

AUS DER ABTEILUNG
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Expressions- und Immunogenitätsstudien einer neuen
Generation sequenzmodifizierter HIV-1 Subtyp B *gagpolnef*
DNA Vakzinekandidaten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lydia Röttger

2012

AUS DER ABTEILUNG
FÜR MEDIZINISCHE MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Expressions- und Immunogenitätsstudien einer neuen
Generation sequenzmodifizierter HIV-1 Subtyp B *gagpolnef*
DNA Vakzinekandidaten

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lydia Röttger

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ralf Wagner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Bernd Salzberger
Tag der mündlichen Prüfung:	21. Juni 2013

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt

.....

Lydia Röttger

„Das Geheimnis des Vorankommens besteht darin, daß man anfängt. Das Geheimnis des Anfangens liegt darin, daß man seine komplexen und überwältigenden Aufgaben in kleine, durchzuführende Handgriffe zerlegt und dann mit dem ersten beginnt.“

Mark Twain

MEINER FAMILIE

Inhaltsverzeichnis

Erklärung

Zusammenfassung

1. Einleitung	1
1.1. Epidemiologie	1
1.2. Virologie und Pathogenese	1
1.2.1. Virusaufbau.....	1
1.2.2. Replikationszyklus und Morphogenese.....	5
1.2.3. Infektionsverlauf.....	6
1.2.4. Pathogenitätsfaktoren.....	9
1.3. HIV-Vakzine	10
1.3.1. Herausforderungen der HIV-Impfstoffentwicklung.....	10
1.3.2. Anforderungen und allgemeine Ansätze einer HIV-Vakzine.....	11
1.3.3. HIV-Vakzinestrategien: Konzepte für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes.....	13
1.3.4. DNA-Vakzine.....	16
1.4. Zielsetzung	18
1.4.1. Vorausgehende Arbeiten.....	18
1.4.2. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	19
2. Materialien und Methoden	20
2.1. Bakterien	20
2.1.1. Bakterienstämme.....	20
2.1.2. Nährmedien.....	20
2.1.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	21
2.1.4. Transformation von kompetenten E. coli.....	21
2.2. DNA	21
2.2.1. DNA-Plasmidpräparation und -Aufreinigung aus Bakterien.....	21
2.2.1.1. Plasmidvektoren.....	21
2.2.1.1.1. pcR-Script™ SK(+)-Plasmid (Amp ^r).....	21
2.2.1.1.2. pcDNA3.1- Expressionsplasmid.....	22

2.2.1.2.	Plasmidisolierung.....	22
2.2.1.2.1.	<i>Rapid lysis</i>	22
2.2.1.2.2.	<i>Nucleobond</i> -Säulen AX100/ AX500.....	22
2.2.1.2.3.	Herstellung endotoxinfreier DNA.....	23
2.2.1.2.4.	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	23
2.2.2.	DNA-Klonierungsverfahren und -synthese.....	23
2.2.2.1.	PCR.....	23
2.2.2.1.1.	Oligonukleotide.....	24
2.2.2.1.2.	Standard-PCR.....	24
2.2.2.1.3.	QuickChange-Mutagenese.....	25
2.2.2.1.4.	Fusions-PCR.....	25
2.2.2.1.5.	Colony-screening.....	26
2.2.2.2.	Enzymatische Spaltung.....	26
2.2.2.2.1.	Restriktionsenzyme.....	26
2.2.2.2.2.	DNA-Molekulargewichtsstandards.....	26
2.2.2.2.3.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	26
2.2.2.3.	DNA-Sequenzierung.....	27
2.2.3.	DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gel.....	27
2.2.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.2.3.2.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	27
2.2.4.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
2.3.	Zellkultur	28
2.3.1.	Eukaryotische Zelllinien und Nährmedien.....	28
2.3.2.	Zellkulturtechniken.....	29
2.3.2.1.	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	29
2.3.2.2.	Lagerung eukaryotischer Zelllinien.....	29
2.3.2.3.	CaPO ₄ -Transfektion von adhärenenten H1299 und 293T-Zellen.....	29
2.3.2.4.	Ernte und Aufschluß der Zellen.....	30
2.3.3.	Proteinanalyse.....	30
2.3.3.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford-Biorad... 30	30
2.3.3.2.	Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	31
2.3.3.3.	Western-Blot-Analyse.....	32

2.3.3.3.1.	Fixierung der Proteine auf Nitrozellulosemembran..	32
2.3.3.3.2.	Panceaurotfarbung.....	33
2.3.3.4.	Antikörpervermittelte Proteindetektion.....	33
2.4.	Immunologische Studien.....	34
2.4.1.	Versuchstiere.....	34
2.4.2.	intramuskuläre Immunisierung von BALB/c-Mäusen.....	34
2.4.3.	Auslese der humoralen Immunantwort.....	34
2.4.3.1.	Serumgewinnung.....	34
2.4.3.2.	Bestimmung der Antikörper-Titer: Gag-spezifischer AK-Elisa.....	35
2.4.4.	Auslese der zellulären Immunantwort.....	36
2.4.4.1.	Präparation und Isolierung von Milzzellen.....	36
2.4.4.2.	Peptide zur Restimulation.....	37
2.4.4.3.	ELISPOT-Assay: Quantifizierung IFN γ -sezernierender Zellen.....	37
2.4.4.4.	FACS-Analyse: Quantifizierung der intrazellulären INF γ -Produktion stimulierter CD8 ⁺ -Lymphozyten.....	38
3.	Ergebnisse.....	40
3.1.	Klonierung.....	40
3.1.1.	Ausgangskonstrukte.....	40
3.1.1.1.	GPN PR-.....	40
3.1.1.2.	Gag.....	41
3.1.1.3.	GP PR+.....	41
3.1.2.	Klonierung der Konstruktvarianten.....	41
3.1.2.1.	GagPolNef V3-Konstruktreihe.....	41
3.1.2.1.1.	<i>frameshift</i> -Konstrukte.....	42
	GPN FS PR- und GPN FS PR- V3	
	GPN FS PR+ und IIIB GPN FS PR+ V3	
3.1.2.1.2.	Protease-Konstrukte.....	43
	GPN PR- und GPN PR- V3	
	GPN PR+/- und GPN PR+/- V3	
	GPN PR+ und GPN PR+ V3	
3.1.2.1.3.	Nef-Konstrukte.....	44

	GP Δ nef PR- und GP Δ nef PR- V3	
	GP Δ nef PR+ V3	
3.1.2.1.4.	GagPol-Konstrukte.....	45
	GP und GP V3	
3.1.2.1.5.	Kurzzusammenfassung.....	45
3.1.2.2.	PolNef V3-Konstruktreihe.....	46
3.1.2.2.1.	PN FS PR-.....	47
3.1.2.2.2.	PN PR- V3 und PN PR+/- V3.....	47
3.1.2.2.3.	Pol Δ nef PR- V3.....	47
3.1.2.2.4.	Kurzzusammenfassung.....	48
3.1.2.3.	Zusammenfassung.....	48
3.2.	Analyse der Proteinexpression in H1299.....	49
3.2.1.	Detektion der Proteinexpression.....	49
3.2.1.1.	Funktionsnachweis der GagPolNef V3-Konstruktreihe.....	50
3.2.1.1.1.	GPN FS PR- und GPN FS PR- V3.....	50
3.2.1.1.2.	Übrige GagPolNef V3-Konstruktvarianten.....	50
3.2.1.1.3.	Einfluß des <i>frameshifts</i> auf die Proteinexpression..	52
3.2.1.1.4.	Einfluß der Protease auf die Proteinexpression.....	54
3.2.1.1.5.	Einfluß von Nef auf die Proteinexpression.....	55
3.2.1.2.	Detektion der Proteinexpression der PolNef V3-Konstruktreihe	
3.2.1.2.1.	Einfluß der Protease auf die Proteinexpression.....	56
3.2.1.2.2.	Einfluß von Nef auf die Proteinexpression.....	57
3.2.1.2.3.	Einfluß von Gag auf die Proteinexpression.....	57
3.2.1.3.	Kurzzusammenfassung.....	57
3.3.	Immunologische Studien.....	58
3.3.1.	Immunisierungsplan der BALB/c Mäuse.....	59
3.3.2.	Bestimmung der humoralen Immunantwort: Antikörperantwort im Elisa.....	59
3.3.3.	Bestimmung der zellulären Immunantwort.....	62
3.3.3.1.	Elispot-Analyse.....	62
3.3.3.2.	FACS-Analyse.....	65
3.3.4.	Kurzzusammenfassung.....	68
3.4.	Zusammenfassung.....	69

4. Diskussion	71
4.1. Bisherige Studien und Ergebnisse	71
4.2. Expressionsstudien	73
4.2.1. Einflüsse der GagPolNef-Konstruktreihe <i>in vitro</i>	73
4.2.1.1. Bedeutung der viralen Protease <i>in vitro</i>	73
4.2.1.1.1. Funktionsweise.....	73
4.2.1.1.2. Aktive Protease und zytotoxische Effekte.....	73
4.2.1.1.3. Aktive Protease und Vorläuferproteine.....	74
4.2.1.1.4. Aktive Protease und der natürliche <i>frameshift</i>	74
4.2.1.1.5. Attenuierte Protease.....	75
4.2.1.1.6. Inaktive Protease.....	75
4.2.1.2. Bedeutung des natürlichen <i>frameshift in vitro</i>	76
4.2.1.2.1. Funktionsweise.....	76
4.2.1.2.2. <i>frameshift</i> vs. Durchlese: GagPol-Vorläuferproteine.	76
4.2.1.2.3. <i>frameshift</i> vs. Durchlese: Gag-Expression.....	77
4.2.1.2.4. <i>frameshift</i> : aktive vs. inaktive Protease.....	78
4.2.1.2.5. Durchlese: aktive vs. inaktive Protease.....	78
4.2.1.3. Bedeutung von Nef <i>in vitro</i>	78
4.2.2. Einflüsse der PolNef-Konstruktreihe <i>in vitro</i>	80
4.2.2.1. PN und die Proteaseaktivität.....	80
4.2.2.2. Pol Δ nef.....	80
4.2.3. GagPolNef- vs. PolNef-Panel (V3-Detektion).....	81
4.3. Immunogenitätsstudien am BALB/c Mausmodell	81
4.3.1. Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten.....	82
4.3.1.1. Einfluß der viralen PR auf die Immunogenität.....	83
4.3.1.2. Einfluß des <i>frameshifts</i> auf die Immunogenität.....	84
4.3.1.3. Einfluß von Nef auf die Immunogenität.....	85
4.3.1.4. Einfluß von PolNef auf die Immunogenität.....	86
4.4. Aktuelle Arbeiten der Arbeitsgruppe	88
4.5. Ausblick	89
5. Literaturverzeichnis	92
6. Lebenslauf	100

7. Danksagung	102
8. Anhang	103
8.1. Oligonukleotide	
8.2. Peptide	
8.3. Vektoren	
8.4. Nukleotidsequenzen	
8.5. Abkürzungsverzeichnis	

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte HIV-1 Vakzinekandidaten hinsichtlich ihrer Expression und Immunogenität untersucht. Der RNA- und kodonoptimierte Leserahmen der Impfstoffvarianten basierte auf dem HIV-Subtyp B und kodierte für synthetische GagPolNef- bzw. PolNef-Polyproteine, die sich bezüglich des Vorhandenseins des natürlichen HI-viralen ribosomalen Leserastersprunges, von Nef sowie der Aktivität der viralen Protease unterschieden. Aus Sicherheitsgründen wurde die Integrase deletiert und die Reverse Transkriptase inaktiviert, darüber hinaus wurde das Myristylierungssignal in Gag entfernt. Neu wurde an die 3'-terminalen Enden der Varianten die Gensequenz von *env-V3*, die ein gut charakterisiertes H-2^d-restringiertes T-Zell-Epitop kodiert, als Reporter angefügt, um im Rahmen von *in vivo*-Studien zusätzlich zu Gag-spezifischen T-Zellen auch Aussagen zu potentiellen PolNef-spezifischen T-Zell-Antworten zu ermöglichen.

Die getesteten GagPolNef-Impfstoffkandidaten waren in der Lage, sowohl humorale als auch CD8⁺ T-Zell-Immunantworten gegen Gag bzw. den *env-V3*-Reporter (V3) zu induzieren. Die Synthese des 160 kD GagPolNef-Durchleseproteins im Ausgangskonstrukt resultierte in detektierbaren, aber niedrigen Gag (A9I)- und V3-spezifischen T-Zell-Antworten. Diese T-Zell-Antworten sowie die Expression der Vakzinekandidaten konnten weder durch Deletion des *nef*-Gens noch durch Aktivierung der viralen Protease verbessert werden, wohingegen das Wiedereinfügen des natürlichen HI-viralen ribosomalen Leserastersprunges die Expressionsraten von Gag steigern und stärkere Gag- und V3-spezifische T-Zell-Antworten induzieren konnte. Demgegenüber induzierten Konstrukte, die die funktionsfähige virale Protease enthielten, schwächere Epitop-spezifische Immunantworten. Die effizienteste Immunantwort gegen Gag und V3 wurde durch das GagPolNef-Polygen-Konstrukt erreicht, das neben einem funktionellen Leserastersprunges eine inaktive Protease und kein Nef enthielt.

Des Weiteren wurden unterschiedliche PolNef-Varianten entworfen, um das Vektorinsert zu verkleinern und so die Aufnahme der Plasmide und nachgelagert die Expression der Impfstoffkandidaten zu verbessern. Auch hier wurde entsprechend die V3-Gensequenz 3'-terminal an den Leserahmen angefügt, mit Hilfe derer die Auslese stattfand. Korrelierend zu den obigen Ergebnissen wirkte sich auch bei den PolNef-Varianten die Inaktivierung der Protease positiv auf die Immunogenität der

Vakzineandidaten aus. Die Deletion der *nef*-Sequenz führte zudem zu gesteigerten zellulären Immunantworten. Darüber hinaus konnte bei den Varianten ohne *gag*- und *nef*-Gensequenz ein Anstieg der Pol-spezifischen T-Zell-Antworten verzeichnet werden.

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie

Nach der Erstbeschreibung von AIDS-Fällen im Jahr 1981 (Gottlieb *et al.*, 1981; Frøland *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1998) gelang es Montagnier (LAV), Levy (ARV) und Gallo (HTLV-III), ein Virus zu isolieren, welches 1986 erstmalig als „*human immunodeficiency virus*“ (HIV) bezeichnet wurde. Als die Entdeckung einer weiteren Antigen-Variante (HIV-2) folgte (Gao *et al.*, 1999; Keele *et al.*, 2006), wurde die Ursprüngliche als HIV-1 bezeichnet. HIV-1 wird unterteilt in drei Hauptgruppen: M (major), O (outlier) und N (nonM, nonO) (Simon *et al.*, 1998), wobei die Gruppe M für den Großteil an HIV-1 Infektionen verantwortlich ist und sich wiederum in derzeit 9 Klassen (*clades* A-K) aufschlüsselt (Jannsens *et al.*, 1999). HIV-1 ist nicht nur wesentlich pathogener als HIV-2 (Greene *et al.*, 1993; Girard *et al.*, 2006), sondern auch am weitesten und häufigsten verbreitet. Während in den westlichen Industrienationen, Lateinamerika und der Karibik HIV-1B dominiert, sind HIV-1C in den Entwicklungsländern (Süd-, Ostafrika, Indien) und die Subtypen B, C und E vorwiegend in Asien verbreitet (Gürtler *et al.*, 2000; Preiser *et al.*, 2005; Letvin *et al.*, 2005). Erweitert werden die Klassen durch sogenannte „HIV-Chimären“ (*circulating recombinant forms* (CRF) oder „Mosaikviren“), durch die das Virus in der Lage ist, neue Antigenvarianten zu entwickeln (Fang *et al.*, 2003; McCutchan *et al.*, 2000; Peeters *et al.*, 2000; Girard *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006).

1.2. Virologie und Pathogenese

1.2.1. Virusaufbau

Das HI-Virus wird der Familie der Retroviren und dem Stamm der Lentiviren zugeordnet, ist kugelförmig und misst etwa 100 nm im Durchmesser (Parkin *et al.*, 1995). Sein etwa 9600-9700 bp langes Genom, bestehend aus zwei RNA-Einzelsträngen, enthält in seinen neun offenen Leserahmen neben den drei Strukturgenen *gag* (gruppenspezifisches Antigen), *pol* (für Enzymfunktionen) und *env* (für Hüll- bzw. Membranproteine) sechs weitere Gene, die für akzessorische (Vif, Vpu, Vpr, Nef) und regulatorische (Tat, Rev) Proteine kodieren und wird von zwei LTR´ (*long terminal repeat*)-Sequenzen flankiert.

1. Einleitung

Neben den P7 (NC)-Nukleokapsidprotein stabilisierten RNA-Strängen finden sich im Viruskapsid die *pol*-kodierte Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p51) mit der RNAseH (p15) und Integrase (IN, p32). Die virale Protease (p11) liegt in inaktivem Zustand vor. Darüberhinaus können im *core* Nef-Proteinmoleküle nachgewiesen werden (Gürtler *et al.*, 2000; Greene *et al.*, 1993; Modrow *et al.*, 2002).

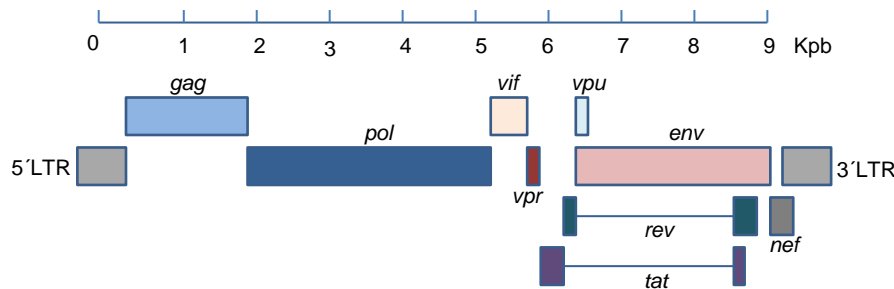


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des HIV-Genoms

Gag kodiert als gruppenspezifisches Antigen über den Polyproteinvorläufer p55 für die Proteine p7 (NC), p17 (MA) und p24 (CA), sowie für p6 (LI) und die zwei Platzhalter-Peptide p2 und p1 (5'-MA-CA-p2-NC-p1-p6-3') (Freed *et al.*, 2001; Scarlata *et al.*, 2003). Es wird direkt aus der viralen RNA translatiert und ist in der Lage, unreife Viruspartikel zu bilden. Sein p24 CA-Protein ist wie das p17-Matrixprotein ein gruppenspezifisches Antigen, das von *gag* kodiert und durch die *pol*-verschlüsselte Protease gespalten wird. Das konische, aus etwa 2000 Proteinmolekülen bestehende Viruskapsid (CA) umschließt als innere Kernhülle den Viruskern und enthält hochkonservierte MHC-Regionen. Die äußere Kernhülle kleiden *gag*-kodierte p17-Matrixproteinmoleküle aus, die in ikosaedrischer Struktur über N-terminal myristylierte Enden kovalent an die Innenseite der äußersten Membran gebunden sind. Das späte akzessorische Protein Vpr bindet im Komplex mit dem Linker-Protein p6 an die äußere Kernhülle und verbindet so das Kapsid mit der Membran (Gürtler *et al.*, 2000; Peterlin *et al.*, 1988). MA ist in eine Hüllmembran eingebettet, in die etwa 72 gp41 Glykoproteine als Transmembranprotein (TP) mit externen gp120 Glykoproteine verankert sind (Chaplin *et al.*, 1999). (Scarlata *et al.*, 2003; Greene *et al.*, 1993; Modrow *et al.*, 2002).

Der sich an *gag* anschließende **pol**-Leserahmen enthält die Information für alle enzymatischen Proteine des Virus, die initial als Teil eines langen Polyproteinvorläufers Pr160 (GagPol) synthetisiert werden. Dieses GagPol-

1. Einleitung

Vorläuferprotein entsteht wie in anderen Retroviren als Resultat eines -1 Leserastersprung (*frameshift*)-Ereignisses in 5-10% der Translationsereignisse. Verglichen dazu wird Gag zu 90-95% translatiert, wodurch eine Überproduktion der viralen Enzyme im Vergleich zu den Strukturproteinen verhindert werden soll (Paulus *et al.*, 1999; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Scarlata *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu anderen Retroviren liegt die in *pol*-kodierte virale Protease PR lediglich als Dimer in aktiver Form vor. Sie katalysiert über zwei Aspartatreste im aktiven Zentrum während der Reifung des Virions die hydrolytische Spaltung der viralen Proteine und Enzyme, die als Gag- und GagPol-Vorläuferproteine (Pr160) vorliegen und für die sie eine natürliche Präferenz aufweist (Hope *et al.*, 2000; Freed *et al.*, 2001; Gilles, 2005; Pettit *et al.*, 2003). Eine vorzeitige Dimerisierung der PR wird durch die physikalische Trennung verhindert. Kommt es unkontrolliert durch Überproduktion und Aggregation zu einer Aktivierung der PR im Zytoplasma, so können zelluläre Proteine (Aktin, Calmodulin) degradiert und Gag- und GagPol-Domänen vorzeitig von essentiellen Transportsignalen abgespalten werden, wodurch die Aggregation und Freisetzung des Viruspartikels verhindert wird. Die Aktivität der PR wird von mehreren Faktoren reguliert: das GagPol *transframe*-Protein p6* verhindert eine vorzeitige Prozessierung der Vorläuferproteine und minimiert die unspezifische Degradation viraler Proteine (Paulus *et al.*, 1999); Prolin übt an erster Stelle der AS-Position der PR Einfluß auf deren Aktivität aus, da ein Austausch mit Alanin zur vermehrten Spaltung zusätzlicher Prozessierungsstellen der Gag- und GagPol-Vorläufer führt (Pettit *et al.*, 2005). Auch der natürliche ribosomale *frameshift* beeinflusst die Aktivität der Protease, da durch den Wegfall des Leserastersprunges das GagPolNef-Vorläuferprotein zu 100% translatiert und somit die Protease entgegen der 5%igen Translationsrate der *frameshift*-Konstrukte überproduziert wird. Die Integrase (IN) ist für die Integration des Virusgenom in das Genom der Wirtszelle zuständig, kann jedoch auch desintegrieren und Fragmente aus dem Genom herauspalten. Nur zusammen mit der RNase ist die Reverse Transkriptase (RT) aktiv und schreibt RNA in DNA um (Gürtler *et al.*, 2000).

Env enthält die Erbinformation für die Hüllproteine gp41 und gp120, die als gemeinsames Vorläuferprotein gp160 generiert werden (Chaplin *et al.*, 1999; Hope *et al.*, 2000). Die konservierten Regionen (C) des gp120 sind unter den hypervariablen Schleifenstrukturen (V1-V5) und Zuckerresten verborgen (Freed *et al.*, 2001; Letvin *et al.*, 2005). Eine dieser variablen Domänen ist die für die Immunerkennung des HIV

bedeutende V3-Region mit seiner immundominanten Schleife (*V3-loop*), welche nicht an der CD4-Bindung beteiligt ist und gegen die eine Mehrzahl neutralisierender Antikörper gerichtet sind. Zudem interagieren Sequenzen innerhalb der V3-Schleife mit den HIV-Korezeptoren CXCR4 und CCR5 (Hope *et al.*, 2000).

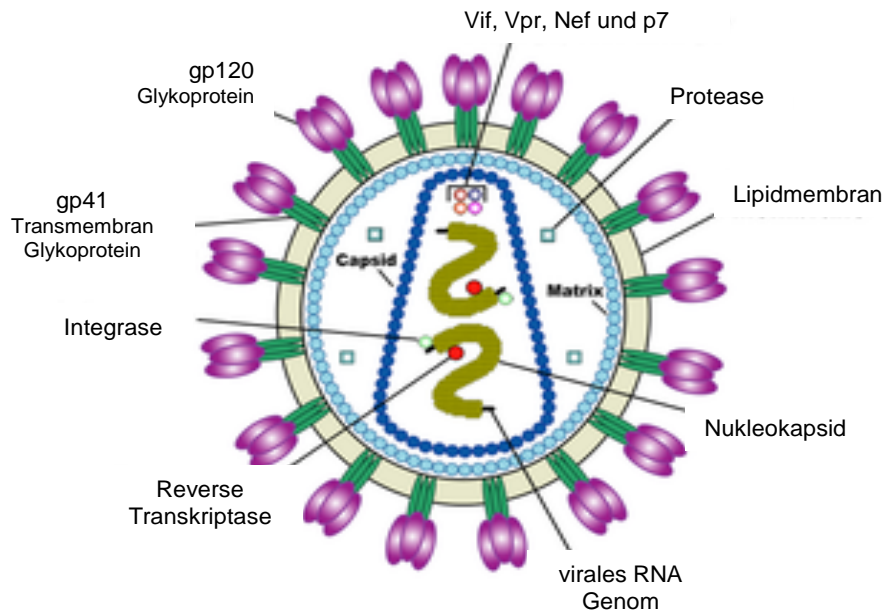


Abb. 1.2: Aufbau des HI-Virus (modifiziert nach NIAID)

Das HIV-1 Genom kodiert darüberhinaus für eine Reihe akzessorischer und regulatorischer Proteine. Der Transaktivator *Tat* steigert die Effizienz der reversen Transkription, während LTR und *Rev* den Export der viralen mRNA aus dem Nukleus erlauben. Die akzessorischen Proteine *Vpu*, *Vif*, *Vpr* und *Nef* sind für die Virusreplikation von Bedeutung. Das *nef*-Gen ist unter allen Lentiviren hochkonserviert und gilt als bedeutender Virulenzfaktor. Es wird während der Frühphase der viralen Infektion zusammen mit *Tat* und *Rev* in großen Mengen gebildet und ist an der Plasmamembran, im Zytosol, im Nukleus und innerhalb des Virions lokalisiert. *Nef* interagiert mit zahlreichen zellulären Kinasen und Signalmolekülen und führt darüberhinaus in der Zielzelle neben einer Herabregulation der Oberflächenmarker CD4, CD28, MHC I und MHC II zu einer verringerten Präsentation viraler Peptide gegenüber Helfer- und zytotoxischen T-Zellen (Ranjan *et al.*, 2005; Fackler *et al.*, 2001; Greenway *et al.*, 2003).

1.2.2. Replikationszyklus und Morphogenese

Zielzellen des HI-Virus und Ort der Replikation sind CD4⁺ T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten des körpereigenen Immunsystems (Gandhi *et al.*, 1999). Neben der Bindung des HIV-Partikels an den zellulären CD4-Rezeptor über eine CD4-Bindungsregion im konservierten Bereich (C3 und C4) des gp120 erfolgt eine weitere Bindung zwischen variablen (V1-, V2-, V3-loops) sowie konstanten (C) Regionen des viralen Hüllproteins mit dem α -Chemokin-Rezeptor CCR-5 (Makrophagen, primäre Lymphozyten) oder β -Chemokin-Rezeptor CXCR4 (T-Helferzelle, primäre Lymphozyten). Erkenntnisse aus HIV-Langzeitüberlebenden zeigen, dass durch Mutationen der Chemokinrezeptoren (CCR-5 delta 32-Mutation) eine hohe Resistenz gegenüber einer HIV-Infektion entwickelt werden kann (Freed *et al.*, 2001). So erschließen sich mit zunehmender Kenntnis über Korezeptoren und Fusionsprozeß des HIV neue Ansatzpunkte für die Entwicklung antiviraler Medikamente (Gandhi *et al.*, 1999).

Die sich nach der Bindung anschließende Membranverschmelzung zwischen Virushülle und Wirtszellmembran wird durch Konformationsänderung der Ektodomäne des gp41 (Fusionspeptid) getriggert, woraufhin die Freisetzung des Viruskapsides in das Zellinnere stattfindet und die virale ssRNA freigelegt wird. Die virale Reverse Transkriptase (RT) generiert, ausgehend von dem an die Primerbindungsregion gebundenem t-RNA Molekül, ein RNA-DNA Hybrid. Nach Abbau des RNA-Anteiles durch die RNaseH liegt ein DNA-Einzelstrang vor, über den die zellinterne DNA-Polymerase die Plusstrangsynthese vollziehen kann. Die Doppelstrang-DNA gelangt nun in Form eines Präintegrationskomplexes (HIV-DNA, Integrase, p17 (MA), Vpr und RT) via zelleigenem Mikrotubuli-Apparat durch die Kernporen zum Zellkern, wo die p32-Integrase durch Prozessierung der 3'-Enden die Insertion der viralen dsDNA in das Wirtszellgenom katalysiert. Das eingebaute Provirus dient als Template für die Synthese viraler mRNAs durch die zelluläre RNA-Polymerase II (Freed *et al.* 2001; Greene *et al.*, 2002).

Die Transkription wird im Bereich U3/ R des HIV-1 LTR aktiviert (Modrow *et al.*, 2002; Freed *et al.*, 2001). In dieser Frühphase entstehen im Zellkern drei Größenklassen viraler mRNA: mehrfach gespleißte, etwa 1,7-2,0 kb kurze mRNA-Moleküle, die für die Regulationsproteine kodieren (Mehrzahl), einfach gespleißte, etwa 4,0 kb lange mRNA für Env, Vif, Vpu und Vpr sowie ungespleißte mRNA-Moleküle, die den RNA-Genomen entsprechen und aus denen Gag und GagPol translatiert werden (Greene

et al., 2002; Modrow *et al.*, 2002). Mit Aktivierung des Rev (*regulator of expression of viral proteins*) wird die späte Infektionsphase eingeleitet, in der längere Transkripte für Strukturproteine und Enzyme (Env, Gag, GagPol) entstehen. In den Zellkern transportiert, bindet Rev an die RRE-Elemente der einfach- und nichtgespleißten RNAs, wodurch diese in das Zytoplasma exportiert und dort translatiert oder als RNA-Genom verpackt werden. Die Proteinsynthese des gp160-Vorläufers findet an der Membran des endoplasmatischen Retikulums statt, in dessen Lumen die Proteinkette mit Asparaginresten glykosyliert wird. Auf dem Weg zur Zelloberfläche durchläuft das Protein den Golgi-Apparat und wird dort in gp120 und gp41 gespalten. Alle übrigen Virusproteine werden im Zytoplasma an den freien Ribosomen translatiert. Nach ihrer Synthese und Myristylierung der aminoterminalen Enden werden schließlich auch Gag und GagPol mittels zellulärer Faktoren zur Zellmembran transportiert (Hunt 2009; Modrow *et al.*, 2002; Freed *et al.*, 2001).

Die so gewonnenen unreifen Proteine kondensieren zusammen mit der viralen RNA unter der Plasmamembran zu einem neuen Viruspartikel (Morphogenese), das sich nun abschnürt. Nach diesem Ausknospungsprozeß (*budding*) aktiviert sich die Protease aufgrund der erhöhten Pol Konzentration in dem leicht sauren Milieu selbst mittels Autodigestion aus der von *pol*-kodierte Polypeptidkette und spaltet die restlichen Proteinvorstufen von Gag und GagPol in die funktionellen Strukturproteine p17, p24, p7 und p6 (Freed *et al.*, 2001). Diese Reifung in ein infektiöses Viruspartikel wird von einer strukturellen Umlagerung von sphärischer in eine konische Form begleitet (Gürtler *et al.*, 2000; Scarlata *et al.*, 2003).

1.2.3. Infektionsverlauf

Als Reservoir des HIV dient der Mensch. Zwar können auch Schimpansen durch HIV-1 infiziert werden, sie erkranken jedoch nicht oder erst nach langer Inkubationszeit an dem Virus (Gürtler *et al.*, 2000). Das Virus verschafft sich entweder direkt über den Blutkreislauf oder über Verletzungen der Schleimhaut mit Befall der Langerhanszellen dendritischer Zellen und dort eingewanderten Makrophagen Zutritt in den Körper. Von der Schleimhaut aus gelangen die Viren über Lymphbahnen zu Lymphknoten und lymphatischem Gewebe (Milz, Tonsillen, Peyersche Plaques), wo sich neben dendritischen Zellen auch Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten mit CD4/CCR5-Rezeptorkombinationen befinden, über die das HI-Virus eindringen kann (Modrow *et al.*, 2002). Während der

1. Einleitung

Frühphase werden zunächst sogenannte „*non syncytium* induzierende Isolate“ (NSI) des HIV übertragen, die über den β -Chemokinrezeptor CD4/CCR-5 Monozyten und Makrophagen befallen (makrophagotrope Virusstämme) (Gürtler *et al.*, 2000; Modrow *et al.*, 2002).

Im peripheren Blut sind nun etwa 1 von 10^4 bis 10^5 Zellen infiziert und in den Keimzentren der Lymphknoten findet sich eine hochgradige Anreicherung befallener Zellen sowie Viren-Antikörper-Komplexe (Modrow *et al.*, 2002). Vorherrschend in diesem Stadium ist eine Virämie. Täglich werden bis zu 10^{12} Viruspartikel gebildet, deren Hauptanteil den infizierten CD4⁺-Zellen entstammt. Zytotoxische B- und T-Lymphozyten stellen jedoch eine starke Abwehr dar und können das Virus vorerst noch aus dem Kreislauf beseitigen (*steady state*) (Ho *et al.*, 1995; Gürtler *et al.*, 2000).

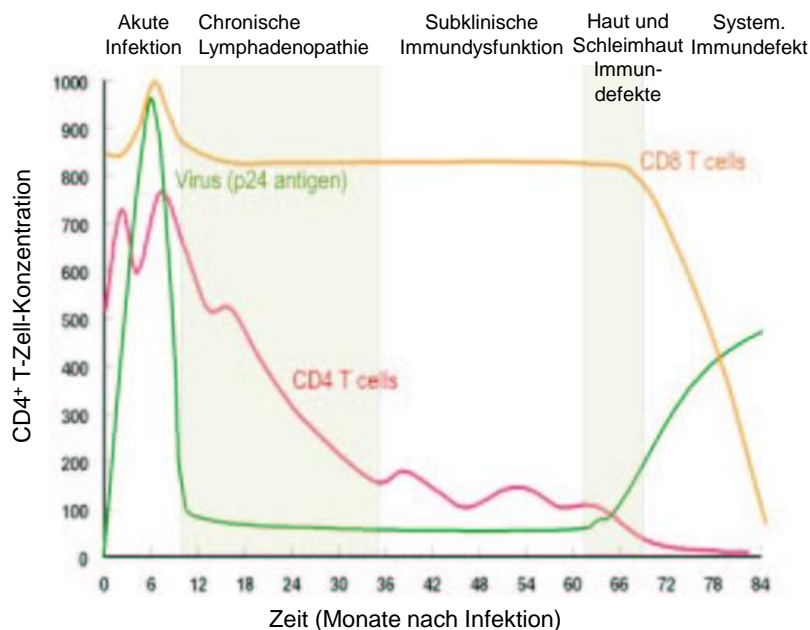


Abb. 1.3: Infektionsverlauf (modifiziert nach Hunt 2009)

Während zunächst die Neubildungsrate an CD4⁺-Zellen dem Virus ebenbürtig ist und den Zellverlust kompensiert (Greene *et al.*, 1993; Ho *et al.*, 1995; Perelson *et al.*, 1996), schreitet die Zerstörung des Lymphgewebes im Laufe der Erkrankung voran und die Zahl an CD4⁺-Zellen nimmt kontinuierlich ab. Ein weiterer Verlust der CD4⁺-Zellpopulation kommt darüberhinaus durch Fusion infizierter und nicht infizierter Zellen zu vielkernigen Riesenzellen (Greene *et al.*, 2002) sowie dem limitierten Vorrat an T-Helferzellen zustande, die die Zellverluste nicht auffüllen können. Dieser CD4-Zellverlust führt schließlich zu einer Immunsuppression, da auch deren

1. Einleitung

immunologische Funktion der Zytokinproduktion verloren geht, in Folge derer zytotoxische CD8⁺-Lymphozyten nicht mehr aktiviert werden können (Modrow *et al.*, 2002).

