildung) und es ist davon auszugehen, dass sie auch zu einer besseren Interaktion zwischen gp41 und dem Matrix Protein führten. Mittlerweile werden jedoch bevorzugt R5-trope, pathogene SHIVs als *Challenge* Viren verwendet ^{1,198,199}, v. a. das gut charakterisierte SHIV-SF162P3 und Derivate ^{200–202}, da eine Infektion mit diesen Viren einen klinischen Verlauf zeigt, der einer HIV-1 Infektion im Menschen deutlich stärker ähnelt als eine Infektion mit X4- oder dualtropen SHIVs (siehe 2.3.2).

In den letzten Jahren wurden zunehmend neue SHIVs konstruiert, die *env*-Sequenzen primärer Subtyp C Isolate tragen, da Viren dieses Subtyps für rund die Hälfte aller HIV-1 Infektionen weltweit verantwortlich sind (siehe auch 2.1.3). Von diesen ist besonders SHIV-1157ip ¹³¹ erwähnenswert, da dieses in diversen Makakenspezies pathogen ist. Seit Beginn dieser Arbeit wurden mehrere Varianten dieses SHIVs hergestellt, die derzeit in zahlreichen Tierstudien eingesetzt werden ^{142,143,146,203}.

Da derzeit verstärkt an verschiedenen, neuen Vakzineansätzen zur Stimulation der humoralen Immunantwort gearbeitet wird (siehe 2.2), wird es in Zukunft einen großen Bedarf an neuen SHIVs geben, die sowohl in homologen als auch heterologen *Challenge* Studien in Makaken zum Einsatz kommen können. Daher war es Ziel dieser Arbeit, eine Methode zur vereinfachten Herstellung von SHIV-Konstrukten über Rekombination zu etablieren und die Anwendbarkeit des Systems an geeigneten Beispielen zu zeigen.

4.1 Herstellung lentiviraler BAC-Vektoren über Red-Rekombination

Die Red-Rekombinationstechnologie, basierend auf den Funktionen der drei Proteine Exo, Beta und Gam des λ Phagen, hat sich in den letzten 10 Jahren als Methode der Wahl für die Herstellung und Mutagenese von Herpesviralen BACs etabliert (siehe 2.4.1). Kürzlich wurde auch die Generierung eines BAC - HIV beschrieben ¹⁵⁶, das unter Verwendung des Cre - loxP Systems hergestellt wurde und für ein HIV-1 basiertes GFP Reportervirus ²⁰⁴ kodiert. Dieser Gruppe gelang es nicht das Volllänge Virusgenom mit einer Größe von 10 kb über Red-Rekombination als BAC-Vektor zu klonieren. Im Rahmen dieser Arbeit dagegen konnten die Volllänge Virusgenome von SIVmac239 und SHIV-KB9 mittels Red-*Recombineering* als BAC-Vektoren hergestellt (siehe Bild 4.1) und unabhängig von Restriktionsschnittstellen oder -enzymen weiter verändert werden.

4.1.1 Herstellung eines SIVmac239 BAC-Vektors über 3-Stufen-Rekombination

Als Grundlage für die effiziente Anwendung der Red-Rekombinationstechnologie sollte ein zu verändernder Zielvektor in möglichst geringer Kopienzahl in einer Bakterienzelle vorliegen. Aus diesem Grund werden hauptsächlich BAC-Vektoren als Zielvektoren eingesetzt, da sie in nur 1 - 2, max. jedoch in 5 Kopien pro Zelle vorhanden sind. Ursächlich für diese geringe Kopienanzahl ist der Replikationsursprung ori2, der durch die Genprodukte von repE, parA, parB und parC kontrolliert wird. Als BAC-Zielvektor für die Herstellung retroviraler BACs wurde der Vektor pCCT (siehe Bild 4.1 A) verwendet. Dieser Vektor basiert auf dem Vektor pCC1BAC™ (Epicentre), enthält iedoch zusätzlich eine Rekombinationskassette, kodierend für die λ Proteine Exo, Beta und Gam unter der Kontrolle des L-Arabinose induzierbaren araBAD Promotors P_{BAD}. Der Vektor pCC1 enthält zusätzlich zu ori2 einen weiteren Replikationsursprung, oriV. Dieser wird durch das Genprodukt von trfA initiiert. Die Expression dieses Proteins wird in dem trfA-positiven E. coli Stamm Epi300 durch Zugabe von L-Arabinose induziert, was ein Ansteigen der Kopienzahl auf ca. 50 - 100 Kopien/Zelle bewirkt ²⁰⁵ und dadurch ein Steigerung der Plasmidausbeute bei DNA-Präparationen des Vektors ermöglicht.



Bild 4.1: Herstellung des lentiviralen BAC-Vektors pCCT-SIV über 3-Stufen-Rekombination in *E. coli* Epi 300. Der Zielvektor pCCT beinhaltet alle zur Red-Rekombination (rosa) sowie zur Vermittlung eines *single*- (dunkelblau) oder *low-copy* Status (hellblau) notwendigen Gene. Das Genom von SIVmac239 (grau) wurde in drei Fragmente aufgeteilt, die nacheinander in drei unabhängigen Rekombinationsschritten in den BAC-Vektor pCCT eingefügt wurden. Schraffiert = LTR-Sequenzen.

4.1.1.1 Herstellung linearer Transferkonstrukte

Für die Entwicklung neuartiger SHIVs, die sich evtl. auch in der Genomorganisation bzw. ihrem SIV - HIV-1 Anteil von den bisher verfügbaren Konstrukten unterscheiden, wurde für diese Arbeit zunächst das Virusgenom des pathogenen SIVmac239 als Ausgangssequenz für die Herstellung eines BAC-Provirus verwendet. Dieses Isolat diente auch bei der Herstellung der bisher verfügbaren SHIVs als Basis. Die Sequenz von SIVmac239 wird durch die beiden Plasmide p239SpSp5' und p239SpE3' nef open (siehe Tabelle 3-6) kodiert. Versuche das Virusgenom durch Verdau dieser Plasmide mit Initiale den Restriktionsendonukleasen Sphl und Xhol und anschließender Ligation in pCCT auf herkömmliche Weise zu klonieren, waren nicht erfolgreich. Daher wurde der gewünschte SIV-BAC über eine 3-stufige Red-Rekombination hergestellt. Zu diesem Zweck wurde das SIVmac239 Virusgenom zunächst mittels PCR in drei Fragmenten A (2,6 kb), B (4,3 kb) und C (3,4 kb) amplifiziert (siehe 3.2.3.1.1; Bild 4.2). Fragment B umfasste Sequenzen beider Ausgangsplasmide und wurde über eine Fusions-PCR (Overlap Extension PCR; siehe 3.2.2.6) generiert. Über die verwendeten Oligonukleotide wurden an jedes der drei Fragmente passende Schnittstellen (Ascl und Xhol oder Pacl) für die Klonierung in die Vektoren pMX-RBX (siehe Tabelle 3-6) fusioniert. Die Fragmente A und C wiesen darüber hinaus 50 bp überlappende Sequenzen zu Fragment B auf, die als homologe Bereiche für die Integration über Rekombination dienten. Durch Klonierung in die Vektoren pMX-RBX wurde jedes der drei Virusgenom-Fragmente mit einer unterschiedlichen positiven Selektionskassette, die eine Resistenz gegen eines der Antibiotika Ampicillin, Kanamycin oder Zeocin vermittelt, und homologen Bereichen von je 50 bp zum Zielvektor pCCT fusioniert (siehe Bild 4.2).



Bild 4.2: Lineare Transferkonstrukte zur Herstellung des BAC-Vektors pCCT-SIV. Lineare dsDNA-Fragmente wurden durch Verdau der Plasmide pMZ-SIVA, pMA-SIVB und pMA-SIVC mit EcoRV hergestellt. Jedes Transferkonstrukt besteht aus einem Virusgenom-Abschnitt von SIVmac239 (grau), fusioniert an eine bakterielle Selektionskassette (orange) und 50 bp homologe Arme (lila, hell- und dunkelgrün) zur Rekombination in pCCT. Die Zahlen beziehen sich auf die Nukleotidposition in SIVmac239. Durch Verdau der drei resultierenden Plasmide pMZ-SIVA, pMA-SIVB und pMA-SIVC mit dem *Blunt* schneidenden Enzym EcoRV konnten schließlich drei lineare dsDNA-Fragmente hergestellt werden, die als Transferkonstrukte für die Rekombination in den BAC-Vektor pCCT dienten.

4.1.1.2 Rekombinationsschritte

In einer ersten Red-Rekombination wurde das Fragment B, kodierend für die Nukleotide 2577 bis 6900 von SIVmac239, über die homologen Bereiche DG (dunkelgrün) und HG (hellgrün) in den Zielvektor pCCT in E. coli Epi300 eingefügt (siehe 3.2.3.2; Bild 4.1). Durch die Verwendung von Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten wurde auf Bakterienklone mit positiv rekombiniertem Vektor pCCT-SIVB selektioniert. Die erhaltenen Kolonien wurden zunächst durch Replikaplattierung auf verschiedenen Selektionsplatten und analytische C-PCR (siehe 3.2.2.5) weiter analysiert. Konkret wurden die erhaltenen Kolonien nach diesem ersten Rekombinationsschritt auf Kanamycin-, Chloramphenicol- und auf Ampicillinhaltigen Agarplatten ausgestrichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass alle Klone sehr gutes Wachstum in Gegenwart von Kanamycin zeigten, was dem erwarteten Verhalten von positiven Rekombinanten entsprach. Jedoch konnte für 13 von 16 Klonen auch ein leichtes Wachstum auf Chloramphenicol-haltigen Platten beobachtet werden, was für das zusätzliche Vorhandensein des nicht-rekombiniertem Ausgangsvektors pCCT spricht (siehe auch Bild 4.3 C). Dies ist darauf zurück zu führen, dass pCCT nicht nur in einer einzigen Kopie pro Zelle vorliegt. Auf Ampicillin-haltigen Platten konnte erwartungsgemäß keinerlei bakterielles Wachstum beobachtet werden. Für die zusätzliche Analyse dieser 16 getesteten Einzelklone mittels C-PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die (1) den Übergang von pCCT in das Fragment B (Rk1f + SIVBr), (2) den Übergang der Kanamycin-Resistenzkassette in pCCT (Rk6f + camRr) und (3) nicht rekombinierten pCCT (Rk1f + Rk3r) nachweisen (siehe Bild 4.3 B). Es zeigte sich, dass 11 von 16 Klonen sowohl bei Ansatz (1) und (2) (siehe Bild 4.3 C, Spur 3-5, 7-10, 13-16) sowie 10 von 16 Klonen auch bei Ansatz (3) (siehe Bild 4.3 C, Spur 1, 5-9, 11, 13-15) ein nachweisbares PCR Produkt lieferten. Dies bestätigt die Annahme, dass bakterielle Einzelklone nach einer Rekombination mit pCCT teilweise eine Mischung aus nicht-rekombiniertem Ausgangsvektor und positiv-rekombiniertem Vektor enthalten.



Bild 4.3: Analyse von Bakterien Einzelkolonien nach der ersten Red-Rekombination. (A) Schema der einzelnen Analyse- und Aufreinigungsschritte. (B) Relative Lage der Oligonukleotide zum Nachweis positiv rekombinanter Klone in einer C-PCR. (C). Ergebnis der C-PCR nach Integration von SIV Fragment B in pCCT als Beispiel.

Anhand der Kombination dieser Ergebnisse wurden zwei Klone ausgewählt (#3 und 4) und für eine BAC DNA-Präparation als Flüssigkultur angezogen (siehe 3.2.2.3). Die erhaltene BAC-DNA wurde mit der *Homing* Endonuklease PI-Scel, die nur im Ausgangsvektor pCCT, nicht jedoch in positiv rekombiniertem pCCT-SIVB einmalig schneidet, verdaut und in chemisch-kompetente *E. coli* Epi300 retransformiert. Diese Methode wurde kürzlich auch als *Unique Restriction Site Elimination* (USE) bezeichnet ²⁰⁶. Es erfolgte eine erneute Analyse der erhaltenen Klone mittels C-PCR. Es zeigte sich, dass nun alle Klone (6 von 6) in Ansatz (1) und (2) positiv und in Ansatz (3) negativ waren (siehe oben). Dies bedeutet, dass die analysierten Einzelklone jetzt ausschließlich den durch Rekombination neu hergestellten BAC-Vektor pCCT-SIVB enthielten. Diese Klone dienten für die Anfertigung von Glycerinkulturen sowie der erneuten BAC DNA-Präparation. Die erhaltene Bacmid-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung erfolgreich auf eine vollständige Integrität des Konstruktes überprüft.

Die angefertigten Glycerinkulturen dienten als Ausgangsmaterial für den zweiten Rekombinationsschritt, der zur Insertion des SIVmac239 Fragments C und damit der Generierung von pCCT-SIVBC führte (siehe Bild 4.1). Analog zu dem oben beschrieben Verfahren wurde in diesem Schritt auf Zeocin-resistente, Kanamycin-sensitive Klone selektioniert. Es erwiesen sich 2 von 16 Klonen als postitive Rekombinanten, die beide noch mit nicht-rekombiniertem Ausgangsvektor kontaminiert waren. Die für die C-PCR verwendeten Oligonukleotide wurden entsprechend variiert. Es kamen die Oligonukleotide tat1f, env1r, Rk7f, camRr, Rk1f und SIVBr (siehe 6.4) zum Einsatz. Als singulär schneidende

Homing Endonuklease für den Verdau von nicht-rekombiniertem Ausgangsvektor pCCT-SIVB wurde das Enzym I-Scel verwendet. Nach erneuter Analyse der erhaltenen Einzelkolonien waren wieder alle Klone (6 von 6) rein d. h. mittels C-PCR wurde ausschließlich erfolgreich rekombinierter Vektor pCCT-SIVBC nachgewiesen.

In einem dritten Rekombinationsschritt schließlich wurde das noch fehlende Genom-Fragment A eingefügt. Die Selektion positiver Rekombinanten erfolgte mittels Ampicillin. Für die C-PCR kamen die Oligonukleotide Rk2f, Rk4r, pol1f, pol1rev, Rk1f und SIVBr zum Einsatz (siehe 6.4). Die Analysen zeigten, dass 16 von 16 getesteten Klonen erfolgreich rekombinierten Vektor pCCT-SIV enthielten. Nicht rekombinierter Vektor pCCT-SIVBC konnte analog zum ersten Schritt mit Hilfe der *Homing* Endonuklease PI-Scel verdaut und somit erfolgreich eliminiert werden.

Als Ergebnis dieser drei einzelnen, hintereinander durchgeführten Red-Rekombinationen lag nun das Volllänge Virusgenom von SIVmac239 als viraler BAC-Vektor pCCT-SIV vor. Erwähnenswert ist an dieser Stelle, dass durch das Einfügen von Fragment A im dritten Rekombinationsschritt die Rekombinationskassette gbx aus dem Vektor entfernt wurde. Dies war im Vorfeld bewusst so gewählt worden, um ungewollte Rekombinationen zu vermeiden und so die Stabilität des hergestellten SIV-BACs zu gewährleisten. Erst nach diesem Schritt wurde den Bakterienkulturen für die DNA-Präparation L-Arabinose zur Induktion des *lowcopy* oriV zugegeben, da dies sonst auch zu einer Induktion der gbx-Kassette geführt hätte. Dies hätte zu ungewünschten Rekombinationen führen können. V. a. jedoch ist die Expression von λ Gam mit der Zeit toxisch und hätte zu einem Absterben der Kulturen geführt.

4.1.2 Herstellung weiterer BAC-Proviren

Analog zu dem Verfahren wie unter 4.1.1 beschrieben, wurden zwei weitere lentivirale BACs hergestellt. Der erste, pCCT-SIV+N kodiert ebenso wie pCCT-SIV für das Genom von SIVmac239. Jedoch wurde im 3' LTR eine zusätzliche NF-κB Bindestelle eingefügt, da beschrieben ist, das dies zu einer gesteigerten Replikationsfähigkeit der resultierenden Viren führt ¹³¹. Hierzu wurde in dem unter 4.1.1.1 hergestellten Plasmid pMA-SIVC die bereits vorhandene NF-κB Bindestelle im 3' LTR über ortsspezifische Mutagenese mittels PCR durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide (siehe Tabelle 3-5) verdoppelt. Das resultierende Plasmid pMA-SIVC+N wurde mit EcoRV verdaut und lieferte so das alternative lineare dsDNA Fragment C+N. Dieses wurde analog zu Fragment C in den Vektor pCCT-SIVB über Rekombination eingefügt. Im Anschluss daran wurde analog zu 4.1.1.2 Fragment A über Rekombination integriert, was zu dem zweiten SIV-BAC-Vektor pCCT-SIV+N führte.

In Anlehnung an die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Johanna Englberger²⁰⁷ ein dritter lentiviraler BAC-Vektor hergestellt. Dieser kodiert für das

Virusgenom des pathogenen SHIV-89.6P, das die *env*-Sequenz eines dualtropen Virus vom Subtyp B trägt. SHIV-89.6P ist eine virale Quasispezies, die durch Passagierung über mehrere Rhesus Makaken entstand ¹²³. Für die Herstellung des SHIV-BACs wurde der molekulare Klon KB9 verwendet ¹³⁷, dessen DNA-Sequenz ebenso wie bei SIVmac239 durch zwei Plasmide kodiert wird (siehe Tabelle 3-6). Das Design der erforderlichen Rekombinationsfragmente, die Herstellung linearer Transferkonstrukte und schließlich die Durchführung der einzelnen Rekombinationsschritte erfolgten analog zu dem unter 4.1.1 beschriebenen Verfahren und resultierten in dem BAC-Vektor pCCT-SHIV-KB9.

Alle drei viralen BAC-Vektoren wurden durch Restriktionsanalyse (siehe Bild 4.11) und Sequenzierung des gesamten Virusgenoms auf ihre vollständige Integrität überprüft.

4.1.3 Rekombinations-Effizienzen

Für die Bestimmung der Effizienz der durchgeführten Red-Rekombinationen wurden bei jedem Versuch auch nicht Red-induzierte Bakterien mit linearer dsDNA elektroporiert und auf dem jeweils erforderlichen Selektionsmedium ausplattiert. Bei der Auswertung wurde sowohl von Red-induzierten als auch von nicht Red-induzierten Kulturen die Anzahl der resistenten Bakterienkolonien (*colony forming units*; CFU), normiert auf die Gesamtzahl der überlebenden Bakterienzellen nach Elektroporation, bestimmt und diese Werte miteinander verglichen (siehe Tabelle 4-1). Die Gesamtzahl der lebenden Bakterien wurde durch serielle Verdünnungen der Kulturen im Verhältnis von 1:1.000 bis 1:10.000 und Ausplattieren auf LB-Agarplatten ohne Zusätze bestimmt.

Tabelle 4-1: Rekombinations-Effizienzen bei der Herstellung lentiviraler BACs (Mit	telwerte aus fünf
unabhängigen Experimenten)	

Resistente Bakterienkolonien / 10 ⁸ lebende Zellen			
Red-induziert	nicht Red-induziert		
2,2 x 10 ⁴ CFU	9,7 x 10 ² CFU		

Die erhaltenen Effizienzen zeigen einen Unterschied von 2 log Stufen zwischen induzierten und nicht induzierten Bakterienkulturen und entsprechen damit den Erwartungen ^{170,150}. Interessanterweise kam es bei 67 % der durchgeführten Rekombinationen zu gar keinem Hintergrund in Form von resistenten Kolonien aus nicht Red-induzierten Bakterienkulturen.

4.1.4 Generierung zellfreier Virusüberstände

Zur Überprüfung ob eine Transfektion von eukaryotischen Zellen mit den hergestellten viralen BACs Viruspartikel liefert wurden 293T-Zellen (siehe Tabelle 3-2) mit äquimolaren Mengen der BAC-Konstrukte (entsprechend ~ 2,5 µg DNA) transfiziert. Zum Vergleich wurden die Zellen auch mit den linearisierten Virusgenomen von SIVmac239 und SHIV-KB9 auf konventionelle Art transfiziert ^{124,118}. Hierfür wurden die 5' und 3' Teile der

Virussequenzen der in Tabelle 3-6 aufgeführten Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und miteinander ligiert. Es wurde direkt der Ligationsansatz zur Transfektion verwendet. Die Zellkulturüberstände der einzelnen Ansätze wurden 72 h nach Transfektion abgenommen, abzentrifugiert, in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C gelagert. Die Menge an Viruspartikeln in diesen zellfreien Überständen wurde durch die Quantifizierung der reverse Transkriptase-Aktivität unter Verwendung des *"RetroSys™ Reverse Transcriptase Activity Kit"* (siehe 3.2.4.3) bestimmt.



Bild 4.4: Herstellung zellfreier Virusüberstände. Pro Ansatz wurden 3x10⁵ 293T-Zellen im 6-*well* Format mit äquimolaren Mengen (0,21 pmol) unterschiedlicher BAC-Vektoren bzw. linearisierten Virusgenomen mittels PEI transfiziert. Virushaltige Überstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Menge an reverser Transkriptase quantitativ bestimmt.

Die Quantifizierung der RT-Aktivität (siehe Bild 4.4) zeigt, dass eine Transfektion mit allen drei hergestellten lentiviralen BAC-Vektoren pCCT-SIV, pCCT-SIV+N und pCCT-SHIV-KB9 zur Produktion von Viruspartikeln führte. Diese Partikel erwiesen sich auch alle als infektiös (siehe 4.2.7). Die Transfektion mit lentiviralen Bacmiden erwies sich dabei als deutlich effizienter (Faktor 5 bei SIV bzw. Faktor 100 bei SHIV-KB9) als eine Transfektion mit linearer DNA.

4.2 BAC-Mutagenese

Für die Mutagenese viraler BACs gibt es zahlreiche Rekombinations- und Selektionssysteme (siehe 2.4.2). Da im letzten Schritt der BAC-Herstellung die Rekombinationskassette von pCCT ersetzt wurde, musste für folgende Rekombinationen eine andere Quelle für die Expression der Proteine Exo, Beta und Gam des λ Phagen verwendet werden. Hierfür ist prinzipiell die Verwendung eines Bakterienstammes, der einen defekten Prophagen stabil integriert hat, oder die Verwendung eines Rekombinationsplasmids möglich. Da in den *trfA*+ *E. coli* Epi300 die Induktion des *low-copy* oriV möglich ist, wurde für die weitere BAC-Mutagenese dieser Stamm in Kombination mit dem Rekombinationsplasmid pSIM5 verwendet, welches die Phagenproteine unter der strikten Kontrolle des temperatursensitiven Repressors cl857 exprimiert (siehe 2.4.2.1). pSIM5 wurde über Elektroporation in BAC-tragende *E. coli* Epi300 eingebracht, mittels Chloramphenicol selektioniert und über eine C-PCR der resultierenden Bakterienkolonien nachgewiesen. Positive Klone wurden für die Anfertigung einer Glycerinkultur verwendet, die als Inokulum für Flüssigkulturen zur

Rekombination diente (siehe 3.2.3.3). Die Expression der Gene *exo*, *bet* und *gam* konnte hierbei durch einen kurzen Temperatursprung von 15 - 30 min auf 42 °C initiiert werden.

Das Plasmid pSIM5 trägt den Temperatur-sensitiven Replikationsursprung ori101. Dieser garantiert die Stabilität des Plasmids bei niedrigen Temperaturen von 30 - 32 °C. Passagiert man eine pSIM5 positive Bakterienkultur jedoch über mehrere Runden bei einer Temperatur von 37°C oder höher geht das Plasmid mit der Zeit verloren, da es nicht weiter vermehrt und so schließlich ausgedünnt wird. Dies ermöglicht eine reine BAC DNA-Präparation nach erfolgter Rekombination ohne Kontamination durch pSIM5.

Bei der Wahl eines Selektionssystems zur weiteren BAC-Mutagenese war es wichtig, ein System zu verwenden, das keinerlei "Narben" im Virusgenom zurück lässt (siehe 2.4.2.2), da nur so die Integrität aller überlappender Leserahmen von SIVmac239 gewährleistet ist. Daher wurde im Weiteren die doppelte Selektions- und Gegenselektionskassette *rpsLNeo*¹⁷² verwendet, da diese Kassette als wenig anfällig für Mutationen gilt und die erforderlichen Selektionsschritte einfach in der Handhabung sind.

4.2.1 Das Selektions- und Gegenselektionssytem *rpsLNeo* zur Herstellung von SIV-BAC-Varianten

Die Verwendung der doppelten Selektions- und Gegenselektionskassette *rpsLNeo* ist in den meisten *E. coli* K12 Laborstämmen möglich, da diese eine Mutation im wt *rpsL* Gen aufweisen. Diese Mutation verleiht den Bakterien eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Streptomycin. Wird in solche Stämme eine Kopie der wt *rpsL*-Sequenz eingebracht, ist dies dominant und die Bakterien werden wieder Streptomycin-sensitiv. *Neo* verleiht eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin und erlaubt eine positive Selektion der Kassette nach erfolgter Integration. Wird im Folgenden die *rpsLNeo*-Kassette wieder durch eine beliebige andere DNA-Sequenz ersetzt, kann mittels Streptomycin auf die Entfernung der Kassette selektioniert werden (siehe Bild 4.5).



E. coli Epi300 + pCCT-SIVrN

Bild 4.5: Funktionsweise der Selektions- und Gegenselektionskassette *rpsLNeo*. Zur Überprüfung der Funktionalität der *rpsLNeo*-Kassette in pCCT-SIVrN wurden Einzelkolonien auf Kanamycin-haltigem oder Kanamycin- und Streptomycin-haltigem LB Nährmedium ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Die wt*rpsL*-Sequenz vermittelt eine Sensitivität gegenüber Streptomycin.

Zur Etablierung und Validierung der Mutagenese lentiviraler BACs unter Verwendung der *rpsLNeo*-Kassette wurden zunächst ausschließlich Varianten des Vektors pCCT-SIV hergestellt. In einem ersten Red-Rekombinationsschritt wurden, unter Verwendung von

SIV-BAC- und pSIM5-tragender *E. coli* Epi300, 1,9 kb des zentralen *env*-Bereichs von SIVmac239 durch die *rpsLNeo*-Kassette (1,5 kb) ersetzt (siehe 3.2.3.3). Durch die Verwendung von Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten konnte auf erfolgreich rekombinierte Einzelklone selektioniert werden. Die Integration der Kassette wurde durch C-PCR unter der Verwendung entsprechender Oligonukleotide nachgewiesen. Von positiven Einzelklonien wurden Flüssigkulturen angezogen, die zur Entfernung des Rekombinationsplasmids pSIM5 3 – 5mal bei 37 °C passagiert wurden. Dies geschah durch 1:5000 Verdünnungen der Kultur in neues Medium, im Abstand von je 12 h. Aliquots der Kulturen wurden auf Selektionsmedium ohne Chloramphenicol ausplattiert und erhaltene Bakterienkolonien mittels C-PCR auf den Verlust von pSIM5 überprüft. C-PCR negative Klone wurden ÜN als Flüssigkultur bei 37 °C unter der Zugabe von L-Arabinose zur Induktion des oriV angezogen und dienten als Ausgangsmaterial für die DNA-Präparation des BAC-Vektors pCCT-SIVrN. Dieser Vektor wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Dabei wurden keine Fehler festgestellt.



Bild 4.6: Mutagenese des BAC-Vektors pCCT-SIV in *E. coli* Epi300. Zunächst wurde der zentrale SIVmac239 *env* Teil (1,9 kb) des Zielvektors pCCT-SIV durch die Selektions- und Gegenselektions-kassette *rpsLNeo* (1,4 kb) ersetzt. Diese Kassette vermittelt *E.coli* Epi300 sowohl eine Kanamycin-Resistenz als auch eine Streptomycin-Sensitivität. In einem zweiten Rekombinationsschritt wurde *rpsLNeo* durch eine Kassette kodierend für den Fluoreszenzmarker *dsRed* bzw. durch eine mutierte SIVmac239 *env*-Sequenz mit einer zusätzlichen KpnI Restriktionsschnittstelle ersetzt. Als homologe Bereiche dienten in beiden Schritten 50 bp bzw. 51 bp flankierende Sequenzen von SIVmac239.