Die HIV-spezifischen, CD8⁺-zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Lyse infizierter Zellen. Befallene Zellen präsentieren Peptidfragmente des Virus über MHC-Moleküle an der Membranoberfläche, die durch T_H1-Helferzellen (CD4⁺-Lymphozyten) erkannt werden können und die CTL-Aktivität steuern, während T_H2-Helferzellen die humorale antikörpervermittelte Immunreaktion regulieren. Hauptsächlich während der Primärinfektion kann die Immunkontrolle der zytotoxischen T-Lymphozyten die Plasmavirämie reduzieren. Mit zunehmendem Infektionsverlauf jedoch sinkt mit Abnahme zytokinproduzierender T_H1-Zellen auch die Aktivität der CD8⁺-Zellen (Clerici *et al.*, 1996; Harrer *et al.*, 1996).

Zwischen einer und vier Wochen nach Infektion tritt eine Serokonversion ein. In Folge der fortschreitenden Virusreplikation verringert sich die CD4⁺-Zellzahl auf bis zu 500 Zellen pro µl, während die Zahl an CD8⁺-Zellen steigt, was in einer Verschiebung des CD4/CD8-Quotienten auf <0,5 resultiert. Die Primärinfektion kann mehrere Wochen lang andauern und mündet nach Abfall der Virustiter in das symptomfreie Latenzstadium (Modrow *et al.*, 2002; Greene *et al.*, 2002).

Dieses ist geprägt von einer starken, gegen HIV gerichteten Immunabwehr und kann über mehrere Jahre andauern. In Folge des Zusammenspiels zwischen Virus und Wirtsfaktoren stellt sich nach initialem Peak ein Niveau der Virusaktivität ein, das das Gleichgewicht der HIV-Replikation und Zerstörung durch zytotoxische T-Lymphozyten widerspiegelt (O'Brien *et al.*, 1996; Gürtler *et al.*, 2000).

Im Mittelpunkt der weiteren Krankheitsprogression steht der fortschreitende Verlust von CD4⁺-Lymphozyten und das verringerte CD4/CD8-Verhältnis (Normalwert >1). Als kritische Schwelle für eine weitere klinische Verschlechterung gilt das Absinken der CD4⁺-Lymphozyten unter 200/µl. Das Risiko für AIDS-typische opportunistische Infektionen ist nun stark erhöht und deutet auf den nahenden Zusammenbruch des Immunsystems hin (Levy *et al.*, 1993; Rinaldo *et al.*, 1995; Gürtler *et al.*, 2000; Modrow *et al.*, 2002).

Die symptomatische Phase tritt mit Zusammenbruch des Immunsystemes ein, in der das HI-Virus nicht länger kontrolliert werden kann. Es resultiert eine hohe Replikations- und damit auch Mutationsrate. Darüberhinaus ändern sich mit den

Replikationseigenschaften aufgrund von Mutationen auch der Zelltropismus: so werden im Spätstadium hochvirulente SI-Varianten (*syncytium inducing*) gebildet, es findet eine Spezifitätsverschiebung statt: Die Varianten zeichnen sich durch schnelle Replikation und hohe Virustiter aus und verfügen über die Fähigkeit der Riesenzellbildung. Über Bindung an den CD4/CXCR-4 Rezeptorkomplex werden vor allem CD4⁺ T-Lymphozyten angegriffen und zerstört (Gürtler *et al.*, 2000; Modrow *et al.*, 2002; Wild *et al.*, 2003).

Während der Endphase der AIDS Erkrankung sinkt neben der CD4⁺ auch die CD8⁺ T-Zellzahl und der Virustiter im Blut steigt rasant an, die Immunaktivität fällt gegen Null. Ab diesem Zeitpunkt setzt der Verlust der Immunkompetenz ein und es treten symptomatische Infektionen mit opportunistischen Erregern und maligne HIV-assoziierte Neoplasien auf (Gürtler *et al.*, 2000; Modrow *et al.*, 2002).

1.2.4. Pathogenitätsfaktoren

Die pathogenen Eigenschaften des HI-Virus erschweren es dem menschlichen Organismus, das Virus zu eliminieren (Douek *et al.*, 2006). So liegt die hohe Pathogenität des Erregers zum Einen darin, daß er über die Schlüsselstelle der körpereigenen Abwehr angreift und die Zellen des Immunsystems nicht nur direkt befällt, sondern auch indirekt an deren Zerstörung beteiligt ist (Parkin *et al.*, 1995). Es werden zwar hauptsächlich T-Zellen befallen und spezifisch zerstört, doch neben Makrophagen und Monozyten können auch Oligodendrozyten, Astrozyten, Neuronen, Gliazellen oder Endothelzellen infiziert werden.

Zum Anderen entstehen aufgrund von Kombination und der hohen Fehlerrate der RT (1:10.000) verschiedene hochvariable Virusvarianten (Douek *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006) und es entwickeln sich, wie oben ausgeführt, während des Krankheitsverlaufes infektiösere Varianten, die durch Änderung des Zelltropismus unterschiedliche Pfeiler des Immunsystems angreifen (Wild *et al.*, 2003). Diese können sowohl im Kreislauf zirkulieren als auch in peripheren Reservoirs (lymphatische Organe, Gehirn) in Latenzstadien verharren, wo sie medikamentös schwer erreichbar sind (Pantaleo *et al.*, 1991; Poli *et al.*, 1993).

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor besteht darin, daß HIV eine zytolytische Wirkung besitzt, indem es in den Zellen direkt und indirekt Apoptose induziert. So schütten infizierte Makrophagen Zytokine aus, die über Oberflächenmoleküle in T-Lymphozyten Apoptose induzieren können. Weiterhin werden durch das HIV-

1. Einleitung

Oberflächenprotein gp120 mittels vielfältiger Mechanismen Autoimmunreaktionen und Apoptose ausgelöst (Chaplin *et al.* 1993, Modrow *et al.* 2002), wodurch nach und nach die CD4⁺-Zellpopulation reduziert wird, während das Virus selbst *escape*-Mechanismen entwickelt, um nicht zerstört zu werden (Greene *et al.*, 2002; Burgers *et al.*, 2005; Douek *et al.*, 2006).

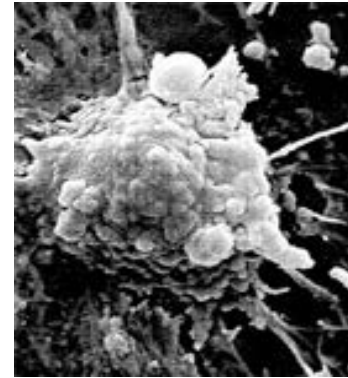


Abb. 1.4: HIV-infizierte Zelle während der Apoptose (modifiziert nach NIAID)

Auch dadurch, daß konservierte Bereiche des hochvariablen Env-Proteins gp120 durch Glykosylierung maskiert bzw. an der Innenseite verborgen sind und somit nur schwer von Antikörpern erreicht und neutralisiert werden können, entzieht sich das Virus der Immunantwort (Burgers *et al.*, 2005; Douek *et al.*, 2006).

1.3. HIV-Vakzine

Wie oben dargelegt, ist das HI-Virus aufgrund multipler Pathogenitätsfaktoren äußerst virulent und erzeugte seit seiner Verbreitung vor über 20 Jahren bis heute sowohl großen volkswirtschaftlichen als auch soziokulturellen Schaden. Seither wurden viel Energie und finanzielle Mittel in Entwicklung, Einsatz und Ausbau geeigneter Bekämpfungsstrategien gesetzt, die jedoch bislang das Virus an seiner Ausbreitung nicht hindern konnten. Prinzipiell fußt die Bekämpfung der AIDS-Pandemie auf 3 Säulen: Die Prävention dient der Verhinderung der Transmission, die bereits stattgefundenen Infektion soll in Schwere und Transmission mittels antiretroviraler Therapie (HAART) eingedämmt werden, während die noch in der Entwicklung befindlichen Impfstoffe sowohl präventiven als auch therapeutischen wirksam sein sollen.

1.3.1. Herausforderungen der HIV-Impfstoffentwicklung

Bei der Entwicklung von HIV-Impfstoffen stößt man auf vielschichtige Probleme. Diese sind u.a. der Verbreitung verschiedener HIV-Subtypen und Klassen in den unterschiedlichen Regionen der Welt geschuldet (Nathanson *et al.*, 2000; Girard *et al.*, 2006). So zirkulieren beispielsweise in Südafrika gleichzeitig verschiedene HIV-Klassen, wodurch in Gebieten mit erhöhtem Risiko eine gleichzeitige Infektion einer einzelnen Person mit unterschiedlichen multiplen Chimären wahrscheinlich ist und

die Immunisierung mit der auf einer Klasse basierende Vakzine wenig erfolgsversprechend erscheint. Weitere Probleme erwachsen aus den Eigenschaften des HIV: die Tatsache, dass keine natürliche Immunität gegen das Virus vorhanden ist (Douek *et al.*, 2006) sowie fehlende Kenntnisse, welche Immunkorrelate Schutz bieten können (Girard *et al.*, 2006), erschweren die Impfstoffentwicklung, zumal selbst eine potente Vakzine zwar die akute Infektionskrankheit einzudämmen, aber nicht das Virus zu zerstören vermag (Nathanson *et al.*, 2000). Die Fähigkeit der Latenz stellt ein Hauptproblem dar, da hierbei das Virus durch Virostatika schwer erreicht werden kann (Lehner *et al.*, 2003). Ein weiteres Problem besteht aufgrund der genetischen Variabilität des HIV (Douek *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006). Neben zahlreichen Varianten, Quasispecies und Rekombinationen untereinander erschwert die extrem hohe Mutationsrate mit Ausbildung o.g. *escape*-Eigenschaften die Entwicklung eines Impfstoffes (Gotch *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2002, Lehner *et al.*, 2003; Burgers *et al.*, 2005; Douek *et al.*, 2006; Girard *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006). Schließlich stößt man auch wegen des Fehlens eines geeigneten Tiermodells, wodurch die Effizienz schließlich nur im Rahmen klinischer Studien am Menschen beurteilbar ist, neben wissenschaftlichen auch auf ethische Grenzen (Graf *et al.*, 2000; Burgers *et al.*, 2005; Letvin, 2005; Girard *et al.*, 2006).

1.3.2. Anforderungen an und allgemeine Ansätze für eine HIV-Vakzine

Große Bedeutung kommt in der Entwicklung von HIV-Impfstoffen der Identifikation von Korrelaten einer schützenden Immunantwort zu. Diesbezüglich werden Erkenntnisse aus bisherigen Vakzine-Studien herangezogen, aber auch die von Langzeitüberlebenden. Dies sind HIV-infizierte Personen, deren Immunsystem trotz fehlender antiretroviraler Therapie über Jahre hin das Virus kontrollieren kann, bevor sich bei Ihnen das Vollbild AIDS entwickelt, sogenannte „*long-term non progressors*“ (LTNP), oder häufig exponierte, jedoch nicht infizierte Personen (z.B. Prostituierte in Nairobi) (Hunt 2009; Gürtler *et al.*, 2000; Dean *et al.*, 1996). Vor dem Hintergrund der Langzeitüberlebenden wird ein Richtungswechsel bezüglich der Zielstellung einer Vakzine deutlich: Entgegen der bisherigen Ansätze, vollständigen Schutz oder eine zeitliche limitierte Infektion zu erlangen, steht nun die Langzeitkontrolle der Infektion im Vordergrund (Deml *et al.*, 2001), und mit zunehmender Kenntnis über die Korrelate einer schützenden Immunantwort erschließen sich der Impfstoffforschung neue Ansatzpunkte für die Entwicklung potenter und sicherer Vakzinekandidaten.

Oft findet die HIV-Übertragung über Sexualkontakte, und damit auch die virale Transmission und Replikation hauptsächlich in genitaler und rektaler Mukosa statt, weshalb ein Vakzin das mukosale Immunsystem aktivieren sollte (Burgers *et al.*, 2005; Lehner *et al.*, 2005). Die mukosale Immunisierungsstrategie macht eine vaginale, rektale oder auch respiratorische Applikation der Immunisierungen erforderlich (Lehner *et al.*, 2005; Hofmann-Sieber *et al.*, 2010).

CTL spielen in humanen- und Primatenstudien eine wichtige Rolle in der Kontrolle des HIV, können jedoch nur infizierte Zellen erkennen und zerstören und erst zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion die Viruslast senken als neutralisierende Antikörper. Diese reduzieren die Virusmenge bereits sehr früh, da sie das Viruspartikel schon vor Infektion der Zelle in Serum sowie Mukosa neutralisieren (Graham *et al.*, 2002; Burgers *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2006).

In Studien an Langzeitüberlebenden konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation beider Arme des adaptiven Immunsystems (B-Lymphozyten und T-Killerzellen) die virale Replikation und Ausbreitung eingedämmt werden konnte (Graham *et al.*, 2002; Burgers *et al.*, 2005; Lehner *et al.*, 2005; Dunham *et al.*, 2006). Vor allem der Aktivierung dreier Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems, der CD4-, CD8-, und B-Zellen, wird die Schlüsselfunktion, Schutz vor Infektion zu erzeugen, zugeschrieben (Clerici *et al.*, 1996; Harrer *et al.*, 1996; Nathanson *et al.*, 2000; Graham *et al.*, 2002). Den in LTNP nachgewiesenen CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen und hohen Zahlen HIV-spezifischer Vorläufer-CTLs gegen verschiedene Virusproteine (Nef, Rev, Tat) und hochkonservierte gruppenspezifische Epitope (v.a. in Gag und Pol) kommt eine entscheidende Rolle zu (Wild *et al.*, 2003), und diese können eine Erklärung für die langsame Krankheitsprogression sein (Gürtler *et al.*, 2000).

Aus der Erkenntnis, daß CTLs von unterschiedlichen, und mit verschiedenen HIV-Klassen infizierten Patienten in der Lage waren, Epitope anderer Virusklassen zu erkennen, erwächst der Ansatz, eine klassenübergreifende Vakzine („*pan-clade*“) zu entwickeln, die kreuzreagierende spezifische Immunantworten auslösen kann bzw. einen „Vakzinecocktail“ aus Vertretern relevanter Virustypen zu entwerfen (Gotch *et al.*, 2000; Pressekonferenz Kompetenznetz HIV/AIDS 2002). Darüberhinaus spielt der Einsatz von Adjuvantien, die die Quantität, Qualität und Dauer der Immunantwort verbessern sollen, eine erhebliche Rolle für die Etablierung einer potenten Vakzine (Coordinating Committee 2005).

Somit sollte der ideale HIV-Impfstoff eine breit gefächerte humorale und zelluläre Immunantwort in Blut, Gewebe und mukosalen Oberflächen induzieren, dabei sowohl CTL-, T-Helferzellen, neutralisierende IgG und mukosale IgA aktivieren, die virale Replikation effektiv kontrollieren und gegen verschiedene HIV-Subtypen und zirkulierende Rekombinanten schützen (Nathanson *et al.*, 2000; Burgers *et al.*, 2005; Lehner *et al.*, 2005).

1.3.3. HIV-Vakzinestrategien: Konzepte für die Entwicklung eines HIV-Impfstoffes

Der Impfstoffeinsatz dient neben dem Schutz des Einzelnen der Ausbildung einer Herdenimmunität (Pschyrembel, 1998; Girard *et al.*, 2006). Prinzipiell werden Vakzine in prophylaktische oder therapeutische Impfstoffe oder in aktive oder passive Impfstoffe eingeteilt. Die aktive Immunisierung erfolgt mittels attenuierter Lebend- und Totimpfstoffe oder inaktivierter Erreger, um eine zelluläre und humorale Immunantwort zu induzieren. Hyperimmunseren hingegen werden zur passiven Immunisierung eingesetzt und zielen vorwiegend auf die humorale Immunantwort ab (Gürtler, 2000; Pressekonferenz Kompetenznetz HIV/AIDS 2002; Burgers *et al.*, 2005).

Erkenntnisse aus bisherigen Entwicklungen der lebend, attenuierten oder inaktivierten Impfstoffe konnten aufgrund der Biologie und Pathologie des HIV sowie aufgrund von Sicherheitsbedenken nicht übernommen werden (Letvin *et al.*, 2005; Burgers *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006):

Attenuierte Impfstoffe zeigten bei SIV-Varianten, dass eine Infektion mit pathogenem SI-Virus verhindert werden konnte, die Impfviren jedoch lebenslang im Körper persistierten und unter bestimmten Bedingungen AIDS verursachten und kein Schutz vor einer Superinfektion mit dem Wildtyp bestand. **Chemisch inaktivierte Viren** erzeugten zwar eine effektive Immunantwort in Polio- und Influenzaimpfung des Menschen, erwiesen sich aber in Primatenstudien als beschränkt in Hinsicht auf die Diversität der Virusisolate sowie Dauer und Spektrum der Immunantwort. Studien zur **passiven Immunisierung** mit monoklonalen neutralisierenden Antikörpern (2G12, 2F5, 4E10) waren hinsichtlich der Suppression des viralen Rebounds während Unterbrechung der antiretroviralen Therapie nicht erfolgsversprechend. Auch kurze **Peptide** eines Antigens können nur eine hochspezifische Immunantwort auslösen (Gotch *et al.*, 2000). **VLPs (Virus like particles, Pseudo-Virionen)**

1. Einleitung

hingegen zeichnen sich durch ihre Sicherheit aus, sind nicht infektiös und können leicht hergestellt werden (Gotch *et al.*, 2000; Letvin *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006). Sie waren in der Lage, neben der humoralen eine systemische Immunantwort zu induzieren.

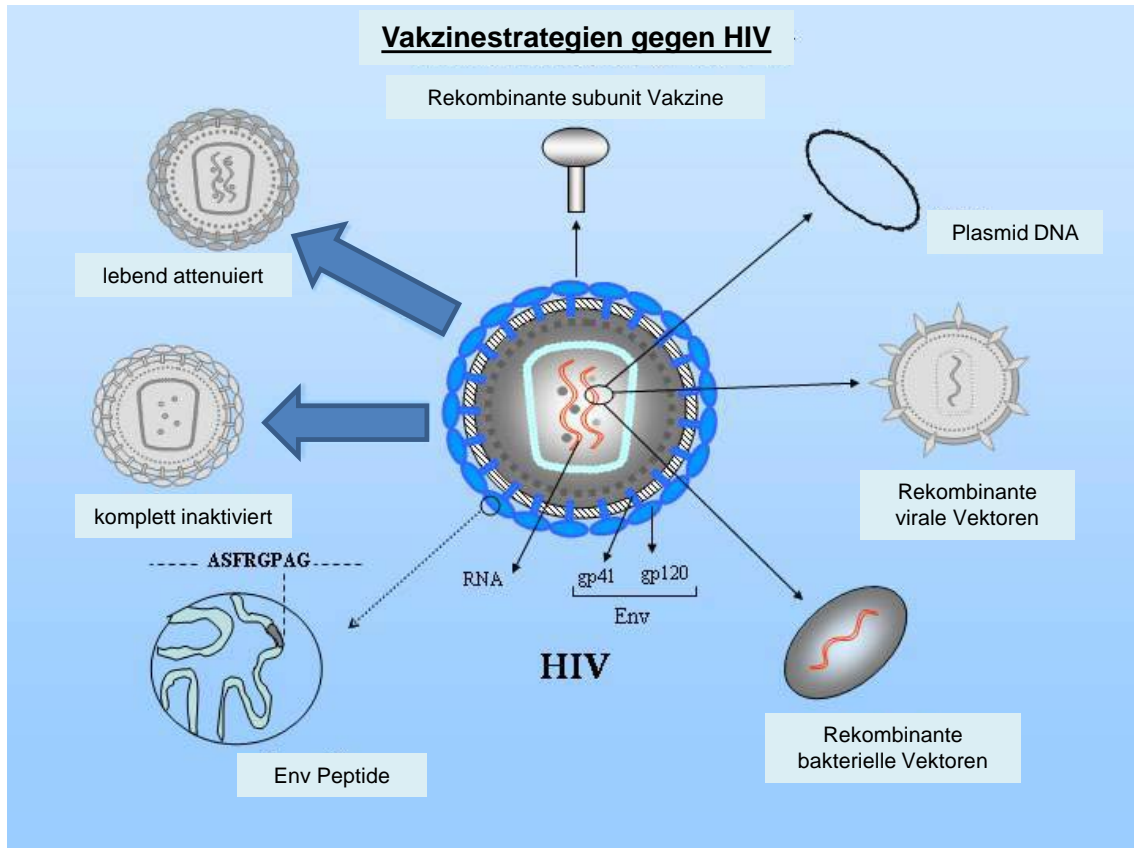


Abb. 1.5: Darstellung einiger Vakzinestrategien gegen HIV, die derzeit untersucht werden, sowie das HI-Virus mit RNA und den Env-Glykoproteinen gp41 und gp120 (modifiziert nach Singh 2006).

Rekombinante subunit Vakzine oder **Proteinvakzine** enthalten einzelne, hoch aufgereinigte, synthetisch hergestellte, virale Proteine (gp120, gp160, p55, p24) oder Virusbestandteile, die von Säuger- oder Bakterienzellen exprimiert wurden (Gotch *et al.*, 2000; Pressekonferenz Kompetenznetz HIV/AIDS 2002; Letvin *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006). Sie induzieren eine Antikörperantwort, jedoch ungenügend kreuzreagierende Antikörper, geringe zelluläre Immunreaktionen und boten in Phase I-II Studien nur mangelnden Schutz. Als *Envelope-based subunit vaccines* sind lösliche, auf dem Env-Glykoprotein basierende, rekombinante gp120 oder gp140 als Vakzinekandidaten getestet worden. Diese wurden zwar gut vertragen, doch konnten diese weder CTLs noch Immunität gegen diverse Virusisolate erzeugen (Girard *et al.*, 2006; Burgers *et al.*, 2005; Douek, 2006; Step Study 2007; IAVI 2008) und boten keinen Schutz vor HIV-1 in Phase II Studien in den USA und Thailand (Girard *et al.*,

2006; Letvin *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006). Mit dem Ziel, Immunantworten gegen früh exprimierte Antigene zu induzieren, um so eine schnelle Elimination infizierter Zellen erreichen zu können, wurden *Non-structural Protein Subunit*-Vakzine basierend auf dem viralen Transaktivator Tat entwickelt. Die Immunisierung mit diesem Impfstoff führte zwar zu einer verminderten Virusreplikation, doch in verschiedenen Studien konnten Tat-Varianten keine Effizienz oder Schutz gegen ein *Virus-Challenge* liefern. In Kombination mit anderen Strategien kann Tat jedoch vor SHIV schützen und Antikörperantworten induzieren.

In lebende bzw. apathogen infektiöse, **rekombinante virale** oder **bakterielle Vektorsysteme** werden gentechnisch hergestellte HIV-Fragmente platziert, die exprimiert und vom humoralen oder zellulären Immunsystem erkannt werden (Gotch *et al.*, 2000; Rajcáni *et al.*, 2005). Hierdurch wird eine Immunität gegenüber Vektor und Genprodukt erzeugt und eine humorale und zelluläre Immunantwort ausgelöst (Letvin *et al.*, 2005), wobei *Prime-Boost*-Strategien die Breite bzw. Qualität der Stärke der Immunantworten verändern können.

Als Trägerviren wurden unter anderem Vakzinia- und Kanarienviruskonstrukte sowie rekombinante Viren auf der Basis von Adenovirus und Alphaviren (Semliki-Forest-Virus, Sindbis-Virus, Venezuelanisches Pferdeenzephalitisvirus) entwickelt (Deml *et al.*, 2001). Nach ermutigenden Ergebnissen in Tiermodellen mussten klinische Studien teilweise wegen unerwünschten Reaktionen gegenüber dem Trägervektor oder wegen des Unvermögens, die virale Diversität abzudecken, gestoppt werden.

Am bedeutendsten war in diesem Zusammenhang die Step-Studie (Buchbinder *et al.*, 2008). In dieser klinischen Phase IIb Studie erhielten 3000 Hochrisiko-Probanden eine Mischung aus rekombinanten Adenoviren (Ad5), die Gag, Pol und Nef kodierten. Die Studie wurde sofort entblindet, als erste Daten vermuten ließen, dass die Immunisierung nicht nur keine Protektion zu vermitteln schien, sondern Ad5-seropositive Probanden sogar eine höhere Infektionssuszeptibilität zu haben schienen (Buchbinder *et al.*, Sekaly, 2008). Mehrere Hypothesen konnten diesbezüglich schon entkräftet werden, der genaue Mechanismus ist weiterhin nicht geklärt.

Vorsichtigen Optimismus verbreitete hingegen die kurz darauf veröffentlichte klinische Phase III Studie RV-144 (*Thai-trial*) (Rerks-Ngarm *et al.*, 2009). Das Impfschema umfasste eine Grundimmunisierung mit pockenviralem ALVAC und einer Auffrischimpfung mit einer gp120 Untereinheitvakzine. Die Analyse ergab ein

31 % reduziertes Infektionsrisiko für Geimpfte im Vergleich zu der Placebo-Kontrollgruppe.

Ebenfalls vielversprechend sind die Ergebnisse der Studien EV02 und EV03 (Harari *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2008; Perreau *et al.*, 2012). Die Grundimmunisierung erfolgte mit einer DNA-Vakzine (DNA-C), die auf getrennten Plasmiden zum einen ein 160 kDa Gag-Pol-Nef-Polyprotein und zum anderen gp120 kodierte. Beide Sequenzen basierten auf einem repräsentativen chinesischen C-Typ Isolat (Su *et al.*, 2000). Die Auffrischimmunisierung erfolgte mittels des pockenviralen Vektors NYVAC, der beide Antigene kodierte (NYVAC-C). Durch den heterologen *prime:boost* wurden breite, langanhaltende und polyfunktionale Immunantworten in den Probanden induziert, die denen ähneln, die in langzeitüberlebenden HIV-Infizierten nachgewiesen werden konnten (Harari *et al.*, 2008).

1.3.4. DNA-Vakzine

DNA- oder Plasmid-Vakzine bestehen aus einem DNA-Plasmid-*backbone*, einer HIV-viralen Gensequenz als Insert unter Promotorkontrolle (z.B. CMV-P), einer *ori*-Sequenz zur Replikationsfähigkeit sowie einem Antibiotikaresistenzgen zur Selektion der transformierten Bakterienzellen (Girard *et al.*, 2006; Letvin *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2006). Bei Auslese der im Vektor kodierten viralen Genkassette durch körpereigene Zellen werden Immunogene (HIV-Proteine: Gag, Pol, Tat, Nef, Rev oder Peptide) generiert, die vom Immunsystem erkannt werden und im Tiermodell eine gute zelluläre und auch humorale Immunantwort auslösen (Douek *et al.*, 2006; Rajcáni *et al.*, 2005). Während Sicherheit und Effizienz der CTL-Induktion in Schimpansen- und Makakenstudien nachgewiesen wurden, erwies sich die Vakzine in humanen Studien als weniger immunogen als im Tiermodell, vor allem hinsichtlich der CTL-Aktivierung. Doch anhand verbesserter Ansätze mittels Codonoptimierung, Bindung von HIV an immunogene Trägersubstanzen, Modifikationen des Promotors und regulatorisch wirksamer Elemente sowie Zusatz von Zytokinen (IL-2, GM-CSF) oder neueren Polymerformeln als Adjuvantien und der Einsatz physikalischer Methoden (Elektroporation) konnte eine Steigerung der zellulären Immunreaktion erreicht werden (Nabel *et al.*, 2002; Letvin *et al.*, 2005; Girard *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006; Harari *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2008).

Die *Applikationsroute* der DNA Vakzine ist entweder intramuskulär (i.m.) oder subkutan (s.k.) per Nadel oder intradermal (i.d.) mit Hilfe einer sogenannten *Gene-*

Gun über Goldpartikel, die über Myozyten und Epidermalzellen (Langerhanszellen) CTL- und Antikörper-Antworten auslösen können (Rajcáni *et al.*, 2005).

Die DNA Vakzine ist gut verträglich, benötigt keinen großen technischen Aufwand und kann in großen Mengen produziert werden. Weitere Vorteile bestehen in der relativ hohen, chemischen Stabilität, da sie Temperaturen bis über 50°C toleriert. Das Plasmid induziert weniger stark als beispielsweise Subunit-Vakzine unerwünschte Immunreaktionen, weshalb der Einsatz konventioneller Adjuvantien, die unerwünschte lokale Entzündungsreaktionen hervorrufen könnten, nicht notwendig ist, um die Immunogenität zu verstärken. Studien zeigten, daß kodonoptimierte *gag*-Genmotive (*gag*), die sich durch erhöhten G und C Gehalt sowie eine Rev-unabhängige Expression und Sekretion in Säugetierzellen auszeichneten, verglichen zur getesteten Wildtypgensequenz (wt *gag*) in einer gesteigerten Expressionsrate und Immunogenität resultierten (Deml *et al.*, 2001; Bojak *et al.*, 2002; Kofman *et al.*, 2003; Graf *et al.*, 2004). Somit können CpG-Motive innerhalb der viralen DNA durch immunstimulatorische Wirkungen adjuvante Effekte zeigen. Anhand der DNA-Vakzine ist es möglich, Antigene in natürlicher Peptidform zu präsentieren, wodurch die mengenmäßige Begrenzung der Applikation aufgereinigter Polypeptide umgangen werden kann. Gegenüber viralen Vektoren, die durch Induktion selbstneutralisierender Antikörper in Readministration und Boosting limitiert sind, induzieren DNA-Vektoren diese nicht und können effektiver, da mehrfach, verabreicht werden (Pressekonferenz Kompetenznetz HIV/AIDS 2002; Rajcáni *et al.*, 2005; Otten *et al.*, 2006).

Nach Optimierung der ursprünglichen Impfstoffkandidaten werden derzeit DNA-Vakzine, die HIV-1 *gag* und IL-12 oder IL-15 (Wyeth) exprimieren, in Phase I Studien in USA, Brasilien und Thailand untersucht. Darüberhinaus erwiesen sich DNA-Vakzine als *Prime*-Vektoren in *Prime-Boost* Strategien mit rekombinantem Vakzin-*Boost* in Affenstudien als sehr nützlich (Girard *et al.*, 2006). Als weiterführende klinische Studien wurden dabei die Phase II AIDSVAX Studien in Nordamerika, und Bangkok abgeschlossen, während seit 2006 die Phase I Studie EuroVacc 02 die Sicherheit und Immunogenität von DNA-HIV-C allein mit dem *Prime-boost* Regime DNA-HIV-C (prime) und NYVAC-HIV-C (Boost) vergleicht. Beide Vektoren enthalten jeweils die HIV-Gene *env*, *gag*, *pol* und *nef* der Gruppe C (IAVI 2008).

Ausgehend von diesen Grundlagen befasst sich die nachfolgende Arbeit mit synthetischen DNA-Vektoren und den eingeschlossenen HIV B-Genen *gag pol* und *nef*, die anhand eingefügter Modifikationen verglichen wurden.

1.4. Zielsetzung

1.4.1. Vorausgehende Arbeiten

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurden verschiedene vollsynthetische DNA-Konstrukte hergestellt, deren viraler Kodongebrauch an den hochexprimierter Säugetiergene adaptiert worden war.

Der HIV-1 Laborstamm IIIB (Ratner *et al.*, 1987) fand hierbei Verwendung, da sich dieser hinsichtlich der Protokolle und verwendeter Antigene, Antikörper und Peptide für die Detektion von Gag als zweckmäßig erwies. Die anhand der Klasse-B Varianten gewonnenen Erkenntnisse konnten in Folge auf weitere HIV-Primärisolate (C-Klasse) übertragen werden.

Ausgangspunkt der Studien war das synthetisch hergestellte, RNA- und kodonoptimierte Ursprungsstruktur „GPN“ in pcDNA 3.1. Es unterscheidet sich von dem Wildtypvirusgenom zusätzlich durch einige Veränderungen, die im *gag*- und *pol*-Leserahmen vorgenommen wurden. So finden sich neben einer fehlenden Integrase (IN) sowie einer nicht funktionellen *nef*-Sequenz, die in das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase (RT) eingefügt wurde, eine durch Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum inaktivierte Protease (PR) sowie ein ebenfalls durch Aminosäureaustausch inaktiviertes Myristylierungssignal.

Basierend auf dem beschriebenen Ursprungsstruktur wurden in einer vorausgehenden Arbeit (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) verschiedene Abwandlungen der Aminosäuresequenz eingeführt, welche neben unterschiedlichem Aktivitätszustand der viralen Protease einen ribosomalen Leserastersprunges durch die Einführung der natürlichen HI-viralen *slippery site* sowie die An- bzw. Abwesenheit der nicht funktionellen *nef*-Sequenz umfasste. Diese Modifikationen wurden anschließend anhand von Expressionsstudien *in vitro* mittels Zellkultur und über Immunogenitätsstudien *in vivo* im BALB/c Mausmodell untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Beurteilung der Expression und Immunogenität von Gag. Die Auslese Pol-spezifischer Antworten hingegen war nur eingeschränkt durchführbar, da keine H-2d-restringierten Pol-Epitope bekannt waren.

1.4.2. Fragestellung und Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Auf Grundlage dieser Ergebnisse und der damit verbundenen Probleme sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Gensequenz von *env-V3* 3'-terminal an die *gagpolnef*-Genkassette der vorbeschriebenen Konstruktvarianten angefügt werden, um mit diesem Reporterkonstrukt potentielle Pol-spezifische Immunantworten abschätzen zu können. Zudem war die Generierung weiterer Konstrukte vorgesehen, deren Insert lediglich aus *polnef*- oder *pol*-Gensequenzen mit 3'-ständigem *V3* bestand, so daß Gag oder der natürliche ribosomale Leserastersprung keinen Einfluß auf die Immunogenität der Konstrukte nehmen konnten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, neben *gag*- nun auch indirekt den *pol*-Leserahmen anhand neu in das Genom integrierter, *V3*-spezifischer Epitope auslesen zu können und hierdurch vergleichende Studien der modifizierten, neuen HIV-1IIIB Vakzinekandidaten hinsichtlich der Einflüsse der PR, des *frameshifts*, von Nef sowie der An- bzw. Abwesenheit von Gag auf Expression und Immunogenität hin vornehmen zu können.

2. Materialien und Methoden

2.1. Bakterien

2.1.1. Bakterienstämme

Für die Klonierungen wurde hauptsächlich der *dam/dcm*-positive *Escherichia coli* K12-Bakterienstamm DH5 α (Hanahan und Meselson, 1983) verwendet.

Darüber hinaus wurden der *dam*-negative, superkompetente *E. coli*-Stamm XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg) und die *E. coli*-Stämme GM2163 und GM169 (New England Biolabs, Frankfurt) eingesetzt, wobei sich diese im Wesentlichen durch die Aufhebung der *dam*- und *dcm*-Methylierung von DH5 α unterscheiden. Um *dam*- bzw. *dcm*-sensitive Restriktionsendonukleasen einsetzen zu können, wurden im Einzelfall die entsprechenden Plasmide in diese Stämme umtransformiert.

DH5 α : F-(ϕ 80dlacZ Δ M15) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁺)supl*
 Δ (lacZYA-argF) U169

(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen)

GM2163: F-dam-13:Tn9 *dcm-6 hsdR2 leuB6 his-4 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 galT22*
xyl-5 mtl-1 rpsL136 tonA31 tsc-78 supE44 McrA- McrB-

(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen)

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^qZDM15*
Tn(tet^r)] (Stratagene Manuals)

GM169: *mutS453 dam-3 thr-1 ara-14 leuB6 del (gpt-proA) 62 lacY1 tsx-33 supE44*
galK2 hisG4 metB1 rfbD1 mgl-51 rpsL260 kdgK51 mtl-1 thi-1 deoB16

(Deutsche Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen)

2.1.2. Nährmedien

Die Bakterien wurden sowohl als Suspensionskultur in sterilem LB (Lurie Bertani)-Medium als auch auf LB-Agar-Platten angezüchtet. Dabei erfolgte die Selektion durch Zugabe von Ampicillin in der Endkonzentration von 100 μ g/ml.

LB₀-Medium: 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5 einstellen mit NaOH

LB_{amp}-Medium: 1% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 1% NaCl; pH 7,5 einstellen mit NaOH; Zugabe von Ampicillin auf eine Endkonzentration von 0,1 mg/ml

2. Materialien und Methoden

TB-Medium: 12g Bacto-Trypton, 24g Hefeextrakt, 4ml Glycerol ad 900ml H₂O, nach Autoklavieren Zugabe von 100ml steriler Lösung A (2,31g KH₂PO₄, 12,54g, K₂HPO₄ ad 100 ml H₂O)

LB_{amp}-Platten: B_{amp}-Medium + 1,5 % Agar

2.1.3. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Transformationskompetente Bakterien wurden nach der RbCl-Methode nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt.

2.1.4. Transformation kompetenter *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit dem entsprechenden Ligationsansatz oder der Plasmid-DNA (50 ng bis 1 µg) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis, während der die DNA an die Zellen adsorbierte, wurden die Proben für 45 sek auf die heatshockTemperatur von 42°C erhitzt und anschließend 5 min auf Eis gestellt. Der Reaktionsansatz wurde nach Zugabe von nicht selektivem LB-Medium etwa 1h bei 37°C schüttelnd inkubiert, bis die Antibiotikaresistenz des transformierenden Plasmids exprimiert wurde. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde die Bakteriensuspension auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert und ÜN bei 37°C im Brutschrank angezogen.

Übernachtkultur

Transformierte Bakterienzellen (z.B. *E. coli*) wurden für ca. 12- 16 h im Selektionsmedium (z.B. LB_{amp}) bei 37°C in einem Inkubationsschüttler inkubiert.

2.2. DNA

2.2.1. DNA-Plasmidpräparation und -aufreinigung aus Bakterien

2.2.1.1. Plasmidvektoren

Als Klonierungsvektor wurde das *pcR-ScriptTM SK(+)-Plasmid (Amp^r)* (Stratagene, Heidelberg) und als Expressionsvektor *pcDNA3.1* (Invitrogen, Leek NV (NL)) eingesetzt.

2.2.1.1.1. *pcR-ScriptTM SK(+)-Plasmid (Amp^r)*

Dieser Klonierungsvektor der Firma Stratagene (Heidelberg, 2961 Basenpaare (bp)), wurde aus dem pBluescript® SK(+)-Phagemid durch Einführung einer *SrfI*-

2. Materialien und Methoden

Schnittstelle in den Polylinker (MCS: *multiple cloning site*) generiert (GenBank® database: *accession number*: U46017).

Der Polylinker liegt innerhalb des *lacZ'*-Gens (α -Peptid) und wird von dem T3- bzw. T7-Promotor flankiert (T3→*Sac* I→*Srf* I→*Kpn* I←T7). Das partielle *lacZ'*-Gen unter der Kontrolle des *upstream* gelegenen, induzierbaren *lac*-Promotor erlaubt eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Plasmide mittels α -Komplementation. Das Ampicillin-Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion positiver Transformanten.

2.2.1.1.2. pcDNA3.1-Expressionsplasmid

Der Polylinker des vom pUC19 abgeleiteten eukaryontischen Expressionsvektors pcDNA3.1(+) (5446bp) der Firma Invitrogen (Leek NV (NL)) wird von den Promotoren T7 und Sp6 flankiert. Die Transkription integrierter Gensequenzen erfolgt unter der Kontrolle des hCMV (humanes Cytomegalievirus) *immediate early* Promotors. Die Transkripte werden für eine erhöhte mRNA-Stabilität mit Hilfe des vektoreigenen Polyadenylierungssignals BGHpolyA (*bovine growth hormone polyA*) polyadenyliert. Innerhalb des Polylinkers befindet sich zudem ATG als Translationsstartpunkt, so dass Gensequenzen integriert werden können, die selbst kein Startkodon besitzen, sowie eine Transkriptionsterminations-Sequenz aus dem BGHpolyA enthalten. Der Vektor enthält zusätzlich Resistenzgene: *amp* für die Selektion in transfizierten, prokaryontischen, sowie *neo* für die Selektion in transfizierten, eukaryontischen Zellen.

2.2.1.2. Plasmidisolierung

2.2.1.2.1. Rapid Lysis

Kleinere Mengen an Plasmid-DNA für Klonierungsarbeiten und zur Charakterisierung hergestellter Klone wurden aus 5ml Übernachtskulturen nach dem Prinzip der alkalischen Schnelllyse gewonnen („Minipräp“, Birnboim und Doly, 1979).

2.2.1.2.2. Isolierung von Plasmid- DNA aus *E. coli* über Nucleobond®-Säulen AX-1 100/500

Für Subklonierungen sowie Transfektionen eukaryontischer Zellen hingegen wurde die benötigte Plasmid-DNA über Nucleobond-Säulen (Anionenaustauscherchromatographie) nach Angaben des Herstellers (Macherei Nagel, Düren)

2. Materialien und Methoden

aufgereinigt. Je nach gewünschter Ausbeute wurden Midi-(*Nucleobond-Tip 100*) oder Maxi-(*Nucleobond-Tip 500*) Säulen eingesetzt.

2.2.1.2.3. Herstellung endotoxinfreier Plasmid-DNA

Für die Immunisierungen benötigte endotoxinfreie DNA wurde unter Verwendung der Mega-(*Qiagen-Tip 2500*) Säulen und des *EndoFree Kits* (Qiagen, Düren) nach der Anleitung des beiliegenden Protokolls präpariert. Die Entfernung des Endotoxins, ein Bestandteil der Lipopolysaccharide (LPS) gram-negativer Bakterien, aus der DNA-Präparation war notwendig, um bei der Applikation von Plasmid-DNA als DNA-Vakzine eine Verfälschung der Ergebnisse durch immunstimulatorische LPS-Kontamination zu verhindern. Als endogene Pyrogene können Endotoxine (O-Antigene) u.a. Fieber, das Endotoxin-Schocksyndrom oder eine Komplementaktivierung auslösen.

Die Konzentration und Reinheit der präparierten DNA wurden photometrisch bestimmt und die Endkonzentration auf 1 µg/µl eingestellt. Der Endotoxin-Gehalt wurde mit Hilfe des „*Limulus Amebocyte*“ Assays QCL-1000 (Biowhittaker, Walkersville, USA) bestimmt. Nach den allgemeinen Richtlinien wurde für die Immunisierungsstudien ausschließlich Plasmid-DNA verwendet, deren Endotoxin-Gehalt < 0,5 EU/ml (1,8 EU/ml = 1 ng LPS) enthält.

2.2.1.2.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung

Konzentration und Reinheit isolierter Plasmid-DNA wurden mit Hilfe eines Zweistrahl-Spektrophotometers (Varian GmbH, Darmstadt) in einem UV-Absorbtionsspektrum zwischen 230nm und 320nm ermittelt. Die Berechnung der Konzentration dsDNA erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz aus dem Wert der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 258 nm ($1 \text{ OD}_{258} = 47,5 \text{ µg ds DNA/ml}$). Die DNA wurde auf eine Konzentration von 1 µg/µl durch Zugabe von H₂O eingestellt und bei -20°C gelagert.

2.2.2. DNA-Klonierungsverfahren und -synthese

2.2.2.1. PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur überexponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Fragmente *in vitro* (Saiki *et al.*, 1988). Die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung des TaqPlus™ Precision Systems

2. Materialien und Methoden

(Stratagene, Heidelberg) in einem programmierbaren Thermocycler (PERKIN ELMER GeneAmp™ 9600 oder Mastercycler gradient, Eppendorf).

Dank des thermostabilen Enzymgemisches aus Pfu-DNA-Polymerase und Taq-DNA-Polymerase und dessen 3'-5'-Exonuklease-Aktivität (*proof-reading*) kann eine fehlerfreie Amplifikation erreicht werden. Die aus dem thermophilen Eubacterium *Thermus aquaticus* isolierte DNA-abhängige Taq-Polymerase besitzt zwar hohe Prozessivität, jedoch keine Exonuklease-Aktivität. Die ebenfalls DNA-abhängige Pfu-Polymerase wiederum wird aus *Pyrococcus furiosus* gewonnen, hat allerdings aufgrund ihrer 3'-5'-Exonuklease-Aktivität eine Prozessivität von 2 min/kb wodurch sich die Amplifikation auf DNA-Fragmente von 5-10 kb Größe beschränkt.

2.2.2.1.1. Oligonukleotide

Die im Anhang aufgeführten Oligonukleotide wurden als Startermoleküle (*Primer*) für PCR-Klonierung, PCR-Analyse (*PCR-Screening*), gerichtete Mutagenese oder für Sequenzierungen eingesetzt. Alle Oligonukleotide wurden in entsalztem, lyophilisierten Zustand von der Firma Invitrogen bezogen.

Für eine Standard-PCR wurden 50-100 ng Plasmid-DNA in einem 100 µl Ansatz (2,5 U TaqPlus™ Precision Polymerase, 0,25 mM dNTP-Mix, 5 pmol 3'-Oligonukleotide, 5 pmol 5'-Oligonukleotide, 1 x Reaktionspuffer) unter nachfolgenden Bedingungen amplifiziert:

2.2.2.1.2. Standard-PCR

Standard-PCR Ansatz (50µl)

PCR- Reaktionsbedingungen

Standard-PCR Ansatz (50µl)		PCR- Reaktionsbedingungen			
			Temperatur	Dauer	Zyklen
50 - 100 ng	Plasmid-DNA als Matrize	Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
20 pmol	5'-Oligonukleotide	Denaturierung	95°C	30 sec	30
20 pmol	3'-Oligonukleotide	Annealing	50°C- 60°C	45- 55 sec	30
1,125 U	TaqPlus™ Precision Polymerase	Elongation	72°C	2 – 3 min	30
1 x	PCR Reaktions-Puffer	Finale Elongation	72°C	10 min	1
0,125 µmol	MgCl ₂				
0,01 µmol (je Nukleotid)	dNTP- Mix (NEB)				

Mit H₂O steril auf 50µl auffüllen

Tab. 2.1: Reaktionsbedingungen und 50µl Ansatz einer Standard-PCR.

2. Materialien und Methoden

Als Richtlinie für die Hybridisierungstemperatur wurden 5°C unter dem Schmelzpunkt des Oligonukleotides gewählt, als Polymerisationszeit wurde 1 min pro kb eingeplant.

2.2.2.1.3. QuickChange Mutagenese

Als Matrize diente *dam*-methylierte Plasmid-DNA, die mittels Pfu-Polymerase amplifiziert wurde. Zwei komplementäre Oligonukleotide, welche beide in ihrer Sequenz den gewünschten Basenaustausch tragen, dienten als Primer.

Die PCR-vermittelte Mutagenese wurde nach Herstellerangaben in einem 50 µl Ansatz (25-50 ng Matrizen-DNA, 2,5 U Pfu-Polymerase, 0,25 mM dNTP-Mix, 125 ng *sense*-Primer, 125 ng *antisense*-Primer, 1 x Reaktionspuffer) unter Standard-Bedingungen durchgeführt.

Durch die anschließende Zugabe des Restriktionsenzym *DpnI* zu dem *Pfu*-Amplifikationsansatz, das spezifisch das *dam*-Methylierungsmuster 5'-G^{m6}ATC-3' erkennt, wird die methylierte Matrizen-DNA durch Verdau ausgesiekt. Die mutierte, zirkuläre, unmethylierte und unligierte dsDNA wird nach der Transformation von *E. coli* durch die bakterielle DNA-Ligase geschlossen.

2.2.2.1.4. Fusions-PCR

Mittels einer Fusions-PCR kann aus zwei DNA-Matrizensträngen ein Fusionsprodukt hergestellt werden. Hierzu wurden mit dem TaqPlusTM Precision System und der Pfu-DNA-Polymerase zunächst zwei PCR-Produkte mit einem Überhang aus ca. 15-25 Nukleotiden hergestellt, wobei die eingesetzten Primerpaare jeweils aus einem Primer mit Restriktionsschnittstellen und einem Primer mit Überhang bestanden. Der Überhang wurde dabei so gewählt, daß er komplementär zu dem zu fusionierenden PCR-Produkt war. In einem 50 µl Reaktionsansatz aus aufgereinigten PCR-Produkten, Oligonukleotiden, Reaktionspuffer, Pfu-Polymerase und dNTP-Mix wurden diese nun fusioniert, indem nach der Strangdenaturierung die komplementären Überhänge hybridisiert und die neu entstandenen Überhänge durch die DNA-Polymerase aufgefüllt wurden. Die Teilfragmente dienten hiernach als Matrize für die Amplifikation des Fusionsproduktes in einem gemeinsamen PCR-Ansatz mit den beiden äußeren Oligonukleotiden. Das neu gewonnene Fusionsprodukt stand dank der durch die Primer mitgelieferten, singulären Schnittstellen für weitere Klonierungsarbeiten zur Verfügung.

2.2.2.1.5. „Colony screening“

Zur Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone wurde das PCR-*screening* eingesetzt. Für den PCR-Ansatz und das Amplifikationsprogramm wurden die gleichen Bedingungen gewählt wie bei der Plasmid-PCR mit der Taq-Polymerase. Als Matrize dienten gepickte Klone aus der Plasmid-Transformation.

2.2.2.2. Enzymatische Spaltung

Zur Analyse der aus *E. coli* isolierten Plasmid-DNA, sowie für präparative Zwecke wurde die DNA mit Restriktionsendonukleasen (Roche, Mannheim oder New England BioLabs, Schwalbach Taunus) enzymatisch geschnitten. Eine Einheit [U] bezeichnet dabei die Enzymaktivität, die benötigt wird, um 1 µg DNA in einer Stunde bei optimalen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen vollständig zu schneiden.

2.2.2.2.1. Restriktionsenzyme

Für Klonierungen wurden Enzyme mit den benötigten Puffern von den Firmen Roche oder New England BioLabs (NEB) GmbH, Schwalbach/Taunus verwendet.

2.2.2.2.2. DNA-Molekulargewichtsstandards

MGS-VII, MGS-VIII	Roche
1kb- Standard	NEB, Schwalbach/Taunus

2.2.2.2.3. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Zur Charakterisierung gereinigter Plasmid-DNA wurde 1 µg DNA mit 10 U Restriktionsendonuklease und 1/10 Volumen Restriktionspuffer in einem 20 µl Ansatz für 1 Stunde bei entsprechender Temperatur geschnitten.

Für präparative Zwecke wurden in einem Standardansatz 5 µg bis 10 µg Plasmid-DNA mit je 60 U Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl ebenfalls mit 1/10 Volumen Restriktionspuffer für mindestens zwei Stunden bei entsprechender Temperatur inkubiert.

War ein Verdau mit mehreren Enzymen notwendig, wurden die Pufferbedingungen so gewählt, dass alle eingesetzten Enzyme mindestens 75-100% ihrer maximalen Aktivität aufwiesen. Bei nicht kompatiblen Bedingungen wurde zuerst mit dem ersten Enzym und entsprechendem Puffer verdaut, die DNA mittels Natriumacetat-Fällung aufgereinigt und anschließend mit dem zweiten Enzym, dem dazugehörigen

2. Materialien und Methoden

Puffersystem und entsprechendem Temperaturoptimum geschnitten. Enzymatische Spaltungen, welche *dam*- und *dcm*-sensitive Restriktionsnukleasen erforderten, wurden mit Plasmiden durchgeführt, die aus dem Stamm GM2163 präpariert worden waren.

2.2.2.3. DNA-Sequenzierung

Alle DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma GeneArt (Regensburg) auf der Basis der Dideoxynukleotid-vermittelten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Die Proben wurden sequenzierfertig aufbereitet (Gesamtvol. 8 µl; DNA 200-500 ng; 1 µl Primer) und nach Sequenzierung durch das Computerprogramm SeqMan (Version: Windows 32 SeqMan 3.57© 1989-1997 DNASTAR inc.) ausgewertet.

2.2.3. DNA-Fragmentisolierung aus Agarose-Gel

2.2.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung linearisierter DNA-Fragmente (0,1 kbp bis 10 kbp) erfolgte ihrem Molekulargewicht entsprechend bei konstanter Spannung und Stromstärke (50 V bis 150 V) in einem 0,8 bis 2,0% Agarosegel in TBE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8,0, 20 mM Borsäure, 2 mM EDTA). Dabei wurde die Agarose im Puffer unter Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 50 ng/ml versetzt. Die DNA-Proben wurden mit einem 1/10 Volumen DNA-Auftragspuffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v) Saccharose) und zusammen mit dem entsprechenden DNA-Molekulargewichts-Standard VII oder VIII (Roche bzw. 1 kb (NEB) zur Abschätzung der Fragmentgröße aufgetragen.

Anhand eines UV-Durchleuchtschirmes (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) konnte die aufgetrennte DNA bei 312 nm Wellenlänge detektiert werden, was dem Absorptionsmaximum des mit der DNA interkalierenden Etidiumbromids entspricht.

2.2.3.2. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die über Agarosegelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente wurden nach Ausschneiden aus dem Gel mit Hilfe des „*QIAquick Gel Extraktions Kit*“ (Quiagen, Düren) nach Angaben des Herstellers für weitere Klonierungsschritte isoliert. Dieses System eignet sich für Molekülgrößen von 200 bp bis 10 kbp und beruht auf der selektiven Bindung der DNA unter Hochsalzbedingungen an die Silikat-Säulenmatrix

2. Materialien und Methoden

und der anschließenden Elution anhand 10 mM Tris/HCl pH 8,5 bei Niedrigsalzbedingungen von der Säule.

DNA aus enzymatischen Reaktionen wurde hingegen mittels Natriumacetat-Fällung aufgereinigt. Dazu wurden 1/10 Volumen 3 M NaAc und das 2,5-fache Volumen 100% Ethanol zum DNA-Ansatz gegeben, bei 4°C und 14.000 rpm gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Puffer wieder aufgenommen.

Durch beide Methoden wird die DNA von Oligonukleotiden, Nukleotiden, Enzymen und Salz befreit und konnte für nachfolgende Reaktionen verwendet werden

2.2.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Die aus dem Agarosegel extrahierten DNA-Fragmente wurden in den molaren Verhältnissen Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:10 für die Ligation eingesetzt. Der Standardligationsansatz von 40 µl enthielt die folgenden Komponenten: neben der Fragment-DNA 100 ng Vektor-DNA, 2 µl (=40 U) T4-DNA-Ligase (New England BioLabs, Schwalbach Taunus) und 4 µl des 10-fach konzentrierten T4-Ligase-Puffers (20 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM Dithiothreitol, 5 µg/ml BSA (*bovine serum albumine*), 0,1 mM ATP).

Die Reaktion erfolgte entweder eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) oder bei einem Temperaturgradient von 0°C bis RT über Nacht (ÜN) und konnte anschließend direkt zur Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen eingesetzt werden.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Eukaryotische Zelllinien und Nährmedien

Die für Expressionsstudien verwendete adhärente Zelllinie H1299 (humane, p53-negative Lungenkarzinomzellen) aus dem Zellbestand der Arbeitsgruppe Wagner, (RIMMH) wurde bei 37°C und 5% CO₂ in serumfreiem DMEM-Medium (*Dulbecco's Mod Eagle Medium* mit (+)L-Glutamin; GIBCO/BRL GmbH, Eggenstein, Leopoldshafen) kultiviert, das mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS; GIBCO/BRL) und mit einem 1% Penicillin/Streptomycin (PAN-System, Aidenbach) Antibiotikagemisch versetzt wurde. Die Pen/Strep Stammlösung enthält 100 µg/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Die Inaktivierung des FKS erfolgte in einem Zeitraum von 30 min bei 56°C.

2.3.2. Zellkulturtechniken

2.3.2.1. Bestimmung der Lebendzellzahl

Nach gründlicher Resuspension wurden 100 µl der Zellkultur mit derselben Menge 0,5%iger Trypanblau-Lösung (Merck) vermischt, und die Lebendzellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch das Eindringen der Färbelösung durch die Zellwand toter Zellen konnten diese anhand ihrer Blaufärbung von den transparenten, lebenden Zellen im Mikroskop unterschieden werden. Eine Zelle in einem Zählkammer-Quadranten entspricht 10^4 /ml Zellen Ausgangssuspension.

2.3.2.2. Lagerung eukaryotischer Zellen

Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, eignen sich zum Einfrieren. Dazu wurden diese durch Zentrifugieren bei 300xg pelletiert, das Pellet in 1 ml Einfriermedium (Zellkulturmedium mit 10% DMSO) aufgenommen und die Zellen in einem Styroporgefäß ÜN bei -70°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff für die dauerhafte Lagerung überführt.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen zügig aufgetaut, in eine 75 cm³ Kulturflasche mit vorgewärmten Kulturmedium überführt, und ÜN im Brutschrank inkubiert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie oben beschrieben kultiviert.

2.3.2.3. CaHPO₄-Transfektion von adhärennten H1299/ 293T-Zellen

Adhärennte Zellen lassen sich effizient mit der CaHPO₄-Präzipitations-Methode (Graham und Eb, 1973) transfizieren, bei der ein CaHPO₄-DNA-Präzipitat über Endozytose von der Zelle aufgenommen wird.

Hierzu wurden je nach gewünschter Proteinnmenge am Vortag 3 ml Zellsuspension in 6-well-Platten oder in 14 ml Petrischalen (Falcon, Heidelberg) ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt.

Für die Transfektion wurde die Plasmid-DNA mit 2,5 M CaCl₂ (steril filtriert) vereint und unter vortexen (Stufe 4-5) tropfenweise zu 2xHeBS-Puffer (HEPES *buffered saline*; 8,2 g NaCl, 5,95 g HEPES, 1,105 g Na₂HPO₄ ad 500 ml H₂O, pH 7,05, steril filtriert) pipettiert. Während des 20-minütigen Inkubationschrittes bei RT bildete sich das Präzipitat aus, das anschließend tropfenweise auf die Zellen gegeben wurde. 8-16 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit PBS_{steril} (*phosphate buffered saline* (Sambrook *et al.* 1989); 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM

2. Materialien und Methoden

KCl) gewaschen, das Medium wurde gewechselt und anschließend wurden die Zellen bis zur Ernte kultiviert.

	6-well	Petrischale
Aussaat Zellanzahl	2,5- 3 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶
Volumen DMEM	3 ml	14 ml
Transfektionsansatz	15 µg DNA	45 µg DNA
	30 µl 2,5 M CaCl ₂	90 µl 2,5M CaCl ₂
	ad 300 µl H ₂ O	ad 900 µl H ₂ O
	300 µl HeBS	900 µl HeBS

Tab. 2.2: Transfektionsbedingungen

2.3.2.4. Ernte und Aufschluß der Zellen

Zur Analyse der Expression viraler Proteine in eukaryotischen Zellen mussten die Zellen geerntet und aufgearbeitet werden.

Dazu wurde der Zellrasen mit kaltem PBS (*phosphate buffered saline* (Sambrook *et al.*, 1989)) gewaschen und durch Versetzen mit Trypsin/EDTA (0,05/0,02%ig in PBS_{ohne} Ca⁺Mg, PAN Biotech GmbH) quantitativ von der Oberfläche des Gefäßes gelöst. Nach Zentrifugation bei 300xg wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet zur weiteren Aufarbeitung in 100 µl (6-well) bzw. 300 µl (Petrischale) RIPA-Puffer (5 ml Tris/HCl (1M) pH 8,0, 15 ml NaCl (1M), 1 ml SDS (10%), 1 ml Nonidet P40, 0,5 g Na-Deoxycholat ad 100 ml dH₂O) lysiert und 30 min auf Eis unter vortexen inkubiert. Nach Abtrennen der Zellfragmente durch weiteres Zentrifugieren bei 20.800xg wurde der Überstand des Zelllysats, die geernteten Proteine, vorsichtig in gekühlte Cups überführt und bei -20°C für Biorad Assay und Western-Blots gelagert.

2.3.3. Proteinanalyse

2.3.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford-Biorad

Für die Westernblotanalyse der exprimierten Proteine aus den transfizierten und lysierten H1299-Zellen wurde zunächst deren Gesamtproteingehalt pro Ansatz quantitativ mit dem *Bradford-Protein-Assay* nach Angaben des Herstellers (Biorad, München) bei konstanter Wellenlänge bestimmt. Nach Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford Reagenz) an positiv geladene Proteine im

sauren Milieu tritt eine Farbänderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte, braunrote, kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte, blaue, anionische Form) ein. Diese Absorptionzunahme bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung, die sich aus dem Vergleich der gemessenen OD mit den Werten einer BSA-Eichkurve näherungsweise bestimmen lässt.

Die zu analysierende Probe wurde im Verhältnis 1:800 in PBS verdünnt, 200 μ l Bradford Reagenz wurde hinzugefügt und nach vortexen ca. 20 min bei RT inkubiert. Wegen der starken Bindung des Farbstoffes an Glas wurden Kunststoff-Einmalküvetten zur Absorptionsbestimmung eingesetzt. Die Proben wurden nun photometrisch bei 595 nm vermessen (Uvikon 930 Spektrophotometer, Kontron Instruments, Neufahrn), wobei reines PBS mit Färbelösung als Referenzwert diente.

2.3.3.2. Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Das Prinzip der Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht in Gegenwart eines hohen SDS-Überschusses. Dabei lagert sich das negativ geladene SDS in konstanten Gewichtsverhältnissen an die Proteine an und kompensiert deren Eigenladungen derart, dass alle Proteine annähernd ihrer Größe entsprechend im elektrischen Feld wandern können.

Hierzu wurde ein Polyacrylamidgel mit zwei Schichten gegossen, wobei sich die beiden Schichten in ihrem Gehalt an Acrylamid unterscheiden. Der Aufbau der Gelapparatur und das Gießen der Gele (Zusammensetzung siehe Tab. 2.3.) erfolgte gemäß Herstellerangaben (Biometra, Göttingen). Zuerst treten die Proteine in das niederprozentige Sammelgel ein, wodurch die Proben in eine gemeinsame Lauffront gebracht werden bevor sie in das höherprozentige Trenngel übergehen. Im Trenngel erfolgt nun die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrer jeweiligen Größe. Sie können je nach Proteingröße mit Konzentrationen an Acrylamid von 5% bis 15% präpariert werden.

Pro Ansatz wurden entweder 25 μ l der zu untersuchenden Zelllysate oder 180 bis 360 μ g Protein mit 5-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer (125 mM Tris, pH 6,8, 2% 2- β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,005% Bromphenolblau) versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in einem speziellen SDS-Page Laufpuffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,5, 190 mM Glycin, 0,1% SDS) bei 20 bis 60 mA.

2. Materialien und Methoden

	Trenngellösung				Sammelgellösung
	7,5%	10%	12,5%	15%	5%
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	4,5 ml	6 ml	7,5 ml	9 ml	0,99 ml
1,88 M Tris/HCl ph 8,8	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml	1,2 ml
0,625 M Tris/HCl ph 6,8	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml	1,2 ml
0,5 % SDS	6,3 ml	4,8 ml	3,3 ml	1,8 ml	2,6 ml
TEMED	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	6 µl
10 % APS	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	30 µl

Tab. 2.3: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgellösung der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele.

Der für die hier beschriebene SDS-Page verwendete Protein-Molekulargewichtsstandard *Precision Plus ProteinTM* wurde von der Firma Bio-Rad (München) bezogen.

2.3.3.3. Western-Blot Analyse

Der Western-Blot dient dem spezifischen Nachweis eines Proteins durch den Einsatz monoklonaler oder polyklonaler Antikörper. Man fixiert die Proteinprobe zunächst auf einer Membran. Für die Detektion des Zielproteins werden zwei Arten von Antikörpern verwendet. Der Nachweis von Proteinen beruht auf der spezifischen Bindung eines primären, monoklonalen Antikörpers am Zielprotein und dessen Erkennung durch einen sekundären, Enzym-konjugierten Antikörper. Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Alkalische Phosphatase (AP) setzt als Substrat BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylophosphat) oxidativ zu einem blaugefärbten Produkt um und führt schließlich zu einer Anfärbung des Proteins. NBT dient bei dieser Reaktion als Oxidationsmittel, wird ebenfalls zu einem blauen Produkt umgesetzt und wirkt somit farbverstärkend.

2.3.3.3.1. Fixierung der Proteine auf einer Nitrozellulosemembran

Der Transfer von aufgetrennten Proteinen aus einem Polyacrylamid-Gel auf Nitrozellulose (Millipore Immobilon NC pure, Millipore, Bedford) erfolgte in einer Fast-

2. Materialien und Methoden

Blot „*semidry*“-Apparatur (Biometra, Göttingen) bei einer Stromstärke von 5 mA/cm² je nach Proteingröße für 45 bis 60 Minuten. Als Puffer wurde ein Transferpuffer (150 mM Glycin, 25 mM Tris, 10% Methanol) verwendet, in dem das Trenngel sowie die Nitrozellulose zuerst äquilibriert wurden. Die denaturierten Proteine wandern im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts in Richtung Anode und werden auf der Nitrozellulosemembran irreversibel gebunden.

2.3.3.3.2. Ponceaurot-Färbung

Um den Proteintransfer zu überprüfen und Proteingrößenstandard zu markieren, wurde die Membran reversibel mit Ponceaurot S-Lösung (0,5 g Ponceau-S, 2 ml Eisessig, ad 500 ml H₂O bidest) angefärbt und anschließend durch Waschen mit TTBS-Puffer (tween-tris buffered saline: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/ HCl, pH 7,5, 0,02 M Tween 20) wieder vollständig entfärbt.

2.3.3.4. Antikörpervermittelte Proteindetektion

Zur Absättigung freier und unspezifischer Bindungsstellen auf der Nitrozellulose nach dem Proteintransfer wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4°C mit einer 5%igen Magermilch-TBS- (tris bufferes saline: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) Lösung bei 50min⁻¹ geschüttelt (Horizontalschüttler Typ 3006, GFL, Burgwedel). Es folgten vier Waschgänge in TTBS für je 5 min, um Milchpulverreste zu entfernen, bevor der erste Antikörper in einer optimalen Verdünnung in TTBS-Puffer auf die Membran gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert wurde. Es folgten wiederum vier Waschschrte mit TBS und TTBS, bevor die Membran mit dem sekundären, AP-konjugierten Antikörper für mindestens 1 h geschwenkt wurde.

Nach erneuten Waschen zur Entfernung des überschüssigen Antikörpers folgte die Färbung mit dem chromogenen Substrat der alkalischen Phosphatase (68 µl NBT, 70 µl BCIP in 20 ml AP-Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 100 mM Tris (Sambrook *et al.* 1989)). Die Färbereaktion wurde durch Waschen der Nitrozellulosemembran mit H₂O_{bid.} abgestoppt.

Die in der Arbeit eingesetzten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen (in TTBS) sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst:

2. Materialien und Methoden

Antikörper	Verdünnung	Antikörperbeschreibung
Anti-p24 (13/5)	1:1000, 1:500	monoklonaler anti-Maus Antikörper (aa. 147-154) (Wolf <i>et al.</i> 1990)
Anti-V3 NEA 9305	1:500	monoklonaler Anti-Maus Antikörper von Du Pont (Roche, NEA 9305)
HRP-anti-Maus	1:2000	Anti-Maus Antikörper, HRP-konjugiert (Kaninchen) (Dako, Hamburg)
AP-anti-Maus	1:2000	Anti-Maus Antikörper, AP-konjugiert (Kaninchen) (BioRad, München)

Tab. 2.4: Eingesetzte AK der AK-vermittelten Proteindetektion im Rahmen der Western-Blot-Analyse.

2.4. Immunologische Studien

2.4.1. Versuchstiere

Für die immunologischen Studien wurden weibliche BALB/c Mäuse (H-2^d) (Charles River, Sulzfeld) in den Tierlaboratorien der Universität Regensburg gehalten und im Alter von acht bis zwölf Wochen mit der entsprechenden Plasmid-DNA intramuskulär immunisiert.

2.4.2. Intramuskuläre Immunisierung von BALB/c Mäusen

50 µg endotoxinfreie Plasmid-DNA wurde in PBS_{ohne} gelöst. Der Gesamtansatz betrug 100 µl DNA-PBS Lösung. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse mit Isofluran (Abbot GmbH&Co. KG, Wiesbaden) durch Inhalation betäubt und anschließend in beide Schienbeinmuskeln (*m. tibialis anterior*) jeweils 50 µl, d.h. der halbe Ansatz an Plasmid-DNA injiziert (*Prime*). Nach der Grundimmunisierung wurden die Mäuse im Abstand von vier Wochen mit der gleichen Menge an Plasmid-DNA nachimmunisiert (*Boost*).

2.4.3. Auslese der humoralen Immunantwort

2.4.3.1. Serumgewinnung

Für die Untersuchungen der Immunantwort der immunisierten Mäuse wurde Blutserum benötigt. Zur Serumgewinnung wurde den Mäusen jeweils eine Woche

2. Materialien und Methoden

nach Grund- bzw. Auffrischungsimpfisierung Blut durch Anritzen der Schwanzvene entnommen. Die Blutentnahme wurde durch vorheriges Erwärmen (3-5min) der Mäuse mittels einer Rotlichtlampe erleichtert. Zur Gewinnung des Serums wurde das Vollblut eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend eine Stunde auf 4°C abgekühlt. Der Blutkuchen wurde 15 min bei 4°C und 10.000xg in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) pelletiert, vorsichtig das Serum abgenommen und für 30 min bei 56°C inaktiviert. Bis zur Austestung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.4.3.2. Bestimmung der Antikörper-Titer: Gag-spezifischer AK-Elisa

Die Quantifizierung der proteinspezifischen Antikörper in den Seren erfolgte im ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*). Hierzu wurden mitteladsorbierende 96-Well-Platten (Nunc, Wiesbaden) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit je 100 ng Pr55^{gag}-VLPs in 100 µl 0,2M Carbonatpuffer (150 mM NaCl, 100 mM Na-Carbonat, pH 9,5) beschichtet (Endkonzentration der VLPs: 1 µg/ml).

Am nächsten Tag wurde die Proteinlösung verworfen, die Platten wurden viermal mit 200-300 µl Waschlösung (PBS/0.05% Tween 20) pro Well gewaschen und nach jedem Waschschrift gründlich ausgeklopft. Anschließend wurde jede Vertiefung mit 100 µl einer bestimmten Serumverdünnung (Verdünnungspuffer: PBS, 2% Tween 20, 3% FKS) befüllt, und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Seren ausgeschüttet, die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und mit je 100 µl eines in Verdünnungspuffer verdünnten (1:2000) anti-Maus Ig-HRP Antikörpers (Dako, Hamburg) 1 h bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte die Gesamtmenge an spezifischen Gag-Antikörpern in den immunisierten Mäusen detektiert werden.