Bakterienklone, die den BAC-Vektor pCCT-SIVrN tragen, dienten als Ausgangsmaterial für eine zweite Rekombination, die analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt wurde. In diesem zweiten Rekombinationsschritt wurde die *rpsLNeo*-Kassette in pCCT-SIVrN zunächst durch eine *dsRed*-Kassette (1,1 kb) ersetzt, die konstitutiv exprimiert wird und ein in *E. coli* rot fluoreszierendes Protein kodiert. Diese Kassette wurde über PCR aus dem Plasmid pGA18-dsRed amplifiziert (siehe 3.2.3.1.2; Tabelle 3-6), wobei durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide homologe Bereiche von 50 bp (5') bzw. 51 bp (3') zum Zielvektor pCCT-SIVrN angefügt wurden. Die Insertion der *dsRed*-Kassette diente der Bestimmung der Effizienz des zweiten Rekombinationsschrittes zur Herstellung von SIV-BAC Mutanten. Nach Durchführung dieses Schrittes sowohl in Red-induzierten als auch

SIV-BAC Mutanten. Nach Durchführung dieses Schrittes sowohl in Red-induzierten als auch nicht Red-induzierten Kulturen, wurden die Bakterien auf Streptomycin-haltigem LB-Agar ausplattiert und ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Effizienz der Rekombination wie unter 4.1.3 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse entsprachen den in Tabelle 4-2 angegebenen Werten. Die Rekombinationsplatten wurden bei 4 °C gelagert und die Bakterienkolonien in regelmäßigen Abständen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf Expression von dsRed untersucht. Anhand der Intensität des Signals konnte festgestellt werden, dass die Expression 48 h nach Rekombination ein Maximum erreicht und danach sehr stabil bleibt. So war die Fluoreszenz bei Lagerung der Platten bei 4 °C mind. eine Woche unverändert detektierbar.

Parallel zur Insertion der *dsRed*-Kassette wurde zur Überprüfung des Rekombinationssystems *rpsLNeo* auch wieder durch die ursprüngliche SIVmac239 *env*-Sequenz (1,9 kb) ersetzt, die im ersten Rekombinationsschritt durch *rpsLNeo* substituiert wurde. In diese virale Sequenz wurde zuvor über ortsspezifische Mutagenese eine stille Mutation eingefügt (siehe auch Tabelle 3-5), die zur Ausbildung einer zusätzlichen Erkennungsstelle für die Restriktionsendonuklease KpnI führte. So konnte die SIV-BAC Mutante pCCT-SIVenvK hergestellt werden, die ein anderes Restriktionsmuster als der Ausgangsvektor pCCT-SIV aufweist (siehe Bild 4.11), jedoch nach Transfektion von eukaryotischen Zellen zur Produktion derselben Viren führt.

4.2.2 Reduktion der Rekombinationseffizienz durch LTR-Rekombination

Die Analyse der Rekombinationseffizienzen in jedem der bisher durchgeführten Versuche zeigte, dass allgemein die Insertion einer DNA-Sequenz, die direkt mit einem positiven Selektionsmarker fusioniert ist, deutlich effizienter ist, als eine Substitution der *rpsLNeo*-Kassette. Dies ist aus Tabelle 4-2 ersichtlich. So wurden bei Substitution von *rpsLNeo* in Red-induzierten und nicht Red-induzierten Kulturen in etwa gleich viele Streptomycin-resistente (StrepR) Bakterienkolonien erhalten. Auch Red-induzierte Kulturen, die ohne Zugabe einer linearen dsDNA elektroporiert wurden, führten zum Wachstum zahlreicher Streptomycin-resistenter bakterieller Einzelklone.

Rekombinationsart	Resistente Bakterienkolonien / 10 ⁸ lebende Zellen			
	Red-induziert + DNA	nicht Red-induziert + DNA	Red-induziert - DNA	
Insertion Sm	2,3 x 10 ⁴ CFU	0,7 x 10 ² CFU	n. d.	
Substitution rpsLNeo	2,9 x 10 ⁵ CFU	4,7 x 10 ⁵ CFU	3,4 x 10 ⁵ CFU	

 Tabelle
 4-2:
 Effizienz
 der
 Red-Rekombination
 mit
 pSIM5
 (Mittelwerte
 aus
 jeweils
 neun

 unabhängigen
 Experimenten)

 <

Es war daher die Überprüfung einer Vielzahl von Kolonien mittels PCR notwendig, bis die SIV-BAC Mutanten pCCT-SIVdsRed und pCCT-SIVenvK erfolgreich isoliert werden konnten. Auch die fluoreszenzmikroskopische Analyse der mit *dsRed* elektrotransformierten Bakterien zeigte, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der erhaltenen, Streptomycin-resistenten Klone erfolgreich rekombiniert war. So konnten im Durchschnitt 13,3 % leuchtende Kolonien beobachtet werden. Dieser Wert zeigte deutliche Schwankungen von 0 - 50 % in insgesamt 14 durchgeführten Rekombinationsversuchen unter Verwendung der *dsRed*-Kassette. In diesen Versuchen wurden verschiedene Parameter des Protokolls variiert, um deren Einfluss auf die Effizienz zu überprüfen. Hierzu zählen unterschiedliche Red-Induktionszeiten, unterschiedliche Protokolle zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien und die Variation der Wachstumszeit und -temperatur nach Elektroporation. Jedoch brachte keine der Veränderungen einen deutlichen oder reproduzierbaren Erfolg. Auch die Verwendung des *E. coli* Stammes Stbl 2 (siehe Tabelle 3-1), der besonders für die Klonierung unstabiler Inserts wie z. B. retroviraler Genome konstruiert wurde ²⁰⁸, brachte keine Verbesserung.

Durch die Analyse von Streptomycin-resistenten, nicht dsRed-exprimierenden Klonen konnte schließlich gezeigt werden, dass diese Bakterienzellen zwar den BAC-Vektor pCCT tragen, dieser jedoch das SIVmac239 Genom nicht mehr beinhaltet. Durch Sequenzierung der DNA entsprechender Klone zeigte sich, dass als Überrest der viralen Sequenz ein LTR im Vektor zurück geblieben ist, was typisch für eine Ausrekombination des Virusgenoms über die repetitiven LTR-Sequenzen ist (LTR-Rekombination).

4.2.3 Optimierung des Recombineering-Systems zur Steigerung der Effizienz

Der durch LTR-Rekombination verursachte hohe Hintergrund an Streptomycin-resistenten Kolonien bei der Substitution von *rpsLNeo* macht die gleichzeitige Herstellung einer Vielzahl von SIV-BAC Mutanten unmöglich. Daher wurde angestrebt, das Rekombinationssystem anzupassen, um diesem Effekt entgegenzuwirken. Dies sollte später die gleichzeitige Konstruktion verschiedener SHIV-Varianten, die *env*-Sequenzen unterschiedlicher HIV-1 Isolate tragen, ermöglichen.

Zur Stabilisierung des SIVmac239 Genoms wurde eine zusätzliche Selektionskassette in den SIV *nef*-Bereich eingefügt. Damit kann zwar die Rate der LTR-Rekombination nicht

vermindert werden, jedoch wird eine Gegenselektion zu diesem Ereignis möglich und das Wachstum von LTR-Rekombinanten verhindert.

Hierfür wurde eine rückstandslos wieder entfernbare Selektionskassette, die eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol vermittelt, über Rekombination in *nef* eingefügt, da bereits gezeigt werden konnte, dass SIV Nef für die *in vivo* Replikation von SHIVs in Makaken deutlich von Vorteil ist ^{135,189} und im weiteren Verlauf nicht durch HIV-1 Sequenzen ersetzt werden sollte. Das Design der Chloramphenicol-Resistenzkassette orientierte sich an der von Tischer *et al.* ¹⁷⁸ beschriebenen *en passant* Mutagenese. Diese Methode ermöglicht eine spurlose Entfernung von DNA-Sequenzen über eine interne homologe Rekombination und basiert ebenfalls auf der Anwendung der Red-Rekombinationstechnologie. So wird nach Entfernung dieser Kassette aus dem SIV *nef*-Bereich wieder ein vollständig intakter *nef* ORF erhalten.



Bild 4.7: Effizienzsteigerung des Rekombinationssystems. Das Einfügen einer Selektionskassette in den SIV *nef* ORF über Red-Rekombination erlaubt eine Selektion auf Bacmide, die das SIVmac239-Virusgenom integriert haben und wirkt so einer LTR-Rekombination entgegen. Nach erfolgreicher BAC-Mutagenese über *rpsLNeo* kann diese Kassette *en passant* wieder entfernt werden. Durch Induktion der *Homing* Endonuklease I-Scel in dem Rekombinationsstamm *E. coli* GS1783 wird flankierend zu der Selektionskassette geschnitten und über eine zuvor mit eingeführte Sequenz-duplikation kann eine interne homologe Rekombination stattfinden.

Um diese Methode anwenden zu können, wurden alle weiteren Rekombinationen dieser Arbeit in dem Rekombinationsstamm *E. coli* GS1783 durchgeführt. Dieser Stamm trägt die für die Red-Rekombination erforderlichen Gene als stabil integrierten Prophagen im Genom. Die Expression der Proteine Exo, Beta und Gam wird ebenso wie bei pSIM5 durch einen Hitzeshift auf 42 °C induziert. Außerdem haben *E. coli* GS1783 das Gen, das für die *Homing* Endonuklease I-Scel kodiert, unter der Kontrolle des L-Arabinose-induzierbaren P_{BAD} Promotors stabil integriert ¹⁷⁹. Die *en passant* Rekombination nützt eine Sequenzduplikation innerhalb der eingebrachten *camR*-Sequenz und eine unmittelbar benachbarte I-Scel Erkennungsstelle für die spurlose Entfernung des Selektionsmarkers (siehe Bild 4.7).

Im Einzelnen wurde zunächst die Chloramphenicol-Resistenzkassette aus pCCT mittels PCR amplifiziert. Über die verwendeten Oligonukleotide (siehe Tabelle 3-3) wurden homologe Arme von 50 bp zu SIV *nef* angefügt. Der homologe Bereich am 3' Ende wurde zusätzlich als Sequenzduplikation hinter den homologen Bereich am 5' Ende eingefügt, gefolgt von einer I-Scel Erkennungsstelle. Dieses Konstrukt wurde wie unter 3.2.3.4 beschrieben in pCCT-SIVrN-tragende *E. coli* GS1783 in den Zielvektor rekombiniert und mittels Chloramphenicol-haltigen LB-Agarplatten selektioniert. Die *rpsLNeo*-Kassette des resultierenden Vektors pCCT-SIVrNc wurde analog zu 4.1.3 durch eine *dsRed*-Kassette zur Bestimmung der Rekombinationseffizienz ersetzt. Im Anschluss daran wurde in erneut Red–induzierten Kulturen, der BAC-Vektor pCCT-SIVRedc durch Induktion der Expression von I-Scel *in vivo* (im Bakterium) geschnitten. Die entstehenden dsDNA-Enden konnten nun aufgrund der eingefügten Sequenzduplikation als Substrate für eine interne Rekombination dienen, wodurch die Chloramphenicol-Kassette aus dem Vektor entfernt wurde.

Es konnte beobachtet werden, dass die Effizienz der Substitution von *rpsLNeo* nun deutlich erhöht war (siehe Tabelle 4-3 im Vergleich zu Tabelle 4-2).

 Tabelle 4-3: Effizienz der optimierten Red-Rekombination mit GS1783 (Mittelwerte aus neun unabhängigen Experimenten)

Rekombinationsart	StrepR / 10 ⁸ lebende Zellen			
	Red induziert + DNA	nicht Red-induziert + DNA		
Substitution rpsLNeo	1,8 x 10 ⁴ CFU	7 x 10 ¹ CFU		

Dies konnte durch Fuoreszenzmikroskopie bestätig werden. In drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten zeigten Streptomycin-resistente Klone nach der Rekombination von dsRed durchschnittlich zu 81,1 % eine rote Fluoreszenz. Diese variierte zwischen 65 % und 91,4 %. Streptomycin-resistente, nicht leuchtende Klone waren in einer PCR zu 88 % positiv für das Virusgenom, jedoch zeigte die BAC-DNA nach Präparation in der Restriktionsanalyse unbekannte Banden (Daten nicht gezeigt).

Zur Analyse, welche Schritte des Rekombinationsprotokolls besonders zur Entstehung der unerwünschten LTR-Rekombinanten beitragen wurde die Anzahl Streptomycin-resistenter

Klone nach verschiedenen Schritten des Protokolls mit und ohne Vorhandensein der *camR* bestimmt (siehe Bild 4.8). Es konnte festgestellt werden, dass während der Anzucht der Flüssigkulturen ÜN, der Red-Induktion und der Herstellung elektrokompetenter Bakterien die Anzahl der StrepR Zellen zunahm. Nach Elektroporation konnte jedoch nur bei Selektion mit Chloramphenicol ein deutlicher Unterschied in der Anzahl StrepR Kolonien in Red-induzierten Bakterien im Vergleich zu nicht Red-induzierten Kulturen festgestellt werden. Dies zeigt, dass die zusätzliche Integration eines weiteren Sm die Effizienz der Rekombination unter Substitution von *rpsLNeo* deutlich erhöht hat.



Bild 4.8: Entstehung Streptomycin-resistenter Bakterien während der Durchführung des Rekombinationsprotokolls. Nach jedem Schritt während der Durchführung einer Red-Rekombination (A) unter Substitution von *rpsLNeo* wurden Proben der Bakterienkultur entnommen, auf LB Agar ohne Selektion oder mit Streptomycin ausplattiert und die Anzahl der StrepR Klone auf die Gesamtzahl der lebenden Bakterienzellen normiert (B). i.= Red-induziert ; n.i.= nicht Red-induziert

Die Effizienz der *en passant* Rekombination zur Entfernung des Selektionsmarkers wurde ebenfalls bestimmt. Hierfür wurden erhaltene Einzelkolonien mittels Replikaplattierung auf Chloramphenicol-Sensitivität überprüft. Im Schnitt erwiesen sich 34,5 % der getesteten Klone als sensitiv. Diese Zahl variierte zwischen 17 % und 73 % in insgesamt 11 Versuchen. Chloramphenicol-sensitive Klone wurden als Flüssigkultur angezogen, BAC-DNA wurde isoliert und mittels Restriktionsverdau analysiert. Im Schnitt entsprach dabei rund die Hälfte der analysierten Klone dem jeweils gewünschten Konstrukt (Daten nicht gezeigt).

4.2.4 Einfügen des trfA Gens zur Steigerung der Plasmid-Kopienanzahl

Für die Anwendung der *en passant* Mutagenese war die Verwendung von *E. coli* GS1783 notwendig geworden. Dieser Bakterienstamm ist jedoch negativ für das Gen *trfA*, das zur Induktion des *low-copy* oriV von pCCT essentiell ist. Um die Erhöhung der Plasmid Kopienanzahl auch in *E. coli* GS1783 zu ermöglichen, wurde eine induzierbare *trfA* Expressionskassette über Rekombination in pCCT-SIV eingefügt. Die *trfA*-Sequenz wurde

mittels PCR aus dem Bakteriengenom von Epi300 amplifiziert und durch eine Overlap Extension PCR (siehe 3.2.2.6) mit dem E. coli Rhamnose Operon (2,0 kb) aus pCR4-egfp fusioniert. Da Yu et al.¹⁶¹ bereits zeigen konnten, dass P_{RhaB} und der Arabinose-induzierbare Promotor P_{BAD} gemeinsam in einer Bakterienzelle verwendet werden können, ohne dass es zu einem Interferieren der Systeme kommt, wurde dieses Operon für die Regulation der trfA Expression ausgewählt. Die Klonierung des PCR-Produktes in den Vektor pMZ-RBA fusionierte die generierte P_{RhaB}-trfA-Kassette mit einer Ampicillin-Resistenzkassette und homologen Armen für die Integration in pCCT-SIV. Das komplette lineare Transferkonstrukt von 4,5 kb wurde durch Verdau des Vektors pMZ-rhatrfA mit dem Blunt schneidenden Enzym EcoRV generiert. Da der ursprünglich über 3-Stufen-Rekombination hergestellte BAC pCCT-SIV (siehe 4.1.1) bereits eine Ampicillin-Resistenzkassette integriert hatte, musste diese zuvor aus dem Vektor entfernt werden. Dies geschah durch Substitution der Resistenz mit einer en passant entfernbaren Kanamycin-Resistenzkassette. Diese wurde analog zu dem unter 4.2.3 beschriebenen Verfahren entworfen, jedoch mit veränderten homologen Bereichen. Die finale Entfernung dieser Kanamycin-Resistenzkassette resultierte in dem Vektor pCCT-SIVAamp, der als Substrat für die Integration der trfA-Kassette diente. In erfolgreich rekombinierte Klone wurde im Anschluss sowohl die rpsLNeo-Kassette als auch die Chloramphenicol-Resistenz über Rekombination eingebracht. Dies führte zu den für die weiteren Versuche verwendeten Vektoren pCCT-SIVrNcT (siehe Bild 4.9) und pCCT-SIV+NrNcT.

Die Expression von *trfA* wurde indirekt durch die Zugabe unterschiedlicher Rhamnose Konzentrationen zu Flüssigkulturen von *E. coli* GS1783 mit pCCT-SIVrNcT über die DNA-Ausbeute nach erfolgter BAC DNA-Isolierung analysiert. Es zeigte sich, dass eine Konzentration von 1 mM L-Rhamnose in der Bakterienkultur zu einer maximalen Steigerung der Kopienanzahl von pCCT-SIVrNcT auf ca. 27 Kopien pro Zelle führte. Somit kann die Kopienanzahl der BAC-Vektoren pCCT-SIVrNcT und pCCT-SIV+NrNcT, unabhängig vom Bakterienstamm in dem sie sich befinden, erhöht und damit die DNA-Ausbeute bei Plasmid-Präparation deutlich gesteigert werden.



Bild 4.9: Schematische Darstellung des BAC-Vektors pCCT-SIVrNcT. Gezeigt ist der als Zielvektor verwendete Vektor kodierend für das Genom von SIVmac239 (grau; schraffiert = LTR-Sequenzen) mit integrierten Selektionskassetten (rosa bzw. orange) und Genen zur Vermittlung eines *single*-(dunkelblau) bzw. *low-copy* Status (hellblau).

4.2.5 Herstellung erster SHIV-Konstrukte basierend auf SHIV-89.6P

Um zu zeigen, dass sich das etablierte Rekombinationssystem dazu eignet, auch größere DNA-Fragmente durch Substitution von rpsLNeo in einen lentiviralen BAC einzubringen, wurde als erstes SHIV-Konstrukt der molekulare Klon SHIV-KB9 der pathogenen viralen Quasispezies SHIV-89.6P rekonstruiert (siehe Bild 4.10). Hierfür wurde der komplette HIV-1 Bereich des molekularen Klons KB9 (2,9 kb) über PCR aus pSHIV-KB9 3' (siehe Tabelle 3-6) amplifiziert, wobei durch die Verwendung entsprechender Oligonukleotide homologe Bereiche von 50 bp zu SIVmac239 angefügt wurden. Dieses lineare dsDNA-Fragment wurde über Rekombination in E. coli GS1783 (siehe 3.2.3.4) sowohl in den BAC-Vektor pCCT-SIVrNcT als auch in den Vektor pCCT-SIV+NrNcT (zusätzliche NF-кВ Bindestelle im 3' LTR) durch Substitution der rpsLNeo-Kassette integriert. Streptomycinund Chloramphenicol-resistente Klone wurden zunächst mittels C-PCR auf positive Rekombination überprüft und anschließend für die *en passant* Mutagenese (siehe 3.2.3.5) zur Entfernung der stabilisierenden camR verwendet (entsprechend Bild 4.7).

Die resultierenden Vektoren pCCT-SHIV-KB9wt und pCCT-SHIV-KB9wt+N wurden nach BAC DNA-Isolierung durch Restriktionsverdau und Sequenzierung analysiert. Sie kodieren für SHIVs, die im HIV-1 Teil identisch sind zu SHIV-KB9. Das SIV *Backbone* entspricht jedoch dem wt SIVmac239 Genom, wie es durch die Plasmide p239SpSp5' und p239SpE3' *nef open* (siehe Tabelle 3-6) kodiert wird und nicht der SIV Sequenz wie sie im molekularen Klon KB9 vorliegt. Durch die *in vivo* Passagierung von SHIV-89.6 kam es zur Akquisition zahlreicher Punktmutationen, besonders im Bereich von HIV *env* und *tat* sowie in der nicht-kodierenden Sequenz des SIV LTRs, was in der viralen Quasispezies SHIV-89.6P resusItierte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Veränderungen im *env*-Bereich für die Fähigkeit der Quasspezies, Lymphozyten zu depletieren verantwortlich ist ¹³⁸. Die LTR-und Tat-Veränderungen scheinen dagegen eine Konsequenz der Wirtsanpassung zu sein.



Bild 4.10: Schema zur Herstellung des ersten chimären SHIV-Konstruktes. Die komplette HIV-1 Sequenz von SHIV-KB9 (2,9 kb) wurde über Red-Rekombination in das wt SIVmac239 Genom (in den Vektoren pCCT-SIVrNcT und pCCT-SIV+NrNcT) eingefügt. Durch Passagierung entstandene Mutationen im SIV *backbone* sind durch X gekennzeichnet. Die LTR-Sequenzen sind schraffiert gezeichnet. Die Nukleotidsequenz der Übergänge zwischen SIV (grau) und HIV (schwarz) ist detailliert dargestellt.

Die hier hergestellten Konstrukte belegen zum einen die Anwendbarkeit des etablierten Red-Rekombinationssystems zur Herstellung chimärer SHIVs. Desweiteren können sie Hinweise geben, wie wichtig die im gesamten SIV-Bereich akkumulierten Mutationen für die Replikationsfähigkeit der resultierenden Viren sind.

4.2.6 Restriktionsanalyse der hergestellten BAC-Vektoren

Zur Überprüfung der Integrität der hergestellten BAC-Varianten wurden nach jedem Rekombinationsschritt Bakterienkolonien, die sowohl den erwarteten Phänotyp als auch ein positives C-PCR Ergebnis geliefert hatten, als Flüssigkulturen angezogen und BAC-DNA isoliert. Es wurden stets mehrere Klone durch Restriktionsverdau analysiert (siehe Bild 4.11). Die anfangs hergestellten Vektoren pCCT-SIV und pCCT-SIV+N wurden stets mit Kpnl und Nhel verdaut, davon abgeleitete BACs entweder nur mit Kpnl oder falls möglich mit Kpnl und Xhol. Die veränderten DNA-Bereiche einschließlich der homologen Sequenzen wurden routinemäßig durch Sequenzierung verifiziert.



Erwartete Fragmente (bp):

SIV	SIV- Red	SIV- envK	SIV- rNcT	SHIV- KB9	SHIV- KB9wt
4534	4587	4587	7769	5685	4329
4329	4329	4329	5016	4502	3516
3516	3516	3516	4329	3516	3357
2967	2208	1667	3516	2036	2036
1576	1576	1576	823	1207	1484
823	823	1300	495	823	1207
495	495	823		495	823
		495			495

Bild 4.11: Restriktionsanalyse der SIVmac239-basierten BAC-Vektoren. Bacmid-DNA wurde mittels Qiaprep Spin Mini Kit aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Je 500 ng DNA wurden ÜN bei 37 °C mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und mit Hilfe eines 0,8 %igen Agarosegels analysiert. Die Größe der erwarteten DNA-Fragmente ist angegeben. Die +N-Varianten weisen ein um 15 bp größeres Fragment auf als die entsprechenden Varianten mit nur einer NF-κB Bindestelle und sind nicht extra aufgeführt.

4.2.7 In vitro Infektiosität und Replikation der generierten Virusvarianten

Im Folgenden wurde untersucht, ob die über Red-Rekombination hergestellten SIV-BAC-Varianten zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln geeignet sind. Hierzu wurden, wie bereits unter 4.1.4 beschrieben, 293T-Zellen mit den verschiedenen BAC-Konstrukten in äquimolaren Mengen (entsprechend 2 - 2,5 µg DNA) transfiziert. Die Partikelproduktion wurde durch Bestimmung der RT-Aktivität in den zellfreien Überständen analysiert. Wie aus Bild 4.12 A ersichtlich ist, führte die Transfektion mit allen lentiviralen BAC-Konstrukten zur Produktion von Viruspartikeln. BACs mit integrierten Selektionskassetten rpsLNeo und/oder camR im Bereich von env und nef lieferten nur sehr geringe Mengen RT im Überstand. Dies war zu erwarten, da diese Virusgenome aufgrund der Integration von rpsLNeo kein RRE (Rev-responsive element) mehr enthalten und es somit zu keinem Kernexport der viralen RNAs kommt ²⁰⁹. In Infektionsstudien konnte auch keinerlei Infektiosität dieser Überstände nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die übrigen hergestellten Überstände enthielten infektiöse Viruspartikel (siehe Bild 4.12 B). Dies konnte durch Infektion der HIV-1 Indikatorzellinie TZM-bl (siehe 3.1.1.2), die firefly Luciferase Tat-abhängig unter einem LTR-Promotor exprimiert, nachgewiesen werden. Die SIVmac239 Variante mit einer zusätzlichen NF-kB Bindestelle zeigte dabei die größte Infektiosität. Die neu generierten SHIV-Varianten SHIV-KB9wt und SHIV-KB9wt+N erwiesen sich ebenfalls als infektiöse Viren, mit einem zu SHIV-KB9 vergleichbar infektiösen Potential.



Bild 4.12: Herstellung infektiöser Virusüberstände. (A) Zur Herstellung zellfreier Virusüberstände wurden $3x10^5$ 293T Zellen im 6-*well* Format mit je 0,21 pmol DNA mittels PEI transfiziert. Die Überstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Menge an reverser Transkriptase quantitativ bestimmt. (B) Zur Analyse der *in vitro* Infektiosität wurden TZM-bl Indikatorzellen mit auf RT-Aktivität normierten Virusmengen infiziert und 48 h *p.i.* die Luciferase-Aktivität bestimmt. Als Negativkontrolle (mock) dienten mit pCCT transfizierte Zellen.

Schließlich wurde auch die Replikationsfähigkeit der hergestellten Viren in der HIV/SIV Indikatorzelllinie CEMx174.5.25.M7 (CEM-M7) und in humanen sowie in Rhesus PBMC analysiert. Bei CEMx174 Zellen handelt sich um eine besonders für SIV permissive, hybride T-/B-Zelllinie, die stabil mit einem HIV-1-LTR-GFP-Konstrukt transfiziert ist (siehe Tabelle 3-2). Humane sowie Rhesus PBMC wurden aus Vollblut von gesunden menschlichen Spendern oder von Rhesus Makaken durch Zentrifugation über Ficoll™ gewonnen (siehe 3.2.5.2). Zur Bestimmung der in vitro Replikationsfähigkeit der hergestellten Viren wurden definierte Zellzahlen mit auf RT-Aktivität normierten Virusmengen infiziert und die Produktion von neuen Viruspartikeln anhand der RT-Menge in den Zellüberständen gemessen. Die Replikationskinetiken (siehe Bild 4.13) zeigen, dass alle sechs getesteten Virusvarianten in vitro vermehrungsfähig sind. Die Replikation erfolgte jedoch in den verschiedenen verwendeten Zelltypen mit einer unterschiedlichen Kinetik. In humanen PBMC (siehe Bild 4.13 A) wiesen alle sechs Viren ein nahezu identisches Replikationsprofil auf, das ein Maximum an Tag 13 zeigt. Im Gegensatz dazu war das Replikationsverhalten in Rhesus Makaken PBMC (siehe Bild 4.13 B) heterogen. Die maximale Partikelproduktion wurde bereits an Tag 5 erreicht. Die SIVmac239 Viren (SIV, SIV+N und SIVenvK) zeigten alle ein sehr ähnliches Replikationsprofil. SHIV-KB9 wies einen ähnlichen Replikationsverlauf auf, jedoch mit niedrigeren Absolutwerten. SHIV-KB9-basierte Viren mit dem ursprünglichen, nicht passagierten SIVmac239 backbone können in Makaken PBMC entweder nicht replizieren (SHIV-KB9wt) oder nur sehr schwach (SHIV-KB9wt+N). Dies zeigt, dass die durch in vivo Passagierung erworbenen Punktmutationen von SHIV-KB9 im SIV-Bereich essentiell für die Replikation in Makaken sind. Die Tatsache, dass die SHIV-KB9wt-Variante mit einer zusätzlichen NF-KB Bindestelle das Replikationsdefizit von SHIV-KB9wt zumindest



teilweise kompensieren kann, deutet darauf hin, dass die effiziente Transkription des Virusgenoms hier der limitierende Faktor ist.