Neben der Bestimmung der absoluten Gag-Ig-Antikörpertiter (IgG_{ges}) wurden parallel die Isotypen IgG₁ und IgG_{2a} bestimmt. Anhand der Verhältnisse einzelner AK-Isotypen zueinander können im murinen System eindeutige Zuordnungen der CD4⁺ T-Zell vermittelten Immunantwort in Richtung T_{H1} (IgG1<IgG2a) bzw. T_{H2} (IgG1>IgG2a) getroffen werden. Dazu wurden die Platten mit 100µl einer im Verdünnungspuffer verdünnten (1:2000) IgG₁-HRP bzw. IgG_{2a}-HRP (beide Antikörper von BD, Heidelberg) Antikörperlösung beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach erneutem fünfmaligen Waschen wurden die Platten ausgeklopft und die Färbereaktion durch die Zugabe von je 100 µl TMB-Substratlösung (TMB Substrat) nach Angaben des Herstellers (BD, Heidelberg) durchgeführt. Nach der

2. Materialien und Methoden

Farbentwicklung (ca. 15- 30 min) im Dunkeln wurde die Reaktion mit 100 µl H₂SO₄ pro Napf abgestoppt.

Die Absorption der im positiven Fall gelb/orange-farbigen Lösung wurde bei einer Wellenlänge von 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) in einem ELISA-Reader (Biorad, München) bestimmt. Serumverdünnungen wurden als positiv gewertet, wenn sie den 2,5- fachen OD-Wert des parallel gemessenen Negativserums (eines nicht immunisierten Versuchstieres) bei gleicher Serumverdünnung überschritten haben.

2.4.4. Auslese der zellulären Immunantwort

2.4.4.1. Präparation und Isolierung von Splenozyten

Für die Auslesung der zellulären Immunantwort immunisierter Mäuse mittels verschiedener immunologischer Methoden wurden isolierte Splenozyten (Milzzellen) benötigt.

Eine Woche nach der *Booster*-Immunisierung wurde die Hälfte der Versuchstiere pro Immunisierungsgruppe durch Genickbruch getötet, deren Milzen wurden unter sterilen Bedingungen entnommen und in 10 ml Medium überführt. Zur Gewinnung von Einzelzellsuspensionen wurden die Milzen unter einer Sterilbank mit Hilfe eines Stempels einer 5 ml Spritze vorsichtig durch ein Nylonsieb (Falcon, Heidelberg, 100 µm Porengröße) in einer Petrischale zerrieben. Diese Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und in einer Tischzentrifuge bei Raumtemperatur mit 300xg für 5 min pelletiert.

Zur Entfernung der Erythrozyten (Hämolyse) wurde das Pellet pro verwendete Milz in 5 ml Lysepuffer (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2), aufgenommen und 5 min bei 300xg zentrifugiert. Die drei nachfolgenden Waschschrte mit 50 ml PBS/ 5%FCS dienten der Entfernung des freigesetzten Hämoglobins.

Anschließend wurde die Lebendzellzahl durch Anfärbung mit Trypanblau (0,4% Trypanblau/PBS) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellzahl durch Zugabe von Komplett-Medium (RPMI-Medium (PAN Biotech) mit 5% FKS, 1% Penicillin/Streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 1% Glutamin) auf eine Konzentration von 2x10⁷/ml eingestellt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank gehalten. Auf diese Weise konnten je nach Größe der Milz bis zu 10⁸ Zellen gewonnen werden.

2.4.4.2. Peptide zur Restimulation

Zur spezifischen *in vitro* Restimulation der T-Zellen wurden Peptide verwendet. Das Peptid A9I AMQMLKETI ist als murines HIV-IIIB p24 (aa 197-205) CTL-Epitope des Haplotyps H-2K^d beschrieben worden (Nakamura *et al.*, 1997). Das Peptid R10I RGPGRFVVTI ist ein murines V3/IIIB (gp160: aa. 318-327)-spezifisches CTL-Epitop (Haplotyp H-2D^d) (Takahashi *et al.* 1988; Hanke, 1998). Als unspezifische Peptid-Kontrolle wurde das PSA-Peptid TKVVHYRKWIKD eingesetzt. Die drei Peptide wurden von der Firma Biosynton, Berlin synthetisiert und HPLC gereinigt. Die lyophilisierten Peptide wurden in HPLC-grade DMSO gelöst (10mM) bei 4°C gelagert.

Zur Restimulation Pol-spezifischer T-Zellen wurden Peptid-Pools verwendet. Diese wurden von der EUROVACC-foundation zur Verfügung gestellt und setzen sich aus 15-mer-Peptiden mit einer Überlappung von jeweils 11 Aminosäuren zusammen, die dadurch die komplette Aminosäuresequenz von Pol-IIIB abdecken. GPN-1, GPN-2, GPN-3 und GPN-4 bildeten dabei Pools von jeweils 56 Peptiden (Gómez *et al.*, 2007).

2.4.4.3. ELISPOT-Assay: Quantifizierung IFN γ -sezernierender Zellen

Mit Hilfe des *enzyme linked immunospot assays* (Elispot) können antigenspezifische Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion detektiert werden.

Zur Bestimmung der Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen nach *in vitro* Restimulation der Splenozyten mit spezifischen *Recall*-Antigenen wurde zunächst die mit Nitrozellulose beschichtete 96- well-Kulturplatte MAHA-S45 (Millipore, Eschborn) mit 100 μ l eines 5-10 μ g/ml in PBS verdünnten Anti-IFN γ -Antikörpers (C, „capture“) (BD, Heidelberg) über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 4maligem sterilen Waschen mit je 200 μ l PBS/ 10%FCS wurde die Platte 1 h bei 37°C mit 200 μ l PBS/10% FCS blockiert. Die Stimulation von je 100 μ l einer entsprechenden Verdünnung der Splenozytensuspension (1×10^6 Zellen pro Ansatz) erfolgte direkt in der Platte durch Zugabe von je 100 μ l des stimulierenden Reagenz (10 μ M Peptid (2 μ g), PMA (0,1 μ g/ml), Ionomycin (1 μ g/ml)) bei 37°C und 5% CO₂ für 24 Stunden. Die Zellsuspension wurde abgezogen und die noch anhaftenden Zellen durch 6-maliges Waschen (je 200 μ l PBS mit 0,05% Tween 20, je 3 min Inkubation mit Waschpuffer) lysiert.

2. Materialien und Methoden

Danach erfolgte die Zugabe des biotinylierten anti-IFN- γ Antikörpers (D, „Detektion“; BD Heidelberg; Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$); die Platten wurden für 2 Stunden bei RT inkubiert, anschließend gewaschen (10mal je 200 μl PBS/Ansatz, pro Waschschrift drei Minuten Inkubation) und für weitere 2 Stunden mit einem Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP)-Konjugat (Roche Mannheim; 1:5000 in PBS) inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (10-mal je 200 μl PBS/Ansatz) erfolgte die Färbereaktion durch Zugabe des Enzymsubstrates NBT/BCIP (Roche, Mannheim). Dafür wurde eine Färbelösung (200 μl NBT/BCIP-Stammlösung auf 10 ml Färbepuffer (0,1 M Tris-Puffer, pH 9,5 mit 0,05 M MgCl_2 , 0,1 M NaCl)) hergestellt und jeweils 100 μl /Ansatz eingesetzt. Nach 15-30 min wurde die Reaktion durch Waschen der Platten mit entionisiertem Wasser gestoppt. Die Auszählung der Spots (SFC; *spot forming cells*) erfolgte nach Trocknen (RT, ÜN) der Platten durch ein automatisiertes ELISPOT-Lesegerät (Bioreader 2.000; Bio-Sys, München) oder per Auge. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat; 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Ionomycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma, Deisenhofen) stimuliert, als Negativkontrolle mit dem irrelevantem PSA-Peptid.

Cytokin	Antikörper-Paar	Klon	Konzentration	Verdünnung
IFN γ	anti-Maus IFN γ	C R4-6A2	1 mg/ml	1:100- 1:200
	Biotin-anti-Maus IFN γ	D XMG1.2	0,5 mg/ml	1:50- 1:100

Tab. 2.5: Eingesetzte IFN γ -AK zur Bestimmung der Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen im Rahmen der ELISPOT-Analyse.

2.4.4.4. FACS-Analyse: Quantifizierung der intrazellulären INF γ -Produktion stimulierter CD8⁺-Lymphozyten

Zur Bestimmung der Frequenz Pr55^{gag}-spezifischer zytotoxischer T-Zellen wurden die Milzzellen der Mäuse verschiedener Immunisierungsgruppen *in vitro* auf 2×10^7 Zellen pro ml mit Komplettmedium eingestellt. Danach wurden jeweils 100 μl der Milzzellsuspension und 0,2 μl Blockierungslösung BFA (Brefeldin A, Sigma #B - 6542) pro Napf einer 96- well-Flachbodenplatte pipettiert.

Zur Bestimmung der Zahl spezifischer CD8⁺ T-Zellen wurden diese mit den Peptiden A9I und R10I restimuliert. Als Positivkontrolle und unspezifisches Aktivierungsantigen wurden je 0,1 μl PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, #P-8139) und Iono

2. Materialien und Methoden

(Iontomycin, Sigma, #I-0634) verwendet. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die entweder mit dem irrelevanten Peptid PSA oder mit 100 μ l RPMI-Medium inkubiert worden waren.

Anschließend wurden die Ansätze für sechs Stunden bei 37°C inkubiert und danach die Zellen vorsichtig für fünf Minuten bei 300xg abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit 200 μ l FACS-Puffer (PBS/1% FCS/ 1 mg/ml NaN₃) wurden die Zellen in 96- well-Rundbodenplatten transferiert. Die Blockierung der F_c-Rezeptoren erfolgte durch Zugabe von 1 μ l CD16/32 Antikörper (CD16/32- α -mouse: BD Heidelberg #01241A) in 100 μ l FACS-Puffer. Die Inkubationsdauer betrug mindestens 10 min bei 4°C. Zur Differenzierung von T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen wurden zur Oberflächenfärbung pro Napf 10 μ l einer 1:20 Antikörperverdünnung von CD4-FITC (CD4-FITC- α -mouse, BD Heidelberg #01064D) und CD8-APC (CD8a-APC- α -mouse; BD Heidelberg #01049A) zugegeben und die Zellen für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit FACS-Puffer-II (PBS/1 mg/ml NaN₃) wurden pro Napf 250 μ l Cytotfix/Cytoperm (4% PFA, 1% Saponin; BD Heidelberg #2090KZ) zugegeben und die Zellen auf Eis für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit jeweils 200 μ l Perm/Wash (PBS, 0,1% Saponin; BD Heidelberg #2091KZ) erfolgte die intrazelluläre Färbung unter Verwendung eines IFN γ -PE- α -mouse-Antikörpers (BD Heidelberg #18115A). Pro Napf wurden 100 μ l Perm/Wash Puffer vorgelegt, 10 μ l einer 1:20 Verdünnung dieses Antikörpers zugegeben und die Ansätze für 25 Minuten im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach anschließendem Waschen mit Perm/Wash Puffer wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die darauf folgende Bestimmung IFN γ -produzierender Zellen wurde am FACS-Calibur (BD Heidelberg) ausgelesen. Zuerst wurde die Gesamtpopulation an Lymphozyten bestimmt und anschließend mit Hilfe der Oberflächenmarker auf CD4- und CD8⁺-Zellen *gated*. Mindestens 25.000 der CD8⁺-Zellen wurden aufgenommen und bezüglich ihrer IFN γ -Produktion untersucht.

3. Ergebnisse

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe wurden verschiedene vollsynthetische DNA-Impfstoffkandidaten hergestellt, deren Ausgangsbasis das kodonoptimierte Konstrukt „GPN“ in pcDNA 3.1. war. Hierauf basierend wurden in einer Vorarbeit (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) verschiedene Abwandlungen der Aminosäuresequenz eingeführt, die neben unterschiedlichem Aktivitätszustand der viralen Protease (PR) einen ribosomalen Leserastersprung (*frameshift*) durch die Einführung einer *slippery site* sowie die An- bzw. Abwesenheit der nicht funktionellen *nef*-Sequenz umfasste und diese Modifikationen anhand von *in vitro* Expressions- sowie *in vivo* Immunogenitätsstudien im BALB/c Tiermodell untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Beurteilung der Expression und Immunogenität von Gag, da die Auslese nach Pol bei lediglich sehr geringer Pol-Expression (verglichen zu publizierten Studien: Nabel *et al.*, 2000; Megede *et al.*, 2003) nur eingeschränkt durchführbar war.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, neben Gag auch Pol indirekt anhand eines C-terminal fusionierten V3-spezifischen Epitops auslesen zu können und in Folge dessen vergleichende Studien der modifizierten neuen HIV-Vakzinekandidaten hinsichtlich der Einflüsse der PR, des *frameshifts*, von Nef sowie der An- bzw. Abwesenheit von Gag auf Expression und Immunogenität hin vornehmen zu können. Hierfür sollte die Gensequenz von *env-V3* 3'-terminal an die *gagpolnef*-Kassette der vorbeschriebenen Konstruktvarianten angefügt werden. Zudem war die Generierung weiterer Konstrukte vorgesehen, deren Insert lediglich aus *polnef*- oder *pol*-Gensequenzen mit 3'-ständigem V3 bestand, so daß Einflüsse von *gag* oder des natürlichen ribosomalen *frameshifts* auf die Immunogenität der Konstrukte ausgeschlossen werden konnten.

3.1. Klonierung

3.1.1. Ausgangskonstrukte

3.1.1.1. GPN PR-

Als Ausgangskonstrukt für alle aufgeführten Klonierungen diente „GPN PR-“. Dieses an den humanen Kodongebrauch angepasste Durchleseprotein, das sich über den *gag*- und *pol*-Leserahmen erstreckt, ist Rev-unabhängig und enthält ein durch

Aminosäureaustausch inaktiviertes Myristylierungssignal. Die Protease wurde anhand eines Aminosäureaustausches durch eine Punktmutation (von Aspartat zu Alanin) im aktiven Zentrum an der Aminosäure (AS)-Position 524 (inkl. Vektor: Position 2537) inaktiviert. In das aktive Zentrum der Reversen Transkriptase wiederum wurde das, durch Vertauschen des amino- und carboxyterminales Endes modifizierte *nef*-Gen (374 Bp., „*scrambled nef*“) an AS-Position 733 eingesetzt und das aktive Zentrum der RT am Ende angefügt. Aus Sicherheitsgründen wurde auf den Einbezug der Integrase komplett verzichtet.

3.1.1.2. Gag

Das kodonoptimierte, Rev-unabhängige synthetische „Gag“, das für Pr55^{gag} kodiert, wurde als Vergleichskonstrukt herangezogen und ist bereits in früheren Studien (Graf *et al.*, 2000) beschrieben und getestet worden.

3.1.1.3. GP PR+

Weiterhin lag als Ausgangskonstrukt „GP PR+“ (Wagner *et al.*, 2000) vor, das ebenfalls Rev-unabhängig ist. Zum Einen wurde hierbei eine 260bp lange Region in der Wildtyp (*wt*)-*frameshift*-Sequenz belassen: durch überlappende *gag*- und *pol*-Leserahmen konnte die sich hier befindliche *slippery site* erhalten werden. Zum Anderen ist die Protease bei diesem synthetischen und 4343bp langen (Insert), kodonoptimierten Konstrukt aktiv.

3.1.2. Klonierung der Konstruktvarianten

3.1.2.1. GagPolNef V3-Konstruktreihe

Da es uns bis zu Beginn dieser Arbeit nicht möglich war, den *gagpolnef*-Leserahmen auszulesen, sollte eine 110bp umfassende Gensequenz der *env*-V3-Schleife 3'-terminal in die Insertvarianten kloniert werden, um mit Hilfe anti-V3 gerichteter Antikörper V3 detektieren zu können. Dadurch sollte die indirekte Auslese des *polnef*-Leserahmens und somit die Beurteilung der Immunogenität der neu generierten Konstrukte sowohl anhand von *in vitro* als auch *in vivo*-Analysen untereinander möglich werden, die dann in Hinblick auf den Einfluß der Protease, des *frameshifts* und von Nef verglichen werden sollten.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, trägt die dem HIV-gp120 entstammende V3-Region eine immundominante Schleife („V3-loop“), die für die Immunerkennung

des HIV und seiner verschiedenen Spezies aufgrund der Tatsache von Bedeutung ist, dass die Mehrzahl neutralisierender Antikörper gegen V3 gerichtet sind.

Die Synthese der V3-Sequenz fand mittels einer Fusions-PCR statt. Die beiden, in getrennten Ansätzen hergestellten Teilfragmente dienten anschließend als Matrize für die Amplifikation des Fusionsproduktes in einem gemeinsamen PCR-Ansatz, wobei die V3-Sequenz an das 3'-Ende der Ausgangskonstrukte angefügt werden konnte.

Dafür wurde mit dem TaqPlusTM Precision System eine PCR ausgehend von dem 3'-Ende des Ausgangskonstruktes „GPN PR-“ mit den Oligonukleotiden „GPN *Kpn Nhe(f)*“ und „GPN (*b*)“ durchgeführt. Parallel hierzu erfolgte eine weitere PCR über das *V3-template* mit den Primern „V3 (*f*)“ und „V3 *Xho Xba Sac (b)*“. (Basensequenzen siehe Anhang) Beide Ansätze wurden anschließend aufgereinigt und die beiden Teilfragmente in einem gemeinsamen PCR-Ansatz mit den Oligonukleotiden „GPN *Kpn Nhe (f)*“ und „V3 *Xho Xba Sac (b)*“ fusioniert. Das so erhaltene neue Fragment wurde über die durch die Oligonukleotide mitgelieferten, singulären Schnittstellen *KpnI* und *SacI* in den Klonierungsvektor pCR-ScriptTM Ampr SK(+) subkloniert, konnte daraufhin in Expressionsvektor pcDNA umgesetzt werden und stand damit für weitere Arbeiten zur Generierung der verschiedenen Konstrukte zur Verfügung.

3.1.2.1.1. *frameshift*-Konstrukte

GPN FS PR- und GPN FS PR- V3

GPN FS PR+ und GPN FS PR+ V3

Als Ausgangskonstrukte lagen „GPN FS PR-“ und „GPN FS PR+“ von einer vorangegangenen Arbeit (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) vor. Verglichen zu „GPN PR“ enthalten diese Plasmidkonstrukte eine *slippery site*, die einen *-1 frameshift* induziert. Dieser Bereich ist nicht mehr kodonoptimiert und verfügt von Position 1107 bis 1841 (Insert) über eine wt-Sequenz.

An diese synthetischen *frameshift*-Varianten sollte die V3-Region 3'-terminal angefügt werden: hierzu wurden die Inserts „GPN FS PR-“ und „GPN FS PR+“ jeweils über die singulären Schnittstellen *EcoRI* und *XbaI* aus dem pcDNA-Vektor geschnitten, die aufgereinigten Fragmente mit *NheI* verdaut und die nun *EcoRI*- und *NheI*-flankierten Fragmente zur Weiterverarbeitung aufgereinigt. Gleichzeitig wurde das in pCR-Script subklonierte V3-Fragment über die per Oligonukleotide generierten

Schnittstellen NheI und XbaI ausgeschnitten und aufgereinigt. Die entsprechenden Insert- und V3-Fragmente wurden nun in den EcoRI/ XbaI-geschnittenen (*multiple cloning site*) Vektor pcDNA3.1 ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5a transformiert.

Neben dem oben beschriebenen ribosomalen *frameshift* enthalten beide Inserts ein aktives („GPN FS PR+ V3“) bzw. inaktives („GPN PR-V3“) Zentrum der Protease sowie 3'-terminal von AS-Position 4947-5057 eine V3-detektierbare Region.

3.1.2.1.2. Protease-Konstrukte

GPN PR- und GPN PR- V3

GPN PR+/- und GPN PR+/- V3

GPN PR+ und GPN PR+ V3

Da bei intaktem *frameshift* die Expressionsrate von Pol gering ausfällt, weil verglichen zu Gag (90-95%) GagPol nur zu 5-10% transkribiert wird, wurde der natürliche *frameshift* entfernt und somit ein Durchlesekonstrukt generiert, um eine äquimolare Expressionsrate an Gag und Pol zu sichern und so Aussagen über die Immunogenität machen zu können. Die Konstrukte „GPN PR+/-“ und „GPN PR+“ wurden daraufhin in der vorangegangenen Arbeit verglichen zum Ursprungskonstrukt „GPN PR-“ bezüglich der Proteasefunktion durch Mutationen modifiziert und resultierten nun in aktiver und attenuierter Protease. Diese Veränderungen wurden eingefügt, um die mögliche zytotoxische Wirkung der Protease analysieren zu können, die sich störend auf die GagPol-Expression und die Präsentation der entsprechenden Peptide auswirken könnte.

Zum Einfügen der V3-Sequenz in das 3'-Ende aller Durchlesekonstrukte wurden „GPN PR-“, „GPN PR+/-“ und „GPN PR+“ jeweils über die singulären Schnittstellen EcoRI und XbaI aus dem Vektor geschnitten, die aufgereinigten Fragmente mit NheI verdaut und wiederum die EcoRI- und NheI-flankierten Fragmente zur Weiterverarbeitung aufgereinigt. Gleichzeitig wurde das in pCR-Script subklonierte V3-Fragment über die Schnittstellen NheI und XbaI geschnitten und aufgereinigt. Die jeweiligen Insert- und V3-Fragmente wurden nun in den EcoRI- und XbaI-geschnittenen Vektor pcDNA3.1 ligiert und in DH5a transformiert. Auf diese Weise konnten die Durchlese-Konstrukte mit inaktiver und attenuierter Protease mit der V3-Region kombiniert werden. Leider gelang es bislang weder über die hier aufgeführte Methode V3 an das Konstrukt „GPN PR+“ anzufügen, noch mittels Quickchange-PCR mit den Primern „Quick durchlese PR+ (f)“ und „Quick durchlese PR+(b)“

(Oligonukleotidsequenzen siehe Anhang) über dem Konstrukt „GPN PR- V3“ das Proteasezentrum zu aktivieren und so das Zielkonstrukt „GPN PR+ V3“ zu generieren.

Die neuen, in den Expressionsvektor pcDNA3.1 integrierten Plasmidkonstrukte „GPN PR+/- V3“ und „GPN PR- V3“ verfügen im Vergleich zum Ursprungskonstrukt über ein inaktives bzw. attenuiertes Proteasezentrum sowie jeweils von AS-Position 4945-5055 über die V3-Sequenz.

3.1.2.1.3. *nef*-Konstrukte

GP Δ *nef* PR- und GP Δ *nef* PR- V3

GP Δ *nef* PR+ V3

Schließlich wurde *nef* durch Vertauschen von amino- und carboxyterminaler Gensequenz verändert (*scrambled nef: scr nef*) und mit den Varianten mit fehlender *nef*-Sequenz (Δ *nef*) verglichen. Um den Genbereich des *scr nef* mit seinen potentiell störenden Effekten per Deletion komplett auszuschalten, wurde in einer vorangehenden Arbeit (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) mittels TaqPlusTM Precision System eine Fusions-PCR über dem Ausgangskonstrukt durchgeführt. Aufgrund des häufigen PCR-Einsatzes entstanden jedoch Punktmutationen im *pol*-Leserahmen: Eine stille Mutation befindet sich an Position 3432 (CCT anstelle von CCC, beide Tripletts codieren für Prolin), drei weitere Mutationen an Position 2708 (GCG statt GTG, führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Alanin), Position 3386 (AGC anstatt von AAC, Asparagin wird hierbei zu Serin) und Position 3551 (CCC anstelle CAC, wodurch es zu einem Aminosäuretausch von Histidin zu Prolin kommt).

Um auch hier V3 an das Konstrukt ohne *nef*-Sequenz (Δ *nef*) anzufügen, wurde das Insert „GP Δ *nef*“ jeweils über die singulären Schnittstellen EcoRI und XbaI aus dem Vektor geschnitten, das aufgereinigte Fragment mit NheI verdaut und das daraus entstandene EcoRI/ NheI-flankierte Fragment zur Weiterverarbeitung erneut aufgereinigt. Zugleich wurde das in pCR-Script subklonierte V3-Fragment über die Oligonukleotid-designten Schnittstellen mit NheI und XbaI ausgeschnitten und aufgereinigt. Diese zwei Fragmente konnten nun in die *multiple cloning site* (MCS) des EcoRI/ XbaI verdauten Vektors pcDNA3.1 ligiert und in DH5a transformiert werden.

Das entstandene Plasmidkonstrukt „GP Δ nef V3“ weist im ursprünglichen Bereich des *scrambled nef* eine Deletion von 374 Nukleotiden sowie die V3-Region an AS-Position 4570 bis 4680 auf. Darüber hinaus befindet sich neben den bereits genannten Punktmutationen eine weitere, neu aufgetretene, stille Mutation an Position 3144 (ACT anstelle ACC, beide codieren für Threonin). Da diese Mutation nicht für ein Stop-Signal kodiert, wurde das beschriebene Konstrukt weiterhin für *in vitro* und *in vivo*-Studien herangezogen.

Der Versuch, in dem neu generierten Konstrukt anhand einer Quickchange PCR mit den Primern „Quick durchlese PR+ (f)“ und „Quick durchlese PR+ (b)“ (Sequenz der Oligonukleotide siehe Anhang) eine Punktmutation zur Aktivierung des Proteasenzentrum einzufügen, um Vergleiche der Δ nef-Konstrukte bezüglich der Protease vornehmen zu können, blieb ohne Erfolg.

3.1.2.1.4. GagPol-Konstrukte

GP und GP V3

Das bereits oben beschriebene Ausgangskonstrukt „GP“ wurde mit EcoRI und NheI aus dem Vektor geschnitten und zusammen mit dem NheI/ XbaI verdauten V3 über EcoRI-Xba in den Vektor pcDNA 3.1 kloniert.

„GP V3“ enthält nun über der slippery site eine wt-*frameshift*-Sequenz, ein aktives Proteasenzentrum sowie an AS-Position 4812 bis 4922 die V3-Sequenz. Bei Sequenzierung des Konstruktes fiel an Position 3527 eine Punktmutation (T anstatt C) auf, wodurch ein Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin stattfand. Da auch hierbei kein Stoppsignal generiert wurde, fand das Konstrukt weiter Verwendung.

3.1.2.1.5. Kurzzusammenfassung

Basierend auf dem Ursprungskonstrukt „GPN“ ist eine Reihe an „GPN V3“-Insertvarianten entworfen worden, die sich hinsichtlich des *frameshifts* (FS), der Aktivität des Proteasenzentrums (PR+, PR+/-, PR-) und des *nef*-Gens (Δ nef, *scr nef*) unterscheiden. Zusätzlich ist das Myristylierungssignal am aminoterminalen Ende aufgehoben worden, die Antigenexpression aller Plasmide erfolgte Rev-unabhängig. Mittels der eingefügten V3-Sequenz konnte nun neben der Expression von Gag auch indirekt die des PolNef-Proteins nachgewiesen werden. Darüber hinaus erlaubt die Fusion des V3-Epitops die indirekte Evaluierung der Induktion Pol- bzw. Nef-spezifischer T-Zell-Antworten.

In der folgenden Abbildung sind die Modifikationen der GagPolNefV3-Konstruktreihe zusammengefasst:

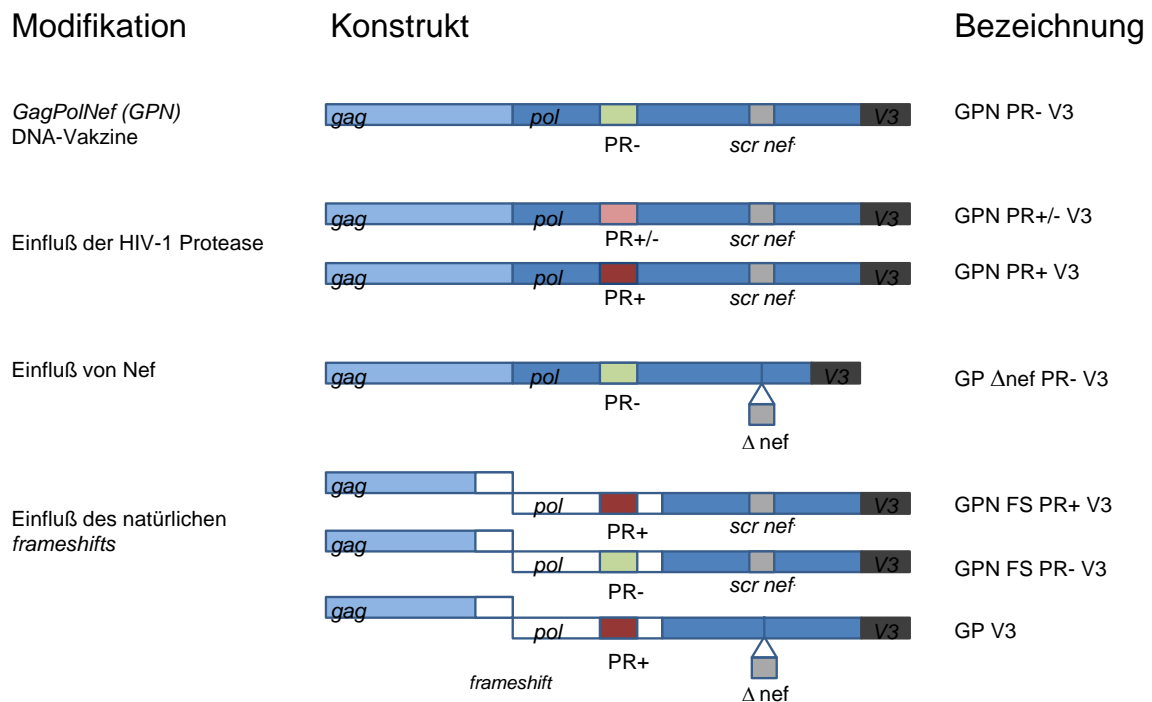


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der HIV GagPolNefV3 DNA-Vakzinevarianten.

gag= gruppenspezifisches Antigen; *pol*= Leserahmen der viralen Enzyme; FS= -1 *frameshift* mit eingefügter *slippery site*; PR= Protease aktiv (+), inaktiv (-), attenuiert (+/-); *scr nef*= *scrambled nef* (amino- und carboxyterminale Enden vertauscht); Δnef = deletiertes *nef*, V3= 3'-terminal eingefügte Gensequenz der V3-Schleife

3.1.2.2. PolNef V3-Konstruktreihe

Um mit Hilfe der 3'-terminalen V3-Sequenz eine Auslese des *polnef*-Leserahmens zu ermöglichen, konnten ausgehend von den bereits generierten GagPolNefV3-Varianten PolNef V3-Konstrukte entworfen werden. Da diese lediglich die *polnef*-Genkassette enthielten, sollte hierdurch eine Evaluation der *in vivo* und *in vitro*-Eigenschaften unabhängig von Gag ermöglicht werden. Darüber hinaus besteht nun die Option, *gag* und *polnefV3* auf separaten Plasmiden zu platzieren und diese somit über unterschiedliche Immunisierungsstrategien verabreichen zu können. Neben neuen Kombinationsmöglichkeiten könnte damit eine verbesserte Immunantwort erzielt werden. Im Vergleich zu *gagpolnef V3* kann dieselbe Menge an Antigen über kleinere Plasmide appliziert werden, die möglicherweise besser von den Zielzellen aufgenommen werden können.

3.1.2.2.1. PN FS PR-

Um die *polnef*-Genkassette zu amplifizieren, wurde mit den zwei dafür entworfenen Oligonukleotiden „PN *hin2*“ und „PN *SacXba*“ (Basensequenzen siehe Anhang) zwischen dem 5´- und 3´-Ende des *polnef*-Bereiches von „GPN FS PR-“ eine PCR mit dem TaqPlusTM Precision System durchgeführt. Das amplifizierte Fragment wurde aus dem Gel geschnitten, aufgereinigt und nach präparativem Verdau über die in den Oligonukleotiden entworfenen Schnittstellen EcoRI und XbaI in den Vektor pcDNA3.1 kloniert.

Das neu entstandene 2703Bp lange „PN FS PR-“ erstreckte sich, verglichen zu seinem Ausgangskonstrukt, nun lediglich über den Sequenzbereich von *polnef* und enthält an AS-Position 1244 eine inaktivierte Proteasesequenz sowie einen Teil der Wildtyp-Sequenz inklusive -1 *frameshift* (AS-Position 970-1528).

3.1.2.2. PN PR+/- V3 und PN PR- V3

Zur Klonierung der Konstrukte „PN PR+/- V3“ und „PN PR- V3“ wurde über den entsprechenden Durchlesekonstrukttemplates „GPN PR- V3“ und „GPN PR+/- V3“ von Beginn der *polnef*-Region bis zum 3´-Ende der V3-Sequenz mit Hilfe der Oligonukleotide „PN *hin2*“ und „V3 *Xho Xba Sac (b)*“ eine PCR mit der TaqPlusTM Precision Polymerase durchgeführt. Die Fragmente wurden danach mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XbaI geschnitten und daraufhin über die genannten singulären Schnittstellen in den pcDNA3.1 Vektor ligiert.

Die beiden neu gewonnenen Konstrukte „PN PR- V3“ und „PN PR+/- V3“ waren 2823Bp groß und enthielten im Gegensatz zu „PN V3“ eine komplett synthetische Gensequenz. Darüber hinaus verfügten sie an AS-Position 1244 über eine attenuierte („PN PR+/- V3“) oder inaktivierte Proteasesequenz („PN PR- V3“) sowie von Position 3652-3762 über die V3-Region.

3.1.2.3. Pol Δ nef PR- V3

Für Vergleichszwecke zu PolNefV3 sollte nun ein Konstrukt ohne *nef*-Sequenz generiert werden. Hierfür wurde über „GP Δ nef V3“ mit den Oligonukleotiden „PN *hin2*“ und „V3 *Xho Xba Sac (b)*“ eine TaqPlusTM Precision-PCR von Beginn der *polnef*-Region bis zum Ende von V3 durchgeführt. Das entstandene 2444Bp lange Fragment wurde nach Aufreinigung und über die in den Oligonukleotiden enthaltenen Schnittstellen EcoRI und XbaI in den pcDNA Vektor eingesetzt.

Das komplett synthetische „Pol Δ nef V3“ enthielt an AS-Position 1244 eine inaktive Proteasensequenz, von 3277-3387 die V3-Region und wie das Ausgangskonstrukt keine *nef*-Sequenz. Die Punktmutationen des Konstruktes entsprachen denen des Ausgangskonstruktes (Pos 1415 T-> C: Val-> Ala, Pos 1851 C-> T: Thr-> Thr: Pos 2093 A-> G: Asn-> Ser, Pos 2139 C-> T: Pro-> Pro, Pos 2258 A-> C: His-> Pro, Pos 2716 G-> A: Glu-> Lys).

3.1.2.4. Kurzzusammenfassung

Die geschilderten PolNefV3-Varianten enthielten Modifikationen von *nef* bzw. eine attenuierte oder inaktive Protease. Da die vorangeschaltete *gag*-Genkassette im Insert fehlt, fiel bei der Expression der Einfluß des ribosomalen *frameshifts* weg, wodurch die Expressionsrate von PolNef bei diesen neuen Konstrukten theoretisch eine Steigerung von 5% auf 100% erfahren und damit in entsprechend größeren Mengen vorliegen sollte. Darüber hinaus sollten potentielle Einflüsse von Gag auf die Expression von PolNef wegfallen.

Im Folgenden sind die Modifikationen der PolNefV3-Konstruktreihe zusammengefasst:

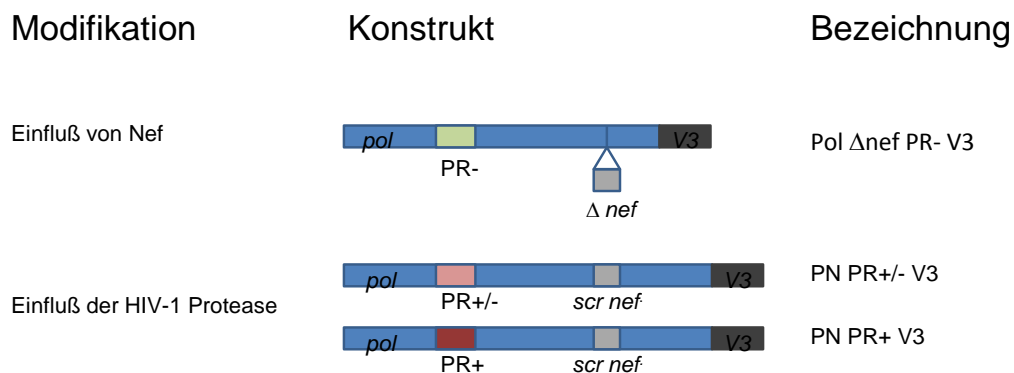


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der HIV PolNefV3 DNA-Vakzinevarianten

pol= Leserahmen der viralen Enzyme; PR= Protease: aktiv (+), inaktiv (-), attenuiert (+/-); *scr nef*= scrambled *nef* (amino- und carboxyterminale Enden vertauscht); Δ *nef*= deletiertes *nef*; V3= 3'-terminal angefügte Gensequenz der V3-Schleife

3.1.2.3. Zusammenfassung

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 3.1) sind alle neu generierten V3-Konstrukte aufgeführt und hinsichtlich der eingefügten Modifikationen beschrieben.

KONSTRUKTE	gagpol		PROTEASE			nef	
	<i>in frame</i>	<i>frameshift</i>	aktiv	attenuiert	inaktiv	+	-
GPN PR+/- V3	+	-	-	+	-	+	-
GPN PR- V3	+	-	-	-	+	+	-
GPN FS PR+ V3	-	+	+	-	-	+	-
GPN FS PR- V3	-	+	-	-	+	+	-
GP V3	-	+	+	-	-	-	+
GP Δnef V3	+	-	-	-	+	-	+
PN PR+/- V3	-	-	-	+	-	+	-
PN PR- V3	-	-	-	-	+	+	-
Pol Δnef PR- V3	-	-	-	-	+	-	+

Tab. 3.1: Modifikationen der gesamten, neu generierten HIV GagPolNefV3- und PolNefV3-Varianten bezüglich des natürlichen Leserastersprunges: *frameshift* vs. *in frame* (durchlese), der Aktivität der Protease sowie von Nef in tabellarischer Übersicht.

3.2. Analyse der Proteinexpression in H1299

3.2.1. Detektion der Proteinexpression

Zur Detektion der Proteinexpression wurden humane, p53-negative H1299 Lungenkarzinomzellen mit oben beschriebenen GagPolNefV3 und PolNefV3-Varianten transfiziert und anschließend die Lysate der Zellen untersucht. Hierbei wurde insbesondere Augenmerk auf den Einfluss der Protease, des natürlichen *frameshifts* sowie der An- oder Abwesenheit von Nef auf die Expressionsrate gerichtet.

Nach Transfektion der adhären Zellen mittels CaHPO₄-Präzipitations-Methode wurden diese nach 8-16 Stunden geerntet und aufgeschlossen. Für die Westernblotanalyse der exprimierten Proteine aus den Zelllysaten wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und über Antikörper detektiert: zum Einen wurde der p24/Pr55 spezifische, murine monoklonale Antikörper 13/5 zur Detektion von Gag, und zum Anderen der ebenfalls monoklonale anti-V3 Antikörper NEA 9305 (Roche) zur Auslese von Pol eingesetzt.

3.2.1.1. Funktionsnachweis der GagPolNef V3-Reihe

3.2.1.1.1. GPN FS PR- und GPN FS PR- V3

Im ersten Versuch wurde die Expression des neu generierten Konstruktes „GPN FS PR- V3“ mit seinem Ausgangskonstrukt verglichen (Abb. 3.3a). Dabei zeigte das neue Konstrukt in der Detektion mittels Gag-spezifischem Antikörper p24/p55 eine Expressionsrate, die dem von „GPN FS PR-“ entsprach. Ebenso konnte bei beiden gleichermaßen das zu 5% generierte Vorläuferprotein GagPolNef bei 160kD nachgewiesen werden. Um die erfolgreiche Klonierung von V3 und des GagPolNef-Vorläufers zu bestätigen, wurde eine Auslese mittels V3-spezifischem Antikörper durchgeführt.

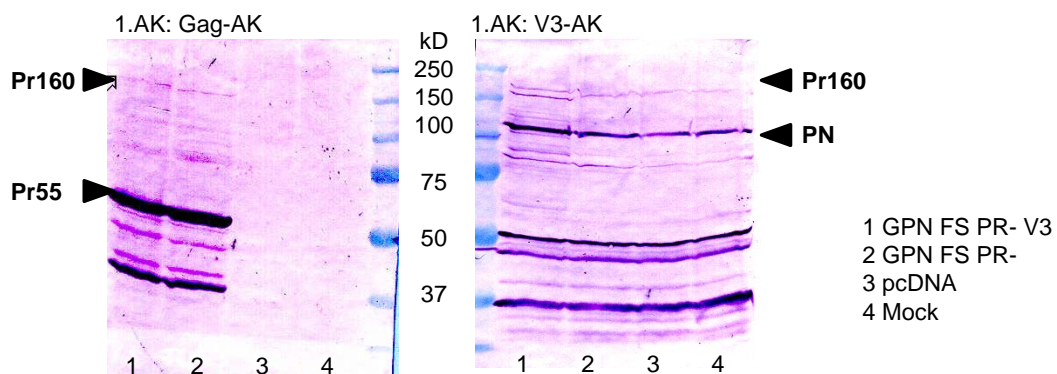


Abb. 3.3a: Western-Blot Expressionsstudie der *frameshift* PR- Konstrukte mit und ohne V3.

H1299-Zellen wurden mit den aufgeführten Proben anhand der CaP-Methode transfiziert und nach 10 h geerntet. Die Proteine wurden per Gelelektrophorese auf 12,5%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die Detektion der Gag-Expression mittels **Gag-spezifischem-AK (13/5)** bzw. der V3-Expression mittels **V3-spezifischem-AK** vorgenommen. Aufgetragen sind links und rechts die genannten *frameshift*-Proben mit (Spur 1) und ohne (Spur 2) V3. Zu sehen sind neben gleichwertiger Gag-Expression des V3-Konstruktes verglichen zum Ausgangskonstrukt (siehe Gag-AK Spur 1 und 2) die Darstellung des Vorläuferproteins (160kD) allein bei dem V3-Konstrukt (Spur 1) mittels V3-Detektion.

Hier zeigte sich bei dem V3-Konstrukt eine Bande in Höhe des Vorläufers GagPolNef, die bei dem Ausgangskonstrukt ohne V3 wie erwartet nicht auftrat. Damit konnte die Funktionsfähigkeit von V3 in „GPN FS PR- V3“ nachgewiesen werden.

3.2.1.1.2. Übrige GagPolNef V3-Konstruktvarianten

In den Abbildungen Abb. 3.3b, 3.3c, Abb. 3.4 und Abb. 3.5 sind die übrigen neuen V3-Varianten im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangskonstrukten dargestellt. Alle Konstrukte zeigten eine Expression nach Detektion mit Gag- und V3-Antikörpern, wenngleich diese auch variierte.

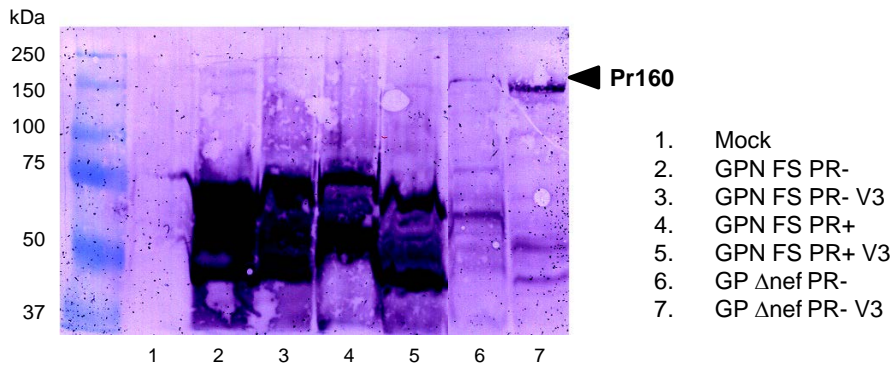


Abb. 3.3b: Western-Blot Expressionsstudie der *frameshift*- und Δ *nef*-Konstrukte mit und ohne V3. H1299-Zellen wurden mit den aufgeführten Proben anhand der CaP-Methode transfiziert und nach 10 h geerntet. Die Proteine wurden per Gelelektrophorese auf 12,5%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose gebロットet und die Detektion der Gag-Expression wurde mittels **Gag-spezifischem-AK (13/5)** vorgenommen. Aufgetragen sind links die neu generierten Konstrukte „GPN FS PR- V3“ (Spur 2), „GPN FS PR+ V3“ (Spur 4) und „GP Δ nef V3“ (Spur 6) mit V3 neben ihren jeweiligen Ausgangskonstrukten. Das Gagpol-Vorläuferprotein Pr160 wurde mit Pfeil markiert.

Die Konstrukte mit eingefügtem natürlichem *frameshift* resultierten entsprechend der Expressionsrate von Gag (95% zu 5% GagPol) in erwartungsgemäß starken Banden in Höhe von Pr55^{Gag} und Pr24^{Gag} (Abb. 3.3a, Nr. 1, 2; Abb. 3.3b, Nr. 2-4; Abb. 3.4, Nr. 3-6, 13, 14). Die mengenmäßige Verteilung der Expression von Gag zu GagPol wurde durch unterschiedlich starke Banden des *frameshift*-Konstruktes mit inaktiver Protease deutlich. Das Vorläuferprotein Pr160, das zu 5-10% exprimiert wurde, zeigte eine dezente Bande (Abb. 3.3a, Nr. 1, 2; Abb. 3.5, Nr. 1). Sobald die Protease aktiviert war („GPN FS PR+ V3“, „GP V3“) und die Vorläuferproteine in die Proteine Pr55 und Pr24 spalten konnte, war die Bande bei 160kDa wie bei der Durchlese-Reihe nicht mehr detektierbar (Abb. 3.4, Nr. 5, 6, 13, 14; Abb. 3.5, Nr. 2, 5).

Während die Durchlesekonstrukte mit inaktiver Protease („GPN PR- V3“, „GP Δ nef PR- V3“) durchweg Proteine im Bereich des Proteinvorläufers Pr160 exprimierten (Abb. 3.3b, Nr. 6, 7; Abb. 3.4, Nr. 7, 8, 11, 12), zeigten die Durchlesekonstrukte mit attenuierter Protease Banden in Höhe von Pr55^{Gag} (Abb. 3.3c, Nr. 2, 3).

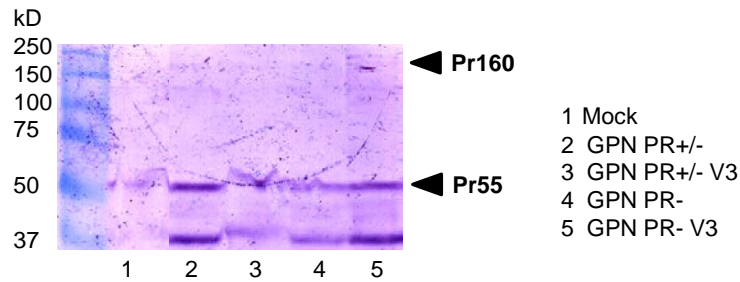


Abb. 3.3c: Western-Blot Expressionsstudie der Durchlesekonstrukte mit attenuierter Protease mit und ohne V3. H1299-Zellen wurden mit den aufgeführten Proben anhand der CaP-Methode transfiziert und nach 10 h geerntet. Die Proteine wurden per Gelelektrophorese auf 12,5%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die Detektion der Gag-Expression mittels **Gag-spezifischem-AK (13/5)** vorgenommen. Aufgetragen ist das neu generierte Durchlesekonstrukt mit attenuierter bzw. inaktiver Protease und V3 (Spur 3 und 5) neben dem jeweiligen Ausgangskonstrukt (Spur 2 und 4).

3.2.1.1.3. Einfluss des *frameshift* auf die Proteinexpression

Um den Einfluss des natürlichen ribosomalen Leserastersprunges auf die Proteinexpression zu untersuchen, wurden die *frameshift*-Konstrukte mit den entsprechenden Durchlesekonstrukten verglichen. Der natürliche *frameshift* ist durch Einfügen einer *slippery site* mit geringem Anteil der Wildtyp-Sequenz und nachfolgender Haarnadelstruktur in das Ursprungskonstrukt integriert worden. Daraus resultierte in 5% der Translationsergebnisse eine -1 Leserasterverschiebung, bei der nach Überspringen des *gag*-Stopcodons ein GagPol-Durchleseprotein entsteht. Mengenmäßig reduzierte sich somit Translation und folglich Expression des Vorläuferproteins Pr160 GagPol mit seinen Produkten zu einem Verhältnis von Gag zu GagPol von 20:1. Durch die geringere Konzentration an Protease bestanden weniger zytotoxische Effekte und die Dimerisierung im Zytoplasma mit vorzeitiger Aktivierung wurde unterbunden.

Abbildung 3.4 stellt die Gag-detektierte Konstruktreihe dar. Bei Vergleich von „GPN FS PR-“ und „GPN FS PR- V3“ (Abb. 3.4, Nr. 3, 4) mit „GPN PR-“ und „GPN PR- V3“ (Abb. 3.4, Nr. 7, 8), sowie „GPN FS PR+“ und „GPN FS PR+ V3“ (Abb. 3.4, Nr. 5, 6) mit „GPN PR+/-“ und „GPN PR+/- V3“ (Abb. 3.4, Nr. 9, 10) und „GP“ bzw. „GP V3“ (Abb. 3.4, Nr. 13, 14) mit „GPN PR+/-“ und „GPN PR+/- V3“ (Abb. 3.4, Nr. 9, 10) wird deutlich, dass die Gag-Proteine der *frameshift*-Konstrukte verglichen zu den Proteinen der Durchlesekonstrukte viel stärker exprimiert wurden. Hinzu kommt, dass die in *polnef* kodierte Protease in den *frameshift*-Konstrukten aufgrund des -1 Rastersprunges in niedrigeren Mengen als in den Durchlesekonstrukten freigesetzt

wurde (5-10% der Translationsereignisse GagPolNef). Die geringere Expression der GagPol-Vorläufer (Abb. 3.3a) der *frameshift*-Konstrukte entsprach der 5-10%igen Translationsrate von GagPolNef. Bei aktiver Protease wurde auch dieser geringe Anteil prozessiert, was das Fehlen des Vorläufers erklärt (Abb. 3.3; Abb. 3.4: *frameshift*-Konstrukte und GP V3).

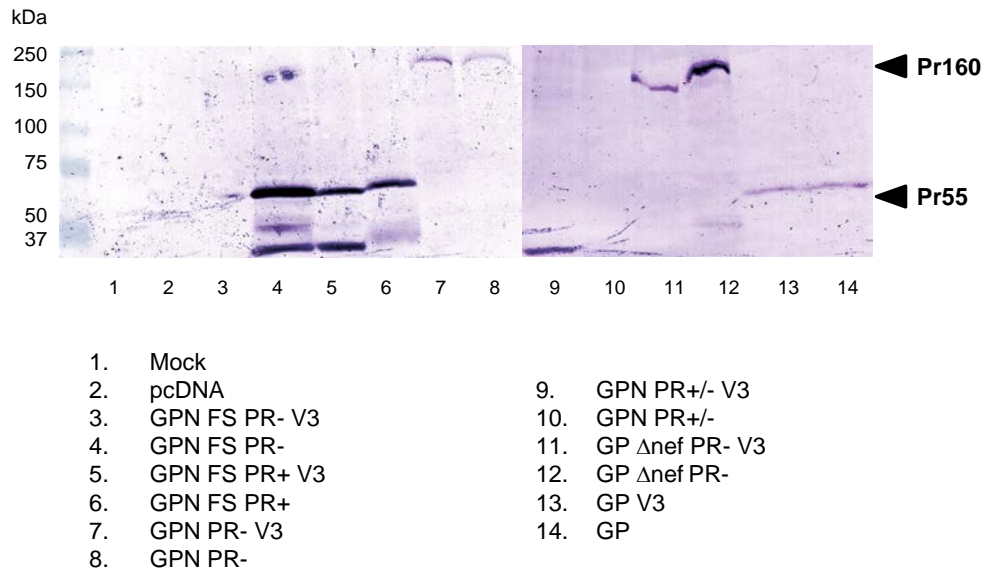


Abb. 3.4: Western-Blot Expressionsstudie der GagPolNef-Konstruktreihe mit und ohne V3. H1299-Zellen wurden mit den aufgeführten Proben anhand der CaP-Methode transfiziert und nach 10 h geerntet. Die Proteine wurden per Gelelektrophorese auf 12,5%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die Detektion der Gag-Expression wurde mittels **Gag-spezifischem-AK (13/5)** vorgenommen. Aufgetragen ist die neu generierte Konstruktpalette mit V3 (Spur 3, 5, 7, 9, 11, 13) neben ihren jeweiligen Ausgangskonstrukten (Spur 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Mit Pfeil wurden die GagPol-Vorläuferproteine Pr160^{Gagpol} sowie Pr55^{Gag} markiert.

In Bezug auf die Aktivität der viralen Protease korrelierten beide Panel: sobald die Protease aktiviert oder attenuiert vorliegt, spaltete sie die Vorläuferproteine und Signale konnten lediglich in Höhe von Pr55 sowie Pr24 detektiert werden. Bei inaktiver Protease beider Konstruktvarianten ließ sich entsprechend der Expressionsrate Pr160 nachweisen. Während die *frameshift*-Konstrukte durchweg bessere Expressionsraten boten, lagen die Signale von „GP V3“ eher im mittleren Bereich, ähnlich denen der Durchleseproteine. Der Vergleich von „GP V3“ (*frameshift*, PR+) mit „GP Δnef V3“ (Durchlese, PR-) ergab mittels Gag-Detektion zudem schwächere Signale von „GP V3“ (Abb. 3.4, Nr. 11-14).

Die Detektion des *polnef*-Leserahmens der *frameshift*-Konstrukte mit Hilfe des V3-spezifischen Antikörpers bestätigte die oben aufgeführten Ergebnisse (Abb. 3.5):

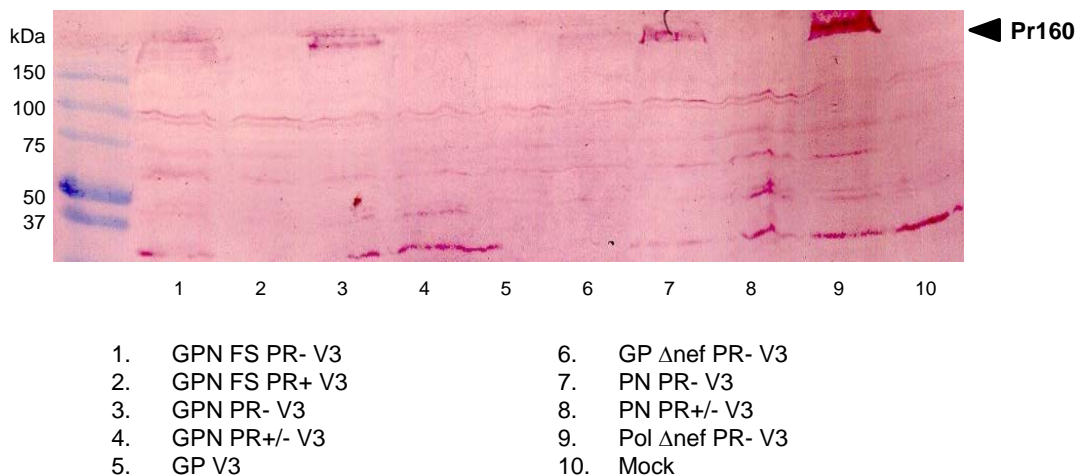


Abb. 3.5: Western-Blot Expressionsstudie der GagPolNef-Konstruktpalette mit V3. H1299-Zellen wurden mit den aufgeführten Proben anhand der CaP-Methode transfiziert und nach 10 h geerntet. Die Proteine wurden per Gelelektrophorese auf 12,5%-igem Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und die Detektion der V3-Expression wurde mittels V3-spezifischem-AK vorgenommen. Aufgetragen sind die neu generierten GPN- und PN-Konstruktreihen mit V3 (Spur 1-9). Mit Pfeil wurden die Gagpol-Vorläuferproteine Pr160 markiert.

Während das *frameshift*-Konstrukt mit inaktiver Protease Pr160 exprimierte, verursachte eine Aktivierung der Protease auch hier durch Prozessierung der Genprodukte ein Fehlen der Bande in Höhe GagPol (Abb. 3.5, Nr. 2, 5). Das Signal der Vorläuferproteine des *frameshift*-Konstruktes mit inaktiver Protease war deutlich schwächer als das des Durchleseproteins, was wiederum der Durchlese rate von 5-10% bei „GPN FS PR- V3“ entsprach (Abb. 3.5, Nr. 1, 3).

Insgesamt gesehen konnte durch Integration des natürlichen *frameshifts* die Expression verglichen zu den *in frame*-Durchlesevarianten erheblich gesteigert werden. Zudem ermöglichte das 3'-ständige V3 die indirekte Detektion von Polnef der *frameshift*-Konstrukte (Vorläuferproteine).

3.2.1.1.4. Einfluß der viralen Protease auf die Proteinexpression

Lediglich durch eine Punktmutation im aktiven Zentrum unterschieden sich die Gensequenzen der aktiven, inaktiven und attenuierten Proteasen. Die aktive virale Protease des wt-HIV schneidet nach einer Selbstaktivierung die Enzyme PR, RT und IN aus dem Vorläuferpolyprotein, liegt jedoch nur als Dimer in aktiver Form vor (Freed *et al.* 2001, Gilles *et al.* 2005). Anhand von *in vitro*-Analysen mit H1299-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung der viralen Protease sowohl in *Durchlese*- als auch in *frameshift*-Varianten eine erhöhte Proteinexpression

verglichen zu den Konstruktvarianten mit aktiver oder attenuierter Protease nach sich zog (siehe Abb. 3.4, Gag-AK: vgl. Nr. 3 und 4 (GPN FS PR-/ GPN FS PR- V3) mit 5 und 6 (GPN FS PR+/ GPN FS PR+ V3) sowie Nr. 7 (GPN PR- V3) mit 9 (GPN PR+/- V3)). Die Bestätigung dieses Ergebnisses war mittels V3-Detektion nicht möglich: In Varianten, die eine aktive oder attenuierte Protease enthielten, waren aufgrund der Prozessierung durch die Protease keine Pr160-Vorläufersignale detektierbar und daher kein Vergleich mit den inaktiven Protease-Varianten möglich.

Vergleiche zwischen der „GP Δ nef PR-“ Variante mit „GP“ (PR+) (Abb. 3.4, Nr. 11-14 und Abb. 3.5, Nr. 5, 6) ergaben bei „GP“ geringere Expressionsraten. Während die übrigen *frameshift*-Konstrukte durchweg stärkere Signale als die Durchlese-Varianten zeigten, fiel einzig „GP“ mit aktiver Protease durch eine schwächere bzw. gleich starke Expression auf.

Die aktive PR schneidet die Vorläuferproteine Pr55 Gag und Pr160 GagPol in deren Prozessierungsprodukte. Aus diesem Grund war bei funktionsfähiger Protease im Gegensatz zur aktiven und attenuierten Variante bei *frameshift*- und Durchlese-Varianten GagPol Pr160 detektierbar (Abb. 3.3a; 3.3b; 3.4; 3.5). Die Attenuierung mittels einer Punktmutation im aktiven Zentrum der Protease schwächte zwar deren Effizienz ab, doch Prozessierfähigkeit und zytotoxische Effekte waren wohl weiterhin vorhanden: So fand sich im Durchlesekonstrukt mit attenuierter PR eine Bande in Höhe von p24^{gag}, die mit der Vorläuferprotein-Prozessierung vereinbar war und trotz Attenuierung eine erhaltene Spaltfähigkeit belegte. War die virale Protease jedoch aktiv, konnte eine vorzeitige Aktivierung bereits im Zytoplasma der Zellen und nicht erst im unreifen Viruspartikel stattfinden. Demnach konnten Vorläuferproteine früher geschnitten werden (Abb. 3.4; Abb. 3.5) und es ließen sich hierdurch zytotoxische Protease-Effekte im Zytoplasma mit konsekutiv verminderten Expressionsraten schlußfolgern, die bereits in vorhergehenden *time-course*-Studien (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) durch Abkugeln adhärenter H1299 nachgewiesen worden sind. Zusammenfassend hatte die Inaktivierung der Protease eine Steigerung der Expression in humanen H1299-Zellen zur Folge.

3.2.1.1.5. Einfluß von Nef auf die Proteinexpression

Ursprünglich wurde *nef* in die Ausgangskonstrukte integriert, um dem Immunsystem eine möglichst hohe Anzahl an immunogenen Epitopen präsentieren zu können und so eine breit gefächerte und spezifische CTL-Antwort zu induzieren. Als zytotoxische

Reaktionen und Herabregulation von Oberflächenrezeptoren beobachtet worden sind, wurden N- und C-terminale Bereiche der neuen *scr nef*-Konstrukte vertauscht, um unter Erhaltung immunstimulatorischer Epitope potentielle zytotoxische Effekte zu verringern bzw. zu unterbinden. Diese *scr nef*-Konstrukte wurden mit dem Δnef - sowie dem GagPol-Konstrukt verglichen, bei denen die Gensequenz von *nef* komplett deletiert worden ist. Neben einer etwa 10kDa niedrigeren Bande und einer, wenn überhaupt, dezent erhöhten Expressionsrate von Δnef konnten korrelierend zu den Ergebnissen der vorherigen Untersuchungen (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichskonstrukten festgestellt werden (Abb. 3.4 Gag-AK: vergleiche dazu Nr. 11 und 12 (Δnef PR-/ Δnef PR- V3) mit 7 und 8 (Durchlese PR-/ Durchlese PR- V3)). Der Vergleich zwischen „GP V3“ und „GPN FS PR+ V3“ belegte eine schwächere Expression von „GP V3“ (Abb. 3.4, Nr. 5, 6, 13, 14).

Bei Detektion mittels V3-spezifischem Antikörper ließ sich aufgrund der aktiven PR in „GP V3“ kein Vorläufer nachweisen, „GP Δnef PR- V3“ hingegen exprimierte Pr160 in geringeren Mengen als das Durchlesekonstrukt „GPN PR- V3“ (Abb. 3.5, Nr. 3, 6). Zusammenfassend war keine signifikante Steigerung der Expression von Gag bzw. GagPol durch die Deletion von *nef* nachweisbar.

3.2.1.2. Detektion der Proteinexpression der PolNef V3-Konstrukte

Durch die Beschränkung der Sequenz auf den *polnef*-Leserahmen konnten kleinere Plasmidkonstrukte hergestellt werden, die untereinander und gegenüber der GagPolNef V3-Reihe verglichen werden sollten. Durch 3'-terminales Anfügen von V3 an die *polnef*-Gensequenz bestand nun die Möglichkeit der Proteindetektion.

Die PolNef V3-Varianten unterschieden sich bezüglich der Aktivität der Protease und des Vorliegens von *nef*. Da diese Varianten kein Gag enthielten, war die Detektion mittels Gag-spezifischem Antikörper nicht möglich, und somit die Detektion über den V3-spezifischen Antikörper umso bedeutsamer. Auf Abbildung 3.5 sind die V3-detektierten Signale der Konstrukte dargestellt (Abb. 3.5, Nr. 7-9).

3.2.1.2.1. Einfluß der viralen Protease auf die Proteinexpression

Korrelierend zu den Ergebnissen der GagPolNef V3-Palette zog auch hier das Ausschalten der viralen PR eine erhöhte Expressionsrate nach sich (vgl. dazu Abb. 3.5, Nr. 7, 8). Darüber hinaus konnte, wie auch oben dargestellt, kein

Vorläuferprotein detektiert werden, sobald die virale PR in aktiviertem Zustand vorlag. In diesen Varianten fiel der ribosomale *frameshift* und damit die Reduktion der Menge an viralen Enzymen gegenüber den Strukturproteinen (Gag) weg, die Protease konnte zu 100% translatiert werden. Aufgrund der Überproduktion der PR steigt neben der Wahrscheinlichkeit der vorzeitigen Dimerisierung und intrazellulären Aktivierung die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung zytotoxischer Effekte. Dementsprechend könnte die verminderte Zytotoxizität der inaktiven Protease für die Erhöhung der Expressionsrate verantwortlich sein.

3.2.1.2.2. Einfluß von Nef auf die Proteinexpression

Vergleicht man „Pol Δ nef PR- V3“ mit „PN PR- V3“, zeigt sich eine enorm verstärkte Expression bei Δ nef. Diese könnten auf den Wegfall möglicher negativer Effekte von Nef (*scr nef*) beruhen. Auch hier findet sich also korrelierend zur Gag-Palette eine ähnliche, jedoch verstärkte Tendenz der *in vitro*-Analyse in H1299.

3.2.1.2.3. Einfluß von Gag auf die Proteinexpression

Das Konstrukt „PN PR- V3“ lieferte eine leicht erhöhte Expression von PolNef verglichen zu seinem Äquivalent mit Gag („GPN PR- V3“) (Abb. 3.5, Nr. 3, 7). Beim Vergleich von „Pol Δ nef PR- V3“ mit dem Ausgangskonstrukt „GP Δ nef PR- V3“ (Abb. 3.5, Nr. 6, 9) fand sich ein deutlicher Expressionsanstieg durch den Wegfall von Gag. Die Ergebnisse der PolNef V3- und GagPolNef V3-Konstrukte korrelierten bezüglich des Einflusses der Protease, wohingegen die Deletion von *nef* im Pol Δ nef-Konstrukt zu einer gesteigerten Expression führte. Die Abwesenheit bzw. das Anfügen der *gag*-Sequenz an *pol* scheint demnach geringen Einfluß auf die Pol-spezifische Expression zu haben, sofern *nef* im *scr*-Zustand vorliegt.

3.2.1.3. Kurzzusammenfassung

Die *in vitro*-Studien an H1299 dienten mittels Gag-spezifischer Detektion dem Funktionsnachweis der neu generierten Konstrukte im Vergleich zu den entsprechenden Ausgangskonstrukten sowie dem Nachweis der erfolgreichen Klonierung von V3 durch Einsatz des V3-spezifischen Antikörpers, und damit auch dem indirekten Nachweis von Pol und PolNef.

Alle Konstrukte zeigten eine Expression, die in ihrem Ausmaß jedoch differierte. Während die Integration des -1 *frameshifts* eine Verschiebung der Expressionsraten

von Gag und Pol verursachte, lieferten die *frameshift*-Varianten prinzipiell höhere Expressionsraten als die entsprechenden Durchlesekonstrukte.

Darüber hinaus korrelierten die Ergebnisse bezüglich der Aktivität der viralen Protease: die Inaktivierung der Protease erwies sich sowohl in der Durchlese- und *frameshift*-Reihe der GagPolNef V3-Varianten als auch bei den PolNef V3-Konstrukten als expressionssteigernd.

Die Deletion von *nef* zeigte sich im Westernblot durch eine erwartungsgemäß erniedrigte Bande, die Expressionsraten der GagPolNef V3-Varianten blieb ohne signifikanten Unterschiede, während anhand der PolNef V3-Palette eine verstärkte Expression auftrat. Die Beschränkung auf den *polnef*-Leserahmen lieferte leicht verbesserte Expressionsraten bezüglich GagPol verglichen zum Durchlese-Konstrukt mit *gag* und inaktiver Protease. Hierbei erwies sich der Wegfall von Gag als förderlich auf die Pol-Expression.

3.3. Immunologische Studien

Im Rahmen immunologischer Studien am BALB/c-Mausmodell sollten die verschiedenen synthetischen GagPolNef V3- und PolNef V3-DNA-Konstruktvarianten hinsichtlich ihrer immunogenen Eigenschaften untersucht werden. Die GagPolNef V3-Varianten unterschieden sich untereinander in der Aktivität der Protease, des intakten *frameshifts* und in der Anwesenheit von *nef*, während sich die PolNef V3-Inserts lediglich über den *polnef*-Leserahmen erstreckten und Unterschiede in der Protease-Aktivität und des *nef* aufwiesen. Um die Induktion humoraler Immunantworten zu analysieren, wurden in Mausblutseren die Titer Gag-spezifischer IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{Ges}-Antikörper bestimmt. Zum Nachweis der CD8⁺ T-Zell spezifischen Immunantwort wurden die Milzen der Versuchstiere präpariert, aufbereitet und die Milzzellen nach *in vitro*-Restimulation mit A9I^{p24} und dem V3-Peptid auf die IFN γ -Produktion ihrer CD8⁺ T-Zellen (FACS) sowie auf die Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen (ELISPOT) hin untersucht. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit keine BALB/c-restringierten Pol-spezifischen Epitope bekannt waren, wurden zum Auslesen der Pol-spezifischen Antworten vier Peptid-Pools eingesetzt, die die komplette Aminosäuresequenz von Pol abdeckten.

3.3.1. Immunisierungsplan der BALB/c Mäuse

In den elf Gruppen je sechs 6 - 8 Wochen alter weiblicher BALB/c Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden pro Maus 100 µg der entsprechenden Vektor-DNA (50 µg pro Muskel) i.m. in beide *m. tibialis anterior* immunisiert. Neben den Konstruktvarianten (Gruppe 1-9) wurde Gruppe 10 mit p24 als Positivkontrolle immunisiert, während Gruppe 11 als Negativkontrolle diente und keine DNA-Vakzine erhielt.

In Woche vier und acht nach Erstimmunisierung erfolgten die Auffrischimmunisierungen mit jeweils der gleichen, initial verabreichten Menge an DNA. Jeweils eine Woche nach der ersten und zweiten Booster-Immunisierung wurden aus den Schwanzvenen der Versuchstiere Blutseren gewonnen, daraufhin wurden die Tiere eine bzw. zwei Wochen nach der zweiten Auffrischimpfung durch Genickbruch getötet und deren Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen.