Bild 4.13: Virusreplikation in vitro. Es wurden 1x10⁶ humane PBMC mit 1 ng RT (A), 1x10⁵ Rhesus PBMC mit 100 pg RT (B) sowie 1x10⁶ CEM-M7 Zellen mit 1 ng RT (C) unter Zugabe
von 20 U/ml IL-2 infiziert. Alle 48 h wurden Proben der Überstände entnommen und deren Viruskonzentration über die RT-Aktivität bestimmt.

Alle sechs Virusvarianten replizierten in CEM-M7 Zellen (siehe Bild 4.13 C). Wiederum verhielten sich die SIV-Varianten sehr ähnlich. SHIV-KB9 replizierte in dieser Zelllinie etwas schlechter als die SHIV-KB9wt-Varianten, wobei SHIV-KB9wt+N wiederum etwas schneller replizierte als die Variante ohne zusätzliche NF-κB Bindestelle.

CEM-M7 Zellen sollten als mögliche Korezeptoren auf der Oberfläche sowohl CCR5 als auch CXCR4 exprimieren. Dies wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Färbung der Rezeptoren mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, an die unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt sind, überprüft. Es wurde ausschließlich die Expression von CXCR4 nachgewiesen, nicht jedoch von CCR5 (Daten nicht gezeigt). Da es jedoch ein Hauptanspruch ist, R5-trope SHIVs herzustellen, wurden diese Zellen für weitere Replikationsanalysen ausgeschlossen.

Zur genauen Analyse des Effekts der zweiten NF-κB Bindestelle im 3' LTR der Viren SIV+N und SHIV-KB9+N wurden sowohl humane als auch Rhesus PBMC mit diesen Viren, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Tumornekrosefaktor (TNF-α), infiziert. Zum Vergleich wurden die verwendeten PBMC mit den jeweiligen Virusvarianten mit nur einer NF-κB Bindestelle infiziert. TNF-α ist ein multifunktionales Zytokin. Bindung von TNF an die TNF-Rezeptoren 1 und 2 löst u. a. eine Signalkaskade aus, die letztlich zur Aktivierung des Transkriptionsaktivators NF-κB und dessen Translokation in den Zellkern führt. Durch Zugabe von extrazellulärem, löslichem TNF-α zum verwendeten Zellkulturmedium kann dieser Effekt verstärkt werden und es sollte zu einer gesteigerten Transkription des Virusgenoms und damit einer verstärkten Partikelproduktion kommen. Die Replikationskinetiken in humanen PBMC (siehe Bild 4.14 A) zeigen, dass (1) die +N-Varianten ähnlich schnell replizieren wie die entsprechenden Viren ohne zusätzliche NF- κ B Bindestelle und (2) eine Zugabe von TNF- α zum Kulturmedium die Replikation beschleunigen kann, sowohl von Viren mit einer als auch mit zwei NF- κ B Bindestellen.

In Rhesus PBMC (siehe Bild 4.14 B) konnten diese *in vitro* Effekte nicht beobachtet werden, es ist jedoch davon auszugehen, dass v. a. die *in vivo* Replikationsfähigkeit der Viren gesteigert wird, da bereits gezeigt wurde, dass eine Duplikation der NF-κB Bindestelle *in vivo* passagierter SIVs in hoch aggressiven, letalen Varianten resultieren kann ²¹⁰. Die Replikationskinetik in Bild 4.13 B zeigt, dass SHIV-KB9wt+N in Rhesus PBMC replizieren kann, SHIV-KB9wt jedoch nicht. Dies macht den möglichen starken Einfluss einer zusätzlichen NF-κB Bindestelle auf das Replikationsverhalten eines Lentivirus deutlich.



Bild 4.14: Einfluss der zweiten NF-κB Bindestelle im 3' LTR auf die Virusreplikation *in vitro.* Es wurden sowohl $1x10^5$ humane (A) als auch $1x10^5$ Rhesus (B) PBMC mit je 100 pg RT-haltigen Virusüberständen infiziert. Die Kulturen wurden mit und ohne 10 ng/ml TNF-α kultiviert. Alle 48 h wurden Proben der Überstände entnommen und deren Viruskonzentration über die RT-Aktivität bestimmt.

4.2.8 Herstellung funktionell unterschiedlicher SHIV-Varianten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Methode des Red-*Recombineering* sehr gut zur Herstellung und Mutagenese von lentiviralen BACs eignet und somit eine ideale Methode für die (1) schnelle, (2) effiziente und (3) standardisierbare Etablierung neuer SHIVs ist. Der Einsatzbereich ist dabei sehr vielseitig. In einer ersten Applikation sollten mit dem etablierten System funktionell unterschiedliche SHIV-Varianten

68

hergestellt werden. So wurden, ausgehend von SHIV-89.6P, Viren mit unterschiedlicher Korezeptor-Verwendung generiert. Durch Veränderung der env V3-Region sollten aus einem dualtropen Ausgangsvirus möglichst rein X4- bzw. rein R5-trope Viren gemacht werden. Wie unter 2.1.4 beschrieben, kann durch eine gezielte Veränderung der Aminosäuresequenz dieses variablen Bereichs von gp120 die Korezeptor-Verwendung eines HI-Virus verändert werden. Hierfür sind v. a. die Aminosäuren an Position 11, 24 und 25 von V3 von Bedeutung. Als Ausgangskonstrukt diente der unter 4.1.2 beschriebene BAC pCCT-SHIV-KB9. Analog zu dem unter 4.2.3 beschriebenen System (siehe Bild 4.7) wurden durch Verwendung der in Kombination mit einer en passant-entfernbaren Selektionskassette rpsLNeo, Chloramphenicol-Resistenz, vier BAC-Varianten über Red-Rekombination generiert. Dazu wurde in einer ersten Rekombination in E. coli GS1783 (siehe 3.2.3.4) wurde die env V3-Region (105 bp) von pCCT-SHIV-KB9 mit beidseitig flankierenden Bereichen (insgesamt 362 bp) durch eine rpsLNeo-Kassette ersetzt (1,5 kb). Diese wurde mittels PCR aus dem Plasmid pSC-wtrpsLNeo amplifiziert (siehe 3.2.3.1.2). Hierfür wurden Oligonukleotide verwendet, die 50 bp homologe Sequenzen zu den V3-angrenzenden Bereichen aufwiesen. In einem zweiten Rekombinationsdurchgang wurde analog zu 4.2.3 eine Selektionskassette, die eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol vermittelt, in den SIV nef-Bereich als Insertion eingefügt. Der resultierende Vektor pCCT-SHIV-KB9rNcV3, wurde durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung verifiziert. Dieser BAC-Vektor wurde als Ausgangskonstrukt für die Insertion verschiedener env V3-Sequenzen verwendet. Auf Basis der 11/24/25-Regel (siehe 2.1.4) wurden vier V3-Varianten hergestellt, die zu einer Veränderung des Korezeptor-Tropismus der resultierenden Viren führen sollten.



Bild 4.15: Design der V3-Varianten. Die AS der V3-Region von SHIV-KB9 wurden an Position 10/11 und 23/24/25 so verändert, dass es zu einem Korezeptor-Wechsel der resultierenden Viren kommen sollte. Positiv geladene AS an diesen Positionen, die zu einer Erhöhung der Netto-Ladung der V3-Region führen, sind mit einem X4-Tropismus assoziiert ⁵¹.

Matsuda *et al.* ¹²⁶ konnten bereits zeigen, dass es durch die Modifizierung der V3-Sequenz eines von SHIV-89.6P abgeleiteten Virus, unter Verwendung der AS Lysin und Serin an Position 10 und 11 sowie den AS Threonin, Glycin und Aspartat an Position 23, 24 und 25 zur Veränderung der Korezeptor-Präferenz des resultierenden SHIV in Richtung CCR5 kommt. Die von Matsuda *et al.* verwendete Sequenz diente daher als Vorlage für das Design
der ersten SHIV-KB9 V3-Variante KS-TGD. Im Vergleich dazu sollte auch eine X4-trope Virusvariante durch Verwendung der AS Lysin und Arginin an Position 10 und 11 sowie Isoleucin, Glycin und Lysin an Position 23, 24 und 25 geschaffen werden ⁵¹. Die beiden anderen in dieser Arbeit hergestellten SHIV V3-Varianten stellen Kombinationen der oben aufgeführten Motive dar und sollten weitere Hinweise über den Beitrag der einzelnen Motive für die Korezeptor-Präferenz der resultierenden Viren liefern. Die Herstellung der V3-Sequenzen erfolgte durch Overlap Extension PCR unter Verwendung entsprechender Oligonukleotide (siehe 3.2.3.1.2). Alle vier neu generierten V3-Sequenzen konnten durch Substitution von rpsLNeo und Selektion mittels Streptomycin und Chloramphenicol in pCCT-SHIV-KB9 eingebracht werden. Im Anschluss daran wurde, in vier parallelen Ansätzen, die camR über en passant Rekombination entfernt, was zur Herstellung der SHIV-BACs pCCT-KS-TGD, pCCT-KS-IGK, pCCT-KR-TGD und pCCT-KR-IGK führte. Diese neuen BAC-Konstrukte wurden alle mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf ihre vollständige Integrität überprüft (siehe Bild 4.16). Die Rekombinationseffizienz lag bei 3,1x10⁴ CFU (StrepR/10⁸ lebende Zellen) in Red-induzierten Kulturen und entsprach damit gut den unter 4.2.3 angegebenen Werten. Es war keinerlei Hintergrund von Streptomycinresistenten Bakterien in nicht Red-induzierten Kulturen detektierbar.



Erwartete Fragmente (bp):

SHIV- KB9	KB9 rNcV3	V3 Varianten
5685	6588	5685
4502	4502	4502
3516	3516	3516
2036	3120	2036
1207	1207	1207
823	823	823
495	495	495

Bild 4.16: Restriktionsanalyse der SHIV-KB9-basierten V3-Varianten. BAC-DNA wurde mittels Qiaprep Spin Mini Kit aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Je 500 ng DNA wurden ÜN bei 37 °C mit geeigneten Restriktionsenzymen (KpnI und XhoI) verdaut und auf einem 0,8 %igen Agarosegel analysiert.

4.2.8.1 In vitro Infektiosität und Replikation

Zur Herstellung zellfreier Virusüberstände wurden analog zu 4.1.4 und 4.2.7 293T-Zellen mit äquimolaren Mengen der vier BAC V3-Varianten von pCCT-SHIV-KB9 transfiziert. Die

Partikelproduktion wurde durch Bestimmung der RT-Aktivität in den Zellkulturüberständen analysiert. Die Transfektion mit allen vier V3-Varianten pCCT-KS-TGD, pCCT-KS-IGK, pCCT-KR-TGD und pCCT-KR-IGK sowie der Ausgangskonstrukte pCCT-SHIVKB9 und pCCT-SHIVKB9-rNcV3 und auch pCCT-SIV führte zur Produktion von ähnlichen Mengen an Viruspartikeln (siehe Bild 4.17 A). Zum Vergleich wurden 293T-Zellen auch mit einem Plasmid kodierend für das HIV-1 Isolat NL4-3 transfiziert. Dies ist ein T-Zell adaptiertes (TCLA), X4-tropes Isolat, das eine hohe Infektiosität und Replikationsfähigkeit in zahlreichen Zelllinien aufweist. Für NL4-3 konnte erwartungsgemäß eine sehr hohe Partikelproduktion beobachtet werden. Nachdem sich die hergestellten Viruspartikel als infektiös in TZM-bl Zellen erwiesen hatten (Daten nicht gezeigt), wurden sie auf ihre Replikationsfähigkeit in humanen PBMC untersucht. Die Replikationskinetik (siehe Bild 4.17 B) zeigt, dass drei der vier V3-Varianten in vitro replikationskompetent sind. Am schnellsten konnte die Variante KS-TGD replizieren, mit einem Maximum der Partikelproduktion an Tag 9. Variante KS-IGK und KR-TGD zeigten erst ab Tag 9 einen Anstieg in der Partikelproduktion, mit einem Maximum an Tag 15, jedoch geringere Absolutwerte an produzierter RT-Menge als die V3-Mutante KS-TGD. Für die V3-Variante KR-IGK konnte keine Replikation in humanen PBMC nachgewiesen werden.



Bild 4.17: Herstellung zellfreier Virusüberstände und deren Replikationsverhalten. (A) Pro Ansatz wurden $3x10^5$ 293T-Zellen im 6-*well* Format mit äquimolaren Mengen (0,21 pmol) der unterschiedlichen SHIV-KB9 basierten BAC-Vektoren mittels PEI transfiziert. Virushaltige Überstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Menge an reverser Transkriptase quantitativ bestimmt (B). Zur Analyse der *in vitro* Replikation wurden humane PBMC mit auf RT-Aktivität normierten Virusmengen infiziert und die Partikelproduktion anhand der RT-Aktivität in den Überständen bestimmt. Mock = uninfizierte Zellen.

4.2.8.2 Korezeptor-Verwendung

Zur Untersuchung der Korezeptor-Präferenz der neu hergestellten SHIV-KB9-basierten V3-Mutanten wurden TZM-bl Zellen mit und ohne Vorinkubation mit einem CXCR4- bzw. CCR5-spezifischen Korezeptor-Antagonisten infiziert. Die Zahl der infizierten Zellen wurde durch die Messung der Luciferase-Aktivität des Zelllysats 48 h nach Infektion bestimmt. Als

Korezeptor-Antagonisten wurden die synthetisch hergestellten, nicht-peptidischen Inhibitoren AMD3100 und TAK779 (siehe Tabelle 3-12) verwendet. Diese binden mit hoher Affinität an CXCR4 bzw. CCR5 und können so die Infektion einer CD4⁺ HIV-1 Zielzelle mit einem X4- bzw. R5-tropen Virus verhindern.



Bild 4.18: Korezeptor-Verwendung der SHIV-KB9 V3-Varianten. Infektion der CD4-, CCR5- und CXCR4- positiven Indikatorzelllinie TZM-bl (1,5x10⁴ Zellen/96-*well*) mit und ohne Vorinkubation mit dem CXCR4-Antagonisten AMD3100 (1 μ M) oder dem CCR5-Antagonisten TAK779 (10 μ M). Diese synthetischen, nicht-peptidischen Moleküle binden mit hoher Affinität an die entsprechenden Korezeptoren und verhindern so eine Infektion. * = signifikante Reduktion im Vergleich zur DMEM-Mediumkontrolle (p < 0,05). Mock = uninfizierte Zellen.

Wie die Infektionsstudie ergeben hat (siehe Bild 4.18), konnten alle verwendeten Virusüberstände CD4-, CCR5- und CXCR4-positive TZM-bl Zellen infizieren. Die Infektiosität des dualtropen SHIV-KB9 und R5-tropen SIVmac239 war dabei am höchsten. Eine Vorinkubation der Zellen mit dem CXCR4-Inhibitor AMD3100 reduzierte die Anzahl an infizierten Zellen bei allen Viren bis auf SIVmac239 und SHIV-KR-TGD. Der Effekt war signifikant ausgeprägt bei dem X4-tropen HIV-1 Isolat NL4-3 und bei SHIV-KB9 und mittel bis schwach ausgeprägt bei den SHIV-KB9 V3-Varianten KS-TGD, KS-IGK und KR-IGK. Die Vorinkubation mit dem CCR5-Antagonisten TAK779 hatte keinen Einfluss auf die Infektiosität von NL4-3 und nur einen leichten negativen Einfluss auf die Infektiosität von SHIV-KB9. Die Infektiosität von SIVmac239 sowie aller vier SHIV-KB9 V3-Varianten war jedoch signifikant reduziert.

Aus dieser Studie wird erkenntlich, dass die eingesetzten Korezeptor-Antagonisten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Infektiosität der verschiedenen getesteten Viren haben. Somit ist davon auszugehen, dass die SHIV V3-Varianten KS-TGD, KS-IGK, KR-IGK und KR-TGD alle eine veränderte Korezeptor-Präferenz im Vergleich zum Ausgangsvirus

SHIV-KB9 aufweisen. Zusätzlich wurden TZM-bl Zellen auch mit PSC-RANTES, einem alternativen CCR5-Antagonisten inkubiert. Die beobachteten Effekte nach Infektion spiegelten prinzipiell das Bild der TAK779 behandelten Zellen wieder, jedoch waren sie durchgehend viel weniger ausgeprägt (Daten nicht gezeigt).

4.2.9 Applikation des etablierten Systems zur Herstellung zweier Subtyp C SHIV-Panel

Im Rahmen dieser Arbeit konnten bereits einzelne chimäre SHIV-Varianten konstruiert werden, die in vitro infektiös und replikationsfähig sind bzw. sich in ihrer Korezeptor Verwendung vom parentalen Virus unterscheiden. Im Folgenden sollte das etablierte Red-Rekombinationssystem dazu verwendet werden, ein SHIV-Panel mit 12 neuen Viren, die jeweils unterschiedliche Subtyp C Envs kodieren, herzustellen. Damit sollte gleichzeitig die Anwendbarkeit des Systems zur parallelen Konstruktion mehrerer neuer viraler BACs demonstriert werden. Es wurden 12 verschiedene primäre env-Sequenzen vom Subtyp C verwendet, die bisher als "Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones" (siehe Tabelle 3-7) hauptsächlich zur Herstellung von pseudotypisierten HI-Viren für den Einsatz in Neutralisationstests zum Einsatz kamen. Diese env-Sequenzen stammen aus akuten oder sehr frühen Stadien von heterosexuellen Infektionen in Südafrika oder Zambia und wurden bereits auf ihre wichtigsten genetischen und antigenen Eigenschaften, wie z.B. die 180 Korezeptor-Verwendung oder ihren Neutralisations-Phänotyp, hin charakterisiert Aufgrund dieser Ergebnisse wurden von insgesamt 18 getesteten Sequenzen 12 ausgewählt, die möglichst umfassend die Charakteristika von derzeit verbreiteten Subtyp C env-Sequenzen widerspiegeln. Im Rahmen dieser Arbeit sollten sie zur Generierung eines Subtyp C SHIV-Panels dienen, das sich zum Einsatz in NHP bei der Validierung neuer Subtyp C env Vakzinekandidaten eignet.

4.2.9.1 Expression der Subtyp C env-Varianten in 293T-Zellen

Um die von Li *et al.* ¹⁸⁰ veröffentlichten Ergebnisse zu bestätigen, wurde zunächst die Expression der 12 unterschiedlichen HIV-1 Subtyp C gp160 Proteine durch Transfektion von 293T-Zellen überprüft.

Im Lysat der transfizierten Zellen (siehe Bild 4.19) konnte durch eine *Western Blot* Analyse (siehe 3.2.4.1 und 3.2.4.2) sowohl das Volllänge Protein gp160 als auch die bereits gespaltene Form gp120 von allen 12 Varianten nachgewiesen werden.



Bild 4.19: Expression der 12 Subtyp C *env*-Varianten in **293T-Zellen.** Zur Analyse der Expression von gp160 wurden je 2x10⁵ 293T-Zellen einzeln mit 2 µg Plasmid des *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* (AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH) transfiziert und nach 48 h geerntet. Es wurden je Ansatz 60 µg Gesamtprotein über SDS-Page aufgetrennt und mit einem polyklonalen anti-gp120 Kaninchen Serum (ARP422) analysiert. Als Negativkontrolle (mock) dienten mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen.

4.2.9.2 Fusogenes Potential der Subtyp C env-Varianten

Im Anschluss an die Expression wurde auch die Funktionalität der 12 HIV-1 Hüllproteine gp160 anhand der Bestimmung des fusogenen Potentials der 12 Varianten analysiert (siehe 3.2.5.9). Hierfür wurde eine HIV-1 Tat-exprimierende Zelllinie (CHO-wtTat) mit den 12 Env-kodierenden Plasmiden einzeln transfiziert und im Anschluss mit der Indikatorzelllinie TZM-bl kokultiviert. Im Fall einer Fusion der Env-exprimierenden und -präsentierenden CHO Zellen mit den CD4-, CCR5- und CXCR4-tragenden TZM-bl Zellen erfolgt eine Translokation von Tat in die TZM-bl Zellen und das unter Kontrolle des LTR-Promotors stehende *luciferase* Gen wird exprimiert. Die Luciferase-Aktivität kann mit Hilfe eines spezifischen Testsystems direkt im Zelllysat quantifiziert werden (siehe 3.2.4.5).



Bild 4.20: Fusogenes Potential der *env*-Varianten. $3x10^4$ CHOwtTat Zellen wurden mit je 200 ng Plasmid des *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* (AIDS Research and Reference Reagent Program, NIH) transfiziert. 24 h *p.t.* wurden jedem Ansatz $1x10^4$ TZM-bl Zellen zugegeben. Nach weiteren 24 h wurde die Luciferase-Aktivität der TZM-bl Zellen vermessen. Die Auswertung der Luciferase-Aktivität ergab, dass alle 12 getesteten Env-Varianten eine Fusion von transfizierten CHO Zellen mit kokultivierten TZM-bl Zellen vermitteln können (siehe Bild 4.20), wobei das Hüllprotein des Isolats ZM135M.PL10a (# 10) zu der stärksten Luciferase-Expression führte. Das Env Protein vom Isolat Du422.1 (# 3) zeigte das geringste fusogene Potential, führte jedoch immer noch zu einer deutlich nachweisbaren Luciferase-Aktivität. Als Positivkontrolle wurde ein bereits in unserer Arbeitsgruppe getestetes HIV-1 Env vom Subtyp C (REKR) verwendet. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Env ohne Protease-Spaltstelle eingesetzt (REKS).

4.2.9.3 Ein Subtyp C SHIV-Panel basierend auf SHIV-89.6P (Klon KB9)

Die unter 4.2.9.1 und 4.2.9.2 analysierten Subtyp C env-Sequenzen wurden im Anschluss für die Herstellung des SHIV-Panels basierend auf SHIV-89.6P, Klon KB9, verwendet. Die Genomorganisation aller 12 Konstrukte sollte dabei identisch sein. Hierfür wurden die primären env-Sequenzen des "Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones" inklusive der vollständigen vpu-Sequenz, die mit env überlappt, zunächst in das Genom von SHIV-KB9 eingefügt. Als Zielvektor für diese Red-Rekombinationen diente der BAC-Vektor pCCT-SHIV-KB9rNc in E. coli GS1783, der bereits die erforderlichen Selektionskassetten rpsLNeo und CamR trug. Die vpu/env-Sequenzen wurden über PCR amplifiziert und durch Verwendung entsprechender Oligonukleotide mit 49 bp bzw. 50 bp zum Zielvektor homologen Bereichen fusioniert. Die Gesamtlänge der linearen Transferkonstrukte betrug ~ 2,7 kb. Durch Substitution von rpsLNeo wurden diese 12 linearen dsDNA-Fragmente in einem Experiment, in parallelen Ansätzen, in das Genom von SHIV-KB9 rekombiniert. Die Bereiche der homologen Arme wurden dabei so gewählt, dass es zu einem 1:1 Austausch der bereits vorhandenen Subtyp B HIV-1 Sequenzen mit den hier verwendeten Subtyp C Sequenzen kam (siehe Bild 4.21). Es kam zu keiner Veränderung der Leserahmen oder Spleißstellen. Das durch in vivo Passagierung entstandene HIV - SIV chimäre gp41 wurde beibehalten, da es eine entscheidende Rolle bei der Pathogenität von SHIV-89.6P spielt.



Bild 4.21: Schema zur Herstellung neuer Subtyp C SHIV-Varianten basierend auf SHIV-89.6P. SHIV-89.6P (KB9) beinhaltet Subtyp B HIV-1 Sequenzen (grau). Der überwiegende HIV-1 Bereich wurde durch Subtyp C *vpu* und *env*-Sequenzen des *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* ersetzt (dunkelgrau). Der chimäre HIV - SIV gp41-Terminus von SHIV-89.6P blieb dabei erhalten. Schraffiert = LTR-Sequenzen.

Die nach Rekombination und Selektion erhaltenen, Streptomycin- und Chloramphenicolresistenten Bakterienklone wurden auf erfolgreiche Integration der Subtyp C env-Sequenz Bacmid-DNA mehrerer Bakterien-Einzelklone pro Konstrukt wurde aus überprüft. Flüssigkulturen isoliert und im Restriktionsverdau analysiert. Diese Vorgehensweise erlaubte die gleichzeitige Überprüfung der erfolgreichen Insertion einer neuen Sequenz sowie der vollständigen Integrität des BAC-Konstruktes. Zusätzlich wurde die BAC-DNA auch als Template für eine PCR zum Nachweis der Integration der vpu/env-Sequenzen eingesetzt. Analog zu 4.1.1.2 wurden die Oligonukleotide hierbei so gewählt, dass eines im Zielvektor und das andere in der neu eingefügten Sequenz hybridisierte. Ausschließlich Bakterienklone, deren BAC-DNA in allen Analysen positiv war, wurden für die nachfolgende en passant Entfernung der camR-Kassette aus dem SIV nef-Bereich verwendet. Die resultierenden Einzelkolonien wurden mittels Replikaplattierung auf Chloramphenicol-Sensitivität überprüft. Die BAC-DNA von sensitiven Klonen wurde schließlich durch Restriktionsverdau (siehe Bild 4.22) analysiert. Auf diese Weise konnten, basierend auf dem Genom des pathogenen SHIV-89.6P (Klon KB9), parallel 12 neue SHIV-BACs, die Subtyp C vpu- und env-Sequenzen tragen, hergestellt werden. Diese werden im Folgenden als SHIV-89.6C.1-12 bezeichnet.



Erwartete Fragmente (~ kb):

SHIV- KB9	Variante 1/3-9/12	Var. 2	Var. 10	Var. 11
5,7	4,1	4,1	4,1	4,1
4,5	3,6	3,5	3,5	3,5
3,5	3,5	3,3	3,3	3,3
2,0	3,3	3,3	1,7	2,0
1,2	1,2	1,2	1,5	1,6
0,8	0,8	0,8	1,2	1,2
0,5	0,5	0,5	0,8	0,8
		0,3*	0,5	0,5
			0,4*	

Bild 4.22: Restriktionsanalyse der SHIV-89.6C-Varianten. Bacmid-DNA wurde mittels Qiaprep Spin Mini Kit aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Je 500 ng DNA wurden ÜN bei 37 °C mit geeigneten Restriktionsenzymen (KpnI und XhoI bzw. ApaLI) verdaut und mit Hilfe eines 0,8 %igen Agarosegels analysiert. Mit * gekennzeichnete Fragmente sind auf dem Gel nicht erkennbar.

Analog zu den bisher durchgeführten Rekombinationsversuchen wurde auch bei der Herstellung der pCCT-SHIV-89.6C BAC-Varianten die Effizienz der einzelnen *Recombineering*-Schritte bestimmt. Diese entsprachen den unter 4.2.3 angegebenen Werten. Insgesamt wurde nach der ersten Red-Rekombination die BAC-DNA von 112 Bakterienklonen isoliert und analysiert, bis alle 12 gewünschten Konstrukte identifiziert werden konnten. Nach dem zweiten Rekombinationsschritt, der internen Entfernung der *camR*, wurden insgesamt 208 Einzelkolonien auf Chloramphenicol-Sensitivität überprüft. Die DNA von 66 sensitiven Klonen wurde isoliert und im Restriktionsverdau analysiert. Darunter waren alle 12 pCCT-SHIV-89.6C-Konstrukte zu finden. Nur ein geringer Anteil von ~ 10 % wies eine Streptomycin-Resistenz aufgrund des Verlusts des Virusgenoms auf.

Im Anschluss daran wurden zur Produktion von Virusüberständen 293T-Zellen mit den hergestellten SHIV-BACs transfiziert. Die Menge an Viruspartikeln wurde durch die RT-Aktivität im zellfreien Überstand quantifiziert (siehe Bild 4.23). Dabei war auffällig, dass nach Transfektion mit einzelnen pCCT-SHIV-89.6C-Konstrukten keine Viruspartikel nachweisbar waren (# 6, 8) bzw. die Menge an produzierter RT zwischen den verschiedenen SHIV-89.6C-Konstrukten sehr starken Schwankungen unterlag. Besonders die Konstrukte # 2 und 3 führten nur zu geringen RT-Mengen im Überstand, die Transfektion mit den Konstrukten # 1, 4 und 10 führte dagegen zur Produktion von sehr hohen RT-Mengen. Diese Konstrukte konnten sogar ähnliche Werte erreichen wie eine Transfektion mit pCCT-SIV. Die SHIV-BACs pCCT-SHIV.89.6C # 5, 7, 9, 11 und 12 führten zur Produktion einer mittleren Menge an RT im Überstand. Die Ergebnisse, die in Bild 4.23 dargestellt sind, waren auch bei der Verwendung mehrerer, unterschiedlicher BAC DNA-Präparationen reproduzierbar.



Bild 4.23: **RT-Gehalt** zellfreier Virusüberstände. Pro Konstrukt wurden 3x10⁵ 293T Zellen im 6-*well* Format mit 0,21 pmol BAC-DNA mittels PEI transfiziert. Virus-haltige Überstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Menge an reverser Transkriptase quantitativ bestimmt.

Die erhaltenen RT-haltigen Zellkulturüberstände wurden im Anschluss auf ihre Infektiosität in TZM-bl Zellen untersucht. Es konnte jedoch in keinem Fall eine erfolgreiche Infektion nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Mittels Western Blot Analyse von ausgewählten SHIV-89.6C-Konstrukten wurde im Folgenden untersucht, ob es nach Transfektion bereits bei der Expression der viralen

Proteine zu Störungen kommt und inwieweit die Abschnürung von Viruspartikeln beeinflusst ist. Zum Nachweis SIV-spezifischer Proteine wurde ein polyklonales Serum aus SIVmac239infizierten Rhesus Makaken verwendet (siehe Tabelle 3-9). Die *Western Blot* Analysen (siehe Bild 4.24) ergaben, dass pCCT-SHIV-89.6C-Konstrukte, die mit einer deutlich nachweisbaren Menge an RT im Zellkulturüberstand assoziiert sind (hier analysiert: # 1, 9, 12), auch ein Expressionsmuster an viralen Proteinen vergleichbar mit SHIV-KB9 zeigen. Die viralen Proteine sind sowohl im Zelllysat (A) als auch im Zellüberstand (B) nachweisbar. Besonders die Bande des SIV Kapsidproteins p27 ist sehr deutlich im Überstand der Konstrukte # 1, 9 und 12 zu sehen, was für die Bildung von Viruspartikeln spricht. Die SHIV-89.6C-Varianten # 2 und 8, die nur zu geringen oder keinen nachweisbaren RT-Mengen im Überstand transfizierter Zellen führten, zeigten auch nur eine sehr geringe Produktion von viralen Proteinen im *Western Blot*, sowohl im Zelllysat (A) als auch im Zelliysat (A) als auch im Überstand (B).



Bild 4.24: *Western Blot* Analyse SHIV-89.6C BAC-transfizierter 293T-Zellen. Zur Analyse des Expressionsprofils von SHIV-89.6C wurden je Konstrukt $5x10^5$ 293T-Zellen mit 0,21 pmol BAC-DNA transfiziert und nach 48 h wurden sowohl die Zellüberstände als auch -lysate geerntet. Von den Zelllysaten wurden je 100 µg Gesamtprotein über SDS-Page aufgetrennt (A). Die Überstände wurden über Ultrazentri-fugation konzentriert und komplett analysiert (B). Der Nachweis SIV-spezifischer Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Makaken Serum (2BR). Als Positivkontrolle dienten mit pCCT-SHIV-KB9 transfizierte Zellen. Als Negativkontrolle (mock) dienten mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen.

Da sich das Proteinexpressionsprofil von SHIV-89.6C # 1, 9 und 12 (siehe Bild 4.24) nicht vom Expressionsprofil von SHIV-KB9 im *Western Blot* unterscheidet, wurden die analysierten viralen Überständen (siehe Bild 4.23) für die Infektion von humanen und Rhesus PBMC verwendet (siehe 3.2.5.7). Zur Bestimmung der *in vitro* Replikationsfähigkeit der Viruspartikel wurden definierte Zellzahlen mit auf RT-Aktivität normierten Virusmengen infiziert, soweit dies möglich war. Von Überständen von SHIV-89.6C # 6 und 8 wurde das maximal mögliche Volumen eingesetzt. Die Produktion von neuen Viruspartikeln wurde anhand der RT-Menge in den Zellkulturüberständen im Abstand von 48 h gemessen.



Bild 4.25: Virusreplikation von SHIV-89.6C.1-12 *in vitro*. Es wurden 1x10⁵ humane PBMC mit 100 pg RT unter Zugabe von 20 U/ml IL-2 infiziert. Alle 48 h wurden Proben der Überstände entnommen und deren Viruskonzentration über die RT-Aktivität bestimmt.

Wie Bild 4.25 zeigt, war SHIV-89.6C.12 als einzige neue SHIV-89.6C-Variante fähig in humanen PBMC zu replizieren. Als Positivkontrollen dienten SIVmac239, SHIV-KB9, der R5-trope Subtyp B SHIV-SF162P3 und der R5-trope Subtyp C SHIV-1157ipd3N4. Dabei zeigte SHIV-89.6C.12 im Vergleich mit diesen etablierten, pathogenen Viren eine zeitlich verzögerte Replikation, die jedoch letztlich ein ähnlich hohes Niveau erreichte. Während die Positivkontrollen bereits ab Tag 3 - 7 zu einem deutlichen Anstieg der nachweisbaren Virusmenge führten, konnte für SHIV-89.6C.12 erst ab Tag 13 ein starker Anstieg beobachtet werden. Auch erreichten die Kontrollviren ihr Maximum an Partikelproduktion deutlich früher (Tag 5 - 9) als SHIV-89.6C.12 (> Tag 19).

Die Infektion von Rhesus PBMC zeigte nur für SIVmac239 eine Replikation, jedoch für keinen der verwendeten SHIVs (Daten nicht gezeigt).

Aus den Überständen von SHIV-89.6C.12 infizierten PBMC, Tag 19, wurde die virale RNA isoliert (siehe 3.2.2.4), revers transkribiert (siehe 3.2.2.7) und schließlich sequenziert. Die Analyse ergab, dass im gp41-Bereich von *env* auf einem Abschnitt von 121 bp 26 Basenaustausche im Vergleich zur Nukleotidsequenz von C *env* # 12 vorliegen, die in 12 Aminosäureaustauschen resultieren. Außerdem weist die Sequenz eine Deletion von 21 Nukleotiden, entsprechend 7 AS auf (siehe Bild 4.26). Die Sequenz von SHIV-89.6C.12mut entspricht damit auf diesem 121 bp Abschnitt exakt der Nukleotidfolge wie sie in SHIV-89.6P (KB9) vorliegt. Da die Vermutung nahe lag, dass diese Sequenz durch eine unbeabsichtigte Rekombination bereits während der Herstellung von pCCT-SHIV-89.6C.12, in dessen Virusgenom integriert wurde, wurde auch das über Rekombination generierte BAC-Konstrukt in diesem Bereich sequenziert. Es konnte festgestellt werden, dass tatsächlich bereits der

über Rekombination hergestellte BAC-Vektor pCCT-SHIV-89.6C.12 diese Mutationen aufweist.

SHIV-KB9 SHIV-89.6C.12	(9088) (9113)	TCTGGGACGATCTGCGGAGCCTGTGCCTCTTCAGCTACCACCGCTTGAGA CCTGGGACGATCTGAGGAGCCTGTGCCTCTTCTGCTACCACCGATTGAGA
SHIV-89.6C.12theo	(9112)	UCTGGGAUGATUTGAGGAGUUTGTGUUTUTTU <mark>T</mark> GUTAUUAUUGATTGAGA
		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
SHIV-KB9	(9138)	GACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAG
SHIV-89.6C.12	(9163)	GACTTACTCTTGATTGTAACGAGGATTGTGGAACTTCTGGGACGCAG
SHIV-89.6C.12theo	(9163)	GACTTACTATGATCACAACGAGAGCGGTGGAACTTCTGGCACGCAGCAT
		veränderte 121 bp
SHIV-KB9	(9185)	CGGGGTGGGAAGCCCTCAAATATTGGTGGAAGC
SHIV-89.6C.12	(9210)	C <mark>GGGGTGGGAA</mark> GCCCTCAAATATTG <mark>GT</mark> GGAATC
SHIV-89.6C.12theo	(9213)	TCTCAAGGGACTACAGAG <mark>GGGGTGGGAA</mark> AT <mark>CCT</mark> T <mark>AAATAT</mark> CT <mark>G</mark> G <mark>AA</mark> G <mark>TC</mark>
SHIV-KB9	(9217)	TCCTACAGTATTGGAGTCAGGAACTAAAGAATAGTGCTGTTAGCTTGCTA
SHIV-89.6C.12	(9242)	TCCTACAGTATTGGAGTCAGGAACTAAAGAATAGTGCTGTTAGCTTGCTA
SHIV-89.6C.12theo	(9263)	TTGTGCAGTATTGGGGCCAGGAGCTAAAAAGAGCCCCATAAAAAAGAGTGCTATTAATCCTGCTT
		← Homologer Arm →
SHIV-KB9	(9267)	CAATATGGGTGGAGCTATTTCCATGAGGCGGTCCAGGCCGTCTGGAGATC
SHIV-89.6C.12	(9292)	CAATATGGGTGGAGCTATTTCCATGAGGCGGTCCAGGCCGTCTGGAGATC
SHIV-89.6C.12theo	(9313)	CAATATGGGTGGAGCTATTTCCATGAGGCGGTCCAGGCCGTCTGGAGATC

Bild 4.26: Nukleotidsequenz von SHIV-89.6C.12 *env.* Aus dem virushaltigen Überstand der Replikationskinetik an Tag 19 wurde virale RNA isoliert, revers transkribiert und sequenziert. Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit der theoretischen Ausgangssequenz von SHIV-89.6C.12 und der Sequenz von SHIV-KB9 verglichen. Dargestellt ist der veränderte Sequenzbereich von 120 bp im gp41 von *env*, sowie flankierende Bereiche.

4.2.9.4 Ein Subtyp C SHIV-Panel basierend auf SIVmac239

Die bisherigen Ergebnisse belegen, dass mit dem in dieser Arbeit etablierten System die parallele Herstellung von 12 unterschiedlichen SHIV-BACs effizient möglich ist. Da von diesen analysierten Viren nur eine Variante (SHIV-89.6C.12) *in vitro* replizierte, wurde ein zweites SHIV-*Panel*, das auf der Verwendung der gleichen Subtyp C *env*-Sequenzen beruht, sich jedoch von der Genomorganisation von SHIV-89.C.1-12 unterscheidet, hergestellt. Zu diesem Zweck wurden die durch das *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* kodierten *vpu* und *env*-Sequenzen über Red-Rekombination in das Virusgenom von SIVmac239 eingefügt. Damit sollte eine neue Klasse an SHIVs hergestellt werden, die sich in ihrem SIV-/HIV-Anteil von den bisher verfügbaren SHIVs unterscheidet. Durch Insertion von *vpu* und *env* sollten SHIV-BAC-Konstrukte kodierend für SHIV-NC.1-12 generiert werden, die sowohl ein chimäres SIV - HIV Tat als auch ein chimäres Rev Protein kodieren (siehe Bild 4.27 A). Beide Proteine werden durch zwei Exons kodiert und ihre zur Translation verwendete mRNA durch mehrfaches Spleißen der primär gebildeten RNA generiert. SHIV-NC-Konstrukte tragen Exon 1 von SIV und Exon 2 der HIV-1 Subtyp C Sequenzen. SIVmac239 und HIV-1 bzw. SHIV-89.6P unterscheiden sich durch die Sequenz ihres

Spleißdonors zwischen den Tat und Env bzw. Tat und Vpu kodierenden Leserahmen. Für die Konstruktion des SHIV-NC-*Panels* wurde die SIVmac239 Spleißdonorsequenz

verwendet. Der 3' Übergang der HIV - SIV Sequenz in SHIV-NC-Varianten wurde analog zu SHIV-KB9 entworfen und kodiert für ein chimäres HIV - SIV gp41.



Bild 4.27: Schema zur Herstellung neuer Subtyp C SHIV-Varianten basierend auf SIVmac239. Zur Herstellung neuartiger SHIV-NC-Konstrukte wurde SIVmac239 *env* sowie *tat* und *rev* Exon 2 (dunkelgrau) durch HIV-1 Sequenzen vom Subtyp C des *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* ersetzt. Zusätzlich wurde auch HIV-1 *vpu* integriert. Resultierende Viren kodieren für chimäre HIV - SIV Proteine Tat und Rev, sowie für ein chimäres gp41 analog zu SHIV-89.6P (A). SIVmac239 und HIV-1 bzw. SHIV-89.6P (Klon KB9) weisen eine unterschiedliche Spleißdonorsequenz zwischen den Leserahmen kodierend für Tat und Env bzw. Vpu auf. SHIV-NC-Varianten beinhalten die SIVmac239 Spleißdonorsequenz (B). Schraffiert = LTR-Sequenzen

Analog zur Herstellung des SHIV-89.6C-*Panels* (siehe 4.2.9.3) wurden die einzufügenden Subtyp C *vpu/env*-Sequenzen zunächst über PCR amplifiziert und durch entsprechende Oligonukleotide 50 bp homologe Bereiche zur Zielsequenz, in diesem Fall zu SIVmac239, angefügt. Diese linearen dsDNA-Fragmente mit einer Größe von 2,7 kb wurden über Red-Rekombination durch Substitution von *rpsLNeo* in den Vektor pCCT-SIV+NrNcT in *E. coli* GS1783 eingebracht. Die erhaltenen, Streptomycin- und Chloramphenicol-resistenten Bakterienklone wurden analog zu 4.2.9.3 auf erfolgreiche Integration der Subtyp C *env*-Sequenzen überprüft. Über eine anschließende *en passant* Rekombination wurde die *camR*-Kassette aus dem SIV *nef*-Bereich von positiven Klonen entfernt. Die BAC-DNA von Chloramphenicol-sensitiven Klonen wurde mittels Restriktionsverdau (siehe Bild 4.28) und Sequenzierung analysiert. Insgesamt wurden nach dem ersten Rekombinationsschritt 159 Bakterienklone analysiert, bis alle 12 gewünschten BAC-Konstrukte vorlagen. Die Effizienz dieses Schrittes entsprach den unter 4.2.3 ermittelten Werten. Nach der *en passant* Rekombination wurden 212 Kolonien auf Chloramphenicol-Sensitivität überprüft, wovon 40 Klone *camS* waren. Die jeweilige BAC-DNA wurde isoliert und im Restriktionsverdau

analysiert. Darunter waren alle 12 pCCT-SHIV-NC-Konstrukte zu finden. Im Vergleich zur Herstellung des SHIV-89.6C-*Panels* wiesen etwas mehr Klone (~ 24 % in Vergleich zu 10 %) eine Streptomycin-Resistenz aufgrund des Verlusts des Virusgenoms auf.

Als Ergebnis konnten 12 neue SHIV-BAC-Konstrukte generiert werden, die sich im Anteil ihrer SIV/HIV Sequenzen von den bisher verfügbaren Viren unterscheiden (siehe Bild 4.28).



Erwartete Fragmente (~ kb):

SIV+N	Variante 1/3-10/12	Var. 2	Var. 11
4,5	7,8	7,8	7,8
4,3	4,3	4,3	4,3
3,5	3,6	3,5	3,5
3,0	3,5	3,3	2,0
1,6	1,1	1,1	1,6
0,8	0,8	0,8	1,1
0,5	0,5	0,5	0,8
		0,3*	0,5

Bild 4.28: Restriktionsanalyse der SHIV-NC-Varianten. BAC-DNA wurde mittels des Qiaprep Spin Mini Kit aufgereinigt und die Konzentration bestimmt. Je 500 ng DNA wurden ÜN bei 37 °C mit adäquaten Restriktionsenzymen (KpnI) verdaut und mit Hilfe eines 0,8 %igen Agarosegels analysiert. Mit * gekennzeichnete Fragmente sind auf dem Gel nicht erkennbar.

Zur Herstellung von Viruspartikeln wurden analog zu 4.2.9.3, 293T-Zellen mit den BAC-Konstrukten pCCT-SHIV-NC.1-12 transfiziert und die RT-Aktivität in den Überständen 48 h später quantifiziert. Wie die Bestimmung der RT-Aktivität ergab (siehe Bild 4.29), konnte jedoch für keine der 12 SHIV-NC-Varianten die Produktion einer deutlichen RT-Menge beobachtet werden.



Bild 4.29: **RT-Gehalt** zellfreier Virusüberstände. Pro Konstrukt wurden 3x10⁵ 293T-Zellen im 6-well Format mit 0,21 pmol BAC-DNA mittels PEI transfiziert. Virushaltige Überstände wurden 72 h nach Transfektion geerntet und die Menge an reverser Transkriptase quantitativ bestimmt.

Analog zur Analyse des SHIV-89.6C-*Panels* wurde die Proteinexpression von ausgewählten SHIV-NC-Varianten nach Transfektion mittels *Western Blot* untersucht. Die Analyse zeigt, dass im Zelllysat (A) zwar virale Proteine nachweisbar sind (v. a. p27 gag), es aber zu keiner Sezernierung von viralen Proteinen oder Viruspartikeln in den Überstand kommt (B) (siehe Bild 4.30). Eine Inkubation von TZM-bl Zellen mit den in Bild 4.29 gezeigten Zellüberständen konnte keine Infektion aufzeigen (Daten nicht gezeigt).



Bild 4.30: *Western Blot* Analyse SHIV-NC BAC-transfizierter 293T-Zellen. Zur Analyse des Expressionsprofils von SHIV-NC wurden je Konstrukt $5x10^5$ 293T-Zellen mit 0,21 pmol BAC-DNA transfiziert und nach 48 h sowohl die Zellüberstände als auch -lysate geerntet. Von den Zelllysaten wurden je 100 µg Gesamtprotein über SDS-Page aufgetrennt (A). Die Überstände wurden über Ultrazentrifugation konzentriert und komplett analysiert (B). Der Nachweis SIV-spezifischer Proteine erfolgte mit einem polyklonalen Makaken Serum (2BR). Als Positivkontrolle dienten mit pCCT-SIV+N transfizierte Zellen. Als Negativkontrolle (mock) dienten mit pcDNA3.1 transfizierte Zellen.

Da die Ergebnisse der *Western Blot* Analyse darauf hindeuten, dass die generierten SHIV-NC BAC-Vektoren einen Defekt in der Expression ihrer viralen Proteine haben, wurden keine weiteren Versuche mit diesem *Panel* durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Herstellung lentiviraler BAC-Vektoren über Red-Rekombination

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden erstmalig lentivirale Genome über Red-Rekombination als Bacterial Artificial Chromosome (BAC) hergestellt. Von Eipers et al. 156 wurde Anfang 2011 die Integration eines HIV-1 Provirus in drei verschiedene BACs beschrieben, jedoch verwendete diese Gruppe hierfür das Cre – loxP System des P1 Phagen. Zur erfolgreichen Anwendung dieser, ebenfalls Rekombinations-basierten Technologie, mussten sowohl in den Zielvektor als auch in das Provirus-Plasmid zunächst die erforderlichen loxP-Erkennungssequenzen integriert werden. Hierfür wurden die beiden LTRs zunächst über PCR amplifiziert und in zwei separate Plasmide kloniert. In diese Plasmide wurden anschließend über Red-Rekombination loxP-Sequenzen eingefügt. Die resultierenden loxPflankierten LTRs wurden daraufhin wieder in das ursprüngliche Provirus-Genom zurückkloniert. Auch eine verwendete rpsLNeo-Kassette musste erst über Red-Rekombination mit loxP-Sequenzen flankiert und in den Zielvektor rekombiniert werden. Dieses System erscheint sehr aufwendig und beruht u. a. auf der Klonierung eines Volllänge Provirus-Genoms. Eigene Arbeiten haben jedoch gezeigt, dass sich konventionelle Klonierungen mit kompletten Lentivirus-Genomen oft als sehr schwierig gestalten. Initiale Versuche das Genom von SIVmac239 in den BAC-Vektor pBeloBac11 zu klonieren, waren nicht erfolgreich. Es kam sogar zur Integration bakterieller Genomseguenzen in die resultierenden Vektoren. Für gezielte sub-genomische Sequenz-Austausche ist das CreloxP System ungeeignet, da bei diesem System stets eine Erkennungssequenz von 34 bp als "Narbe" zurückbleibt, was die Integrität der lentiviralen ORFs zerstören würde.

Als alternative Methode bot sich an, das SIVmac239 Virusgenom über Red-*Recombineering* in den BAC-Vektor pCCT einzufügen. Um eine eventuelle Interferenz der LTRs bei der Rekombination zu vermeiden, wurde hierfür eine mehrstufige Strategie erarbeitet. Aufgrund der Größe des viralen Genoms von ~ 10 kb wurde mit drei Fragmenten gearbeitet. Die PCR Amplifikation und Klonierung der Virusgenom-Abschnitte in die Vektoren pMX-RBX verlief problemlos. Die nach EcoRV Verdau resultierenden linearen Transferkonstrukte (virale Sequenz + positiver Selektionsmarker + homologe Sequenz zum Zielvektor) hatten Größen von 3,9 kb, 5,5 kb und 4,7 kb (Fragment A, B und C; siehe Bild 4.2), ein Gößenbereich, der sich als sehr effizient in den Red-Rekombinationen erwies. Auf Basis einer sehr guten Reproduzierbarkeit könnte daher für die Herstellung weiterer lentiviraler BACs, beispielsweise der Herstellung bestimmter HIV-1 BACs, auch eine 2-Stufen-Rekombination mit nur zwei Fragmenten in Erwägung gezogen werden. Dies würde einen Klonierungs- und einen Rekombinationsschritt weniger erfordern und würde damit einen zeitlichen Vorteil bedeuten.

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten lentiviralen BAC-Vektoren mit Größen zwischen 18 kb und 22 kb erwiesen sich bei DNA-Präparationen und chemischen Transformationen in verschiedenen Bakterienstämmen (siehe Tabelle 3-1) als äußerst stabil. Es konnten während der gesamten Arbeit keinerlei *Rearrangements* der Bacmide beobachtet werden. Die ermittelten Rekombinationseffizienzen variierten zunächst stark zwischen den einzelnen Versuchen. Jedoch konnte bei rund 67 % der Rekombinationen zur Herstellung lentiviraler BAC-Konstrukte keinerlei Hintergrund beobachtet werden. Dies zeigt deutlich die äußerst effiziente Anwendung des Systems bei Verwendung eines positiven Selektionsmarkers. Starke Schwankungen in der Effizienz waren v. a. bei bereits geringen Abweichungen vom optimalen Rekombinationsprotokoll (siehe 3.2.1.5, 3.2.1.6 und 3.2.3) zu beobachten.

5.2 BAC-Mutagenese unter Verwendung von rpsLNeo

Entscheidend für die effiziente und rückstandslose Veränderung der lentiviralen BACs über Red-Rekombination war die Wahl eines geeigneten Selektionssystems. Unter 2.4.2.2 sind einige Doppelselektionssysteme beschrieben, die nach Entfernung keine "Narbe" im viralen Genom zurück lassen. Aus technischen Gründen wurde die doppelte Selektions- und Gegenselektionskassette *rpsLNeo* bestehend aus zwei ORFs verwendet. Da eine Selektion mit Streptomycin sehr effizient ist und dieses System weniger anfällig für Resistenzbildung ist als das *sacB* System ^{173,211,212}, wurde über PCR eine *rpsLNeo*-Kassette amplifiziert und für die rückstandslose Herstellung neuer lentiviraler BACs mittels Red-Rekombination verwendet.

5.2.1 Optimierung des rpsLNeo Systems durch Reduktion des Hintergrunds

Die ersten Rekombinationsexperimente, die auf der Substitution von *rpsLNeo* durch lineare Transfersequenzen basierten, wiesen einen starken Hintergrund von Streptomycinresistenten Bakterienklonen auf, die nicht erfolgreich rekombiniert waren. Durch Restriktionsverdau und Sequenzierung konnte zunächst nachgewiesen werden, dass die meisten StrepR Klone (~ 83 %) nicht nur die *rpsLNeo*-Kassette, sondern das komplette Virusgenom über Rekombination zwischen den terminalen LTR-Sequenzen des Virsugenoms aus dem BAC-Vektor entfernt hatten. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, bzw. die Häufigkeit dieser internen Rekombination zu verringern, wurden verschiedene Reaktionsparameter variiert um das Rekombinationsprotokoll zu optimieren. Die Effizienz wurde dabei unter Zuhilfenahme der *dsRed*-Kassette und durch die Analyse der resultierenden Fluoreszenz bestimmt. Im Detail wurden (1) die Induktionszeit der Red Proteine, (2) das Protokoll zur Herstellung elektrokompetenter Bakterien, (3) die Menge an elektroporierter linearer dsDNA sowie (4) die Wachstumszeit und -temperatur der Kulturen ohne Selektionsmedium nach Elektroporation variiert. Zusätzlich wurde eine Rekombination in dem Bakterienstamm *E. coli* Stbl2, der besonders *Repeat*-haltige Sequenzen stabilisieren soll, durchgeführt. Jedoch hatte keine der Veränderungen eine Reduktion der durch LTR-Rekombination verursachten Entfernung der Virusgenome zur Folge. Westenberg *et al.* beobachteten einen vergleichbar starken Hintergrund von Streptomycin-resistenten Bakterienklonen bei der Substitution von *rpsL* in einem *Repeat*-Sequenz-haltigen Baculovirus BAC ²¹³. Diese Arbeitsgruppe analysierte ebenfalls den Effekt verschiedener Modifikationen des Rekombinationsprotokolls bezogen auf die Häufigkeit dieses unerwünschten Hintergrunds. Die Effizienz der Red-Rekombination durch Substitution von *rpsL* konnte dabei ausschließlich durch die Verwendung von sehr langen homologen Bereichen von 600 bp erhöht werden. Da dies eine zusätzliche Klonierung von einzubringenden DNA-Sequenzen erforderlich macht, wurde im Rahmen dieser Arbeit das Virusgenom durch einen weiteren *en passant* entfernbaren Selektionsmarker stabilisiert und so die Effizienz der Rekombination gesteigert.

5.2.2 Stabilisierung des Virusgenoms durch einen *en passant* entfernbaren Selektionsmarker

Für die Erhöhung der Rekombinationseffizienz bzw. für eine Reduktion des durch LTR-Rekombination verursachten Hintergrunds wurde ein zusätzlicher Selektionsmarker in den SIV nef-Bereich der bereits hergestellten viralen BACs eingefügt. Der nef-Bereich wurde gewählt, da dieser im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstant gehalten werden sollte. Nef ist in Zellkultur sowohl für die Bildung von Viruspartikeln als auch für die Infektiosität der Viren nicht von Bedeutung^{214,215} und wird sehr häufig für die Insertion von Reportergenen genutzt. Als Selektionsmarker wurde eine Chloramphenicol-Resistenz Expressionskassette gewählt. Die Fusion einer Sequenzduplikation und einer Erkennungsstelle für die Homing Endonuklease I-Scel erlaubte eine rückstandslose Entfernung des Selektionsmarkers durch eine interne en passant Rekombination nach in vivo I-Scel Restriktion (siehe Bild 4.7) aus allen zur Produktion von Viruspartikeln verwendeten BAC-Vektoren. Dadurch kodieren alle hergestellten Viren für ein funktionelles Nef Protein und können somit auch für in vivo Experimente in NHP eingesetzt werden. Für die Anwendung dieser en passant Technologie wurde der E. coli Stamm GS1783 verwendet, da dieser sowohl eine L-Arabinose induzierbare I-Scel Expressionskassette, als auch einen integrierten Prophagen für die Expression der λ Red Proteine im bakteriellen Genom integriert trägt. Die Anwendung der en passant Mutagenese ist durch die Verwendung des episomal vorliegenden Plasmids pBAD-I-scel auch in jedem anderen Rekombinationsstamm möglich. Jedoch hat die Verwendung von pBAD-I-scel eine Kontamination von BAC DNA-Präparationen mit diesem Plasmid zur Folge. Durch die Integration des zusätzlichen Sm, konnte die Effizienz der Substitution von rpsLNeo deutlich gesteigert werden (siehe Tabelle 4-2 und Tabelle 4-3), da

die Chloramphenicol-Resistenz das Virusgenom stabilisiert bzw. eine Gegenselektion zu dem Ereignis der LTR-Rekombination ermöglicht.