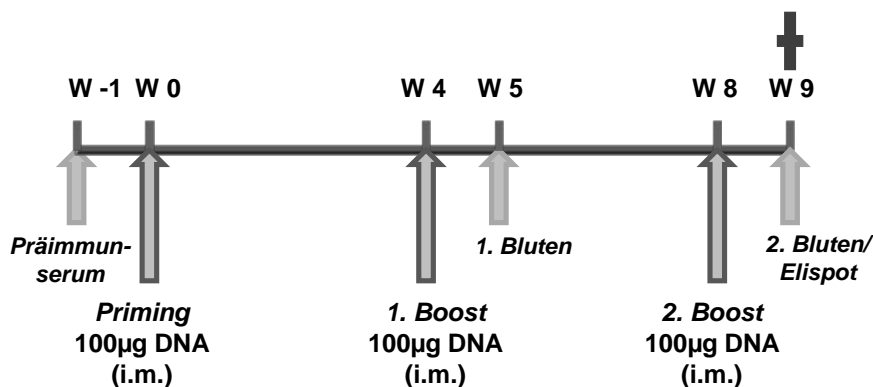


Abb. 3.6: Immunisierungsschema der BALB/c Mäuse Die BALB/c Mäuse wurden dreimalig mit DNA-Vektoren immunisiert: *Priming*, *1. Boost*, *2. Boost*. Die Blutgewinnung erfolgte je eine Woche nach den *Boost*-Immunisierungen zur Bestimmung der humoralen Immunantwort mittels Antikörper-ELISA. Eine bzw. zwei Wochen nach der zweiten Auffrischimmunisierung fand die Milzentnahme von jeweils drei Tieren pro Gruppe zur Detektion der zellulären Immunantwort mittels Elispot und FACS-Analyse statt.

3.3.2. Bestimmung der humoralen Immunantwort: Antikörperantwort im Elisa

Der Nachweis der humoralen Immunantwort erfolgte anhand der Bestimmung von Antikörperisotypen in den Blutproben der BALB/c Mäuse, die jeweils eine Woche nach der ersten und zweiten Auffrischimmunisierung entnommen wurden. Dafür wurden in den Mausblutseren Gag-spezifische Antikörpertiter (IgG_{Ges}) sowie die Titer der AK-Subtypen IgG₁ und IgG_{2a} anhand AK-ELISA als Endpunkttitrierungen der Seren ermittelt. Gewertet wurden hierbei die Serum IgG-Titer, bei denen sich

mindestens eine 2,5mal höhere optische Dichte als in den Seren der Negativkontrolle fand.

Dabei ergab sich, dass korrelierend zur vorangegangenen Arbeit (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003), das Kontrollkonstrukt p24 bereits nach der ersten Auffrischimmunisierung Antikörper-Titer bis zu 1:100.000 induzierte, allerdings nicht in allen Versuchstieren. Nach dem zweiten *Boost* konnten ebenfalls Antikörper-Titer bis zu 1:100.000 nachgewiesen werden.

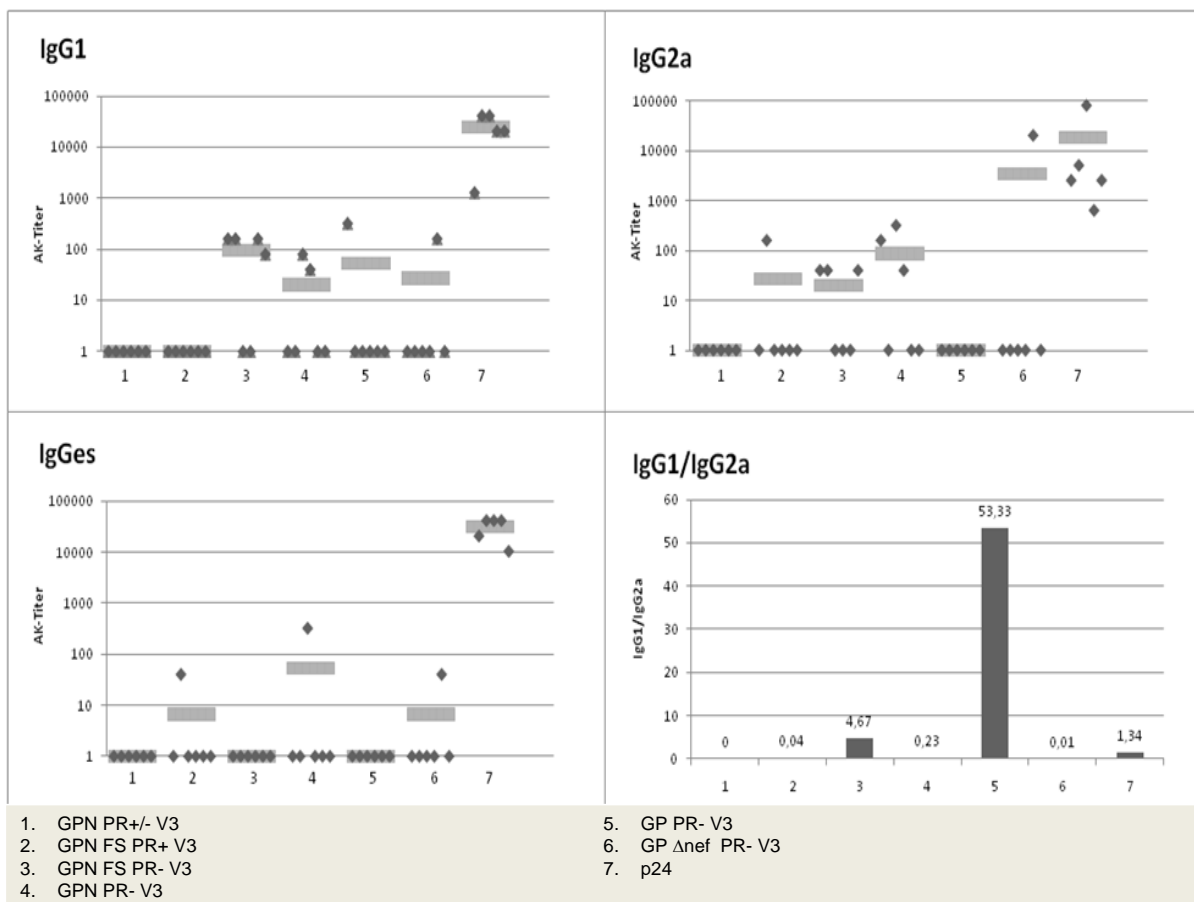


Abb. 3.7: Gag-spezifische humorale Immunantworten (1. Elisa): Die Serumentnahme der getesteten BALB/c-Mäuse (je 6 pro Gruppe) erfolgte je eine Woche nach der ersten i.m. *Boost*-Immunisierung (*m. tibialis anterior*) von 100 μ g Gesamt- Plasmid- DNA zur Bestimmung der humoralen Immunantwort: Ermittlung der absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer (IgG_{ges}), sowie der IgG_1 und IgG_{2a} AK-Isotypen der Mausblutseren mittels Endpunkt-Elisa Titer. Gewertet wurden Serum IgG-Titer, bei denen sich mindestens eine 2,5mal höhere optische Dichte als in den Seren der Negativkontrolle fand. Punkte: Einzelwerte, Balken: jeweilige Mittelwerte einer Gruppe.

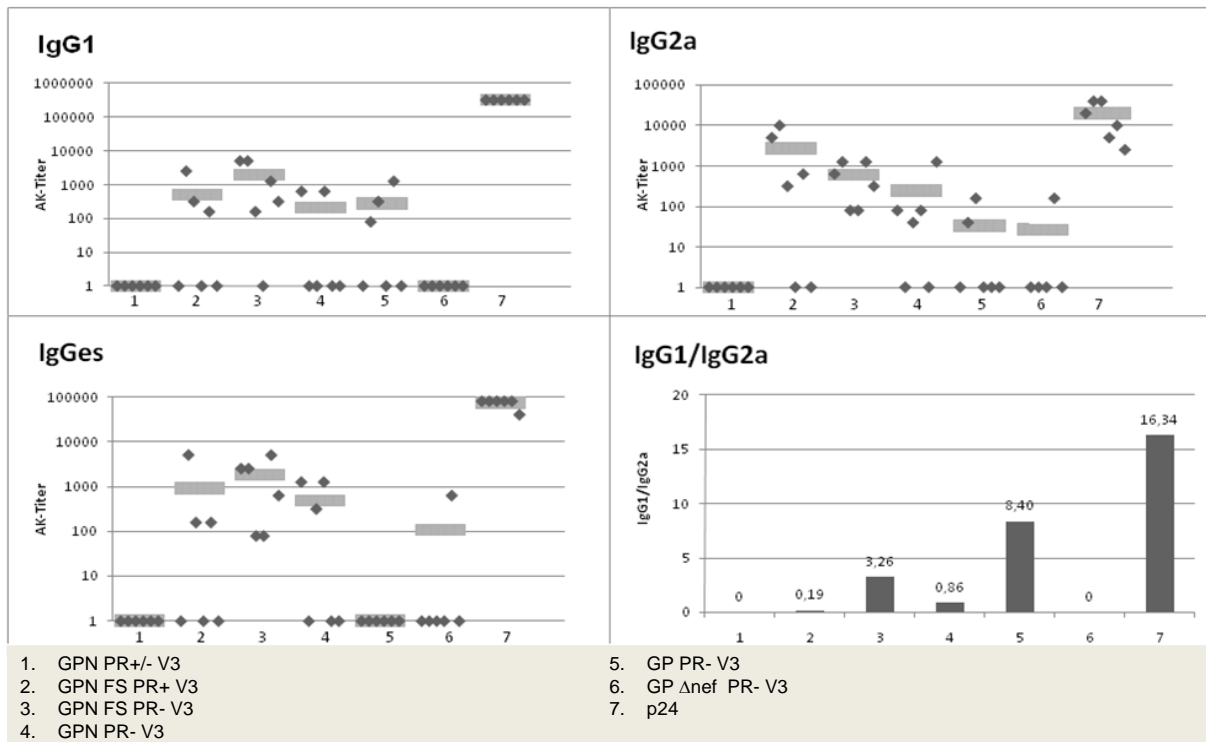


Abb. 3.8: Gag-spezifische humorale Immunantworten (2. Elisa): Die Serumentnahme der getesteten BALB/c-Mäuse (je 6 pro Gruppe) erfolgte je eine Woche nach der zweiten i.m. *Boost*-Immunisierung (*m. tibialis anterior*) von 100 µg Gesamt-Plasmid-DNA zur Bestimmung der humoralen Immunantwort: Ermittlung der absoluten Gag-spezifischen Ig-Antikörper Titer (IgG_{ges}), sowie der IgG₁ und IgG_{2a} AK-Isotypen der Mausblutseren mittels Endpunkt-Elisa Titer. Gewertet wurden Serum IgG-Titer, bei denen sich mindestens eine 2,5mal höhere optische Dichte als in den Seren der Negativkontrolle fand. Punkte: Einzelwerte, Balken: jeweilige Mittelwerte einer Gruppe.

„GPN PR- V3“ induzierte in beiden Auswertungen AK-Antworten in den Versuchstieren, wenngleich auch eher mittelmäßig. Keine Aktivierung der humoralen Immunantwort, weder nach dem ersten noch nach dem zweiten *Boost*, zeigte das Konstrukt „GPN PR+/- V3“. Die *frameshift*-Konstrukte lösten spätestens nach dem zweiten *Boost* eine humorale Immunantwort aus. „GP Δnef V3“ und „GP V3“ induzierten lediglich geringe Antikörper-Titer. Die Gewichtung der Antikörperreaktion lag bei „GP V3“ und „GP FS PR- V3“ auf einer T_{H2} gerichteten und bei den übrigen untersuchten Konstrukten auf einer T_{H1}-polarisierten Immunantwort, die sich durch eine stärkere IgG_{2a} Sekretion auszeichnet: Anhand der Verhältnisse einzelner AK-Isotypen zueinander können im murinen System Zuordnungen der CD4⁺ T-Zell vermittelten Immunantwort in Richtung T_{H1} (IgG₁<IgG_{2a}) bzw. T_{H2} (IgG₁>IgG_{2a}) getroffen werden.

3.3.3. Bestimmung der zellulären Immunantwort

Zum Nachweis der zellulären Immunantwort der mit unterschiedlichen Plasmid-DNA immunisierten BALB/c Mäuse wurden je Gruppe drei Versuchstiere eine Woche nach der zweiten Auffrischimmunisierung (neun Wochen nach der Grundimmunisierung) getötet und die Milzen entnommen. Nach Vereinigung der Milzen jeder Mausgruppe wurden Einzelzellen gewonnen (wie in M&M beschrieben) und eingesetzt, um in ELISPOT-Analysen alle IFN γ -sekretorische Zellen sowie in FACS-Analysen spezifische zytotoxische T-Zellen und deren IFN γ -Sekretion nachzuweisen. Zwei Wochen nach dem zweiten *Boost* wurden die restlichen drei Mäuse je Immunisierungsgruppe getötet und deren Milzen verarbeitet.

3.3.3.1. ELISPOT-Analyse

Die Elispot Analyse wurde eingesetzt, um die Anzahl IFN γ -sezernierender Immunzellen 24h nach Restimulation mit Peptiden zu quantifizieren und damit eine Vergleichsbasis für die Immunogenität der Konstruktvarianten zu schaffen. Für *in vitro*-Restimulationen wurde das p24^{Gag}(CA)-spezifische synthetische 9-mer Peptid A9I, für die Auslese nach Pol das V3-Peptid R10I und als Negativkontrolle PSA als unspezifisches Peptid eingesetzt. Die in den Abbildungen angegebenen Daten geben die Mittelwerte aus jeweils drei Ansätzen wieder.

Die Daten der ersten *in vitro*-Restimulation eine Woche nach dem zweiten Boost mit Gag- spezifischem CTL-Epitop A9I zeigten eine erhöhte Anzahl stimulierbarer Zellen bei der Kontrolle p24 und „GPN FS PR- V3“. Auch die übrigen GagPolNef V3-Konstruktvarianten induzierten eine zelluläre Immunantwort, wobei diese jedoch geringer ausfiel. Die Aktivierung der Protease führte in den Varianten zu besserer Immunogenität, während sich die Deletion von *nef* leicht negativ auswirkte.

Prinzipiell erwies sich der *frameshift* als immunogenitätssteigernd auf zelluläre Gag-spezifische Immunantworten. Die PolNef V3-Varianten zeigten erwartungsgemäß keinerlei zelluläre Reaktion auf Stimulation mittels Gag-spezifischem Protein A9I.

Nach Restimulation mit dem V3-CTL Epitop zeigte sich ein ähnliches Bild: das *frameshift*-Konstrukt mit inaktiver Protease lieferte weiterhin die höchsten Werte, während die übrigen GagPolNef V3-Konstrukte weniger stark reagierten. Die PolNef V3-Varianten sprachen wie erwartet an und zeigten eine Aktivität auf mittlerem Niveau. „GP V3“ fiel hier vollkommen aus. Die V3-Restimulation veranschaulichte keinen negativen Einfluß der attenuierten Protease im Durchlesekonstrukt, darüber

hinaus wirkte sich die Deletion von *nef* positiv auf zelluläre Pol-spezifische Immunantworten aus. Unter den PolNef V3-Varianten zeigte ein deletiertes *nef* mit inaktiverter und attenuierter Protease die besten Ergebnisse.

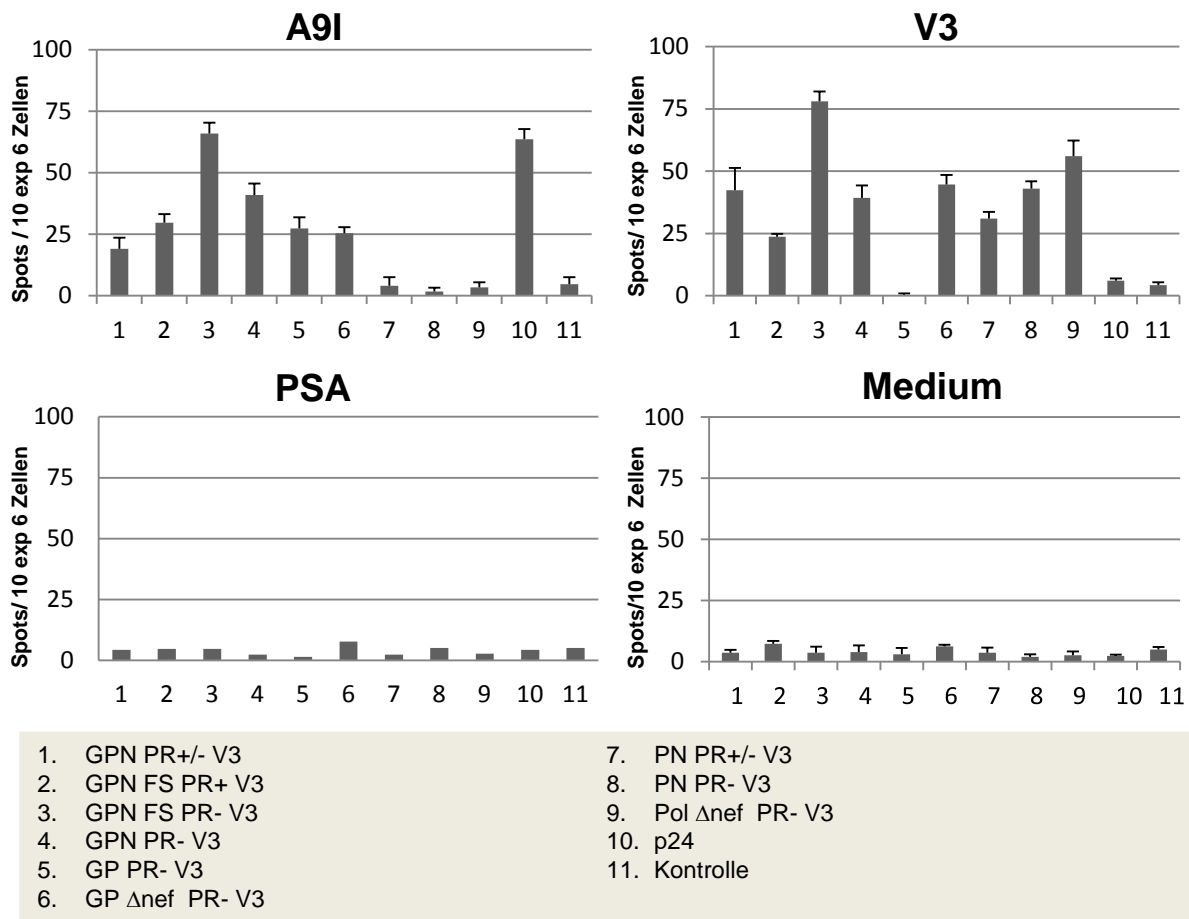


Abb. 3.9: Gag-spezifische zelluläre Immunantwort (1. Elispot-Assay): Entnahme der Milzzellen der immunisierten BALB/c-Mäuse (6 pro Gruppe) eine Woche nach der zweiten *Boost*-Immunisierung, Aufarbeitung und Auslese Gag-spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Zellantworten. Die Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen wurde mit Hilfe der Peptide A9I und V3 sowie als Negativkontrollen PSA und Medium mittels ELISPOT-Assay detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Ansätzen und repräsentieren die Anzahl positiver Zellen pro 10⁶. Auslese mittels ELISPOT-Lesegerät (BioSys).

Die Werte der zweiten Restimulation mit A9I und V3 zwei Wochen nach der zweiten Auffrischimmunisierung bestätigten die Ergebnisse der ersten *in vitro*-Analyse. Darüber hinaus konnte eine Steigerung CD8⁺ T-Zell-Antworten nachgewiesen werden, die vor allem nach Restimulation mit V3, und damit bezogen auf den *polnef*-Leserahmen auftraten. Die A9I-Restimulation veranschaulichte bereits bekannte Ergebnisse: Das *frameshift*-Konstrukt mit inaktiver Protease lag noch vor der Kontrolle p24, während die übrigen Varianten vierfach schwächer waren.

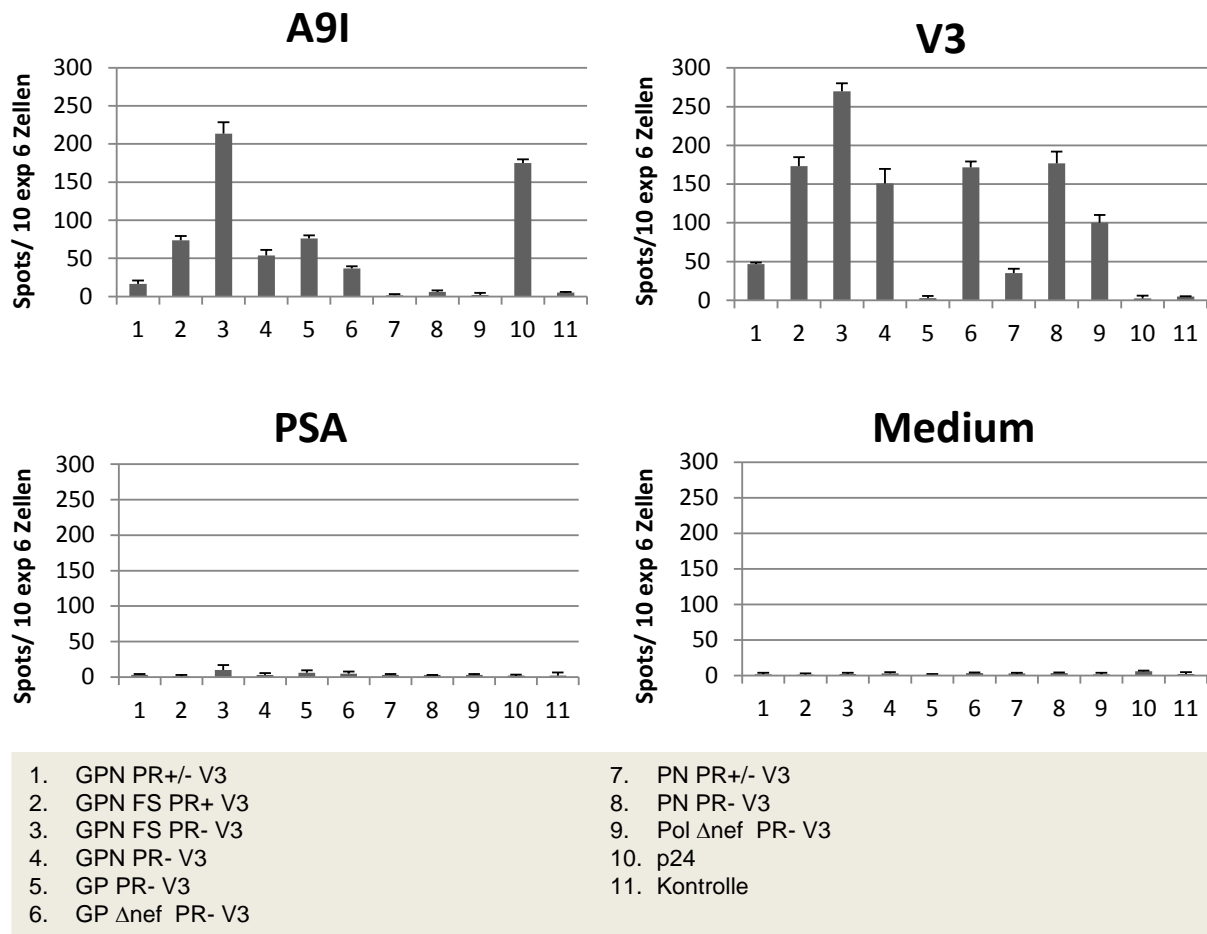


Abb. 3.10: Gag-spezifische zelluläre Immunantwort (2. ELISPOT-Assay): Entnahme der Milzzellen der immunisierten BALB/c-Mäuse (6 pro Gruppe) zwei Wochen nach der zweiten *Boost*-Immunisierung, Aufarbeitung und Auslese Gag-spezifischer CD8+ zytotoxischer T-Zellantworten. Die Anzahl IFN γ -sezernierender Zellen wurde mit Hilfe der Peptide A9I und V3 sowie als Negativkontrollen PSA und Medium mittels ELISPOT-Assay detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Ansätzen und repräsentieren die Anzahl positiver Zellen pro 10⁶. Auslese mittels ELISPOT-Lesegerät (BioSys).

Auch hier führte die Attenuierung der Protease sowie Deletion von *nef* zur verringerten Immunogenität. Nach Restimulation mit V3 (Pol) ergaben sich trotz *frameshift* die besten Ergebnisse durch „GPN FS PR- V3“. Neben dem Leserastersprung steigerte die inaktive Protease sowohl im GagPolNef V3- als auch im PolNef V3-Panel die zellulären Immunantworten.

Während die *nef*-Deletion bei GagPolNef V3 zu einer Verbesserung der Immunogenität führt, schneidet das entsprechende Konstrukt der PolNef V3-Reihe schlechter ab. Es fiel auf, dass unter den Konstrukten mit attenuierter Protease, also „GPN PR+/- V3“ und „PN PR+/- V3“ keinerlei Zunahme insbesondere an V3-spezifischen stimulierbaren IFN γ -Zellen auftraten.

3.3.3.2. FACS-Analyse

Die FACS-Analyse erlaubt, aus der Lymphozytenpopulation dank spezifischer Oberflächenanfärbungen CD4⁺- von CD8⁺-Zellen zu unterscheiden und aus der Gruppe dieser CD8⁺-Lymphozyten wiederum anhand intrazellulärer IFN γ -Anfärbung die Anzahl der IFN γ -sezernierenden CD8⁺-Lymphozyten zu bestimmen. Diese Zahl bezieht sich jeweils auf 3×10^4 CD8⁺-Lymphozyten. So konnten die synthetischen DNA-Vakzinekandidaten auf ihre Immunogenität bezüglich der Induktion potentiell zytotoxischer T-Zellen hin untersucht werden.

Der Nachweis dieser Zellen erfolgte, wie bereits im Elispot beschrieben, eine respektive zwei Wochen nach der zweiten *Boost*-Immunisierung. Die *in vitro* Restimulation der aus den drei Milzen einer Immunisierungsgruppe vereinigten Milzzellen erfolgte mit den CTL-Epitopen A9I, V3, PSA und vier Pools an potentiellen Pol-spezifischen Epitopen.

Die hierbei ermittelten Daten korrelierten zu denen der ELISPOT-Analyse. Nach Restimulation mit A9I erzielte „GPN FS PR- V3“ die höchsten Werte, während die übrigen Konstrukte im unteren bis mittleren Bereich rangierten. Die attenuierte Protease und das deletierte *nef*-Gen verringerte die Anzahl an IFN γ -sezernierenden CD8⁺-Lymphozyten, der *frameshift* hingegen steigerte die Immunogenität.

Die Restimulation mit V3 induzierte, bis auf die *frameshift*-Konstrukte, eine höhere Anzahl an CD8⁺-Lymphozyten durch die eingesetzten DNA-Plasmide als nach Restimulation mit A9I. Die Ergebnisse wiesen dabei höhere Werte auf, bis auf „GPN FS PR+ V3“, das eine geringere Lymphozytenzahl aktivierte, sowie „GP V3“ und p24, die, korrelierend zu den Ergebnissen im Elispot, auch hier gering ausfielen. In der FACS-Analyse zeigte sich wie bereits in der ersten Elispot-Analyse ein eher steigernder Effekt der attenuierten Protease und des deletierten *nef* unter den GagPolNef V3-Varianten.

Die besten Ergebnisse unter allen Konstrukten wurden durch „Pol Δ nef PR- V3“ erzielt, in der PolNef V3-Gruppe wirkte sich zudem die inaktive Protease positiv auf Pol-spezifische Immunantworten aus.

Der zweite *in vitro*-Assay zwei Wochen nach der zweiten Auffrischimmunisierung fiel neben einem hohen Hintergrund auch mit durchweg sehr hohen Ergebnissen auf, der die Induktion einer bis zu zehnfachen Menge an CD8⁺ IFN γ -produzierenden Lymphozyten im Vergleich zur ersten FACS-Analyse ergab.

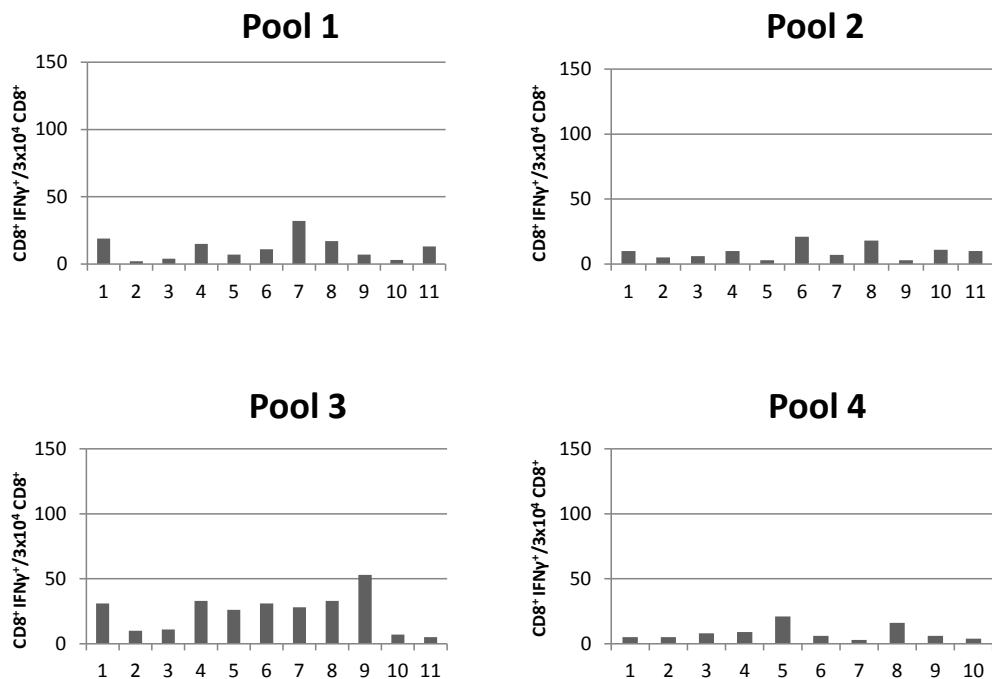
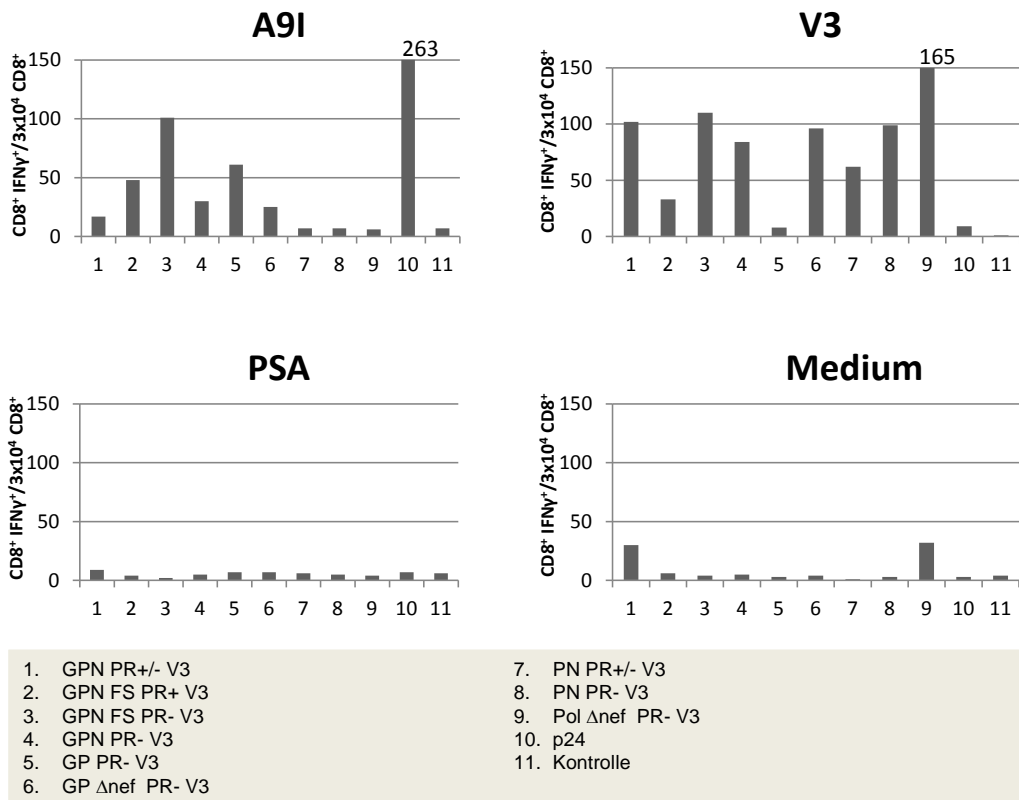


Abb. 3.11: Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten (1. FACS-Analyse): Eine Woche nach der zweiten Booster-Immunisierung entnommene Milzzellen der getesteten BALB/c Mäuse (6 Mäuse pro Gruppe) wurden bezüglich Gag- und Pol-spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozytantworten untersucht. Hierzu wurde nach Restimulation mit dem Peptid A9I (zur Auslese von Gag) bzw. V3 (zur Auslese von Pol) sowie den Negativkontrollen PSA und Medium und vier Pools an überlappenden potentiellen Pol-Epitopen die Zellzahl mittels intrazellulärer IFN γ -Anfärbung bestimmt. Die absolute Anzahl an IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten von 3x10⁴ untersuchten CD8⁺ T-Lymphozyten wurde aufgetragen.