Bei der Entfernung der Chloramphenicol-Resistenzkassette durch *en passant* Rekombination kam es durchschnittlich in nur 12 % der analysierten Einzelklone zu einem Verlust des Virusgenoms. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die interne homologe Rekombination zur Entfernung des Sm über die flankierende Sequenzduplikation aufgrund der räumlichen Nähe der freien dsDNA Enden nach I-Scel Verdau gegenüber der LTR-Rekombination bevorzugt wird. Außerdem ist davon auszugehen, dass in diesem finalen Schritt *per se* weniger StrepR Bakterien entstehen, da bei der Durchführung der *en passant* Mutagenese die Kulturen nicht mehr elektrokompetent gemacht und elektroporiert werden müssen und dadurch Stress-induzierte Rekombinationsereignisse vermieden werden.

5.2.3 Steigerung der BAC-Kopienanzahl durch Insertion von trfA

Für die Anwendung der *en passant* Technologie wurden alle viralen BACs in *E. coli* GS1783 transformiert. In diesem Bakterienstamm ist jedoch eine Induktion des *low-copy* oriV von pCCT nicht möglich, da diese Bakterien im Gegensatz zu *E. coli* Epi300 das Protein TrfA nicht kodieren. TrfA ist als Initiatorprotein für die Steigerung der Kopienzahl durch Bindung an *direct repeats* (Iterons) im oriV jedoch zwingend erforderlich ²⁰⁵. Daher wurde die *trfA*-Sequenz unter Kontrolle des Rhamnose induzierbaren Promotors P_{RhaB} über Rekombination in die Vektorsequenz der viralen BACs eingefügt (siehe 4.2.4). Nach Induktion der resultierenden BAC-Konstrukte mit L-Rhamnose konnte zwar eine Steigerung der Kopienzahl beobachtet werden, jedoch war der Effekt deutlich geringer ausgeprägt als in *E. coli* Epi300. Im Vergleich zu nicht *trfA*-induzierten Bakterien lieferte die Induktion des Vektor-kodierten *trfA* eine 5-fach höhere Plasmidausbeute nach DNA-Isolierung. Die Induktion in Epi300 dagegen führte zu einer bis zu 22-fach höheren Menge an BAC-DNA.

Um die grundsätzliche Funktionalität des Rhamnose-Operons zu überprüfen und systematische Fehler auszuschließen, wurde auch eine *dsRed*-Sequenz mit P_{RhaB} fusioniert. Die resultierende Kassette wurde sowohl in einem *low-copy* Plasmid, als auch in einem *single-copy* Vektor mit unterschiedlichen Rhamnose-Mengen induziert und die Fluoreszenz der Bakterien im FACS analysiert. Dabei konnte jedoch nur im *low-copy* Format eine Fluoreszenz nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass die Expressionsleistung des P_{rhaB}-Systems im Vektor pCCT in *E. coli* GS1783 nicht optimal ist und für diese Anwendung daher nur bedingt eingesetzt werden kann. Alternativ zu diesem Vorgehen, können für die Bereitstellung sehr großer BAC DNA-Mengen in *E. coli* GS1783 hergestellte Konstrukte in *E. coli* Epi300 umtransformiert und diese Klone für eine DNA-Präparation verwendet werden. Die Insertion der P_{RhaB}-*trfA*-Kassette in die BAC-Vektoren pCCT-SIV und pCCT-SIV+N zeigt jedoch das große Potential des verwendeten Rekombinationssystems auf, da hier eine

relativ große Kassette (4,5 kb) über sehr kurze homologe Sequenzen von 27 bp und 38 bp integriert werden konnte.

5.3 Herstellung verschiedener SHIV-Varianten über BAC-Mutagenese

Das in dieser Arbeit neu etablierte Red-Rekombinationssystem diente schließlich zur effizienten Herstellung verschiedener SIV-BAC sowie SHIV-BAC-Varianten, die zur weiteren Aufklärung einiger spezifischer Fragestellungen im Bereich der HIV-Impfstoffentwicklung genutzt werden konnten.

5.3.1 "Rückbau" des passagierten HIV-1 Bereichs von SHIV-89.6P (Klon KB9)

Als Proof of Principle für die erfolgreiche Anwendung der Red-Rekombination in Kombination mit der en passant Mutagenese zur Herstellung chimärer SHIV-BAC-Konstrukte wurde der komplette HIV-1 Sequenzbereich des pathogenen SHIV-KB9 in pCCT-SIVrNc sowie in pCCT-SIV+NrNcT eingefügt (siehe 4.2.5). Im Vorfeld war versucht worden, dieses DNA-Fragment mit einer Größe von 2,9 kb in den ursprünglichen BAC pCCT-SIVrN, ohne CamR im nef ORF, einzufügen, analog zur Herstellung der Varianten pCCT-SIVdsRed und pCCT-SIVenvK. Aufgrund des hohen Hintergrunds an StrepR Klonen konnten jedoch trotz intensiver Screenings keine positiven Rekombinanten isoliert werden. Erst das Einbringen der en passant entfernbaren Chloramphenicol Resistenzkassette in die Zielvektoren zur zusätzlichen Selektion von positiven Rekombinanten, erlaubte die Fertigstellung der Konstrukte pCCT-SHIV-KB9wt und pCCT-SHIV-KB9wt+N und betont darüber hinaus das Potential des etablierten Systems. Das unterschiedliche Replikationsverhalten von SHIV-KB9, SHIV-KB9wt und SHIV-KB9wt+N in verschiedenen Zelllinien (siehe 4.2.7) bestätigt ein bereits beschriebenes Phänomen. So stellt die unterschiedliche in vitro Replikationsfähigkeit in humanen und Makaken PBMC, sowie in diversen SIV-permissiven Zelllinien, eine Schwierigkeit bei der gezielten Konstruktion in vivo infektiöser und replikationsfähiger Viren dar, da in Zellkultur beobachtete Eigenschaften keine Vorhersage auf das *in vivo* Verhalten ermöglichen ^{124,216}. Das im Rahmen dieser Arbeit generierte Virus SHIV-KB9wt zeigte keinerlei Replikation in Rhesus PBMC. Dies bestätigt in Analogie zu Karlsson et al. 138, dass die Mutationen, die SHIV-KB9 durch in vivo Passagierung im SIVmac239 Backbone erworben hat, für die erfolgreiche Replikation in Makaken essentiell und als eine Folge der Wirtsanpassung zu sehen sind. Auffällig ist (siehe Bild 4.10), dass besonders im Bereich der LTRs Mutationen akkumulierten. Dies ist als eine Folge der Anpassung der LTR-Sequenz an das HIV-1 Tat von Isolat 89.6 zu sehen. Nur eine optimale Bindung von Tat an den LTR-Promotor erlaubt eine effiziente Transkription und somit Virusproduktion. Das Einfügen einer zusätzlichen NF-KB Bindestelle in die LTR-Region konnte das Replikationsvermögen von SHIV-KB9wt+N in Rhesus PBMC zumindest teilweise wieder herstellen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Transkription des Virusgenoms der limitierende Faktor für eine effiziente Virusvermehrung ist.

In wie weit die Mutationen im LTR-Bereich auch für das pathogene Potential des Virus verantwortlich sind, lässt sich derzeit nicht sagen. Es wurden bereits verschiedene Mutanten von SHIV-KB9 hergestellt, die zeigen, dass bestimmte Mutationen im *env*-Bereich einen Einfluss auf das pathogene Potential des Virus haben, dieses jedoch nicht vollständig konstituieren können ¹³⁸. Daher ist es durchaus möglich, dass auch Mutationen im SIVmac239 *Backbone* zum pathogenen Potential eines Virus beitragen. Das in dieser Arbeit entwickelte System kann wesentlich zur Aufklärung dieser Fragestellung beitragen, da wie gezeigt, punktuelle Variationen im Virusgenom sehr effizient etabliert werden können.

5.3.2 Generierung von SHIV V3-Varianten mit unterschiedlichem Korezeptor-Tropismus

Eine wichtige Fragestellung im Bereich der HIV-Impfstoffentwicklung und in besonderem Maße bei der Entwicklung adäquater Tiermodelle betrifft auch die Korezeptor-Verwendung von als *Challenge* Viren eingesetzter SHIVs. Das in dieser Arbeit entwickelte System wurde daher verwendet, um ausgehend vom pathogenen, dualtropen SHIV-KB9 neue R5-trope SHIVs herzustellen. Hierfür wurden vier verschiedene SHIV-BACs mit mutierter V3-Sequenz in gp120 generiert. Diese sollten im Vergleich zum Ausgangsvirus eine Veränderung im Korezeptor-Tropismus aufweisen. Zur genauen Überprüfung der bioinformatischen Vorhersage-Programme wurden neben den R5-tropen auch potentiell X4-trope Virusvarianten konstruiert. Bis auf die Variante KR-IGK zeigten alle SHIV V3-Varianten eine Replikation in humanen PBMC. Die Ursache für das fehlende Replikationsvermögen von SHIV-KR-IGK ist derzeit noch unklar.

Unter 4.2.8.2 konnte gezeigt werden, dass die über Red-Rekombination hergestellten Viren SHIV-KS-TGD, SHIV-KS-IGK, SHIV-KR-TGD und SHIV-KR-IGK alle ein gegenüber dem Ausgangsisolat SHIV-KB9 verändertes Korezeptor-Profil aufweisen. SHIV-KB9 kann nach vorherrschender Meinung sowohl CXCR4 als auch CCR5 als Korezeptor für die Infektion nutzen ^{138,195}. Nach dem in dieser Arbeit erzielten Ergebnis (siehe Bild 4.18) scheint SHIV-KB9 jedoch bevorzugt CXCR4 zu verwenden, da der Einsatz des CXCR4-Antagonisten AMD3100 einen deutlich stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Infektiosität der eingesetzten Viren hatte, als die Verwendung des CCR5-Antagonisten TAK779 (siehe Bild 5.1). Die vier neu hergestellten SHIV V3-Varianten können prinzipiell immer noch beide Korezeptoren zur Infektion nutzen, jedoch scheinen sie alle CCR5 gegenüber CXCR4 zu präferieren. So konnte die Zugabe von TAK779 die Infektiosität aller vier SHIV-Varianten sehr stark reduzieren (83 - 90 %). Eine Inkubation mit AMD3100 konnte die Anzahl an infizierten Zellen ebenfalls herabsenken, jedoch in weit geringerem Ausmaß als bei SHIV-KB9. Auch war der Effekt bei den SHIV V3-Varianten variabler als bei Zugabe

von TAK779. So reduzierte AMD3100 die Anzahl an infizierten Zellen nur um 10 % bei der Variante KR-TGD, um 24 % bei SHIV-KR-IGK und um 38 % bzw. 42 % bei den Varianten KS-IGK und KS-TGD. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass v. a. SHIV-KR-TGD bevorzugt CCR5 zur Infektion nutzt. Dieses Virus könnte daher als R5-trope Variante von SHIV-89.6P für *in vivo* Versuche in NHP verwendet werden.



Bild 5.1: Inhibition der Infektion durch Einsatz von Korezeptor-Antagonisten. Zur Veranschaulichung des Effekts von AMD3100 (CXCR4-Antagonist) und TAK779 (CCR5-Antagonist) wurden die Ergebnisse von Bild 4.18 in % Inhibition der Infektion aufgetragen.

Die hier ermittelten Ergebnisse entsprechen im Kern auch von Matsuda *et al.* ¹²⁶ veröffentlichten Daten, die ebenso auf Basis der Subtyp B R5-Konsensussequenz nach Cardozo *et al.* ⁵¹, durch Substitution von fünf AS im *env* V3-Bereich den Tropismus eines X4-tropen SHIVs (SHIV-KS661, abgeleitet von SHIV-89.6P) veränderten. Das resultierende SHIV (SHIV-MK1) infizierte Rhesus PBMC bevorzugt über CCR5 und erwies sich als replikationskompetent in Rhesus Makaken.

Zum Vergleich mit den unter 4.2.8.1 beschriebenen Phänotypen der V3-Varianten von SHIV-KB9 wurde zusätzlich eine bioinformatische Vorhersage der Korezeptor-Verwendung mit Hilfe des Online Tools WebPSSM²¹⁷ durchgeführt.

Tabel	le 5-1: B	ioinformatische	Vorhersage	der Korezept	tor-Verwendu	ng (mit	WebPSSM)	im
Vergleich zu den experimentell ermittelten Daten (Grenzwert % Inhibition: positiv wenn >15 %)								
	SHIV	Korezentor			Netto	ovnorin	nontollos	

SHIV Name	Korezeptor Verwendung	Score X4	Score R5	Netto Ladung	experimentelles Ergebnis
89.6P	Auch X4	0.38	0.98	6	Nur X4
KS-TGD	Nur R5	0.16	0.73	4	Auch X4
KS-IGK	Auch X4	0.29	0.95	6	Auch X4
KR-TGD	Nur R5	0.22	0.91	5	Nur R5
KR-IGK	Auch X4	0.51	0.98	7	Nur R5

Wie aus Tabelle 5-1 ersichtlich ist, wird für die Varianten KS-TGD und KR-TGD ein reiner R5-Tropismus hervorgesagt. Dies widerspricht für SHIV-KR-TGD der 11/24/25-Regel, da diese V3-Variante die positiv geladene AS Lysin an Position 11 aufweist. Nach Interpretation der Testergebnisse verwendet SHIV-KR-TGD sogar hauptsächlich CXCR4 als Corezeptor. Auch SHIV-KS-TGD kann durchaus CXCR4 für eine Infektion verwenden. Um dies exakt aufzuklären, sind noch weitere Analysen der Korezeptor-Verwendung der SHIV V3-Varianten nötig. So könnte die Infektion von humanen und/oder Rhesus PBMC unter Einsatz der hier verwendeten Korezeptor-Antagonisten analysiert werden. Auch könnten Reporter-Zelllinien (U87 oder GHOST), die zusätzlich zu CD4 jeweils einen oder beide Korezeptoren exprimieren, mit den verschiedenen SHIV-Mutanten infiziert werden und weiteren Aufschluss über die Korezeptor-Präferenz der hergestellten Viren geben. Die hier generierten experimentellen Daten stimmen nur zum Teil mit der bioinformatischen Vorhersage überein, größere Abweichungen ergaben sich besonders für SHIV-89.6P, SHIV-KS-TGD und SHIV-KR-TGD. Das Verhalten von SHIV-KR-TGD widerspricht dabei auch der 11/24/25-Regel. Allgemein lässt sich sagen, dass Vorhersagen des Korezeptor-Tropismus besser für rein R5-trope Viren als für rein X4-trope Viren zutreffen und dualtrope Viren sogar komplett ausgeschlossen werden ⁵¹. Insgesamt eignet sich das entwickelte System daher hervorragend, um solche bioinformatische Vorhersage-Programme experimentell zu überprüfen und durch die erhaltenen Ergebnisse zugrunde liegende Algorithmen zu verbessern.

Bei diesen Analysen sollte auch berücksichtigt werden, dass nicht nur die Sequenz, sondern auch die Struktur der V3-Region für die Korezeptor-Präferenz eines Virus verantwortlich sein kann ²¹⁸. Der Korezeptor-Tropismus wird außerdem nicht ausschließlich durch die V3-Sequenz bestimmt, sondern auch die Sequenzen der V1- und V2-Region in gp120 können hierauf einen Einfluss haben ²¹⁹. Am Isolat SF162 konnte überdies gezeigt werden, dass *in vitro* und *in vivo* unterschiedliche Mutationen in der V3-Sequenz für eine Veränderung der Korezeptor-Verwendung verantwortlich sein können ¹⁴⁵.

5.3.3 Herstellung zweier Subtyp C SHIV-Panel

Als *Proof of Principle* für die Skalierbarkeit des etablierten Systems wurden zwei Sets von jeweils 12 SHIV-Provirus BAC-Konstrukten parallel hergestellt. Aus dem *"Subtype C HIV-1 Reference Panel of Env Clones"* wurde die primäre *env-* inklusive der vollständigen *vpu-*Sequenz, in zwei unterschiedliche lentivirale BAC-Vektoren über *Recombineering* eingefügt. Diese BACs kodierten zum einen für das Virusgenom von SHIV-89.6P (Klon KB9) und zum anderen für das Genom von SIVmac239 und enthielten alle zur Rekombination erforderlichen Selektionskassetten. Beim Design dieser Konstrukte wurde gezielt der chimäre HIV - SIV gp41 Terminus von SHIV-89.6P beibehalten, da dieser eine wichtige Rolle

für die Replikationsfähigkeit und die Pathogenität resultierender Viren *in vivo* zu spielen scheint ¹²³.

Die 12 generierten SHIV-89.6C-Varianten enthalten sowohl Subtyp B als auch Subtyp C HIV-1 Sequenzen, wobei sie im Vergleich zu den bereits verfügbaren SHIVs den bisher größten Anteil an Subtyp C Sequenzen kodieren. Die gesamte gp120-Sequenz und der größte Teil der gp41-Sequenz ist von Subtyp C Isolaten abgeleitet. Überdies beinhalten die neu hergestellten SHIV-89.6C-Varianten auch Subtyp C vpu, was für die Replikationsfähigkeit und das Vermögen der resultierenden SHIVs, CD4+ T-Zellen zu depletieren, in vivo von Bedeutung sein kann. Es ist bekannt, dass HIV-1 Subtyp B und Subtyp C Vpu unterschiedliche Strukturmotive und biologische Eigenschaften aufweisen ²²⁰. Subtyp C Vpu kann beispielsweise CD4 weniger effizient runterregulieren und führte in einem pathogenen Subtyp B SHIV (SHIV-SCVpu) zu einer mehr graduellen CD4-Depletion als das originale Subtyp B Vpu²²¹. Es könnte daher sein, dass SHIVs mit Subtyp C Vpu eher eine HIV-1 Subtyp C Infektion im Menschen widerspiegeln, da Subtyp C Viren in humanen PBMC generell schlechter replizieren als Subtyp B Viren ²²².

Parallel wurde ein zweites *Panel* auf Basis von SIVmac239 hergestellt. Die 12 resultierenden SHIV-NC-Konstrukte stellen eine neue Klasse von SHIVs dar, da sie einen geringeren HIV-1 Anteil aufweisen als die bisher verfügbaren SHIVs und für chimäre SIV - HIV Proteine Tat und Rev kodieren. Tat wirkt als Transkriptionsaktivator durch Bindung an das spezifische TAR-Element im 5' LTR. Die LTR-Sequenz von HIV-1 und SIV weist jedoch nur eine Identität von ~48 % auf. Bei SHIV-89.6P konnte bereits beobachtet werden, dass HIV-1 Tat durch *in vivo* Passagierung zahlreiche Mutationen akkumulierte, die wahrscheinlich in ihrer Gesamtheit die Interaktion mit einem SIV LTR erleichterten. Die Bindung an den LTR wird durch die Proteindomäne von Tat vermittelt, die durch das Exon 1 kodiert wird. Daher könnte es sein, dass SHIVs, die ein SIV *tat* Exon 1 beinhalten, initial besser replizieren können als vergleichbare Viren mit HIV-1 *tat*, da das resultierende chimäre Tat besser mit dem SIV LTR interagieren kann. HIV-1 Rev bindet an das sog. *Rev responsive element* (RRE) im *env*-Bereich von einfach gespleißten oder ungespleißten RNAs und ermöglicht so deren Kernexport²⁰⁹. Da die Bindedomäne durch das *rev* Exon 2 kodiert wird, sollte eine SIV Rev Domäne, die durch das Exon 1 kodiert wird, diese Interaktion nicht verschlechtern.

Die Herstellung dieser 24 neuen SHIV-Konstrukte über Red-Rekombination und *en passant* Mutagenese dauerte ca. sechs Wochen. Es ist daher möglich, mit dem etablierten System innerhalb kurzer Zeit zahlreiche neue SHIV-BAC-Konstrukte mit *env*-Sequenzen verschiedenster HIV-1 Isolate herzustellen und so die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung neuer replikationsfähiger Viren zu verbessern.

Wie die Western Blot Analysen (siehe Bild 4.24 und Bild 4.30) zeigen, führte eine Transfektion mit den 24 neuen Subtyp C SHIV-Varianten nicht in jedem Fall zur Produktion

von Viruspartikeln. Da jedoch 8 von 12 SHIV-89.6C-Konstrukten zu einer deutlich nachweisbaren RT-Aktivität und damit zur Ausbildung von Viruspartikeln führten und für diese die Proteinexpression vergleichbar mit SHIV-KB9 war, ist davon auszugehen, dass die hergestellten pCCT-SHIV89.6C-Varianten nicht generell einen Defekt in der Partikelbildung Dagegen scheinen die SHIV-NC-Varianten einen prinzipiellen Defekt aufweisen. aufzuweisen, da sie nicht effizient oder richtig exprimiert wurden (siehe Bild 4.30) und es zu keiner Abschnürung viraler Partikel in den Überstand kam. Dies könnte an der verwendeten Spleißdonor Sequenz zwischen SIV tat und HIV-1 vpu liegen, die eventuell eine Produktion von funktionalem Tat verhindert und somit eine effiziente Transkription des Virusgenoms blockiert. Versuche, in Western Blot Analysen die Expression von Tat und Rev in Lysaten transfizierter Zellen nachzuweisen, blieben erfolglos. Eine Ko-Transfektion von eukaryontischen Zellen mit den SHIV-NC-Konstrukten und einem Plasmid kodierend für exogenes Tat könnte einen Hinweis geben, ob eine fehlende Tat-Funktion für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist. In diesem Fall, könnte durch eine alternative Verwendung der HIV-1 Spleißdonorsequenz (siehe Bild 4.27) in einem neuen SHIV-Panel dieser generelle Defekt der Transkription und Translation der viralen Proteine aufgehoben werden.

Über den Grund, warum Viruspartikel-haltige SHIV-89.6C Überstände mit hoher RT-Aktivität nicht zu einer Infektion von TZM-bl Zellen führten, kann derzeit nur spekuliert werden. So könnten (1) die zur Transfektion verwendeten 293T-Zellen nicht optimal für die Partikelbildung sein, (2) die eingesetzten infektiösen Titer der Virusüberstände zu gering gewesen zu sein oder (3) den eingefügten *env*-Sequenzen evtl. bestimmte wichtige Spleißdonor-, Spleißakzeptor- oder *Ehancer*-Sequenzen fehlen. Nach Infektion von humanen PBMC replizierten alle bereits etablierten Viren, die als Positivkontrollen verwendet wurden und ein Virus aus dem SHIV-89.6C-*Panel* (# 12). Eine virale Replikation in Rhesus PBMC war nur für SIVmac239 nachweisbar, nicht jedoch für die in NHP replikationsfähigen und pathogenen Viren SHIV-KB9, SHIV-SF162P3 und SHIV-1157ipd3N4. Es ist möglich, dass ebenso wie bei Infektion der TZM-bl Zellen nur sehr geringe infektiöse Virustiter eingesetzt wurden, die für eine produktive Infektion nicht ausreichten. Eventuell könnte für die erfolgreiche Infektion von Rhesus PBMC mit den verwendeten SHIVs auch eine weitere Optimierung des Protokolls zur PBMC-Stimulierung und -Aktivierung nötig sein.



Bild 5.2: Schematische Darstellung des Rekombinationsereignisses bei der Herstellung von SHIV-89.6C.12. Gezeigt ist der zu verändernde Sequenzbereich von pCCT-SHIV-KB9rNc. Dargestellt sind virale Sequenzen (hellgrau), zur Rekombination verwendete virale Sequenzen (dunkelgrau bzw. schwarz) und die relative Lage der viralen ORFs im Endkonstrukt. Gestrichelte Linien zeigen an, über welche Sequenzen die Subtyp C *vpu/env*-Sequenz #12 rekokmbinieren hätte sollen (grau) bzw. über welche Sequenz tatsächlich rekombiniert wurde (rot).

Die Isolierung und Sequenzierung des viralen Genoms von SHIV-89.6C.12 aus den Überständen humaner PBMC zeigte, dass dieses Virus Sequenzen im gp41-Terminus aufweist, die exakt der Sequenz von SHIV-89.6P entsprechen. Die Sequenzierung von pCCT-89.6C.12 daraufhin zeigte, dass diese Mutationen bereits im hergestellten BAC-Vektor vorlagen. Es ist daher anzunehmen, dass während der Rekombination zur Integration der *env*-Sequenz in pCCT-SHIV-KB9rNc, aufgrund einer teilweise vorhandenen Homologie der Sequenzen von Subtyp C *env* # 12 und 89.6P *env* (79,2 %; siehe auch Bild 4.26), ein größerer Sequenzbereich von 89.6P *env* erhalten blieb, als beabsichtigt war (siehe Bild 5.2).

Α			
	SHIV-1157ipd3N4	(726)	GE <mark>R</mark> DRD <mark>RSTRL</mark> VTG <mark>S</mark> LALTWDDLRSLCLF <mark>S</mark> YHRLRDLLLI <mark>VTR</mark> TVELLGR
	SHIV-89.6P (KB9)	(736)	GE <mark>R</mark> DRDRSGPSVNG <mark>S</mark> LA <mark>LT</mark> WDDLRSLCLF <mark>S</mark> YHRLRDLLLI <mark>VTR</mark> IVELLGR
	SHIV-89.6C.12theo	(740)	GEQDR <mark>G</mark> RS <mark>VRL</mark> VS <mark>GFL<mark>P</mark>LAWDDLRSLCLFCYHRLRDLLLITTRAVELL<mark>A</mark>R</mark>
	SHIV-89.6C.12	(740)	GEQDR <mark>G</mark> RS <mark>VRLV</mark> SGFL P LAWDDLRSLCLFCYHRLRDLLLI <mark>V</mark> TR <mark>IVELLG</mark> R
	SHIV-1157ipd3N4	(776)	<mark>RGWE<mark>A</mark>LKY<mark>WWNLL</mark>LYW<mark>SQELK</mark>NSA<mark>VS</mark>LL<mark>N</mark>ATAIAVRQYG<mark>WSYF</mark></mark>
	SHIV-89.6P (KB9)	(786)	<mark>RGWEALKYWWNLLQYW</mark> SQELK <mark>NSAVSLLQYG</mark> <mark>WSYF</mark>
	SHIV-89.6C.12theo	(790)	SILKGLQ <mark>RGWE</mark> I <mark>LKY</mark> LGS <mark>L<mark>VQ</mark>YW<mark>GQELK</mark>K<mark>SA<mark>I</mark>NLL<mark>QYG</mark>WSYF</mark></mark>
	SHIV-89.6C.12	(790)	RGWE <mark>ALKYWWNL</mark> LQYW <mark>SQELKN</mark> SAVSLLQYGWSYF
	SHIV-1157ipd3N4	(819)	HEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWE <mark>ILRRGGRWILAIPRRIRQGLELTLL</mark>
	SHIV-89.6P (KB9)	(821)	HEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWE <mark>T</mark> LRRGGRWILAIPRRIRQGLELTLL
	SHIV-89.6C.12theo	(832)	HEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWE <mark>T</mark> LRRGGRWILAIPRRIRQGLELTLL
	SHIV-89.6C.12	(825)	HEAVQAVWRSATETLAGAWGDLWE <mark>T</mark> LRRGGRWILAIPRRIRQGLELTLL
В			
	SHIV-1157ipd3N4	(1)	MAGRSGDSDEELIRTVRLIKLLYQSNPPPTSEGSRQARRNR
	SHIV-89.6P (KB9)	(1)	MAGRSGDSDEELIRTVRLIKLLYQSNPPPSLEGTRQARRNR
	SHIV-89.6C.12theo	(1)	MSNHEREEELRKRLRLIHLLHQTTGILTLIVADPPPKPEGTRQARRNR
	SHIV-89.6C.12	(1)	M <mark>SN</mark> HER <mark>EEEL<mark>RK</mark>R<mark>L</mark>RLIHLL<mark>HQTT</mark>GILTLIVADPPPKP<mark>EG</mark>TRQARRNR</mark>
	SHIV-1157ipd3N4	(42)	RRRWRERQRQIHSISDRILSTYLGRSAEPVPLQLPPLERLTLDCNEDCGT
	SHIV-89.6P (KB9)	(42)	RRRWRERQRQIR <mark>SISERILGTY</mark> LGRSAEPVPLQLPPLERLTLDCNEDCGT
	SHIV-89.6C.12theo	(49)	RRRWRARQRQI <mark>CEISERILT</mark> TCLGRSEEPVPLLLPPIERLTIDHNESGGT
	SHIV-89.6C.12	(49)	RRRWRARQRQI <mark>C</mark> EISERIL <mark>T</mark> TCLGRSEEPVPLLLPPTERLTLDCNEDCGT
	SHIV-1157ipd3N4	(92)	P <mark>GTQ</mark> RVGSPQIL <mark>VES<mark>P</mark>TVLESGTKE-</mark>
	SHIV-89.6P (KB9)	(92)	S <mark>GTQ</mark> GVGSPQIL <mark>V</mark> ES <mark>P</mark> TVLESGTKE-
	SHIV-89.6C.12theo	(99)	<mark>SGTQ</mark> HSQGTTEG <mark>V</mark> GN <mark>P</mark>
	SHIV-89.6C.12	(99)	S <mark>GTQ</mark> GVGSPQIL <mark>V</mark> ES <mark>P</mark> TVLESGTKE-

Bild 5.3: Aminosäuresequenz von SHIV-89.6C.12 gp41 und Rev. Aus dem virushaltigen Überstand der Replikationskinetik an Tag 19 wurde virale RNA isoliert, revers transkribiert und sequenziert. Die resultierende AS-Sequenz des gp41-Bereichs wurde mit den AS-Sequenzen von SHIV-1157ipd3N4, SHIV-89.6P (KB9) und der theoretischen Ausgangssequenz von SHIV-89.6C.12 verglichen. Dargestellt sind der C-terminale Bereich von gp41 (A) sowie die komplette AS-Sequenz von Rev (B. Die Zahlen in Klammern geben die Positionen der AS in Env bzw. Rev an.