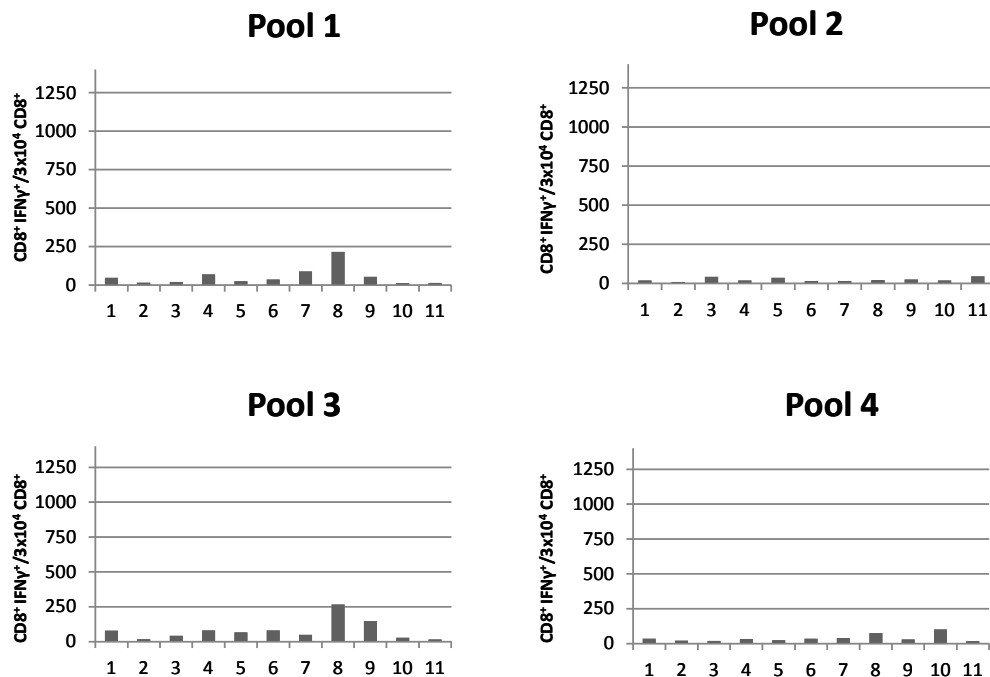
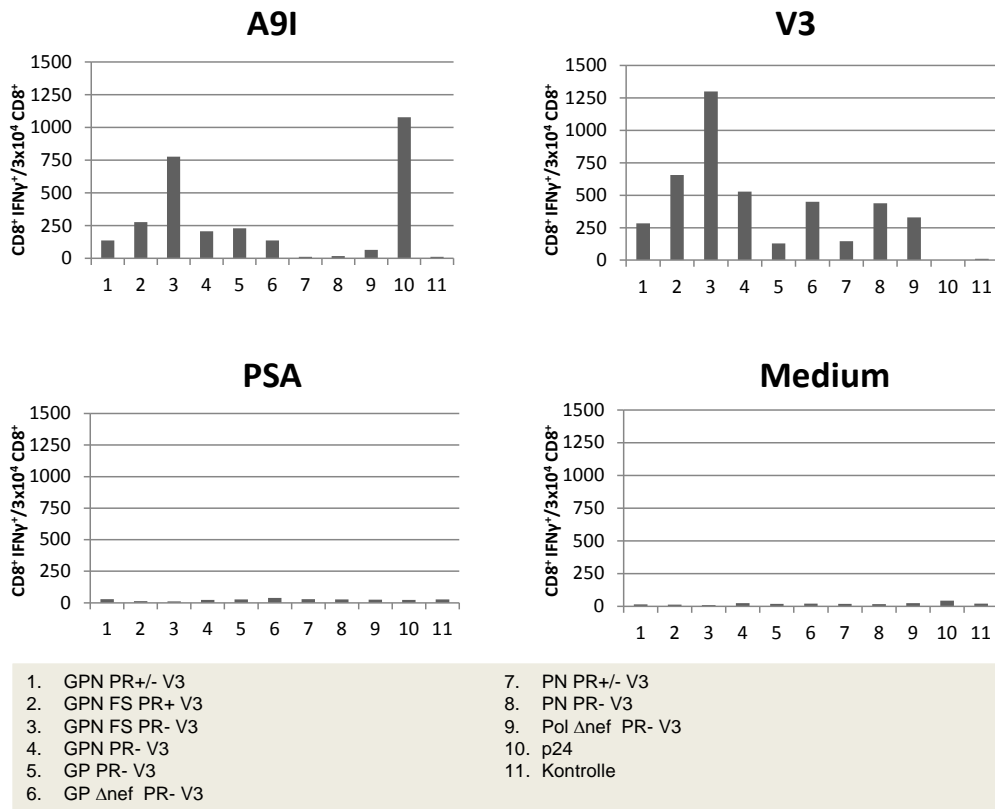


Abb. 3.13: Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten (2. FACS-Analyse): Zwei Wochen nach der zweiten Booster-Immunsierung entnommene Milzzellen der getesteten BALB/c Mäuse (6 Mäuse pro Gruppe) wurden bezüglich Gag- und Pol-spezifischer CD8⁺ zytotoxischer T-Lymphozytantworten untersucht. Hierzu wurde nach Restimulation mit dem Peptid A9I (zur Auslese von Gag) bzw. V3 (zur Auslese von Pol) sowie den Negativkontrollen PSA und Medium und vier Pools an überlappenden potentiellen Pol-Epitopen die Zellzahl mittels intrazellulärer IFN γ -Anfärbung bestimmt. Die absolute Anzahl an IFN γ -produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten von 3x10⁴ untersuchten CD8⁺ T-Lymphozyten wurde aufgetragen.

Zusätzlich zu dem V3-Peptid wurden insgesamt vier Peptidpools (Pool 1 - 4) eingesetzt, die aus überlappenden, die komplette Pol-Aminosäuresequenz abdeckenden 15-mer Peptiden bestehen (siehe M&M), um evtl. vorhandene H-2^d-restringierte Epitope innerhalb des Pol Proteins abzudecken und dadurch Pol-spezifische T-Zell-Antworten direkt auslesen zu können. Pool 1 bis Pool 4 spiegelten die oben beschriebene Erscheinung wieder. Insgesamt waren die mittels der Peptid-Pools gemessenen Antworten aber sehr schwach und ließen nur tendenzielle Aussagen zu.

Die Tendenzen der A9I- und V3-Restimulation korrelierten erneut größtenteils mit denen der ersten FACS-Analyse und der Auswertung des Elispots: stimuliert mit A9I induzierte „GPN FS PR- V3“ neben p24 die höchste zelluläre Aktivität, alle übrigen GagPolNef V3-Konstrukte erreichten etwa ein Drittel davon.

Auch die Restimulation mit V3 bestätigte diesen Trend. Hier erzielten die PolNef V3-Konstrukte mittelstarke Ergebnisse. Während das GagPolNef V3-Panel nach beiden Stimulationen konsistent war und eine Steigerung durch *frameshift*, inaktive Protease und *scr nef* erlangte, führte in der PolNef V3-Reihe die Inaktivierung der Protease zu besseren Werten als die Deletion von *nef* und verhielt sich damit gegensätzlich zur ersten FACS-Analyse. Die Stimulation mit den verschiedenen Pools resultierte bis auf Pool 3 durchschnittlich in eher geringer Reaktion. Die Tendenz des Pool 3 zeigte eine bessere Reaktion unter den Durchlese- und PolNef V3-Konstruktgruppen.

3.3.4. Kurzzusammenfassung

Die humoralen Immunantworten der DNA-Vakzinevarianten wurde nach Immunisierung anhand der Antikörperisotypen IgG₁, IgG_{2a} und IgG_{ges} in den Blutproben der BALB/c Mäuse bewertet. Dabei induzierte das vollsynthetische Kontrollkonstrukt p24^{Gag} nach der 2. Booster Immunisierung Antikörpertiter bis zu 1:100.000. Die Durchlese-Varianten mit attenuierter Protease sowie mit deletiertem *nef* mit inaktiver Protease zeigten keine signifikante Gag-spezifische humorale Immunantwort. Demgegenüber induzierte das Konstrukt „GPN PR- V3“ sowie das *frameshift*-Konstrukt mit funktionsfähiger Protease nach dem ersten und zweiten *Boost* bei Titern zwischen 800 und 2000 mittelmäßige humorale Antikörperantworten. Mit Antikörpertitern zwischen 800 und 8000 konnte „GPN FS PR- V3“ die besten humoralen Immunantworten gegen Gag auslösen.

Für die Beurteilung der zellulären Immunität durch FACS und Elispot-Analysen wurden spezifische zytotoxische T-Zellen aus Splenozyten der BALB/c Mäuse untersucht und nach Restimulation mit A9I, V3 und Pol-Peptiden deren IFN γ -Produktion gemessen. Mit Hilfe des 3'-terminal angefügten V3-Epitops konnte nun anhand der neuen Konstrukte der *polnef*-Leserahmen indirekt ausgewertet werden.

Die Elispot-Analyse ergab nach A9I- *in vitro*-Restimulation bei dem *frameshift*-Konstrukt mit inaktiver Protease sowie der Referenz p24 vergleichbar hohe Werte. Die restlichen GagPolNef V3-Varianten induzierten Immunantworten auf niedrigerem Niveau. Die Inaktivierung der Protease, der integrierte *frameshift* sowie die Entfernung von *nef* führten zu einer gesteigerten Gag-spezifischen zellulären Immunantwort. Die PolNef V3-Varianten reagierten erwartungsgemäß nicht auf die Stimulation mit A9I Gag. Die V3-Restimulation zur Auslese von *polnef* ergab auch hier die beste Pol-spezifische Immunität durch das *frameshift* Konstrukt mit inaktiver Protease. Eine negative Bewertung der attenuierten Protease und von *nef* konnte jedoch in der Pol-Auslese der Durchlese-Konstrukte nicht gefestigt werden, während sich die Inaktivierung der Protease in den *frameshift*-Konstrukten weiterhin als immunogenitätssteigernd erwies. Unter den PolNef V3-Varianten wirkte sich die inaktive Protease sowie, entgegen den Ergebnissen des GagPolNef-Panels, auch das deletierte *nef*-Gen positiv auf zelluläre Pol-spezifische Immunantworten aus.

Die Ergebnisse der FACS-Analysen korrelierten mit den Daten der Elispot-Auswertung: „GPN FS PR- V3“ konnte nach A9I-Stimulation erneut die beste Immunreaktion auslösen, die restlichen GagPolNef V3-Konstrukte aktivierten lediglich mittlere bis niedrige Zahlen CD8⁺-Lymphozyten. Die Stimulation mit dem V3-CTL Epitop ergab bis auf die *frameshift*-Varianten leicht höhere Werte als nach A9I-Stimulation.

Die Werte von Peptid-Pool 3 spiegelten eine stärkere Reaktion der Durchlese- und PolNef-Varianten wieder, während die übrigen ausgelesenen Pools eher geringe Aktivierungen zeigten.

3.4. Zusammenfassung

Wie in der untenstehenden Tabelle aufgeführt, korrelieren die Ergebnisse der *in vitro*-Studie in H1299 weitestgehend mit den *in vivo*-Analysen der BALB/c Mäuse. Die stärksten Expressionsraten und Immunantworten verzeichneten die *frameshift*-Konstrukte, unter denen wiederum die Variante mit inaktiver Protease vorn lag.

Danach folgten die Durchlesekonstrukte und Δ nef, wobei auch hier eine Inaktivierung der Protease die besten Ergebnisse erzielte. GagPol fiel sowohl in Expression als auch in der Immunogenität mit schwachen Werten auf, die in sich jedoch konsistent sind.

Die PolNef V3-Varianten ergaben ein ähnliches Bild: *in vivo* wie *in vitro*-Analysen korrelierten auch hier. Insgesamt gesehen generierte das Δ nef-Konstrukt vor der Variante mit inaktiver Protease die besten Ergebnisse, während die attenuierte Protease sich negativ auf Expression und Induktion einer Immunantwort auswirkte.

Vergleicht man die PolNef V3- mit der GagPolNef V3-Konstruktreihe, so sind die Daten der Wirkung der Proteaseaktivität konsistent. Die humorale Immunantwort konnte zwar nicht analysiert werden, doch zeigten zelluläre Immunantworten und Expressionsstudien ansteigende Werte des Δ nef-Panels nach Ausschluß von *gag*.

Auffallend an den Immunogenitätsstudien war der enorme Anstieg IFN γ -produzierender CD8⁺-Zellen im FACS zwischen dem ersten und zweiten Boost (100 auf 1200) der zwar auch im Elispot verzeichnet werden konnte, jedoch nicht in dieser Höhe (lediglich 3-4 fach) auftrat.

Zusammenfassend lieferten die GagPolNef V3- und PolNef V3-Konstrukte sowohl gute Expressionsraten und induzierten Gag-spezifische humorale sowie Gag- und Pol-spezifische zelluläre Immunantworten.

Konstrukt	Expression	zelluläre Immunantwort	humorale Immunantwort
GPN PR+/- V3	+	+	-
GPN PR- V3	+	+	+
GPN FS PR+ V3	++	++	+
GPN FS PR- V3	+++	+++	+
GPN V3	+/-	+/-	+/-
GP Δ nef V3	+	+	+
PN PR+/- V3	+/-	+	
PN PR- V3	++	+	
Pol Δ nef PR- V3	+++	++	

Tab. 3.2: Übersicht über die Ergebnisse der *in vitro*- und *in vivo*-Analysen.

4. Diskussion

4.1. Bisherige Studien und Ergebnisse

Aufgrund ihrer Fähigkeit, neben zellulären auch humorale Immunantworten im Menschen auszulösen (Catanzaro *et al.*, 2007), stellen DNA-Vakzine eine vielversprechende Grundlage für die Entwicklung eines potenten und sicheren HIV-Impfstoffes dar. Ein optimales Vakzin zielt darauf ab, eine größtmögliche Breite an zellulären Immunantworten gegen multiple HIV-Antigene in Kombination mit neutralisierenden Antikörperantworten zu induzieren (Kong *et al.*, 2003). Der Einsatz multipler Gene in einen HIV-Impfstoff führt, verglichen zu Vakzinen mit lediglich einem einzigen Geninsert, über den Anstieg potentieller T-Zell-Epitope zu einem verbesserten *Outcome* nach einem Virus-Challenge (Megede *et al.*, 2003).

Das Genom des HIV enthält neben multiplen variablen Bereichen auch einige konservierte Regionen, die sich als HIV-Vakzin-Insert als sehr vielversprechend darstellen. Diese konservierten Bereiche liegen unter anderem in Gag, das für die Strukturproteine des HIV kodiert und in großen Mengen translatiert wird. In mehreren Studien erwiesen sich modifizierte *gag*-Plasmide als potente Immuninduktoren (Megede *et al.*, 2003). Zum Anderen liegen in *pol*, das durch den unregelmäßigen ribosomalen *frameshift* zu 5-10% als GagPol-Fusionsprotein exprimiert wird (Scarlara *et al.*, 2003) und für virale Enzyme (PR, RT, IN) kodiert, ebenfalls konservierte Bereiche. Auch Nef gilt als bedeutendes Immunogen, da es im Infektionsverlauf neben Gag die höchste Dichte konservierter CTL-Epitope enthält. Zudem wird Nef vom Immunsystem von 91% der Infizierten erkannt und erzeugt eine starke zelluläre Immunität (Verrier *et al.*, 2005). Neben der hohen Variabilität und der damit verbundenen Fähigkeit des *immune-escape* löst Nef zytotoxische Effekte aus.

Da Gag, Pol, Nef und Env während der viralen Infektion vorrangig exprimiert werden, sind diese Proteine die Hauptangriffsorte der HIV-spezifischen T-Zellen (Otten *et al.*, 2006). Während Env als Hüllstruktur das Hauptziel der humoralen Immunantworten darstellt, bieten die intrazellulär gelegenen Proteine Gag, Pol und Nef potentielle Angriffspunkte für CD8⁺-Immunantworten. Prozessiertes Gag, Pol, Nef und Env kann, auf MHC I-Molekülen als Antigen präsentiert, von CTLs erkannt und die infizierte Zelle lysiert werden. Ist die T-Zell-Antwort stark genug, könnten befallene Wirtszellen beseitigt werden, bevor die Replikation einsetzt und das Virus in der Lage

ist, Reservoirs auszubilden (Kong *et al.*, 2003). Studien an Rhesusmakaken zeigten, daß eine DNA-Vakzine, die multiple Komponenten wie HIV-1 *gag* und *pol* enthält, eine breit gefächerte Immunantwort induzieren kann: sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Gag- und Pol-spezifische T-Zellen konnten stimuliert werden (Otten *et al.*, 2006; Bart *et al.*, 2008; McCormack *et al.*, 2008; Wild *et al.* 2009). Kombinationen von GagPolNef und Env erzeugte im Mausmodell eine starke CD8⁺-Immunität gegen Env, ohne jedoch CD4⁺- oder Antikörperantworten zu beeinträchtigen (Kong *et al.*, 2003).

Auf diesen Studien basierend, wurde für die vorliegende Arbeit *gagpolnef* als Geninsert der DNA-Vakzine eingesetzt, um anhand dieser Multigen-Vakzine mit erhöhter potentieller Epitopanzahl die Impfstoffimmunogenität bezüglich spezifischer Immunantworten zu steigern. Grundlage dafür lieferten HIV-1 Klasse B-Varianten des Ursprungskonstruktes „GPN“, das als Vektorplasmid in pcDNA3.1+ unter CMV-Promotorkontrolle stand. Die Adaption des Kodongebrauches an den hochexprimierter humaner Gene (Kodonoptimierung) ermöglichte unter anderem aufgrund der Elimination inhibitorischer Sequenzen (*cis*-aktiver Elemente (INS)), welche Stabilität und Translationseffizienz verminderten, eine *Rev*-unabhängige Proteinexpression (Graf *et al.*, 2000). Die Expressionsraten konnten hierdurch gesteigert und zelluläre sowie humorale Immunantworten deutlich verbessert werden (Deml *et al.*, 2001; Kofman *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003). Auch eine Inaktivierung des Myristylierungssignals sollte zu einer Steigerung der zellulären Abwehr beitragen (Scarlara *et al.*, 2003). In den Konstrukten wurde aus Sicherheitsgründen die Integrase deletiert sowie die RT durch Einsetzen der vertauschten *nef*-Termini (*scr nef*) in deren aktives Zentrum inaktiviert, um die immunstimulatorischen Epitope zu erhalten.

Die in dieser Arbeit getesteten Impfstoffvarianten unterschieden sich bezüglich der Proteaseaktivität (PR aktiv, inaktiv, attenuiert), des ribosomalen *frameshifts* (*frameshift* vs. Durchlesekonstrukte) sowie Nef (*scr nef* vs. deletiert). Zusätzlich enthielten die Modifikationen nun zur Auslese des *pol*-Leserahmens 3'-terminal die Gensequenz von *env*-V3, wodurch ein zusätzliches immunstimulatorisches Epitop (Kong *et al.*, 2003) in die Vektorplasmide integriert wurde und damit möglicherweise die Immunogenität der Impfstoffvarianten erhöht werden konnte.

Der Größe von Polygenen und Polyproteinen wird ein limitierender Einfluß auf die Effizienz von Transkription und Translation zugeschrieben. So sind neben dem GagPolNef-Varianten weitere Konstrukte entworfen worden, die sich lediglich über den *polnef*-Leserahmen erstreckten. Neben der Beurteilung der Expression und Immunogenität dieser PolNef-Varianten ohne den Einfluß von Gag soll in weiterführenden Studien die Kombination zweier einzelner Plasmide, die jeweils *gag* oder *polnef* tragen, im Vergleich zu *gagpolnef* auf einem Plasmid ermöglicht werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluß des natürlichen ribosomalen *frameshifts*, der PR und von Nef auf Expression und Immunogenität der neu modifizierten HIV-1B V3-Vakzinekandidaten zu evaluieren.

Expressionsstudien zu den Konstrukten wurden hierzu an der humanen Zelllinie H1299 durchgeführt. Daran schlossen sich Immunogenitätsstudien im H-2^d BALB/c Mausmodell an.

4.2. Expressionsstudien

4.2.1. Einflüsse der GagPolNef-Konstruktreihe *in vitro*

4.2.1.1. Bedeutung der Protease *in vitro*

4.2.1.1.1. Funktionsweise

Die im *pol*-Leserahmen kodierte HI-virale Aspartyl-Protease (PR, p11) liegt nur dimerisiert in aktivem Zustand vor und setzt sich aus 8 antiparallelen β -Faltblättern und einer α -Helix zusammen, die durch nichtkovalente Bindung ein Homodimer bilden (Gilles *et al.*, 2005; Pettit *et al.*, 2003, 2004 und 2005). Die aktive Protease schneidet nach Autokatalysation die viralen Vorläuferproteine und ist essentiell für Reifung und Morphogenese des Viruspartikels (Adamson 2003).

4.2.1.1.2. Aktive Protease und zytotoxische Effekte

Bei vorzeitiger Dimerisierung und damit Aktivierung der PR im Zytoplasma, beispielsweise durch Überproduktion und Aggregation, können zelluläre Proteine des Zytoskelettes degradiert werden, wodurch zytotoxische Effekte auftreten, die bis zur Nekrose führen können (Shoemann *et al.*, 1990; Riviere *et al.*, 1991; Gilles *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2003; Adamson *et al.*, 2003). Darüber hinaus können hierbei Gag- und GagPol-Domänen vorzeitig von essentiellen Transportsignalen abgespalten werden, und so kann die Aggregation und Freisetzung des Viruspartikels verhindert werden (Gilles *et al.*, 2005). Die in Insektenzellen festgestellte mangelnde Fähigkeit

von Gag-VLPs zur Morphogenese wird auf eine vorzeitige Proteaseaktivität zurückgeführt, die dazu führt, daß Gag verfrüht intrazellulär prozessiert wird. Durch Inaktivierung der Protease konnte jedoch die Morphogenese wieder stattfinden. Die Kombination von *gag* mit einer aktiven Protease führt demnach zum Abbruch der Partikelbildung (Adamson *et al.*, 2003; Wagner *et al.*, 1992). Hinweise auf diese Vorgänge gaben in der vorliegenden Arbeit verminderte Expressionsraten und das Abkugeln adhärenter Zellen (H1299), wie es bereits in vorhergehenden Studien gezeigt wurde (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003; Megede *et al.*, 2003). Reduzierte Expressionsraten im Westernblot wurden somit auf die negativen Effekte einer voll funktionsfähigen Protease oder veränderter Expressionskinetiken zurückgeführt (Megede *et al.*, 2003).

4.2.1.1.3. Aktive Protease und die Vorläuferproteine

Die erhöhte Prozessierung der Pr160 und Pr55-Vorläufer konnte in den vorliegenden Zellkulturstudien gezeigt werden: sobald das Enzym voll funktionsfähig vorlag, waren unprozessierte Polyproteine nicht nachweisbar, sondern einzig die entsprechenden Spaltprodukte p55^{gag} und p24^{gag}. Eine Inaktivierung der Protease führte demgegenüber zu einer stark reduzierten Prozessierung der viralen Genprodukte. So enthielten Zelllysate transfizierter H1299 der inaktiven oder attenuierten Protease-Varianten nach Detektion mit 13/5 anti-Gag und V3-spezifischem Antikörper NEA 9305 Pr160^{GagPol}-Vorläufer. Die PolNef-Varianten exprimierten ihre Vorläuferproteine unter einer inaktiven Protease; war diese jedoch voll funktionsfähig, wurden die Vorläuferproteine prozessiert und konnten nicht mehr nachgewiesen werden.

4.2.1.1.4. Aktive Protease und der natürliche *frameshift*

Die virale Protease wird von *pol* in einem GagPol Fusionsprotein via ribosomalem Leserastersprung exprimiert. Die Häufigkeit dieser *frameshift*-Ereignisse beläuft sich auf etwa 5-10% und reguliert die Expression von Pol und dessen Enzymaktivitäten (Pettit *et al.*, 2004). Durch Wegfall des natürlichen *frameshift* in den Durchlesekonstrukten werden durch Erhöhung des Verhältnisses von GagPol zu Gag auf 1:1 *pol*-kodierte Enzyme, darunter auch die virale Protease, überexprimiert. Die gesteigerte Konzentration des Enzymes resultiert bereits im Zytoplasma in der Dimerisierung und in Folge zu vorzeitiger und vollständiger Aktivierung mit Prozessierung der Substrate (Pettit *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2003).

Die voll funktionsfähige Protease führte somit zu verringerten Expressionsraten, insbesondere hinsichtlich der Durchlese-Varianten, wo sie in erhöhtem Maß vorlag. Die Inaktivierung der Protease sorgte demgegenüber zu einer Steigerung der Expression.

4.2.1.1.5. Attenuierte Protease

Um die beschriebenen zytotoxischen Effekte zu verringern und positiv auf die Expressionseffizienz einzuwirken, wurde die aktive virale Protease über den Aminosäureaustausch von Threonin zu Serin im aktiven Zentrum der PR an Position 94 des *pol*-Leserahmens attenuiert (Konvalinka *et al.*, 1995). Trotz gesteigerter Gag-Expression erfuhr die Protease damit eine 5-10 fache Abschwächung ihrer Aktivität, die in vorangegangenen Untersuchungen dargestellt worden ist (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003; Megede *et al.*, 2003). Dennoch blieb die Prozessierfähigkeit des Enzyms gegenüber seinen Substraten erhalten, die Spaltung von den Proteinvorläufern in Pr24^{gag} fand weiterhin statt. War die Aktivität der Protease zu gering, wirkte sich dies limitierend auf die Reifung des Viruspartikels aus, und die Infektiosität sank (Adamson *et al.*, 2003).

4.2.1.1.6. Inaktive Protease

In COS-1 Zellen konnte gezeigt werden, daß ein GagPol-*frameshift* Konstrukt mit inaktiver Protease weder prozessiert wurde, noch im Zellüberstand nachgewiesen werden konnte (Pettit *et al.*, 2004). Megede *et al.* (2003) verzeichneten bei inaktiver Protease ebenfalls fehlende p24-Expressionen und beeinträchtigte VLP-Sekretionen. Vorliegende Studien an funktionsunfähigen Protease-Konstrukten zeigten darüber hinaus erhöhte Gag-Expressionsraten sowohl der Durchlese- als auch der *frameshift*-Varianten verglichen zu attenuierten oder aktiven Proteasen und bestätigten damit die vorangegangenen Studien (Rajcáni *et al.*, 2003; Megede *et al.*, 2003; Diplomarbeit Isabell Koch, 2003). Auch der Vergleich unter *nef*-deletierten Vektorinserts korrelierte zu diesen Ergebnissen: eine inaktive Protease führte auch hier zu gesteigerten Expressionsraten.

4.2.1.2. Bedeutung des *frameshift in vitro*

4.2.1.2.1. Funktionsweise

Im retroviralen Genom werden Gag und Pol im Bereich des *spacer*-Proteins p1 durch offene, überlappende Leserahmen kodiert. Während *gag* über eigene Initiations- und Terminationskodons verfügt, resultiert die Synthese des GagPol-Polyproteins aus einem *-1frameshift*-Ereignis, das mit einer Häufigkeit von 5% auftritt. Der *frameshift*-Bereich besteht aus einer AU-reichen *slippery-site*-Sequenz 3'-terminal von NC (p7), an die sich eine Haarnadelstruktur anschließt. Nach Überspringen des *gag*-Stopkodons folgt eine ribosomale Leserasterverschiebung von einem Nukleotid, ein GagPol-Fusionsprotein wird exprimiert. Auch andere Retroviren setzen ähnliche *frameshift*-Mechanismen oder Durchlese-Unterdrückungen ein, um die Expression von GagPol zu regulieren und damit die Überproduktion von strukturellen Gag-Proteinen (MA, CA, NC, p6, p2, p1) in Relation zu enzymatischen Pol-Produkten sicherzustellen (CA, p2, NC, *transframe* Protein, PR, RT IN): unter allen Retroviren wurden intrazellulär Mengenverhältnisse von 20:1 (Gag:GagPol) gefunden. Die Erhaltung dieser Relation ist wichtig für die Generierung infektiöser Partikel und die Bewahrung der Stabilität der viralen RNA-Dimere (nach Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Scarlara *et al.*, 2003).

Da die Integration von multiplen Genen die Immunogenität einer Vakzine steigert und der zusätzliche *pol*-Leserahmen konservierte Bereiche enthält sowie die Anzahl an CTL-Epitopen erhöht, wurde in die Vektorinserts *pol* integriert. Durch *in frame* Schaltung von *pol* wurde in vorangegangenen Arbeiten ein *gagpol*-Fusionsgen geschaffen (Megede *et al.*, 2003; Arbeitsgruppe Prof. Ralf Wagner) wodurch äquimolare Mengen an Gag und Pol generiert werden konnten, was jedoch in einer Verschlechterung der VLP-Sekretion resultierte (Megede *et al.*, 2003). Um einen ribosomalen *frameshift* in die Durchlesekonstrukte zu integrieren, wurde ein Teil der HI-viralen Wildtyp-Sequenz verwendet, die sich inklusive *p6** bis zum Anfangsbereich der RT erstreckte und nicht kodonoptimiert war.

4.2.1.2.2. *frameshift* vs. Durchlese: GagPol-Vorläuferproteine

Anhand vorliegender Expressionsstudien wurde unter inaktiver Protease der Einfluß des *frameshift* auf das Expressions-Verhältnis der GagPol-Vorläuferproteine ersichtlich: die lediglich zu 5% exprimierten GagPol-Vorläufer zeigten sich als dünne Banden in Höhe Pr160^{gagpol}. Verglichen dazu stieg durch Entfernung des *frameshift*

sowie inhibitorischer Sequenzen die Expression von Pol an: in Zellysaten der Durchlesekonstrukte zeigten sich größere Mengen an Vorläuferproteinen (100% GagPol-Synthese). Entsprechende Beobachtungen wurden bereits in anderen Studien gemacht (Megede *et al.*, 2003).

Wird die Protease in den *frameshift*- und Durchlese-Varianten aktiviert, tritt wie oben erläutert eine frühzeitige Prozessierung der Vorläuferproteine ein: sie können nicht mehr nachgewiesen werden.

4.2.1.2.3. *frameshift* vs. Durchlese: Gag-Expression

Prinzipiell konnte nach Transfektion mit *frameshift*-Varianten ein Anstieg der Expressionsraten von Gag verglichen zu den Durchlesekonstrukten erreicht werden. Die Integration des ribosomalen *frameshift* in das Genom führte, korrelierend zu vorangegangenen Studien (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Diplomarbeit Isabell Koch, 2003), zu einer erhöhten Expression. Obwohl die eingefügte *frameshift*-Region Sequenzen des Wildtypes enthielt, wirkte sie dennoch förderlich auf die Gag-Expressionsraten. Demgegenüber wurde in weiteren Studien festgestellt, daß Wildtypsequenzen innerhalb von *gag* einen negativen Einfluß auf Pr55^{Gag} Raten haben, der teilweise durch Kodonoptimierung aufgehoben werden konnte (Graf *et al.*, 2000, 2004; Deml *et al.*, 2001; Kofman *et al.*, 2003). Die Integration des *frameshift* und die damit verbundene Regulation der Proteinverhältnisse von Gag und Pol schien demnach Einfluß auf die Expression der Genprodukte zu nehmen. Somit wurden möglicherweise durch Regulation der Expression von Pol die inhibitorischen Effekte der wt-Sequenzen positiv beeinflusst.

Verminderte Expressionsraten von Durchlesevarianten wurden bereits in anderen Studien beobachtet: die Überexpression von GagPol mit inaktiver Protease veränderte sowohl Proteinmenge als auch -profil, es fand sich 8mal weniger virales Protein als im Wildtyp (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). Veränderungen des Gag/GagPol Verhältnisses mit Überexpression von GagPol-Vorläufern führte zu reduzierter Infektiosität des Virus, hemmte die Formation stabiler RNA-Dimere und interferierte damit mit der Morphogenese, ohne jedoch die Verpackung der viralen RNA zu beeinflussen (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Park *et al.*, 1991; Dulude *et al.*, 2006). Die Aufrechterhaltung des ribosomalen *frameshift* war demnach für die Infektiosität das HI-Virus äußerst bedeutend.

4.2.1.2.4. **frameshift: aktive vs. inaktive Protease**

Die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Protease in Anwesenheit des natürlichen *frameshift* nahm keinen Einfluß auf die Expression von Gag. Aufgrund der geringeren Expression von GagPol und dessen Enzymen konnten keine zytotoxischen Effekte der Protease auf die *frameshift*-Konstrukte nachgewiesen werden. Da die Protease in nur geringen Mengen gebildet wurde, wurde durch physikalische Trennung eine vorzeitige Dimerisierung mit intrazellulärer Aktivierung verhindert und so deren zytotoxische Wirkung minimiert. Da dennoch eine Spaltung der Proteine stattfand, war dieser Effekt nicht absolut: eine inaktive Protease führte in den *frameshift*-Konstrukten zu leicht besseren Expressionsraten verglichen zu denen der funktionsfähigen Variante.

4.2.1.2.5. **Durchlese: aktive vs. inaktive Protease**

Demgegenüber stand die Überexpression der viralen Protease in den Durchlesekonstrukten, die GagPol zu 100% ausbildeten: in diesen Varianten nahm die Protease Einfluß auf die Expression. Eine erhöhte Menge des Enzyms inhibierte die Replikation der Durchlesekonstrukte (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001). Megede *et al.* (2003) fanden durch Aktivierung der Protease in GagPol-Durchlesekonstrukten erhöhte intrazelluläre Mengen der GagPol-Produkte p66 RT, p51 RT, wohingegen Durchlesevarianten mit inaktiver Protease höhere Level des Pr160 Vorläufers aufwiesen und geringere Mengen der GagPol Produkte zeigten.

4.2.1.3. **Bedeutung von Nef *in vitro***

Aufgrund der Herabregulationen von CD4 und CD28 auf T-Helferzellen sowie MHC Klasse I und II Expressionen auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC) verhindert Nef normalerweise die Präsentation und Erkennung viraler Peptide an der Oberfläche der Zielzellen. Zudem werden durch Nef zellinterne und externe Apoptosesignale und damit die Lebensdauer der infizierten Zelle kontrolliert. So wurde der infizierten Zelle der Entzug vor dem Immunsystem (zytotoxische T-Zellen, neutralisierende AK) und die Freisetzung neuer Virionen ermöglicht (Fackler *et al.*, 2001; Greenway *et al.*, 2003; Ranjan Das *et al.*, 2005). Nef stellt damit einen wichtigen Faktor für die Infektiosität des Virus dar (Verrier *et al.*, 2005). In einer Kohorte von 10 HIV-Infizierten aus Sydney, bei denen natürliche Deletionen in Nef vorkamen, traten die AIDS-typischen Symptome bei einer relativ hohen Anzahl an CD4⁺-T-Lymphozyten sehr verzögert auf (Nathanson *et al.*, 2000). Während der

Einschluß von Nef in die Vakzine durch CTL-Induktion in Primatenstudien für Schutz sorgte, berichtete eine weitere Studie von einer positiven Korrelation zwischen Nef-spezifischen T-Zell-Antworten und ansteigender Viruslast in C-Typ Vakzinen, was zu dem Schluß führte, daß sich Nef in HIV-1C Vakzinen als nicht nützlich erwies (Nkolola *et al.*, 2006).

Nef wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in die Ausgangskonstrukte der Vakzinevarianten integriert, um dem Immunsystem eine möglichst hohe Anzahl an immunogenen Epitopen präsentieren zu können und so *in vivo* eine breit gefächerte und spezifische CTL-Antwort (Majumder *et al.*, 2003) zu induzieren. Da zytotoxische Reaktionen (Fujii *et al.*, 1996) und Herabregulationen von immunrelevanten Oberflächenrezeptoren (Stumptner-Cuvelette *et al.*, 2001, 2003; Fackler *et al.*, 2001; Greenway *et al.*, 2003; Ranjan Das *et al.*, 2005) beobachtet worden sind, wurden N- und C-terminale Bereiche des *nef* in den *scr nef*-Konstrukten vertauscht, um die immunstimulatorischen Epitope bei verringerten zytotoxischen Effekten zu erhalten.

Wir verglichen die *scr nef*-Konstrukte mit einem GagPol-Konstrukt, bei dem die Gensequenz von *nef* komplett aus dem Konstrukt entfernt worden war (Δnef). Neben der etwa 10 kDa niedrigeren Bande und einer dezent erhöhten Gag-Expressionsrate bei Δnef konnten, korrelierend zu den Ergebnissen vorheriger Untersuchungen (Diplomarbeit Isabell Koch, 2003), keine signifikanten Unterschiede zwischen den GagPol-Vergleichskonstrukten festgestellt werden. Die Deletion von *nef* hatte damit entsprechend den Vorstudien keine Auswirkung auf die Expressionseffizienz.

Weitere publizierte *in vitro*-Studien belegten, daß Nef entweder keine oder positive Effekte auf die virale Replikation ausübte. Ein Virus ohne *nef*-Gen replizierte in signifikant geringeren Mengen und war nicht pathogen. In HeLa-Zelllinien replizierten *nef*-positive Varianten 5-10 fach mehr verglichen zu deletierten *nef*-Varianten: Nef fördert die Replikation direkt über eine Aktivierung der Signalkaskade und der darauf folgenden verbesserten Replikation und Infektiosität des Virus (Fackler *et al.*, 2001; Ranjan Das *et al.*, 2005). Verglichen zum Wildtyp waren mutierte Nef-Varianten 4-40mal weniger infektiös (Ranjan Das *et al.*, 2005). Während bei „GP“ aufgrund seiner funktionstüchtigen Protease die Pr160-Vorläufer nicht detektierbar waren und dieses Konstrukt somit nicht in die Bewertung des Pol-Leserahmens einbezogen werden konnte, exprimierte „GP Δnef V3“ in der V3-Analyse geringere Mengen GagPol als die entsprechende Durchlesevariante mit *scr nef*. Die Expression der Vorläufer wurde also durch inaktivierte Anteile von Nef leicht verbessert. Das *scrambling* des *nef*-

Gens schwächte somit mögliche zytotoxische Effekte ab und *scr nef* kann in einer Vakzine eingesetzt werden.