Dies resultierte in einem Virus mit einer im Vergleich zu den anderen SHIV-89.6C-Varianten veränderten und um 7 AS verkürzten gp41-Sequenz (siehe Bild 5.3 A). Interessanterweise weist auch das pathogene Subtyp C SHIV-1157ipd3N4 eine ähnliche AS-Sequenz in diesem Bereich auf. Daher könnte diese Sequenz für eine erfolgreiche Replikation *in vivo* von Bedeutung sein. Hierzu sollte jedoch zunächst die Replikation von SHIV-89.6C.12 in Rhesus PBMC untersucht werden. Auch die C-terminalen AS von Rev waren von diesen Mutationen betroffen (siehe Bild 5.3 B). Es ist jedoch nicht davon auszugehen, dass dies einen bedeutenden Einfluss auf die Virusreplikation hat, da für diesen Rev-Abschnitt keine wichtigen Funktionen bekannt sind ⁵.

Dieses unerwartete Ergebnis zeigt ein weiteres, bisher noch nicht beschriebenes Anwendungspotential des hier etablierten Systems auf: Aufgrund einer Sequenzhomologie von 79,2 % zwischen der 89.6 *env*- und der Subtyp C *env*-Sequenz (# 12) kam es zu einer nicht gezielt geplanten homologen Rekombination. Solche Ereignisse könnten auch genutzt werden, um ungerichtete SIV - HIV Mosaikviren zu erhalten und mögliche Zusammenhänge zwischen der Genomzusammensetzung, der Replikationskompetenz und eventuell sogar pathogenen Eigenschaften eines resultierenden Virus aufzuklären. Diese Entdeckung ist umso erstaunlicher, als übereinstimmend eine Mindestanzahl von > 20 bp an homologen Bereichen für eine erfolgreiche Red-Rekombination postuliert werden ^{161,172}. Dies scheint damit zusammenzuhängen, dass das λ Beta Protein nur mit Sequenzen, die mindestens 36 bp lang sind stabile Nukleoprotein-Komplexe ausbilden kann²²³. Wie die in Bild 4.26 dargestellte Nukleotidsequenz zeigt, scheint bei der Entstehung von SHIV-89.6C.12 jedoch über eine 14 bp homologe Sequenz rekombiniert worden zu sein. Alternativ dazu könnte es auch sein, dass einzelne Nukleotid-Fehlpaarungen in einem größeren homologen Bereich durch das System toleriert werden können. Falls die hier beschriebene Beobachtung reproduziert werden kann, wäre eine Optimierung dieser Methode zur ungerichteten Rekombination zwischen sehr ähnlichen, nicht-homologen Sequenzen denkbar. Der Einsatzbereich würde dabei über die Schaffung neuer SHIVs hinausreichen und sowohl für Grundlagen- als auch Anwendungsbezogene Forschung ein bedeutendes Werkzeug bereitstellen.

5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch Anwendung der Red-Rekombinationstechnologie zunächst mehrere lentivirale BACs hergestellt. Diese konnten durch die Verwendung einer doppelten Selektions- und Gegenselektionskassette über Rekombination rückstandslos verändert werden. Die Effizienz dieser Methode konnte außerdem durch eine Kombination mit der *en passant* Mutagenese deutlich gesteigert werden. Auf diese Weise wurden einige neue SHIV-Varianten konstruiert, die *in vitro* in humanen und teilweise auch in Rhesus PBMC replizieren können, und damit äußerst interessant für weitere *in vivo* Analysen sind.

Die V3-Varianten von SHIV-KB9 mit einem veränderten Korezeptor-Tropismus könnten, falls sie *in vivo* eine Pathogenität vergleichbar mit SHIV-KB9 hervorrufen, als R5-trope Varianten anstelle SHIV-89.6P in HIV-1 *Challenge* Studien in NHP eingesetzt werden. Dies wäre von Vorteil, da Infektionen von Makaken mit R5-tropen SHIVs, im Gegensatz zu X4- oder dualtropen Viren, einen ähnlichen klinischen Verlauf zeigen wie eine HIV-1 Infektion im Menschen (siehe 2.3.2).

Lentivirale BACs, die zur Bildung einer neuen Klasse von Subtyp C SHIV-Konstrukten führen sollten (SHIV-NC), zeigten einen generellen Defekt bei der Expression des viralen Genoms. Es konnten daher keine Viruspartikel gebildet werden. Jedoch könnte dies durch ein verändertes Design des SHIV-NC-*Panels* mit einer anderen Spleißdonorsequenz zwischen SIV *tat* Exon 1 und HIV-1 *vpu* geändert werden. Anhand dieses SHIV-*Panels* konnte gezeigt werden, dass durch die parallele Herstellung mehrerer Konstrukte, die sich nur durch die

primäre Sequenz des verwendeten *env* Isolats unterscheiden, schnell Rückschlüsse auf die prinzipielle Funktionalität der Viren gezogen werden können. Wird dagegen wie herkömmlich nur eine neue SHIV-Variante hergestellt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein eventueller Defekt nur isolatspezifisch ist.

Die Herstellung eines SHIV-*Panels* basierend auf dem pathogenen SHIV-KB9 führte zur Produktion mehrerer neuer SHIV-haltiger Überstände. Von diesen erwies sich eine Variante als replikationskompetent in humanen PBMC. Dieses Virus, SHIV-89.6C.12, kodiert primäre *vpu/env*-Sequenzen aus einem frühen Infektionsstadium nach einer heterosexuellen Übertragung in Südafrika. Es konnte gezeigt werden, dass SHIV-89.6C.12 als einzige Variante, aufgrund eines eigentlich unbeabsichtigten Rekombinationsereignisses, einen Abschnitt von 121 bp im gp41 Terminus von SHIV-KB9 integriert hat. Die weitere Analyse des Replikationspotentials dieses mutierten Virus in Rhesus PBMC *in vitro* und in Makaken *in vivo* wäre nun äußerst interessant. Dieser SHIV könnte daher den Pool an R5-tropen, in vivo replikationsfähigen und evtl. pathogenen SHIVs mit einer Subtyp C HIV-1 *env*-Sequenz erweitern und sich für den Einsatz in NHP-Studien eignen. Die gezielte Herstellung weiterer SHIV-89.6C-Varianten unter Verwendung der Subtyp C *env*-Sequenzen # 1 - 11 und diesem 121 bp Abschnitt von SHIV-KB9 könnte weiteren Aufschluss auf die Bedeutsamkeit dieser Sequenz für das Replikationspotential resultierender Viren geben.

Das etablierte Red-*Recombineering*-System eignet sich auch für die Generierung weiterer, neuer SHIV-Konstrukte, die eine sog. virale Quasispezies bilden. Durch die Amplifikation primärer *env*-Sequenzen aus HIV-1 positiven Patienten in einem späten Infektionsstadium und eine Adaptation des Verfahrens auf das 96-*well* Format könnte diese SHIV Quasispezies hergestellt werden. Dies wäre sehr interessant, da bereits gezeigt werden konnte, dass eine virale Quasispezies die Selektion von besser replizierenden und stärker pathogenen Viren begünstigen kann¹⁹³. Eine Inokulation mit einer möglichst diversen Quasispezies kann somit den Pathogenitätsfaktor erhöhen bzw. den Fortschritt einer Infektion beschleunigen²²⁴.

Desweiteren eignet sich die hier etablierte Methode selbstverständlich auch zur Herstellung von HIV-1 BACs und ermöglicht somit eine einfache Konstruktion von neuen Reporterviren, Deletions- oder Punktmutanten.

6 Anhang

6.1 Übersicht aller hergestellten Konstrukte

Rekombinations- System	Eigenschaften	Hergestellte Konstrukte
pCCT in <i>E. coli</i> Epi300	gbx: Ara-induzierbar Kopien-Anzahl: Ara-induzierbar recA+	pCCT-SIV (B) pCCT-SIV (BC) pCCT-SIV (BC+N) pCCT-SIV (ABC) pCCT-SIV (ABC+N) pCCT-SHIV-KB9 (B) pCCT-SHIV-KB9 (BC) pCCT-SHIV-KB9 (ABC)
pSIM5 in <i>E. coli</i> Epi300	gbx: Hitze-induzierbar ori101: Temperatur-sensitiv	pCCT-SIVrN pCCT-SIVdsRed pCCT-SIVenvK
	aby: Hitze-induzierbar	pCCT-SIVkanaout pCCT-SIV-rNc pCCT-SIV $+$ NrNc pCCT-SIV Δ a-rN pCCT-SIV Δ a-rNc pCCT-SIV Δ a-dsRed pCCT-SIV Δ a-dsRed pCCT-SHIV-KB9wt pCCT-SHIV-KB9wt pCCT-SIVrhaRed-rNc pCCT-SIVrhaRed-rNc pCCT-SIV-rNcT (<i>trfA</i> +) pCCT-SIV+NrNcT (<i>trfA</i> +) pCCT-SHIV-NC.1-12 pCCT-SHIVKB9kanaout
E. coli GS1783	I-Scel: Ara-induzierbar Kopien-Anzahl: teilweise Rha- induzierbar	pCCT-SHIVKB9Δa-rN pCCT-SHIVKB9Δa-rNc pCCT-SHIV-89-6C.1-12

6.2 Sequenzen Transferkonstrukte

Sce-wtrpsLNeo:

5' CAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGGCCT GGTGATGATGGCGGGATCGTTGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGCGTCCTCATATT GTGTGAGGACGTTTTATTACGTGTTTACGAAGCAAAAGCTAAAACCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTTAACCA GCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCATGCCCGCAAAAACG TGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGTGTTCG TCTGACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAATCTGCAGGAACACTCCGTTATCCT GATCCGTGGCGGTCGTGTTAAAGACCTCCCGGGTGTTCGTTACCACCCGTACGTGGTGCGCTTGACTGCTCCGG CGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTCTAAGTATGGCGTGAAGCGTCCTAAGGCTTAAGGAGGACAATCATGATT GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAG ACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGAC GCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTC CTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGAT GTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGC ATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGC TTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGAT ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAG CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAACCTTGCTTCTTGGATAAAGTATATACAATATGGAG TTTATATAGTTGTAG'3

Ceu-wtrpsLNeo (siehe oben), Erkennungsstelle Endonuklease ausgetauscht durch:

TAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGA

Sce-dsRed:

5'CAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAACTCTTTGAGACCTCAATAAAGTAGGGATAACAGGGTAATGCGCA ACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGTCAATTAAC CCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGTTAATTAAGCTGGAGTCTTCGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTT AAGGGATTTTGGTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGGCGAGCA GCGAAGATGTGATCAAAGAATTTATGCGCTTCAAAGTGCGTATGGAAGGCAGCGGTGAACGGCCATGAATTTGAAA TTGAAGGCGAAGGCGAAGGTCGTCCGTATGAAGGCACCCAGACCGCGAAACTGAAAGTGAACATCCGGCGGATA TTCCGGATTATAAAAAACTGAGCTTCCCGGAAGGCTTTCAGTATGGCAGCAAAGTGTATGTGAAACATCCGGCGGAAA TTCCGGATTATAAAAAACTGAGCTTCCCGGAAGGCTTTAAATGGGAACGCGTGATGAACTTTGAAGATGGCGGCG TGGTGACCGTGACCCAGGATAGCAGCCTGCAGGATGGCAGCTTTATCTATAAAGTGAAATTCATCGGCGTGAACT TTCCGAGCGATGGCCCGGTGATGCAGAAAAAACCATGGGCTGGGAAGCGGCGCCATTATCTGGTGGAATTCAAAA GCATCTATATGGCGAAAAAACCGGTGCAGCTGCCGGGCTATTATTATGTGGGATAGCAAACTGGATATTACCAGCC ACAACGAAGATTATACCATCGTGGAACAGTATGAACGTGCGGGAAGGCCGTCATCACCTGTTTCTGTAAACCTTGC *TTCTTGGATAAAGTATATACAATATGGAGTTTATATAGTTGTAG'* 3

SIVenvK:

Sce-camR-EnP:

 $GATGAGGAAGATGATGACTTGGTAGGGGTATCAGTGAGGCCAAAAGTTCC \colored{C} \$

Sce-kanR-EnP:

Amprha-trfA:

ATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGGGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAAGGCCGCAAAAAAGGG AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA TTGTCTCATGAGCGGATAGATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTGACGTCGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCCGCCGCGCCGCTTAATCTTTCTGCGAATTGAGATGA CGCCACTGGCTGGGCGTCATCCCGGTTTCCCGGGTAAACACCACCGAAAAATAGTTACTATCTTCAAAGCCACAT TCGGTCGAAATATCACTGATTAACAGGCGGCTATGCTGGAGAAGATATTGCGCATGACACACTCTGACCTGTCGC AGATATTGATTGATGGTCATTCCAGTCTGCTGGCGAAATTGCTGACGCAAAACGCGCTCACTGCACGATGCCTCA TCACAAAATTTATCCAGCGCAAAGGGACTTTTCAGGCTAGCCGCCAGCCGGGTAATCAGCTTATCCAGCAACGTT TCGCTGGATGTTGGCGGCAACGAATCACTGGTGTAACGATGGCGATTCAGCAACATCACCAACTGCCCGAACAGC AACTCAGCCATTTCGTTAGCAAACGGCACATGCTGACTACTTTCATGCTCAAGCTGACCGATAACCTGCCGCGCC TGCGCCATCCCCATGCTACCTAAGCGCCAGTGTGGTTGCCCTGCGCTTGGCGTTAAATCCCCGGAATCGCCCCCTGC GAGTGTTTATCGTCAGCATGAATGTAAAAGAGATCGCCACGGGTAATGCGATAAGGGCGATCGTTGAGTACATGC AGGCCATTACCGCGCCAGACAATCACCAGCTCACAAAAATCATGTGTATGTTCAGCAAAGACATCTTGCGGATAA CGGTCAGCCACAGCGACTGCCTGCTGGTCGCCAGAAAAAATCATCTTTGAGAAGTTTTAACTGATGCGCCACC GTGGCTACCTCGGCCAGAGAACGAAGTTGATTATTCGCAATATGGCGTACAAATACGTTGAGAAGATTCGCGTTA TTGCAGAAAGCCATCCCGTCCCTGGCGAATATCACGCGGTGACCAGTTAAACTCTCGGCGAAAAAGCGTCGAAAA GTGGTTACTGTCGCTGAATCCACAGCGATAGGCGATGTCAGTAACGCTGGCCTCGCTGTGGCGTAGCAGATGTCG GGCTTTCATCAGTCGCAGGCGGTTCAGGTATCGCTGAGGCGTCAGTCCCGTTTGCTGCTTAAGCTGCCGATGTAG CGTACGCAGTGAAAGAGAAAATTGATCCGCCACGGCATCCCAATTCACCTCATCGGCAAAATGGTCCTCCAGCCA GGCCAGAAGCAAGTTGAGACGTGATGCGCTGTTTTCCAGGTTCTCCTGCAAACTGCTTTTACGCAGCAAGAGCAG TAATTGCATAAACAAGATCTCGCGACTGGCGGTCGAGGGTAAATCATTTTCCCCTTCCTGCTGTTCCATCTGTGC AACCAGCTGTCGCACCTGCTGCAATACGCTGTGGTTAACGCGCCAGTGAGACGGATACTGCCCATCCAGCTCTTG ATTATCGGTATGTTCATACAGATGCCGATCATGATCGCGTACGAAACAGACCGTGCCACCGGTGATGGTATAGGG CTGCCCATTAAACACATGAATACCCGTGCCATGTTCGACAATCACAATTTCATGAAAATCATGATGATGTTCAGG AAAATCCGCCTGCGGGAGCCGGGGTTCTATCGCCACGGACGCGTTACCAGACGGAAAAAAATCCACACTATGTAA TACGGTCATACTGGCCTCCTGATGTCGTCAACACGGCGAAATAGTAATCACGAGGTCAGGTTCTTACCTTAAATT TTCGACGGAAAACCACGTAAAAAAACGTCGATTTTTCAAGATACAGCGTGAATTTTCAGGAAATGCGGTGAGCATC ACATCACCACAATTCAGCAAATTGTGAACATCATCACGTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCCCATTTTCCTG TCAGTAACGAGAAGGTCGCGAATTCAGGCGCTTTTTAGACTGGTCGTAATGAAATTCAGGAGGTTGTCGACATGA ATCGGACGTTTGACCGGAAGGCATACAGGCAAGAACTGATCGACGCGGGGTTTTCCGCCGAGGATGCCGAAACCA TCGCAAGCCGCACCGTCATGCGTGCGCCCCGCGAAACCTTCCAGTCCGTCGGCTCGATGGTCCAGCAAGCTACGG CCAAGATCGAGCGCGACAGCGTGCAACTGGCTCCCCTGCCCTGCCCGCGCCATCGGCCGCCGTGGAGCGTTCGC GTCGTCTCGAACAGGAGGCGGCAGGTTTGGCGAAGTCGATGACCATCGACACGCGAGGAACTATGACGACCAAGA AGCGAAAAACCGCCGGCGAGGACCTGGCAAAACAGGTCAGCGAGGCCAAGCAGGCCGCGTTGCTGAAACACACGA AGCAGCAGATCAAGGAAATGCAGCTTTCCTTGTTCGATATTGCGCCGTGGCCGGACACGATGCCGAGCGATGCCAA ACGACACGGCCCGCTCTGCCCTGTTCACCACGCGCAACAAGAAAATCCCGCGCGAGGCGCTGCAAAACAAGGTCA TTTTCCACGTCAACAAGGACGTGAAGATCACCTACACCGGCGTCGAGCTGCGGGCCGACGATGACGAACTGGTGT GGCAGCAGGTGTTGGAGTACGCGAAGCGCACCCCTATCGGCGAGCCGATCACCTTCACGTTCTACGAGCTTTGCC AGGACCTGGGCTGGTCGATCAATGGCCGGTATTACACGAAGGCCGAGGAATGCCTGTCGCGCCTACAGGCGACGG CGATGGGCTTCACGTCCGACCGCGTTGGGCACCTGGAATCGGTGTCGCTGCACCGCTTCCGCGTCCTGGACC GTGGCAAGAAAACGTCCCGTTGCCAGGTCCTGATCGACGAGGAAATCGTCGTGCTGTTTGCTGGCGACCACTACA CGAAATTCATATGGGAGAAGTACCGCAAGCTGTCGCCGACGGCCCGACGGATGTTCGACTATTTCAGCTCGCACC GGGAGCCGTACCCGCTCAAGCTGGAAACCTTCCGCCTCATGTGCGGATCGGATTCCACCCGCGTGAAGAAGTGGC GCGAGCAGGTCGGCGAAGCCTGCGAAGAGTTGCGAGGCAGCGGCCTGGTGGAACACGCCTGGGTCAATGATGACC ${\tt TGGTGCATTGCAAACGCTAGTAATAGGCCGCCGCGTGCCACCTGACGTCGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCGAT}$

Amp-rha-dsRed:

ATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGGGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAAGGCCGCAAAAAAGGG AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA TTGTCTCATGAGCGGATAGATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCG AAAAGTGCCACCTGACGTCGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCCGCCGCGCCGCTTAATCTTTCTGCGAATTGAGATGA CGCCACTGGCTGGGCGTCATCCCGGGTTTCCCGGGTAAACACCACCGAAAAATAGTTACTATCTTCAAAGCCACAT TCGGTCGAAATATCACTGATTAACAGGCGGCTATGCTGGAGAAGATATTGCGCATGACACACTCTGACCTGTCGC AGATATTGATTGATGGTCATTCCAGTCTGCTGGCGAAATTGCTGACGCAAAACGCGCTCACTGCACGATGCCTCA TCACAAAATTTATCCAGCGCAAAGGGACTTTTCAGGCTAGCCGCCAGCCGGGTAATCAGCTTATCCAGCAACGTT TCGCTGGATGTTGGCGGCAACGAATCACTGGTGTAACGATGGCGATTCAGCAACATCACCAACTGCCCGAACAGC AACTCAGCCATTTCGTTAGCAAACGGCACATGCTGACTACTTTCATGCTCAAGCTGACCGATAACCTGCCGCGCC TGCGCCATCCCCATGCTACCTAAGCGCCAGTGTGGTTGCCCTGCGCTGGCGTTAAATCCCCGGAATCGCCCCCTGC GAGTGTTTATCGTCAGCATGAATGTAAAAGAGATCGCCACGGGTAATGCGATAAGGGCGATCGTTGAGTACATGC AGGCCATTACCGCGCCAGACAATCACCAGCTCACAAAAATCATGTGTATGTTCAGCAAAGACATCTTGCGGATAA CGGTCAGCCACAGCGACTGCCTGGTCGCTGGCAAAAAAATCATCTTTGAGAAGTTTTAACTGATGCGCCACC GTGGCTACCTCGGCCAGAGAACGAAGTTGATTATTCGCAATATGGCGTACAAATACGTTGAGAAGATTCGCGTTA TTGCAGAAAGCCATCCCGTCCCTGGCGAATATCACGCGGTGACCAGTTAAACTCTCGGCGAAAAAGCGTCGAAAA GTGGTTACTGTCGCTGAATCCACAGCGATAGGCGATGTCAGTAACGCTGGCCTCGCTGTGGCGTAGCAGATGTCG GGCTTTCATCAGTCGCAGGCGGTTCAGGTATCGCTGAGGCGTCAGTCCCGTTTGCTGCTTAAGCTGCCGATGTAG CGTACGCAGTGAAAGAGAAAATTGATCCGCCACGGCATCCCAATTCACCTCATCGGCAAAATGGTCCTCCAGCCA GGCCAGAAGCAAGTTGAGACGTGATGCGCTGTTTTCCAGGTTCTCCTGCAAACTGCTTTTACGCAGCAAGAGCAG TAATTGCATAAACAAGATCTCGCGACTGGCGGTCGAGGGTAAATCATTTTCCCCCTTCCTGCTGTTCCATCTGTGC AACCAGCTGTCGCACCTGCTGCAATACGCTGTGGTTAACGCGCCAGTGAGACGGATACTGCCCATCCAGCTCTTG ATTATCGGTATGTTCATACAGATGCCGATCATGATCGCGTACGAAACAGACCGTGCCACCGGTGATGGTATAGGG CTGCCCATTAAACACATGAATACCCGTGCCATGTTCGACAATCACAATTTCATGAAAATCATGATGATGTTCAGG AAAATCCGCCTGCGGGAGCCGGGGTTCTATCGCCACGGACGCGTTACCAGACGGAAAAAAATCCACACTATGTAA TACGGTCATACTGGCCTCCTGATGTCGTCAACACGGCGAAATAGTAATCACGAGGTCAGGTTCTTACCTTAAATT TTCGACGGAAAACCACGTAAAAAACGTCGATTTTTCAAGATACAGCGTGAATTTTCAGGAAATGCGGTGAGCATC ACATCACCACAATTCAGCAAATTGTGAACATCATCACGTTCATCTTTCCCTGGTTGCCAATGGCCCATTTTCCTG TCAGTAACGAGAAGGTCGCGAATTCAGGCGCTTTTTAGACTGGTCGTAATGAAATTCAGGAGGTTGTCGACATGG CGAGCAGCGAAGATGTGATCAAAGAATTTATGCGCTTCAAAGTGCGTATGGAAGGCAGCGTGAACGGCCATGAAT TTGAAATTGAAGGCGAAGGCGAAGGTCGTCCGTATGAAGGCACCCCAGACCGCGAAACTGAAAGTGACCAAAGGCG GTCCGCTGCCGTTTGCGTGGGATATTCTGAGCCCGCAGTTTCAGTATGGCAGCAAAGTGTATGTGAAACATCCGG CGGATATTCCGGATTATAAAAAACTGAGCTTCCCGGAAGGCTTTAAATGGGAACGCGTGATGAACTTTGAAGATG GCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGATAGCAGCCTGCAGGATGGCAGCTTTATCTATAAAGTGAAATTCATCGGCG TGAACTTTCCGAGCGATGGCCCGGTGATGCAGAAAAAAACCATGGGCTGGGAAGCGAGCACCGAACGTCTGTATC CGCGTGATGGCGTGCTGAAAGGCGAAATTCATAAAGCGCTGAAACTGAAAGATGGCGGCCATTATCTGGTGGAAT TCAAAAGCATCTATATGGCGAAAAAACCGGTGCAGCTGCCGGGCTATTATTATGTGGATAGCAAACTGGATATTA CCAGCCACAACGAAGATTATACCATCGTGGAACAGTATGAACGTGCGGAAGGCCGTCATCACCTGTTTCTGTAAT AGGCGGCCGCGTGCCACCTGACGTCGGCCGTCAAGGCCTAGGCGCGCCGAT

Ceu-wtrpsLNeo-V3:

GGCCTGGTGATGATGGCGGGATCGTTGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGCGTCCTC ATATTGTGTGAGGACGTTTTATTACGTGTTTACGAAGCAAAAGCTAAAACCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGTT AACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCATGCCCGCAA AAACGTGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCGT GTTCGTCTGACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAATCTGCAGGAACACTCCGTT ATCCTGATCCGTGGCGGTCGTGTTAAAGACCTCCCGGGTGTTCGTTACCACACCGTACGTGGTGCGCTTGACTGC TCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTCTAAGTATGGCGTGAAGCGTCCTAAGGCTTAAGGAGGACAATCA TGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCAC AACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGA CTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGG ATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGC GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGG GCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCC GTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATT CGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA*AACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTT TACAACAGATAGTTATAAA*

Ceu-wtrpsLNeo-KB9:

CTATTATGGGGTACCTGTGTGGAGAGAAGCAACCACCACTCTATTTTGTGTAACTATAACGGTCCTAAGGTAGCGAGGCCTGGTGATGATGGCGGGGATCGTTGTATATTTCTTGACACCTTTTCGGCATCGCCCTAAAATTCGGCGTCCT CATATTGTGTGAGGACGTTTTATTACGTGTTTACGAAGCAAAAGCTAAAACCAGGAGCTATTTAATGGCAACAGT TAACCAGCTGGTACGCAAACCACGTGCTCGCAAAGTTGCGAAAAGCAACGTGCCTGCGCTGGAAGCATGCCCGCA AAAACGTGGCGTATGTACTCGTGTATATACTACCACTCCTAAAAAACCGAACTCCGCGCTGCGTAAAGTATGCCG TGTTCGTCTGACTAACGGTTTCGAAGTGACTTCCTACATCGGTGGTGAAGGTCACAATCTGCAGGAACACTCCGT TATCCTGATCCGTGGCGGTCGTGTTAAAGACCTCCCGGGTGTTCGTTACCACCGTACGTGGTGCGCTTGACTG CTCCGGCGTTAAAGACCGTAAGCAGGCTCGTTCTAAGTATGGCGTGAAGCGTCCTAAGGCTTAAGGAGGACAATC ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCA CAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAG CCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAG GATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACG GGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAG GGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACC CGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGAT ${\tt TCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGA{\tt GAATAACATGACCTGGATGGAGTGGGAAAG}$ AGAAATTGACAATTACACAGAC

SHIV-KB9wt:

ACCTGGGGGGAGGAAATCCTCTCTCAGCTATACCGCCCTCTAGAAGCATGCTGTAGAGCAAGAAATGGAGCCAGTA GATCCTAGACTAGAGCCCTGGAAGCATCCAGGGAGTAAGCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAAAAAG TGTTGCTTTCATTGCCAAGTTTGTTTCACAACAAAAGCCTTAGGCATCTCCTATGGCAGGAAGAAGCGGAGACAG CCTATACAAATAGCAATAGTAGCATTAGTAGTAGCAATAATAATAGCAATAGTTGTGTGGTCCATAGTAATCATA GAATATAGGAAAATATTAAGACAAAGAAAAATAGACAGGTTAATTGATAGACTAATAGAAAGAGCAGAAGACAGT GGCAATGAGAGTGAAGGAGAAATATCAGCACTTGTGGAGATGGGGGTGGAGATGGGGCACCATGCTCCTTGGGAT GTTGATGATCTGTAGTGCTACAGAAAAATTGTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACCTGTGTGGAGAGAAGCAAC CACCACTCTATTTTGTGCATCAGATGCTAAAGCCTATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCCTG TGTACCCACAGACCCCAACAAGAAGTAGTAGTAGTGGGAAAATGTGACAGAAAATTTTAACATGTGGAAAAATAA CATGGTAGATCAGATGCATGAGGATATAATCAGTTTATGGGATGAAAGCCTAAAGCCATGTGTAAAATTAACCCC ACTCTGTGTTACTTTAAATTGCACTAATTTGAATATCACTAAGAATACTACTAATCTCACTAGTAGCAGCTGGGG ATATGCACTTTTTAATAGACTTGATGTAGTACCAGTAAAAAATACTAGTAATACTAAGTATAGGTTAATAAGTTG TAACACCTCAGTCATTACACAGGCCTGTCCAAAGGTATCCTTTCAGCCAATTCCCATACATTATTGTGTCCCGGC TGGGTTTGCGATACTAAAGTGTAACAATAAGACATTCAATGGATCAGGACCATGCACAAATGTCAGCACAGTACA TACAAGACCCAACAACAATACAAGAGAAAGGTTATCTATAGGACCAGGGAGAGCATTTTATGCAAGAAGAAACAT AATAGGAGATATAAGACAAGCACATTGTAACATTAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTACAACAGATAGTTAT GCACAGTTTTAATTGTGGAGGGGAATTTTTCTACTGTAATACAGCACAACTGTTTAATAGTACTTGGAATGTTGC TGGAGGGACAAATGGCACTGAAGGAAATGACATAATCACACTCCAATGCAGAATAAAACAAATTATAAATATGTG GCAGAAAGTAGGAAAAGCAATGTATGCCCCTCCCATCACAGGACAAATTAGATGTTCATCAAAATATTACAGGGCT GCTACTAACAAGAGATGGAGGTAATAGTACTGAGACTGAGACTGAGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGAATATGAG AAAGAGAAGAACAGTGCAAAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTGTGTTCCTTGGGTTCTTGGGAGCAGC AGGAAGCACTATGGGCGCAGCGTCAGTGACGCTGACGGTACAGGCCAGGCTATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCA GCAGAACAATCTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGAATATGTTGCGACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCT CCAGGCAAGAGTCCTGGCTCTGGAAAGATACCTAAGGGATCAACAGCTCATGGGAATTTGGGGTTGCTCTGGAAA ACTCATTTGCACCACTTCTGTGCCTTGGAATGTTAGTTGGAGTAATAAATCTGTGGATGATATTTGGAATAACAT CCAACAAGAAAAGAATGAAAAAGAATTATTGGAATTGGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTGACATAAC AAACTGGCTGTGGTATATAAGATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGATAGGTTTAAGAATAGTTTTTGCTGT ACTTTCTATAGTAAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCTCCTCCCAGCCTCGAGGGG

V3-KS-IGK:

V3-KS-TGD:

V3-KR-IGK:

V3-KR-TGD:

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
μg	Mikrogramm
μΜ	Mikromolar
ADCC	antibody-dependant cell cytotoxicity
ADCVI	antibody-dependant cell-mediated viral inhibition
AGM	african green monkey
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
APOBEC	apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide
AS	Aminosäure(n)
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
Bst2	bone marrow stromal antigen
CTL	Cytotoxische CD8 ⁺ T-Lymphozyten
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
Env	envelope
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	green fluorescent protein
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
Gp	Glykoprotein
HAART	highly active antiretroviral therapy
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leukocyte antigen
LTR	long terminal repeat
Μ	Molar
MHC	major histocompatibility complex
mM	Millimolar
MPER	Membran externe proximale Region
Nef	negative factor
ng	Nanogramm
NHP	Nicht-humane Primaten
nM	Nanomolar
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
pg	Picogramm
Rev	regulator of expression of virion proteins
RRE	Rev-responsive element

RT	reverse Transkriptase
SHIV	simian/human immunodeficiency virus
SIV	simian immunodeficiency virus
Sm	Selektionsmarker
SM	sooty mangabey
Sog.	sogenannt
ssDNA	Einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
TAR	trans-activation response
Tat	transactivator of transcription
TCLA	T-cell line adapted
T _{EM}	effector memory T-Zelle
T _{EM} TH-Zellen	effector memory T-Zelle T-Helferzellen
T _{EM} TH-Zellen TNF	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a.	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a. Vif	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem <i>viral infectivity factor</i>
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a. Vif Vpr	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem <i>viral infectivity factor</i> <i>viral protein rapid</i>
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a. Vif Vpr Vpu	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem <i>viral infectivity factor</i> <i>viral protein rapid</i> <i>viral protein out</i>
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a. Vif Vpr Vpu Vpu Vpx	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem viral infectivity factor viral protein rapid viral protein out viral protein x
T _{EM} TH-Zellen TNF ÜN v. a. Vif Vpr Vpu Vpx wt	effector memory T-Zelle T-Helferzellen Tumornekrosefaktor über Nacht vor allem viral infectivity factor viral protein rapid viral protein out viral protein x Wildtyp

6.4 Oligonukleotide für Sequenzierung, Kolonie-PCR und Standard Klonierung

Bezeichnung	Sequenz $(5' \rightarrow 3')$
1) Sequenzierprir	ner
SIV_pol1fwd	GCAGCAGCCCAACAGAGG
SIV_pol2 fwd	CCTATTGAGACTGTACCAG
SIV_pol3 fwd	GGACAGTACAGCCTATAGTG
SIV_pol4 fwd	GTCACCCTAACTGACACAAC
SIV_pol5 fwd	GTAAAGATGGTTGCATGGTGG
SIV_vif fwd	GAAGTACAAGGGTATTGGC
SIV_vpr fwd	GATGAATGGGTAGTGGAGG
SIV_env1 fwd	CAGGCAATAGAGGATGTATG
SIV_env2 fwd	GGCATGGTAGGGATAATAGG
SIV_env3 fwd	CATGAGTGCAGAGGTGGCAG
SIV_env4 fwd	AGCTGGGATGTGTTTGGC
SIV_nef1 fwd	CAATCAGGGACAGTATATG
SIV_gag2 fwd	CACTGTCAGAAGGTTGCAC
SIV_ori fwd	CACCTCTGACTTGAGCGTC
SIV_pol6 fwd	GTCGCCTTAAAGCCAGGAAAG
SIV_pol7 fwd	GATAGAGTTGCCACAAAGAG
SIV_pol8 fwd	CTCATGGCATTGACAGACTC
SIV_vpr fwd II	GATCCTCGCTTGCTAACTGC
SIV_gag1 fwd II	CTGAGTACGGCTGAGTGAAG
SIV_LG rev	CTCCGTCGTGGTTGGTTC
89.6vpufwd	GCAATGAGAGTGAAGGAG
89.6env1rev	CTACTAGTGAGATTAGTAG
89.6env1 fwd	CTCAGTCATTACACAGGC
89.6env2 fwd	CATCACAGGACAAATTAGATG
89.6env3 fwd	GAATTGGATAAATGGGCAAG
rhaR fwd	ATGCTACCTAAGCGCCAGTG
rhaS fwd	CAGGTATCGCTGAGGCGTCA
PrhaRS fwd	GGTTCTATCGCCACGGAC
gag1 rev	GCACCAGATGACGCAGACAG
tat1 rev	CTGGCAATGGTAGCAACAC
LTR-zeo rev	GATGGCCCATGAGGCCAG
camnef fwd	GATGAGGAAGATGATGACTTG

Pol7 rev	GAACTTCCTCTGTTAGAGTC	
Vpr rev	CTCCATTTCTTGCTCTACAGC	
Nef1 rev	CAAGTCATCTTCCTCATC	
V1 rev	CATAAACTGATTATATCCTGATG	
V4 rev	GGGTGGTGCAAATTCTATTG	
Gp41 rev	CTTGTCTGAAGCTGCTTAATG	
Gp41 fwd	GCAGCATCCATAACGCTGAC	
2) Primer für Kolonie-PCR		
MAkana fwd/rev	GATAGCCAGCGTATTGC	
MAdg rev/fwd	GACGTAATACGACTCAC	
MZamp fwd	GAATACTCATACTCTTCCT	
MZloxP rev	CCCATGCTGATAACTTCG	
MAspec rev	GTGCATTACGTGAAAGGC	
SIVB rev	GTATAATGTGGACCTAACTC	
Rk1 fwd	GAATCGGCCAACGCGAAC	
Rk2 fwd	GTAACCTGTAGAACGGAG	
Rk3 rev	GTGATGGCTTCCATGTCG	
Rk4 rev	GGCAACTATGGATGAACG	
Rk5 fwd	CGGTCTGGTTATAGGTAC	
Rk6 fwd	CGCATCAGAGCAGCCAATG	
Rk7 fwd	CACCATTACCGCCGCTAC	
pol1 rev	GCTCTACTTTAGCTATGG	
tat1 fwd	GTGCAACCAAGAATAGG	
env1 rev	CCCTGTCATGTTGAATTTAC	
gbx fwd	CGACCCACAGGAACTGATC	
gbx rev	CGGCTTCATCCTTGTCATAG	
Neo fwd	GATGCCTGCTTGCCGAATATC	
SIVC rev	CTGTTGGATATGGGTCTGCTG	
KB9 tat rev	GCTTGATGAGTCTGACTG	
SIV nef1 rev	CTTCCTCATCTATATCATCC	
KB9 env3' fwd	GAGTTAGGCAGGGATATTC	
rpsL rev II	GCCTGCTTACGGTCTTTAAC	
rpsLwt rev	GATAACGGAGTGTTCCTGCAGATTG	
SIVC fwd II	GTGTACCAGCTTGGAGGAATGC	
3) Primer für Klonierungen		
5LTR-Ascl fwd	CATTGCGGCGCGCCTGGAAGGGATTTATTACAGTGC	
gag-EcoXho rev	TCATCACTCGAGATATCCAGTAATACTTCTACAGGCTG	

pol-Ascl fwd	CTCTCTGGCGCCGACCAGTAGTCACTGCTCATATTG
pol-env fwd	CACAAGAGACAGGAAGACAGAC
pol-env rev	GTCTGTCTTCCTGTCTCTTGTG
env-Xhol rev	TCTTACCTCGAGCTTTATTGAGGTCTCAAAGAGTTG
env-AscEco fwd	GATCTAGGCGCCGATATCCAGAACAGGCAATAGAGGATG
3'LTR-Xhol rev	CTTCAACTCGAGTGCTAGGGATTTTCCTGCTTCGG
rpsL+SIV fwd	CTCAATAAAGGGCCTGGTGATGATGGCGGGATC
rpsL-Neo rev	GATTGTCCTCCTTAAGCCTTAGGACGCTTCACG
rpsL-Neo fwd	GGAGGACAATCATGATTGAACAAGATGGATTGCACG
Neo+SIV rev	CAAGAAGCAAGGTTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGG
dsRed-Asc fwd	CGACTCACTATAGGGCGAATTG
dsRed-Pac rev	GTACGTTAATTAAGGCAGTGAGCGCAACGCAA
dsRed-Xhol rev	GTATTCTCGAGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
Zeo-Kpn fwd	TTCTAGGTACCTCTTAATTAACTGGC
EcoRV-Zeo rev	CGATTGATATCACTACCGGGCGTATTT
KB9LTR Ascl fwd	ATCGAGGCGCCGCAATCTTAGACATATACTTAG
KB9vpr5' rev	CTTGCTCTACAGCATGCTTCTAGAGGGC
KB9vpr3' fwd	AGAAGCATGCTGTAGAGCAAGAAAT
KB9env Xhol rev	CTTACCTCGAGCACAAAATAGAGTGGTGGTTG
KB9env Ascl fwd	GATCTAGGCGCGCCGATATCCTATTATGGGGTACCTGTG
KB9 LTR Pac rev	CTTACGTTAATTAATACTTCTAAAATGGCAGCTT
trfA fwd	ATGAATCGGACGTTTGACC
trfA rev	CTAGCGTTTGCAATGCACC
Asc-rha fwd	TAATAGGCGCGCGCGGCCGCTTAATCTTTCTGCGAATTGAG
rhaB-trfA rev	CGTCCGATTCATGTCGACAACCTCCTGAATTTCATTACGACCAGTC
rhaB-dsRed rev	GCTGCTCGCCATGTCGACAACCTCCTGAATTTCATTACGACCAGTC
trfA-rhaB fwd	AGGAGGTTGTCGACATGAATCGGACGTTTGACC
dsRed-rhaB fwd	AGGAGGTTGTCGACATGGCGAGCAGCGAAGATG
trfA-Pac rev	GCACTTAATTAAGATATCGGCGCGCCTAGGCCTTGACGGCCGACGTCAGGTGG CACGCGGCCGCTTACTAGCGTTTGCAATGCAC
dsRed-Pac rev	GCACTTAATTAAGATATCGGCGCGCCTAGGCCTTGACGGCCGACGTCAGGTGG CACGCGGCCGCTTATTACAGAAACAGGTGATG
trfA-Sal fwd	GTAACGTCGACATGAATCGGACGTTTGACCG
trfA-Nde rev	CTTCTCCCATATGAATTTCGTG

Literaturverzeichnis

1. Nishimura Y, Shingai M, Willey R, u. a. Generation of the pathogenic R5-tropic simian/human immunodeficiency virus SHIVAD8 by serial passaging in rhesus macaques. *J. Virol.* 2010;84(9):4769-4781.

2. Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, u. a. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):868-871.

3. Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, u. a. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 1983;220(4599):865-867.

4. Reeves JD, Doms RW. Human immunodeficiency virus type 2. J. Gen. Virol. 2002;83(Pt 6):1253-1265.

5. Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare Virologie. 3. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag; 2010.

6. Gordon S, Pandrea I, Dunham R, Apetrei C, Silvestri G. The Call of the Wild: What Can Be Learned from Studies of SIV Infection of Natural Hosts? *HIV Sequence Compendium*. 2005:2-29.

7. Nahmias AJ, Weiss J, Yao X, u. a. Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet.* 1986;1(8492):1279-1280.

8. Sauter D, Vogl M, Kirchhoff F. Ancient origin of a deletion in human BST2/Tetherin that confers protection against viral zoonoses. *Hum. Mutat.* 2011;32(11):1243-1245.

9. Sauter D, Specht A, Kirchhoff F. Tetherin: holding on and letting go. Cell. 2010;141(3):392-398.

10. Jin MJ, Rogers J, Phillips-Conroy JE, u. a. Infection of a yellow baboon with simian immunodeficiency virus from African green monkeys: evidence for cross-species transmission in the wild. *J. Virol.* 1994;68(12):8454-8460.

11. Gürtler LG, Zekeng L, Tsague JM, u. a. HIV-1 subtype O: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and perspectives of the evolution of HIV. *Arch. Virol. Suppl.* 1996;11:195-202.

12. Keele BF, Jones JH, Terio KA, u. a. Increased mortality and AIDS-like immunopathology in wild chimpanzees infected with SIVcpz. *Nature*. 2009;460(7254):515-519.

13. Paiardini M, Pandrea I, Apetrei C, Silvestri G. Lessons learned from the natural hosts of HIV-related viruses. *Annu. Rev. Med.* 2009;60:485-495.

14. Brenchley JM, Silvestri G, Douek DC. Nonprogressive and progressive primate immunodeficiency lentivirus infections. *Immunity*. 2010;32(6):737-742.

15. Shedlock DJ, Silvestri G, Weiner DB. Monkeying around with HIV vaccines: using rhesus macaques to define "gatekeepers" for clinical trials. *Nat. Rev. Immunol.* 2009;9(10):717-728.

16. Gordon SN, Dunham RM, Engram JC, u. a. Short-lived infected cells support virus replication in sooty mangabeys naturally infected with simian immunodeficiency virus: implications for AIDS pathogenesis. *J. Virol.* 2008;82(7):3725-3735.

17. Grossman Z, Meier-Schellersheim M, Paul WE, Picker LJ. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med.* 2006;12(3):289-295.

18. Rosenberg ES, Billingsley JM, Caliendo AM, u. a. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science*. 1997;278(5342):1447-1450.

19. Goldstein S, Ourmanov I, Brown CR, u. a. Wide range of viral load in healthy african green monkeys naturally infected with simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* 2000;74(24):11744-11753.

20. Koup RA, Safrit JT, Cao Y, u. a. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome. *J. Virol.* 1994;68(7):4650-4655.

21. Picker LJ. Immunopathogenesis of acute AIDS virus infection. Curr. Opin. Immunol. 2006;18(4):399-405.

22. Silvestri G, Sodora DL, Koup RA, u. a. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity*. 2003;18(3):441-452.

23. Estes JD, Gordon SN, Zeng M, u. a. Early resolution of acute immune activation and induction of PD-1 in SIVinfected sooty mangabeys distinguishes nonpathogenic from pathogenic infection in rhesus macaques. *J. Immunol.* 2008;180(10):6798-6807.

24. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, u. a. Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood.* 2008;112(7):2826-2835.

25. Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, u. a. CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004;200(6):749-759.

26. Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, u. a. Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.* 2004;200(6):761-770.

27. Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, u. a. Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection. *Science*. 1998;280(5362):427-431.

28. Pandrea IV, Gautam R, Ribeiro RM, u. a. Acute loss of intestinal CD4+ T cells is not predictive of simian immunodeficiency virus virulence. *J. Immunol.* 2007;179(5):3035-3046.

29. Schmitz JE, Zahn RC, Brown CR, u. a. Inhibition of adaptive immune responses leads to a fatal clinical outcome in SIV-infected pigtailed macaques but not vervet African green monkeys. *PLoS Pathog.* 2009;5(12):e1000691.

30. Li B, Stefano-Cole K, Kuhrt DM, u. a. Nonpathogenic simian immunodeficiency virus infection of sooty mangabeys is not associated with high levels of autologous neutralizing antibodies. *J. Virol.* 2010;84(12):6248-6253.

31. Fellay J, Shianna KV, Ge D, u. a. A whole-genome association study of major determinants for host control of HIV-1. *Science*. 2007;317(5840):944-947.

32. Bontrop RE, Watkins DI. MHC polymorphism: AIDS susceptibility in non-human primates. *Trends Immunol.* 2005;26(4):227-233.

33. Conley AJ, Kessler JA 2nd, Boots LJ, u. a. Neutralization of divergent human immunodeficiency virus type 1 variants and primary isolates by IAM-41-2F5, an anti-gp41 human monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91(8):3348-3352.

34. Trkola A, Purtscher M, Muster T, u. a. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 1996;70(2):1100-1108.

35. Gaufin T, Pattison M, Gautam R, u. a. Effect of B-cell depletion on viral replication and clinical outcome of simian immunodeficiency virus infection in a natural host. *J. Virol.* 2009;83(20):10347-10357.

36. Mangeat B, Turelli P, Caron G, u. a. Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts. *Nature*. 2003;424(6944):99-103.

37. Schröfelbauer B, Chen D, Landau NR. A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(11):3927-3932.

38. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, u. a. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature*. 2004;427(6977):848-853.

39. Stremlau M, Perron M, Lee M, u. a. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5alpha restriction factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(14):5514-5519.

40. Picker LJ, Hansen SG, Lifson JD. New Paradigms for HIV/AIDS Vaccine Development. *Annual Review of Medicine*. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21942424.

41. Hemelaar J, Gouws E, Ghys PD, Osmanov S. Global trends in molecular epidemiology of HIV-1 during 2000-2007. *AIDS*. 2011;25(5):679-689.

42. HIV Sequence database - CRFs. *www.hiv.lanl.gov*. Available at: http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/ HIV/CRFs/CRFs.html.

43. Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, u. a. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(21):7552-7557.

44. Rucker J, Edinger AL, Sharron M, u. a. Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirusencoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 1997;71(12):8999-9007.

45. Chen Z, Kwon D, Jin Z, u. a. Natural infection of a homozygous delta24 CCR5 red-capped mangabey with an R2b-tropic simian immunodeficiency virus. *J. Exp. Med.* 1998;188(11):2057-2065.

46. Deng H, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*. 1997;388(6639):296-300.

47. Gautam R, Gaufin T, Butler I, u. a. Simian immunodeficiency virus SIVrcm, a unique CCR2-tropic virus, selectively depletes memory CD4+ T cells in pigtailed macaques through expanded coreceptor usage in vivo. *J. Virol.* 2009;83(16):7894-7908.

48. Riddick NE, Hermann EA, Loftin LM, u. a. A novel CCR5 mutation common in sooty mangabeys reveals SIVsmm infection of CCR5-null natural hosts and efficient alternative coreceptor use in vivo. *PLoS Pathog.* 2010;6(8):e1001064.

49. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:657-700.

50. Koot M, van Leeuwen R, de Goede RE, u. a. Conversion rate towards a syncytium-inducing (SI) phenotype during different stages of human immunodeficiency virus type 1 infection and prognostic value of SI phenotype for survival after AIDS diagnosis. *J. Infect. Dis.* 1999;179(1):254-258.

51. Cardozo T, Kimura T, Philpott S, u. a. Structural basis for coreceptor selectivity by the HIV type 1 V3 loop. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2007;23(3):415-426.

52. Casper C, Navér L, Clevestig P, u. a. Coreceptor change appears after immune deficiency is established in children infected with different HIV-1 subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2002;18(5):343-352.

53. Ren W, Tasca S, Zhuang K, u. a. Different tempo and anatomic location of dual-tropic and X4 virus emergence in a model of R5 simian-human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* 2010;84(1):340-351.

54. Shakirzyanova M, Ren W, Zhuang K, Tasca S, Cheng-Mayer C. Fitness disadvantage of transitional intermediates contributes to dynamic change in the infecting-virus population during coreceptor switch in R5 simian/human immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Virol.* 2010;84(24):12862-12871.

55. Zhuang K, Finzi A, Tasca S, u. a. Adoption of an "open" envelope conformation facilitating CD4 binding and structural remodeling precedes coreceptor switch in R5 SHIV-infected macaques. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21350.

56. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(5):1925-1930.

57. Coetzer M, Nedellec R, Cilliers T, u. a. Extreme genetic divergence is required for coreceptor switching in HIV-1 subtype C. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2011;56(1):9-15.

58. Fuchs JD, Sobieszczyk ME, Hammer SM, Buchbinder SP. Lessons drawn from recent HIV vaccine efficacy trials. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2010;55 Suppl 2:S128-131.

59. Munier CML, Andersen CR, Kelleher AD. HIV vaccines: progress to date. *Drugs.* 2011;71(4):387-414.

60. Kim JH, Rerks-Ngarm S, Excler J-L, Michael NL. HIV vaccines: lessons learned and the way forward. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(5):428-434.

61. Eron JJ Jr, Ashby MA, Giordano MF, u. a. Randomised trial of MNrgp120 HIV-1 vaccine in symptomless HIV-1 infection. *Lancet.* 1996;348(9041):1547-1551.

62. Pontesilli O, Guerra EC, Ammassari A, u. a. Phase II controlled trial of post-exposure immunization with recombinant gp160 versus antiretroviral therapy in asymptomatic HIV-1-infected adults. VaxSyn Protocol Team. *AIDS*. 1998;12(5):473-480.

63. Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MB. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J. Virol.* 1994;68(9):6103-6110.

64. Harrer T, Harrer E, Kalams SA, u. a. Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1996;12(7):585-592.

65. Rowland-Jones S, Sutton J, Ariyoshi K, u. a. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat. Med.* 1995;1(1):59-64.

66. McAdam S, Klenerman P, Tussey L, u. a. Immunogenic HIV variant peptides that bind to HLA-B8 can fail to stimulate cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Immunol.* 1995;155(5):2729-2736.

67. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8(4):247-258.

68. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, u. a. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J. Infect. Dis.* 1998;178(1):92-100.

69. Amara RR, Villinger F, Altman JD, u. a. Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science*. 2001;292(5514):69-74.

70. Robinson HL, Montefiori DC, Johnson RP, u. a. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* 1999;5(5):526-534.

71. Li H, Liu J, Carville A, u. a. Durable mucosal simian immunodeficiency virus-specific effector memory T lymphocyte responses elicited by recombinant adenovirus vectors in rhesus monkeys. *J. Virol.* 2011;85(21):11007-11015.

72. Lasaro MO, Haut LH, Zhou X, u. a. Vaccine-induced T cells provide partial protection against high-dose rectal SIVmac239 challenge of rhesus macaques. *Mol. Ther.* 2011;19(2):417-426.

73. Harari A, Bart P-A, Stöhr W, u. a. An HIV-1 clade C DNA prime, NYVAC boost vaccine regimen induces reliable, polyfunctional, and long-lasting T cell responses. *J. Exp. Med.* 2008;205(1):63-77.

74. Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, u. a. Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet.* 2008;372(9653):1881-1893.

75. Gray G, Buchbinder S, Duerr A. Overview of STEP and Phambili trial results: two phase IIb test-of-concept studies investigating the efficacy of MRK adenovirus type 5 gag/pol/nef subtype B HIV vaccine. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(5):357-361.

76. Sáez-Cirión A, Lacabaratz C, Lambotte O, u. a. HIV controllers exhibit potent CD8 T cell capacity to suppress HIV infection ex vivo and peculiar cytotoxic T lymphocyte activation phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104(16):6776-6781.

77. Fischer W, Perkins S, Theiler J, u. a. Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat. Med.* 2007;13(1):100-106.

78. Barouch DH, O'Brien KL, Simmons NL, u. a. Mosaic HIV-1 vaccines expand the breadth and depth of cellular immune responses in rhesus monkeys. *Nat. Med.* 2010;16(3):319-323.

79. Haase AT. Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu. Rev. Med.* 2011;62:127-139.

80. Hansen SG, Vieville C, Whizin N, u. a. Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge. *Nat. Med.* 2009;15(3):293-299.

81. Hansen SG, Ford JC, Lewis MS, u. a. Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*. 2011;473(7348):523-527.

82. Shibata R, Igarashi T, Haigwood N, u. a. Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat. Med.* 1999;5(2):204-210.

83. Hessell AJ, Poignard P, Hunter M, u. a. Effective, low-titer antibody protection against low-dose repeated mucosal SHIV challenge in macaques. *Nat. Med.* 2009;15(8):951-954.

84. Hessell AJ, Rakasz EG, Tehrani DM, u. a. Broadly neutralizing monoclonal antibodies 2F5 and 4E10 directed against the human immunodeficiency virus type 1 gp41 membrane-proximal external region protect against mucosal challenge by simian-human immunodeficiency virus SHIVBa-L. *J. Virol.* 2010;84(3):1302-1313.

85. Palker TJ, Matthews TJ, Clark ME, u. a. A conserved region at the COOH terminus of human immunodeficiency virus gp120 envelope protein contains an immunodominant epitope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1987;84(8):2479-2483.

86. Moore PL, Ranchobe N, Lambson BE, u. a. Limited neutralizing antibody specificities drive neutralization escape in early HIV-1 subtype C infection. *PLoS Pathog.* 2009;5(9):e1000598.

87. Labrijn AF, Poignard P, Raja A, u. a. Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 2003;77(19):10557-10565.

88. Wei X, Decker JM, Wang S, u. a. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422(6929):307-312.

89. Frey G, Peng H, Rits-Volloch S, u. a. A fusion-intermediate state of HIV-1 gp41 targeted by broadly neutralizing antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(10):3739-3744.

90. Simek MD, Rida W, Priddy FH, u. a. Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J. Virol.* 2009;83(14):7337-7348.

91. Euler Z, van Gils MJ, Bunnik EM, u. a. Cross-reactive neutralizing humoral immunity does not protect from HIV type 1 disease progression. *J. Infect. Dis.* 2010;201(7):1045-1053.

92. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, u. a. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature*. 2009;458(7238):636-640.

93. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui P-Y, u. a. Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*. 2009;326(5950):285-289.

94. Corti D, Langedijk JPM, Hinz A, u. a. Analysis of memory B cell responses and isolation of novel monoclonal antibodies with neutralizing breadth from HIV-1-infected individuals. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8805.

95. Wu X, Yang Z-Y, Li Y, u. a. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010;329(5993):856-861.

96. Cardoso RMF, Zwick MB, Stanfield RL, u. a. Broadly neutralizing anti-HIV antibody 4E10 recognizes a helical conformation of a highly conserved fusion-associated motif in gp41. *Immunity*. 2005;22(2):163-173.

97. Zhou T, Georgiev I, Wu X, u. a. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01. *Science*. 2010;329(5993):811-817.

98. Kwong PD, Mascola JR, Nabel GJ. Rational design of vaccines to elicit broadly neutralizing antibodies to HIV-1. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(10):a007278.

99. McElrath MJ, Haynes BF. Induction of immunity to human immunodeficiency virus type-1 by vaccination. *Immunity*. 2010;33(4):542-554.

100. Burton DR, Weiss RA. A Boost for HIV Vaccine Design. Science. 2010;329(5993):770 -773.

101. Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, u. a. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *New England Journal of Medicine*. 2009;361:2209-2220.

102. Tudor D, Derrien M, Diomede L, u. a. HIV-1 gp41-specific monoclonal mucosal IgAs derived from highly exposed but IgG-seronegative individuals block HIV-1 epithelial transcytosis and neutralize CD4(+) cell infection: an IgA gene and functional analysis. *Mucosal Immunol.* 2009;2(5):412-426.

103. Sun Y, Asmal M, Lane S, u. a. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J. Virol.* 2011;85(14):6906-6912.

104. Gardner MB, Luciw PA. Animal models of AIDS. FASEB J. 1989;3(14):2593-2606.

105. Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, u. a. Human immunodeficiency virus infection of human-PBL-SCID mice. *Science*. 1991;251(4995):791-794.

106. Baenziger S, Tussiwand R, Schlaepfer E, u. a. Disseminated and sustained HIV infection in CD34+ cord blood cell-transplanted Rag2-/-gamma c-/- mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2006;103(43):15951-15956.

107. Bontrop RE, Otting N, Slierendregt BL, Lanchbury JS. Evolution of major histocompatibility complex polymorphisms and T-cell receptor diversity in primates. *Immunol. Rev.* 1995;143:33-62.

108. O'Neil SP, Novembre FJ, Hill AB, u. a. Progressive infection in a subset of HIV-1-positive chimpanzees. *J. Infect. Dis.* 2000;182(4):1051-1062.

109. Novembre FJ, de Rosayro J, Nidtha S, u. a. Rapid CD4(+) T-cell loss induced by human immunodeficiency virus type 1(NC) in uninfected and previously infected chimpanzees. *J. Virol.* 2001;75(3):1533-1539.

110. Hirsch VM, Lifson JD. Simian immunodeficiency virus infection of monkeys as a model system for the study of AIDS pathogenesis, treatment, and prevention. *Adv. Pharmacol.* 2000;49:437-477.

111. Gamble LJ, Matthews QL. Current progress in the development of a prophylactic vaccine for HIV-1. *Drug Des Devel Ther.* 2010;5:9-26.

112. Casimiro DR, Wang F, Schleif WA, u. a. Attenuation of simian immunodeficiency virus SIVmac239 infection by prophylactic immunization with dna and recombinant adenoviral vaccine vectors expressing Gag. *J. Virol.* 2005;79(24):15547-15555.

113. Letvin NL, Rao SS, Montefiori DC, u. a. Immune and Genetic Correlates of Vaccine Protection Against Mucosal Infection by SIV in Monkeys. *Sci Transl Med.* 2011;3(81):81ra36.

114. Watkins DI, Burton DR, Kallas EG, Moore JP, Koff WC. Nonhuman primate models and the failure of the Merck HIV-1 vaccine in humans. *Nat. Med.* 2008;14(6):617-621.

115. Shiver JW, Fu T-M, Chen L, u. a. Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective antiimmunodeficiency-virus immunity. *Nature*. 2002;415(6869):331-335.

116. Javaherian K, Langlois AJ, Schmidt S, u. a. The principal neutralization determinant of simian immunodeficiency virus differs from that of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(4):1418-1422.

117. Li JT, Halloran M, Lord CI, u. a. Persistent infection of macaques with simian-human immunodeficiency viruses. *J. Virol.* 1995;69(11):7061-7067.

118. Li J, Lord CI, Haseltine W, Letvin NL, Sodroski J. Infection of cynomolgus monkeys with a chimeric HIV-1/ SIVmac virus that expresses the HIV-1 envelope glycoproteins. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1992;5(7):639-646.

119. Bogers WM, Cheng-Mayer C, Montelaro RC. Developments in preclinical AIDS vaccine efficacy models. *AIDS*. 2000;14 Suppl 3:S141-151.

120. Shibata R, Kawamura M, Sakai H, u. a. Generation of a chimeric human and simian immunodeficiency virus infectious to monkey peripheral blood mononuclear cells. *J. Virol.* 1991;65(7):3514-3520.

121. Luciw PA, Pratt-Lowe E, Shaw KE, Levy JA, Cheng-Mayer C. Persistent infection of rhesus macaques with T-cell-line-tropic and macrophage-tropic clones of simian/human immunodeficiency viruses (SHIV). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995;92(16):7490-7494.

122. Kuwata T, Shioda T, Igarashi T, u. a. Chimeric viruses between SIVmac and various HIV-1 isolates have biological properties that are similar to those of the parental HIV-1. *AIDS*. 1996;10(12):1331-1337.

123. Reimann KA, Li JT, Veazey R, u. a. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J. Virol.* 1996;70(10):6922-6928.

124. Reimann KA, Li JT, Voss G, u. a. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high in vivo replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J. Virol.* 1996;70(5):3198-3206.

125. Ranjbar S, Jones S, Stott EJ, Almond N. The construction and evaluation of SIV/HIV chimeras that express the envelope of European HIV type 1 isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1997;13(9):797-800.

126. Matsuda K, Inaba K, Fukazawa Y, u. a. In vivo analysis of a new R5 tropic SHIV generated from the highly pathogenic SHIV-KS661, a derivative of SHIV-89.6. *Virology*. 2010;399(1):134-143.

127. Chen Z, Huang Y, Zhao X, u. a. Enhanced infectivity of an R5-tropic simian/human immunodeficiency virus carrying human immunodeficiency virus type 1 subtype C envelope after serial passages in pig-tailed macaques (Macaca nemestrina). *J. Virol.* 2000;74(14):6501-6510.

128. Ndung'u T, Lu Y, Renjifo B, u. a. Infectious simian/human immunodeficiency virus with human immunodeficiency virus type 1 subtype C from an African isolate: rhesus macaque model. *J. Virol.* 2001;75(23):11417-11425.

129. Cayabyab M, Rohne D, Pollakis G, u. a. Rapid CD4+ T-lymphocyte depletion in rhesus monkeys infected with a simian-human immunodeficiency virus expressing the envelope glycoproteins of a primary dual-tropic Ethiopian Clade C HIV type 1 isolate. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2004;20(1):27-40.

130. Wu Y, Hong K, Chenine A-L, u. a. Molecular cloning and in vitro evaluation of an infectious simian-human immunodeficiency virus containing env of a primary Chinese HIV-1 subtype C isolate. *J. Med. Primatol.* 2005;34(2):101-107.

131. Song RJ, Chenine A-L, Rasmussen RA, u. a. Molecularly cloned SHIV-1157ipd3N4: a highly replicationcompetent, mucosally transmissible R5 simian-human immunodeficiency virus encoding HIV clade C Env. *J. Virol.* 2006;80(17):8729-8738.

132. Himathongkham S, Halpin NS, Li J, u. a. Simian-human immunodeficiency virus containing a human immunodeficiency virus type 1 subtype-E envelope gene: persistent infection, CD4(+) T-cell depletion, and mucosal membrane transmission in macaques. *J. Virol.* 2000;74(17):7851-7860.

133. Himathongkham S, Douglas GC, Fang A, u. a. Species tropism of chimeric SHIV clones containing HIV-1 subtype-A and subtype-E envelope genes. *Virology*. 2002;298(2):189-199.

134. Joag SV, Li Z, Foresman L, u. a. Chimeric simian/human immunodeficiency virus that causes progressive loss of CD4+ T cells and AIDS in pig-tailed macaques. *J. Virol.* 1996;70(5):3189-3197.

135. Shibata R, Maldarelli F, Siemon C, u. a. Infection and pathogenicity of chimeric simian-human immunodeficiency viruses in macaques: determinants of high virus loads and CD4 cell killing. *J. Infect. Dis.* 1997;176(2):362-373.

136. Luciw PA, Mandell CP, Himathongkham S, u. a. Fatal immunopathogenesis by SIV/HIV-1 (SHIV) containing a variant form of the HIV-1SF33 env gene in juvenile and newborn rhesus macaques. *Virology*. 1999;263(1):112-127.

137. Karlsson GB, Halloran M, Li J, u. a. Characterization of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4+ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J. Virol.* 1997;71(6):4218-4225.

138. Karlsson GB, Halloran M, Schenten D, u. a. The envelope glycoprotein ectodomains determine the efficiency of CD4+ T lymphocyte depletion in simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Exp. Med.* 1998;188(6):1159-1171.

139. Chenine AL, Siddappa NB, Kramer VG, u. a. Relative transmissibility of an R5 clade C simian-human immunodeficiency virus across different mucosae in macaques parallels the relative risks of sexual HIV-1 transmission in humans via different routes. *J. Infect. Dis.* 2010;201(8):1155-1163.

140. Igarashi T, Endo Y, Englund G, u. a. Emergence of a highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus in a rhesus macaque treated with anti-CD8 mAb during a primary infection with a nonpathogenic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1999;96(24):14049-14054.

141. Reyes RA, Canfield DR, Esser U, u. a. Induction of simian AIDS in infant rhesus macaques infected with CCR5- or CXCR4-utilizing simian-human immunodeficiency viruses is associated with distinct lesions of the thymus. *J. Virol.* 2004;78(4):2121-2130.

142. Siddappa NB, Song R, Kramer VG, u. a. Neutralization-sensitive R5-tropic simian-human immunodeficiency virus SHIV-2873Nip, which carries env isolated from an infant with a recent HIV clade C infection. *J. Virol.* 2009;83(3):1422-1432.

143. Humbert M, Rasmussen RA, Song R, u. a. SHIV-1157i and passaged progeny viruses encoding R5 HIV-1 clade C env cause AIDS in rhesus monkeys. *Retrovirology*. 2008;5:94.

144. Ho S-hong, Tasca S, Shek L, u. a. Coreceptor switch in R5-tropic simian/human immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Virol.* 2007;81(16):8621-8633.

145. Sina ST, Ren W, Cheng-Mayer C. Coreceptor use in nonhuman primate models of HIV infection. *J Transl Med.* 2011;9 Suppl 1:S7.

146. Siddappa NB, Watkins JD, Wassermann KJ, u. a. R5 clade C SHIV strains with tier 1 or 2 neutralization sensitivity: tools to dissect env evolution and to develop AIDS vaccines in primate models. *PLoS ONE*. 2010;5(7):e11689.

147. Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Frohlich JA, u. a. Effectiveness and safety of tenofovir gel, an antiretroviral microbicide, for the prevention of HIV infection in women. *Science*. 2010;329(5996):1168-1174.

148. Hosoda F, Nishimura S, Uchida H, Ohki M. An F factor based cloning system for large DNA fragments. *Nucleic Acids Res.* 1990;18(13):3863-3869.

149. Warden C, Tang Q, Zhu H. Herpesvirus BACs: past, present, and future. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:124595.

150. Westenberg M, Bamps S, Soedling H, Hope IA, Dolphin CT. Escherichia coli MW005: lambda Red-mediated recombineering and copy-number induction of oriV-equipped constructs in a single host. *BMC Biotechnol.* 2010;10:27.

151. Roth SJ, Höper D, Beer M, u. a. Recovery of infectious virus from full-length cowpox virus (CPXV) DNA cloned as a bacterial artificial chromosome (BAC). *Vet. Res.* 2011;42(1):3.

152. Cottingham MG, Andersen RF, Spencer AJ, u. a. Recombination-mediated genetic engineering of a bacterial artificial chromosome clone of modified vaccinia virus Ankara (MVA). *PLoS ONE*. 2008;3(2):e1638.

153. Wagner M, Jonjic S, Koszinowski UH, Messerle M. Systematic excision of vector sequences from the BACcloned herpesvirus genome during virus reconstitution. *J. Virol.* 1999;73(8):7056-7060.

154. Smith GA, Enquist LW. A self-recombining bacterial artificial chromosome and its application for analysis of herpesvirus pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(9):4873-4878.

155. Wussow F, Fickenscher H, Tischer BK. Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PLoS ONE*. 2009;4(12):e8178.

156. Eipers PG, Salazar-Gonzalez JF, Morrow CD. HIV gene expression from intact proviruses positioned in bacterial artificial chromosomes at integration sites previously identified in latently infected T cells. *Virology*. 2011;410(1):151-160.

157. Brune W, Messerle M, Koszinowski UH. Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* 2000;16(6):254-259.

158. Wagner M, Ruzsics Z, Koszinowski UH. Herpesvirus genetics has come of age. *Trends Microbiol.* 2002;10(7):318-324.

159. Yang XW, Model P, Heintz N. Homologous recombination based modification in Escherichia coli and germline transmission in transgenic mice of a bacterial artificial chromosome. *Nat. Biotechnol.* 1997;15(9):859-865.

160. Borst EM, Hahn G, Koszinowski UH, Messerle M. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J. Virol.* 1999;73(10):8320-8329.

161. Yu D, Ellis HM, Lee EC, u. a. An efficient recombination system for chromosome engineering in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(11):5978-5983.

162. Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, u. a. A highly efficient Escherichia coli-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics*. 2001;73(1):56-65.

163. Court DL, Swaminathan S, Yu D, u. a. Mini-lambda: a tractable system for chromosome and BAC engineering. *Gene*. 2003;315:63-69.

164. Sopher BL, La Spada AR. Efficient recombination-based methods for bacterial artificial chromosome fusion and mutagenesis. *Gene.* 2006;371(1):136-143.

165. Muyrers JP, Zhang Y, Testa G, Stewart AF. Rapid modification of bacterial artificial chromosomes by ET-recombination. *Nucleic Acids Res.* 1999;27(6):1555-1557.

166. Court DL, Sawitzke JA, Thomason LC. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet.* 2002;36:361-388.

167. Copeland NG, Jenkins NA, Court DL. Recombineering: a powerful new tool for mouse functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2(10):769-779.

168. Poteete AR. What makes the bacteriophage lambda Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001;201(1):9-14.

169. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000;97(12):6640-6645.

170. Datta S, Costantino N, Court DL. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene.* 2006;379:109-115.

171. Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI. Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Mol. Microbiol.* 1991;5(6):1447-1457.

172. Zhang Y, Buchholz F, Muyrers JP, Stewart AF. A new logic for DNA engineering using recombination in Escherichia coli. *Nat. Genet.* 1998;20(2):123-128.

173. Heermann R, Zeppenfeld T, Jung K. Simple generation of site-directed point mutations in the Escherichia coli chromosome using Red(R)/ET(R) Recombination. *Microb. Cell Fact.* 2008;7:14.

174. DeVito JA. Recombineering with toIC as a selectable/counter-selectable marker: remodeling the rRNA operons of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(1):e4.

175. Warming S, Costantino N, Court DL, Jenkins NA, Copeland NG. Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(4):e36.

176. Wong QNY, Ng VCW, Lin MCM, u. a. Efficient and seamless DNA recombineering using a thymidylate synthase A selection system in Escherichia coli. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(6):e59.

177. Narayanan K. Intact recombineering of highly repetitive DNA requires reduced induction of recombination enzymes and improved host viability. *Anal. Biochem.* 2008;375(2):394-396.

178. Tischer BK, von Einem J, Kaufer B, Osterrieder N. Two-step red-mediated recombination for versatile highefficiency markerless DNA manipulation in Escherichia coli. *BioTechniques*. 2006;40(2):191-197. 179. Tischer BK, Smith GA, Osterrieder N. En passant mutagenesis: a two step markerless red recombination system. *Methods Mol. Biol.* 2010;634:421-430.

180. Li M, Salazar-Gonzalez JF, Derdeyn CA, u. a. Genetic and neutralization properties of subtype C human immunodeficiency virus type 1 molecular env clones from acute and early heterosexually acquired infections in Southern Africa. *J. Virol.* 2006;80(23):11776-11790.

181. Hanahan D. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 1983;166(4):557-580.

182. Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(13):6127-6145.

183. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3 Vol.* 3. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory; 2000.

184. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1977;74(12):5463-5467.

185. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, u. a. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.

186. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 1989;77(1):51-59.

187. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248-254.

188. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685.

189. Kuwata T, Igarashi T, Ido E, u. a. Construction of human immunodeficiency virus 1/simian immunodeficiency virus strain mac chimeric viruses having vpr and/or nef of different parental origins and their in vitro and in vivo replication. *J. Gen. Virol.* 1995;76 (Pt 9):2181-2191.

190. Joag SV, Li Z, Foresman L, u. a. Chimeric simian/human immunodeficiency virus that causes progressive loss of CD4+ T cells and AIDS in pig-tailed macaques. *J. Virol.* 1996;70(5):3189-3197.

191. Shinohara K, Sakai K, Ando S, u. a. A highly pathogenic simian/human immunodeficiency virus with genetic changes in cynomolgus monkey. *J. Gen. Virol.* 1999;80 (Pt 5):1231-1240.

192. Harouse JM, Gettie A, Eshetu T, u. a. Mucosal transmission and induction of simian AIDS by CCR5-specific simian/human immunodeficiency virus SHIV(SF162P3). J. Virol. 2001;75(4):1990-1995.

193. Reimann KA, Watson A, Dailey PJ, u. a. Viral burden and disease progression in rhesus monkeys infected with chimeric simian-human immunodeficiency viruses. *Virology*. 1999;256(1):15-21.

194. Reimann KA, Parker RA, Seaman MS, u. a. Pathogenicity of simian-human immunodeficiency virus SHIV-89.6P and SIVmac is attenuated in cynomolgus macaques and associated with early T-lymphocyte responses. *J. Virol.* 2005;79(14):8878-8885.

195. Etemad-Moghadam B, Sun Y, Nicholson EK, u. a. Envelope glycoprotein determinants of increased fusogenicity in a pathogenic simian-human immunodeficiency virus (SHIV-KB9) passaged in vivo. *J. Virol.* 2000;74(9):4433-4440.

196. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, u. a. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD+ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 2001;75(12):5646-5655.

197. Etemad-Moghadam B, Rhone D, Steenbeke T, u. a. Understanding the basis of CD4(+) T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *Vaccine*. 2002;20(15):1934-1937.

198. Harouse JM, Gettie A, Tan RC, Blanchard J, Cheng-Mayer C. Distinct pathogenic sequela in rhesus macaques infected with CCR5 or CXCR4 utilizing SHIVs. *Science*. 1999;284(5415):816-819.

199. Ho S-hong, Shek L, Gettie A, Blanchard J, Cheng-Mayer C. V3 loop-determined coreceptor preference dictates the dynamics of CD4+-T-cell loss in simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J. Virol.* 2005;79(19):12296-12303.

200. Hsu M, Harouse JM, Gettie A, u. a. Increased mucosal transmission but not enhanced pathogenicity of the CCR5-tropic, simian AIDS-inducing simian/human immunodeficiency virus SHIV(SF162P3) maps to envelope gp120. *J. Virol.* 2003;77(2):989-998.

201. Hsu M, Buckner C, Harouse J, u. a. Antigenic variations in the CD4 induced sites of the CCR5-tropic, pathogenic SHIVsf162p3 gp120 variants. *J. Med. Primatol.* 2003;32(4-5):211-217.

202. Hsu M, Ho S-H, Balfe P, u. a. A CCR5-tropic simian-HIV molecular clone capable of inducing AIDS in rhesus macaques. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2005;40(4):383-387.

203. Siddappa NB, Hemashettar G, Wong YL, u. a. Development of a tier 1 R5 clade C simian-human immunodeficiency virus as a tool to test neutralizing antibody-based immunoprophylaxis. *J. Med. Primatol.* 2010. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21044092.

204. Levy DN, Aldrovandi GM, Kutsch O, Shaw GM. Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101(12):4204-4209.

205. Wild J, Hradecna Z, Szybalski W. Conditionally amplifiable BACs: switching from single-copy to high-copy vectors and genomic clones. *Genome Res.* 2002;12(9):1434-1444.

206. Noll S, Hampp G, Bausbacher H, Pellegata N, Kranz H. Site-directed mutagenesis of multi-copy-number plasmids: Red/ET recombination and unique restriction site elimination. *BioTechniques*. 2009;46(7):527-533.

207. Englberger J. Red recombineering as novel tool for the generation of chimeric simian/human immunodeficiency viruses (SHIVs) with distinct coreceptor usage. 2011.

208. Trinh T, Jesse J, Bloom FR, Hirsch V. STBL2: an Escherichia coli strain for the stable propagation of retroviral clones and direct repeat sequences. *Focus*. 1994;(16):78-80.

209. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature*. 1989;338(6212):254-257.

210. Dewhurst S, Embretson JE, Anderson DC, Mullins JI, Fultz PN. Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVSMM-PBj14. *Nature*. 1990;345(6276):636-640.

211. Tuntufye HN, Goddeeris BM. Use of lambda Red-mediated recombineering and Cre/lox for generation of markerless chromosomal deletions in avian pathogenic Escherichia coli. *FEMS Microbiology Letters*. 2011. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22029745.

212. Kasem S, Yu MHH, Yamada S, u. a. The ORF37 (UL24) is a neuropathogenicity determinant of equine herpesvirus 1 (EHV-1) in the mouse encephalitis model. *Virology*. 2010;400(2):259-270.

213. Westenberg M, Soedling HM, Mann DA, Nicholson LJ, Dolphin CT. Counter-selection recombineering of the baculovirus genome: a strategy for seamless modification of repeat-containing BACs. *Nucleic Acids Res.* 2010. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621982.

214. Tobiume M, Lineberger JE, Lundquist CA, Miller MD, Aiken C. Nef Does Not Affect the Efficiency of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Fusion with Target Cells. *Journal of Virology*. 2003;77(19):10645 -10650.

215. Laguette N, Benichou S, Basmaciogullari S. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Incorporation into Virions Does Not Increase Infectivity. *Journal of Virology*. 2009;83(2):1093 -1104.

216. Kuwata T, Dehghani H, Brown CR, u. a. Infectious molecular clones from a simian immunodeficiency virusinfected rapid-progressor (RP) macaque: evidence of differential selection of RP-specific envelope mutations in vitro and in vivo. *J. Virol.* 2006;80(3):1463-1475.

217. Jensen MA, Li F-S, van 't Wout AB, u. a. Improved Coreceptor Usage Prediction and Genotypic Monitoring of R5-to-X4 Transition by Motif Analysis of Human Immunodeficiency Virus Type 1 env V3 Loop Sequences. *Journal of Virology*. 2003;77(24):13376 -13388.

218. Lengauer T, Sander O, Sierra S, Thielen A, Kaiser R. Bioinformatics prediction of HIV coreceptor usage. *Nat. Biotechnol.* 2007;25(12):1407-1410.

219. Pastore C, Nedellec R, Ramos A, u. a. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *J. Virol.* 2006;80(2):750-758.

220. Hout DR, Mulcahy ER, Pacyniak E, u. a. Vpu: a multifunctional protein that enhances the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. *Curr. HIV Res.* 2004;2(3):255-270.

221. Hill MS, Ruiz A, Pacyniak E, u. a. Modulation of the severe CD4+ T-cell loss caused by a pathogenic simianhuman immunodeficiency virus by replacement of the subtype B vpu with the vpu from a subtype C HIV-1 clinical isolate. *Virology*. 2008;371(1):86-97.

222. Ball SC, Abraha A, Collins KR, u. a. Comparing the ex vivo fitness of CCR5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolates of subtypes B and C. *J. Virol.* 2003;77(2):1021-1038.

223. Mythili E, Kumar KA, Muniyappa K. Characterization of the DNA-binding domain of beta protein, a component of phage lambda red-pathway, by UV catalyzed cross-linking. *Gene*. 1996;182(1-2):81-87.

224. Balfe P, Shapiro S, Hsu M, u. a. Expansion of quasispecies diversity but no evidence for adaptive evolution of SHIV during rapid serial transfers among seronegative macaques. *Virology*. 2004;318(1):267-279.

Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Wagner dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat meine Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Des Weiteren möchte ich mich für seine fachlich kompetente Betreuung und die anregenden Gespräche bedanken.

Ein herzlicher Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. Thomas Dobner für die bereitwillige Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf und Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner gilt mein Dank für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg.

Ebenso herzlich danke ich Dr. Matthias Arnold für seine anfängliche Unterstützung, die der Arbeit den ersten Schub gegeben haben. Vielen Dank auch an Johanna Englberger, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit fleißig rekombiniert hat. Bei Dr. Kathrin Kindsmüller möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für die kompetente Betreuung und Unterstützung sowie ihre stete Diskussionsbereitschaft und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken. Ebenso Danke für das Korrekturlesen an Dr. Benedikt Asbach und Dr. Frank Notka.

Ein ganz besonderer Dank geht an die ehemaligen und derzeitigen Kollegen aus dem 80er Labor. Das sind: Denijal, Helga, Kathi, Kathrin und Philipp. Es war eine intensive und schöne Zeit, die wir gemeinsam verbracht haben. Danke für all eure wissenschaftlichen Ratschläge, aufmunternden Worte, lustigen kulinarischen Abende (Zimthuhn) und eure Freundschaft.

Ich danke auch allen übrigen Kollegen der AG Wagner für ihre Hilfsbereitschaft sowie die überaus angenehme und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine Freunde und meine Familie, die alle meine Höhen und Tiefen während des Entstehens dieser Arbeit mitmachen mussten. Insbesondere danke ich meinem Ehemann Frank für sein Verständnis, seine Geduld und seine sowohl fachliche als auch seelisch-moralische Untersützung dieser Arbeit.