4.2.2. Einflüsse der PolNef-Konstruktreihe *in vitro*

Da der Größe eines Vektors Einfluß auf Translations- und Transkriptionseffizienz sowie Vakzineverträglichkeit zugeschrieben wurden (Rajcáni *et al.*, 2002), wurden vollsynthetische, kodonoptimierte PolNef-Varianten entworfen, die in Expression und Immunogenität von Gag unbeeinflusst blieben. Diese Varianten unterschieden sich in der Aktivität der Protease sowie in Nef (*scr nef* vs. Δ *nef*) und wurden nach Transfektion humaner H1299 mit Hilfe V3-spezifischer Antikörper hinsichtlich ihrer Expression untersucht. Der Vergleich der Konstrukte untereinander korrelierte zum Großteil zu den oben aufgeführten Analysen der GagPolNef-Varianten.

4.2.2.1. PolNef und die Proteaseaktivität

Die funktionsfähige Protease konnte in den PolNef-Varianten durch Überexprimierung vorzeitig intrazellulär dimerisieren und bewirkte, wie bereits erwähnt, zytotoxische Effekte. Vorzeitig aktiviert, spaltete die virale Protease auch unter den Polnef-Varianten die Proteinvorläufer, die daraufhin nicht mehr detektierbar waren. Gegenüber der aktiven Protease sorgte deren Inaktivierung durch Wegfall der negativen Einflüsse für detektierbare Vorläufer in der V3-Studie. Somit verhielten sich die Varianten ohne Gag entsprechen den Varianten mit Gag und bestätigten die Vorstudien (Megede *et al.*, 2003; Diplomarbeit Isabell Koch, 2003). Die An- oder Abwesenheit von Gag übte also keinen Einfluß auf die negativen Effekte der aktiven respektive positiven Einflüsse der inaktiven Protease aus.

4.2.2.2. Pol Δ *nef*

Demgegenüber stand der Einfluß von Nef: die Variante ohne Nef („Pol Δ *nef* V3“) zeigte im Gegensatz zu den GagPolNef-Analysen die stärkste Expression unter den PolNef-Konstrukten. Zum Einen könnte die Steigerung der Expressionsrate auf dem Fehlen möglicher zytotoxischer Effekte von Nef beruhen, zum Anderen könnten auch der Verlust des Einflusses von Gag und damit das Wegfallen eventueller Interaktionen zwischen Gag und Nef eine förderliche Wirkung auf die Expression der Konstrukte haben.

4.2.3. GagPolNef- vs. PolNef-Konstruktreihe (V3-Detektion)

Der Vergleich zwischen PolNef- und GagPolNef-Varianten zeigte etwa ähnlich starke Banden der Varianten mit inaktiver Protease in der V3-Analyse. Wurde die Protease aktiviert, fanden sich in beiden Konstruktpaletten entsprechend der enzymatischen Zytotoxizität und Spaltung der Proteinvorläufer keine detektierbaren Banden. Die Ergebnisse zwischen GagPolNef- und Polnef-Panel korrelierten bezüglich der Protease und bestätigten vorhergehende Untersuchungen (Megede *et al.*, 2003; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Diplomarbeit Isabell Koch, 2003). Eine inaktive Protease erzielte *in vitro* die besten Ergebnisse und könnte nicht zuletzt wegen der geringen toxischen Effekte in eine HIV-Vakzine eingeschlossen werden.

Demgegenüber stand der Expressionsanstieg der Variante ohne Gag und ohne Nef verglichen zu der Variante mit Gag und ohne Nef. Anhand dieser Analyse erschien ein Einfluß von Gag auf die Expression von Nef möglich, da der Wegfall von Gag verbesserte Expressionsraten nach sich zog. Darüber hinaus wäre auch das Fehlen toxischer Effekte von Nef verglichen zu *scr nef* eine mögliche Erklärung. Da die Ergebnisse beider Konstruktreihen diesbezüglich variierten, sollten weitere Studien durchgeführt werden, um die genannten Zusammenhänge und die Evaluierung des Einbezuges in eine potente HIV-Vakzine klären zu können.

Insgesamt gesehen konnte mit den gezeigten Ergebnissen bislang noch nicht vollkommen gesichert werden, ob Gag Einfluß auf die Expression von Pol nimmt. Während in Studien von Megede *et al.* (2003) der Zusatz von *gag* an den *pol*-Leserahmen für lediglich geringfügigen Veränderungen von Pol-spezifischen Expressionsraten und andersherum sorgte, hatte in den vorliegenden Ergebnissen Gag keinen Einfluß in Varianten mit ausgeschaltetem jedoch vorhandenem Nef (*scr. nef*), wohingegen bei fehlendem Nef starke Varianzen zu Gunsten der Variante ohne Gag auftraten.

4.3. Immunogenitätsstudien am BALB/c Mausmodell

Die spätere Anwendung der verschiedenen HIV-1B Vakzinekandidaten in einem HIV-Impfstoff erfordert Kenntnisse über deren immunologischen Eigenschaften. Die Induktion humoraler sowie zellulärer Immunantworten gegenüber Gag und Pol wurde im Tiermodell an weiblichen BALB/c Mäusen ausgetestet. Bezüglich der humoralen Immunantwort wurde die GagPolNef-Reihe ausgewertet, während die zellulären

Gag- und Pol-spezifischen Reaktionen sowohl anhand der GagPolNef- als auch der PolNef-Varianten untersucht wurden.

4.3.1. Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten

Nach i.m. Immunisierung erfolgt die Plasmidaufnahme in Myozyten sowie in Makrophagen und dendritischen Zellen, die entlang der Muskulatur lokalisiert sind. Vorwiegend dendritische Zellen drainieren das Plasmid in die Lymphknoten. Prinzipiell scheint die Aufnahme in Rezeptorzellen via Endozytose stattzufinden, in der das Plasmid den Endosom-Lysosom-Apparat durchwandert und dabei teilweise degradiert wird. Da sich zu diesem Zeitpunkt kaum T-Zell Rezeptoren der CTLs in der Umgebung befinden, fungiert die Muskelzelle zunächst als Antigenreservoir, das Antigen wird durch sogenanntes „*cross-priming*“ an der üblichen MHC Klasse I-Präsentation „vorbeigeschleust“. Dafür dienen Makrophagen und dendritische Zellen als APC (*antigen presenting cells*) und präsentieren die immunogenen Peptide nach Endozytose über ihre MHC I-Oberflächenmoleküle den CD8⁺ T-Lymphozyten und führen sie so der CTL-Antwort zu. Die MHC II-präsentierten Vakzine-Peptide werden von CD4⁺ T-Helfer Zellen erkannt, die wiederum über spezielle B-Lymphozyten T_H2-Antworten auslösen und Antikörper produzieren können. Nach spezifischem *Priming* sind CD4⁺ T-Helfer Zellen in der Lage, neben B-Zellen auch mit CD8⁺ T-Zellen zu interagieren. Dendritische Zellen (DC) sind die effektivsten APCs und setzen neben MHC I und II Präsentation IFN γ und andere Zytokine frei, die NK-Zellen aktivieren und damit T_H1 CTL-Antworten induzieren sowie CTL-Gedächtniszellen hervorbringen. Darüber hinaus produzieren DCs IL-12, sind zur *cross-presentation* in der Lage und wandern in aktiviertem Zustand in Lymphknoten zur weiteren DC-Aktivierung und Proliferation. Wird das Antigen der DC von außen oder durch eine zerstörte Nachbarzelle angeboten, erfolgen MHC II Formation und CD4⁺ T-Helfer Zell Aktivierung 1000-fach effizienter. Durch die intramuskuläre Injektion wird vorwiegend eine T_H1 Antwort ausgelöst, während die intradermale Applikation zu T_H2 Antworten führt. Die Dominanz der T_H1 CTL Antwort nach i.m. Verabreichung hat einige Vorteile: CTLs zerstören die infizierte Zellen direkt und sind damit effizienter als Antikörper. Darüber hinaus können sich CTLs eher gegen Antigenomänen konservierter und interner Proteine richten als gegen variable Oberflächenproteine und sind damit in der Lage, für *cross protection* innerhalb verschiedener Virusstränge und Serotypen zu sorgen (nach Rajcáni *et al.*, 2005).

4.3.1.1. Einfluß der viralen PR auf die Immunogenität

Die inaktive Protease der *frameshift*-Konstrukte induzierte eine stärkere, hauptsächlich T_H1 betonte Antikörperantwort verglichen zur aktiven Protease. Unter den Durchlesekonstrukten ist das Verhältnis noch ausgeprägter: während die attenuierte Protease weder nach erstem noch nach zweitem *boost* Antikörper induzierte, führte hier die Inaktivierung sowohl nach dem ersten als auch nach dem zweiten *boost* zu einem mittelstarken Anstieg der Antikörpertiter.

A9I-Stimulation

ELISPOT

GPN V3: PR- > PR+/-

GPN FS V3: PR- >> PR+

FACS

GPN V3: PR- > PR+/-

GPN FS V3: PR- >> PR+

V3-Stimulation

GPN V3: PR- ~ PR+/-

GPN FS V3: PR- >> PR+

GPN V3: PR- < PR+/-

GPN FS V3: PR- >> PR+

Tab. 4.1: Zelluläre Immunantworten nach A9I (Gag)- und V3-Stimulation bezüglich der Proteaseaktivität.

Die Ergebnisse der humoralen Immunreaktion korrelierten weitestgehend mit der Aktivität der zellulären Immunantwort: Die Elispot-Analyse ergab nach A9I und V3-Stimulation generell höhere Zahlen an IFN γ -sezernierenden Immunzellen der Konstrukte mit inaktiver Protease verglichen zu denen mit funktionsfähiger viraler Protease. Die PolNef-Palette bot ein entsprechendes Bild. Sowohl in Elispot- als auch in FACS-Analysen induzierte das Konstrukt mit inaktiver Protease durchweg bessere Immunantworten.

Demnach konnte festgestellt werden, daß eine inaktivierte Protease die Immunogenität der Vakzinevarianten verbesserte und Konstrukte, die sie enthielten, in der Lage waren, sowohl humorale Antikörper als auch zelluläre Immunantworten gegen Gag und Pol auszulösen. Entgegen früheren Untersuchungen (Megede *et al.*, 2003) beeinflusste demnach die proteasevermittelte Spaltung von Gag und GagPol auch deren Prozessierung und Präsentation *in vivo*. Es bestätigten sich somit auch die Erkenntnisse der *in vitro*-Analyse: die festgestellten zytotoxischen Effekte der aktivierten Protease, welche die Expression der Konstrukte beeinflusste, setzten sich in den Mausstudien fort. Die funktionsfähige Protease verringerte die Zahl IFN γ -produzierender, CD8⁺ T-Zell Antworten. Da sich die Wirkung der Protease besonders

unter den *frameshift*-Varianten zeigte, schienen die zytotoxischen Effekte der Protease allein jedoch keine ausreichende Erklärung darzustellen, da, wie oben ausgeführt, diese Konstrukte Pol lediglich zu 5-10% exprimiert wurden und damit eine vorzeitige Dimerisierung im Zytoplasma unwahrscheinlich war.

Insgesamt gesehen erzielten Konstrukte mit einer inaktiven Protease die besten Immunantworten und sollten daher in einem potenten HIV-Impfstoff eingesetzt werden.

4.3.1.2. Einfluß des *frameshift* auf die Immunogenität

In der vorliegenden Untersuchung konnten neben Gag- auch Pol-spezifische Immunantworten indirekt über die V3-Detektion ausgelesen werden, die Ergebnisse beider Analysen stimmten miteinander überein.

A9I-Stimulation

ELISPOT

GPN PR- V3: **FS >> Durchlese**

FACS

GPN PR- V3: **FS >> Durchlese**

V3-Stimulation

GPN PR- V3: **FS >> Durchlese**

GPN PR- V3: **FS >> Durchlese**

Tab. 4.2: Zelluläre Immunantworten nach A9I (Gag)- und V3-Stimulation bezüglich des *frameshift*.

Die Integration des *frameshift* in die Vakzinekandidaten erwies sich sowohl in der Aktivierung humoraler als auch zellulärer Immunantworten als förderlich: die Ergebnisse der Analyse der Antikörpertiter, insbesondere nach dem 2. Bluten, sowie die der FACS- und Elispot-Studien korrelierten mit diesem Ergebnis, während Durchlese-Konstrukte viel geringere Reaktionen induzierten. Somit könnte es sein, daß sich durch die Entfernung des natürlichen ribosomalen Leserastersprunges das überexprimierte Pol negativ auf die Immunogenität der Varianten auswirkt, wobei jedoch auch die Größe der Konstrukte mit ihrer konsekutiv verminderten Expressionrate eine zusätzliche Rolle spielen könnte. Die gesteigerte Induktion Pol-spezifischer Effektor- oder Memoryzellen der Durchlese-Varianten führte zu verringerten Gag-spezifischen Immunantworten. Die zuvor beschriebene, nicht nachweisbare Pol-spezifische zelluläre und humorale Immunantwort nach Immunisierung einer *frameshift*-Variante mit aktiver Protease (Nabel *et al.*, 2000; Megede *et al.*, 2003; Diplomarbeit Isabell Koch, 2003) konnte damit nicht bestätigt

werden. Zwar war die direkte Detektion Pol-spezifischer T-Zellen nicht möglich, doch das V3-CTL Epitop ermöglichte die indirekte Auslese des *pol*-Leserahmens und ergab mittelstarke zelluläre Immunreaktionen IFN γ -sezernierender Immunzellen nach Applikation des *frameshift*-Konstruktes mit attenuierter Protease.

Demgegenüber könnten die vorliegenden Ergebnissen Hinweise auf die Erkenntnisse geben, die besagen, daß der Wegfall des *frameshift* bzw. die intrazelluläre Überexprimierung der viralen Protease die HIV-1 Replikation inhibiert (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Dulude *et al.*, 2006), während die übermäßige Expression von GagPol-Vorläuferproteinen mit der Morphogenese von HIV-1 (*assembling*) interferiert (Park *et al.*, 1991; Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001).

Die geringere Menge an Antigenproduktion durch die Durchlese-Konstrukte erklärte die gezeigte geringere Immunogenität verglichen zu *frameshift*-Varianten, die in ihrer Genomstruktur eher dem Wildtyp ähneln: in Studien wurde nachgewiesen, daß Veränderungen des Gag/GagPol Verhältnisses zu Gunsten des GagPol Vorläufers (20:21) starke Beeinträchtigungen (etwa 1000-fach geringer) der Immunogenität nach sich zogen (Shehu-Xhilaga *et al.*, 2001; Megede *et al.*, 2003; Dulude *et al.*, 2006). Demzufolge wäre die starre Aufrechterhaltung des wt-Gag/GagPol Verhältnis von 20:1 durch den *frameshift* für die Sicherung der viralen Immunogenität notwendig.

Zudem hat die im Bereich der *slippery site* enthaltene, nicht kodonoptimierte wt-Sequenz keinen negativen Einfluß auf die Immunogenität, was der Fähigkeit des *frameshift* entspricht, hinreichend Immunreaktionen zu induzieren.

Demzufolge erwies sich die *frameshift*-Variante als sinnvoll und potent für den Einschluß in eine HIV-DNA Vakzine.

4.3.1.3. Einfluß von Nef auf die Immunogenität

Die Integration von *nef*-Gensequenzbereichen in die HIV-Vakzinekandidaten führte zu besseren humoralen Immunantworten verglichen zu Varianten ohne *nef*. Bezüglich der zellulären Immunogenität von Nef konnten zwei Aussagen getroffen werden: zum Einen erlaubten *scr nef*-Varianten bessere Gag-spezifische Reaktionen als Δ *nef*-Varianten, demgegenüber führte das Fehlen von Nef zu leicht besseren Pol-spezifischen Immunantworten nach V3-Stimulation, die jedoch auch im Zusammenhang mit der geringeren Konstruktgröße stehen kann.

A9I-Stimulation**ELISPOT**GP PR- V3: *scr nef* > Δnef **FACS**GP PR- V3: *scr nef* > Δnef **V3-Stimulation**GP PR- V3: *scr nef* ~ Δnef GP PR- V3: *scr nef* \leq Δnef

Tab. 4.3: Zelluläre Immunantworten nach A9I (Gag)- und V3-Stimulation bezüglich Nef.

Während „GP V3“ mittelmäßige, T_H2 gerichtete humorale und Gag-spezifische zelluläre Immunantworten induzierte, fiel dieses Konstrukt nach Stimulation mit V3 aus: es konnten keine Pol-spezifischen Reaktionen detektiert werden. Wie Ranjan Das *et al.* (2005) berichteten, konnte Nef neben den bereits genannten Fähigkeiten der Herabregulation verschiedener Oberflächenrezeptoren und der Apoptose und Signalsteuerung in infizierten Zellen in Makrophagen die Freisetzung lymphozytenstimulierender Faktoren induzieren und dadurch das Reservoir potentieller Wirtszellen erweitern. Durch Aktivierung von T-Zellen steigerte Nef die virale Replikation. Darüber hinaus führte Nef in Rhesusaffen zu verstärkter Infektiosität, höherer Viruslast sowie rasanterer Krankheitsprogression. Während einerseits Studien zeigten, daß Nef auch in anderen Mausstämmen hoch immunogen war (Verrier *et al.*, 2005; Catanzaro *et al.*, 2007), fielen, korrelierend zu einer weiteren Studie in BALB/c Mäusen, die Immunantworten in diesem Mausstamm eher mäßig aus. Möglicherweise lag dieser eher geringe Unterschied zwischen *scr nef* und Δnef -Varianten an der Fähigkeit des BALB/c-Mausstammes, Nef-spezifische Epitope zu erkennen (Kong *et al.*, 2003). Diesbezüglich könnten weitere Studien der Konstrukte in anderen Mausstämmen hilfreich sein.

Aufgrund der in der Literatur beschriebenen, überwiegenden Immunogenität der *scr nef*-Konstrukte sowie der Möglichkeit der breiteren CTL-Stimulierung mittels Nef-Antigen scheint dennoch der weitere Einsatz von abgeschwächten *scr nef*-Sequenzen in einer DNA-Vakzine sinnvoll, auch wenn in der vorliegenden Arbeit, wohl aufgrund der o.g. Restriktionen des BALB/c Mausmodells, keine T-Zell-Antworten nachweisbar waren.

4.3.1.4. Einfluß von PolNef auf die Immunogenität

Tierstudien von Casimiro wiesen Pol-spezifische Immunantworten nach *pol*-DNA Vakzinierung sowohl in Maus- als auch in Makakenstudien nach. Die Vakzine

induzierte neben CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Mäusen auch in Affen CTLs und Pol-spezifische T-Zellen (Casimiro *et al.*, 2002). Darüber hinaus lösten die konservierten Bereich von Pol im Großteil von HIV-Patienten breite CTL-Antworten aus, deren Stärke wiederum invers mit der Viruslast korrelierte (Megede *et al.*, 2003). Demnach könnte Pol ein gutes Antigen innerhalb einer HIV-Vakzine darstellen.

Wie bereits unter den Expressionsstudien beschrieben, wurden PolNef-Varianten entworfen, um das ursprüngliche GagPolNef-DNA-Vektorinsert zu verkleinern. Dieselbe Menge Antigen könnte so dem Organismus auf zwei getrennten Plasmiden (pGag vs. pPolNef) angeboten werden, wodurch eine verbesserte Aufnahme, Verträglichkeit und Expressionsrate erreicht werden soll (Rajcáni *et al.*, 2005). Zudem stimulierte eine GagPol DNA-Vakzine in gleichem Maße CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wie die Kombination aus Gag- und Pol-Plasmiden (Otten *et al.*, 2006).

In der vorliegenden Immunisierungsstudie wurden die PolNef-Plasmide den Mäusen zunächst einzeln und ohne zusätzliches Gag verabreicht, um die immunogenen Eigenschaften der Varianten mit den GagPolNef-Konstrukten in Relation setzen zu können. Gag-spezifische zelluläre und Antikörper-Antworten konnten erwartungsgemäß nicht ausgelesen werden, doch zelluläre Pol-spezifische Immunreaktionen der Konstrukte waren nach V3-Stimulation detektierbar.

Korrelierend zu *in vitro* und *in vivo* Ergebnissen der GagPolNef- und PolNef-Konstrukte bot auch hier die Variante mit inaktiver Protease die besten Immunantworten, während die attenuierte Variante in FACS und Elispot-Auswertungen schlechter abschnitt und die These des negativen Einflusses der Protease unterstützte.

Hinsichtlich Nef fiel die Bewertung anders aus: die Deletion des Genbereiches führte in den Immunogenitätsstudien zu durchweg besseren Reaktionen verglichen zu den restlichen Konstrukten. Hiermit entsprach dieses Ergebnis dem der Expressionsstudie, stand jedoch im Gegensatz zu den GagPol-Varianten. Dieses Resultat widersprach ebenfalls Publikationen, in denen Steigerungen von Gag- und Nef-spezifischen Immunantworten in Folge der Applikation auf getrennten Plasmiden beobachtet wurde: während separates Gag und Nef die Expression und spezifischen T-Zell Antworten steigerten, blieb die Immunogenität von Pol unbeeinflusst (Catanzaro *et al.*, 2007). Möglicherweise beeinflussten sich *gag* und *nef* untereinander auf einem gemeinsamen Plasmid negativ, so daß der Wegfall einer Sequenz zu einer verbesserten Immunantwort führte. Da beide Antigene

hochimmunogen sind (Megede *et al.*, 2003), könnte auch die hohe Epitopdichte beider Antigene konkurrieren.

4.4. Aktuelle Arbeiten der Arbeitsgruppe

Neben den oben genannten Studien an HIV-B-Typ Viruskandidaten erfolgten durch die Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Wagner, Regensburg, weitere Entwicklungen und Untersuchungen möglicher HIV-Vakzinekandidaten.

So wurden im Rahmen eines EuroVacc-Projektes zwei Vakzinekandidaten im Mausmodell evaluiert (Wild *et al.*, 2009). Basierend auf der Sequenz eines für China repräsentativen Provirus-Isolates (97CN54), welches eine Chimäre aus den Subtypen B-Thai und C-Typ darstellt (Su *et al.*, 2000), wurden zwei RNA- und kodonoptimierte Leserahmen synthetisiert. Einer dieser Leserahmen kodierte ein artifizielles 160kDa GagPolNef Polyprotein. Neben der Kodonoptimierung waren in dem Durchlese-Konstrukt folgende Modifikationen eingefügt: vergleichbar zur vorliegenden Arbeit fanden sich aus Sicherheitsgründen eine Inaktivierung des Myristylierungssignals und der aktiven Zentren der viralen PR und RT sowie eine deletierte Integrase und ein *scr nef* (vertauschte C- und N-Termini). Neben GagPolNef wurde auch ein RNA- und kodonoptimiertes gp120 generiert, das am 5'-Ende die Sequenz für ein künstliches *leader*-Peptid enthielt, welches es erlaubt, daß das resultierende gp120 Protein sekretiert wird. Diese beiden Konstruktvarianten wurden als Plasmid-basierte DNA-Vakzine (DNA-C) sowie als Bestandteil eines pockenviralen Impfstoffkandidaten (NYVAC, New York Vaccinia) (NYVAC-C) untersucht. Im Falle der DNA-Vakzine wurden die beiden Leserahmen von getrennten Plasmiden kodiert, wohingegen NYVAC-C beide Leserahmen unter der Kontrolle zweier Promotoren enthielt. Wild *et al.* (2009) und Gomez *et al.* (2007) konnten im Rahmen von Mausstudien nachweisen, daß starke T-Zell-Antworten induziert wurden. Heterologe DNA-*prime:NYVAC-boost* Verfahren erwiesen sich dabei homologen *prime:boost*-Strategien als deutlich überlegen, insbesondere gp120-spezifische T-Zell-Antworten fielen sehr gut aus.

Auf Basis dieser Datenlage erfolgten weitere Studien in Primaten (Mooij *et al.*, 2009), die vergleichbare Ergebnisse lieferten. Zudem wurde im Primatenmodell ein Immunisierungsschema verwendet, das auch im Rahmen einer Phase I Studie an Probanden in Lausanne eingesetzt wurde (Bart *et al.*, 2008; McCormack *et al.*,

2008). In dieser zeigten sich die Impfstoffkandidaten als sicher und waren mit nur geringen Nebenwirkungen verbunden.

Die immunologischen Daten waren mit denen aus den vorangegangenen Tierversuchen vergleichbar: die DNA-C-Vakzine induzierte stärkere und breitere T-Zell-Antworten als NYVAC-C alleine, und heterologe *prime:boost* Protokolle lieferten die potentesten Immunantworten. Neben diesen vielversprechenden Ergebnissen zeigte sich allerdings sowohl in den präklinischen als auch den humanen Studien, daß die induzierten gp120-spezifischen Antworten deutlich stärker ausfielen als die Gag-spezifischen. Da gerade Gag-spezifische T-Zellen jedoch für die Kontrolle der Virusinfektion als wichtig erachtet werden (siehe Einleitung), werden derzeit unterschiedliche Ansätze verfolgt, um die Gag-spezifischen Antworten zu verbessern: einerseits wird versucht, das immunogene Potential von NYVAC zu erhöhen (Kibler *et al.*, 2011), zum Anderen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Ralf Wagner die Antigene weiter modifiziert, indem beispielsweise die Myristylierung wieder hergestellt, der natürliche *frameshift* wieder eingeführt sowie Gag und PolNef getrennt und in separate Plasmide kloniert wurden. Durch diese Modifikationen konnten im Mausmodell bereits deutlich gesteigerte Gag-spezifische T-Zellantworten induziert werden (Böckl *et al.*, 2012). Diese Modifikationen basierten teilweise auf den bereits im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit untersuchten Varianten und die generierten Daten korrelieren zum Teil auch mit den hier aufgeführten Ergebnissen.

4.5. Ausblick

Seit dem ersten Auftreten von HIV-Fällen im Jahr 1981 fehlt noch immer 90% der Infizierten der Zugang zur HIV-Langzeittherapie. Impfstoffentwicklungen wurden in die Wege geleitet, durch die mittels unterschiedlichster Ansätze versucht wird, humorale und zelluläre Immunreaktionen zu induzieren, um sowohl der Diversität als auch der Variabilität des Virus Rechnung zu tragen. In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Vakzinekandidaten untersucht, die über die Verwendung multipler HIV-1B Genabschnitte darauf abzielten, möglichst breite Immunantworten auszulösen.

Anhand der neu gewonnenen Daten der GagPolNef-Varianten war ersichtlich, daß durch den Einsatz einer inaktiven Protease, der Integration des ribosomalen *frameshifts* sowie eines *scr nef* Gag- und Pol-spezifische Immunantworten gesteigert werden konnten.

Um der geographischen Verteilung der verschiedenen Subtypen des HI-Virus gerecht zu werden, können die in der Impfstoffentwicklung gewonnenen Erfahrungen eines Subtypes in die Entwicklung eines anderen Subtypes einbezogen werden. Die hier vorliegenden Analysen der HIV-1 Impfstoffvarianten bezogen sich auf die eher in den westlichen Industrienationen vorkommende Klasse B. Da HIV-1 C hauptsächlich in Asien und Teilen Afrikas verbreitet ist und somit eine höhere Prävalenz aufweist, sind diesbezüglich bereits Analysen unternommen worden, wie oben ausgeführt (Wild *et al.* 2009). Eigene Studien sind notwendig, da die Daten aufgrund der Variabilität der HIV Klassen untereinander (die Protease ist bspw. in Klasse C mehr divers) nicht einfach übertragen werden können.

Das Ziel des Entwurfs der PolNef-Varianten lag darin, durch Minimierung der Vektor- bzw. Insertgröße die Aufnahme des Plasmids und Immunogenität des kodierten Antigens zu steigern, um so einen besseren Schutz von Infektion bieten zu können. Um die verschiedenen Applikationsschemata und Kombinationen von Gag und PolNef auf separaten Plasmiden auszutesten, liegt eine weitere Immunogenitätsstudie nahe, wie dies inzwischen für die CN54-basierten Vakzinkandidaten erfolgt ist (Böckl *et al.*, 2012). So könnten, neben Verträglichkeitsstudien und Analysen der Plasmidaufnahme, die Plasmide zeitlich (*time course*) und räumlich getrennt (verschieden Muskeln, linkes Bein vs. rechtes Bein) appliziert werden. Darüber hinaus können Vergleiche von GagPolNef auf einem Plasmid zu Gag und PolNef auf zwei Plasmiden vorgenommen werden, um den Einfluß von Vektorgröße und Gag auf die Immunogenität hin zu untersuchen. Zudem besteht die Möglichkeit, beide Ansätze zu kombinieren.

Die Daten der PolNef-Varianten zeigten, daß die Induktion Pol-spezifischer Immunantworten auch in Abwesenheit von Gag stattfinden kann. Die Auswertung humoraler Antikörperantworten bezüglich Pol und Nef fand in der Arbeit nicht statt und könnte in weiteren Analysen vorgenommen werden.

Generell könnten sowohl die GagPolNef- als auch die PolNef-Vakzinekandidaten weiter modifiziert werden. Neben Veränderungen (Einfügen immunstimulatorischer Chemokin- bzw. anderer kostimulatorischer Rezeptormoleküle (CD80, CD86) u./o. Adhäsionsmoleküle (ICAM-1), TPA-*Leader* bzw. Austausch des viralen Vektors (Vakzinia-Virus: nasal/ oral: mukosale Immunantwort, Alphavirus: mukosale Applikationsroute) inklusive heterologer *prime-boost* Verfahren und Kombinationen mit weiteren DNA- oder anderen Vektoren können Adjuvantien (VLPs; CpG-Motiv:

APC-, T_H1-Stimulation; Chemokine: T-Zell Wachstumsfaktoren, IL-2, IL-12, IFN γ) zur Steigerung der Impfstoff-Immunogenität beitragen. Einige Ansätze davon werden bereits in der Arbeitsgruppe untersucht. Schließlich sind weitere immunologische Studien notwendig, um Applikationsroute, -art (Genegun, Nadel, Spray; im, intradermal, oral, rektal etc.) und Menge des Impfstoffes zu optimieren und so die Vakzine-induzierte Immunität ausweiten (neben systemischer auch mukosale Immunreaktion) und verbessern zu können.

Die Steigerung der Immunogenität der GagPolNef-Multigenvakzine (diese konnte bislang neben der Thai-Studie nur in Tierstudien nachgewiesen werden) trägt einen wichtigen Teil an der Entwicklung eines effizienten und global einsetzbaren Impfstoffes bei. Wenngleich auch derzeitige Vakzinekandidaten die Infektion mit HIV nicht verhindern, so könnten sie doch zur Verminderung der Viruslast führen und somit über eine mögliche Verringerung des Ansteckungsrisikos Einfluß auf die Gesamtpopulation haben. Es ist also Grund genug gegeben, trotz vielfacher Rückschläge weiterhin mit der HIV-Impfstoffentwicklung fortzufahren.

5. Literaturverzeichnis

- Ada GL. The immunological principles of vaccination. *Lancet* 1990; 335: 523-526.
- Adamson CS, Nermut M, Jones IM. Control of human immunodeficiency virus type-1 protease activity in insect cells expressing Gag-Pol rescues assembly of immature but not mature virus-like particles. *Virology* 2003; Vol. 308, 157-165.
- Bart P-A, Goodall R, Barber T, Harari A, Guimaraes-Walker A, Khonkarly M, Sheppard NC, Bangala Y, Frchette M-J, Wagner R, Liljeström P, Kraehenbuhl J-P, Girard M, Goudsmit J, Esteban M, Heeney J, Sattentau Q, McCormack S, Babiker A, Pantaleo G, Weber J. EV01: A phase I trial in healthy HIV negative volunteers to evaluate a clade C HIV vaccine, NYVAC-C undertaken by the EuroVacc Consortium. *Vaccine* 2008; 26, 3153-3161.
- Buchbinder SP, Mehrotra DV, Duerr A, Fitzgerald DW, Mogg R, Li D, Gilbert PB, Lama JR, Marmor M, del Rio C, McElrath MJ, Casimiro DR, Gottesdiener KM, Chodakewitz JA, Corey L, Robertson MN, and the Step Study Protocol Team. 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: 1881–93.
- Burgers WA, Williamson C. The challenges of HIV vaccine development and testing. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2005; Vol19 No2: 277-291.
- Böckl K, Wild J, Bredel S, Kindsmüller K, Köstler J, Wagner R. Altering an artificial GagPolNef polyprotein and mode of Env co-administration affects the immunogenicity of a clade C HIV DNA vaccine. *PLoSOne* 2012, in production.
- Bojak A, Wild J, Deml L, Wagner R. Impact of Codon Usage Modifications on T Cell Immunogenicity and Longevity of HIV- 1 Gag- Specific DNA Vaccines. *Intervirology* 2002; 45: 275-286.
- Brack-Werner R. Astrocytes: HIV cellular reservoirs and important participants in neuropathogenesis. *AIDS* 1999; 13: 1-22
- Casimiro DR, Tang A, Perry HC, Long RS, Chen M, Heidecker GJ, Davies ME, Freed DC, Persaud NV, Dubey S, Smith JG, Havlir D, Richman D, Chastain MA, Simon AJ, Fu TM, Emini EA, Shiver JW. Vaccine-induced immune responses in rodents and nonhuman primates by use of a humanized human immunodeficiency virus type 1 pol gene. *Journal of Virology* 2002; 76(1): 185-94.
- Catanzaro AT, Roederer M, Koup RA, Bailer RT, Enama ME, Nason MC; Martin JE, Rucker S, Andrews CA, Gomez PL, Mascola JR, Nabel GJ, Graham BS, VRC 007 Study Team. *Vaccine* 2007.
- Chaplin JW. HIV pathogenesis: gp120-antibody complexes bind CD4 and kill T4 cells; immunotoxin therapy should prevent pathogenesis of HIV to AIDS, *Medical hypotheses* 1999; 52, 2,133-146.
- Clerici M, Shearer GM. Correlates of protection on HIV infection and the progression of HIV infection to AIDS. *Immunol Lett* 1996; 51: 69-73.
- Coordinating Committee of the Global HIV/ AIDS Vaccine Enterprises. The Global HIV/AIDS Vaccine Enterprise: Scientific Strategic Plan. *PLOS Medicine* Feb 2005; Vol. 2, Issue 2, e25, 0111-0121.
- Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, Goedert JJ, Buchbinder SP, Vittinghoff E, Gomperts E, Donfield S, Vlahov D, Kaslow R, Saah A, Rinaldo C, Detels R, O'Brien SJ. Genetic restriction of HIV-1 infection and

- progression to AIDS by a deletion allele of the *CKR5* structural gene. *Science* 1996; 273: 1856-1862.
- Deml L, Bojak A, Steck S, Graf M, Wild J, Schirmbeck R, Wolf H, Wagner R. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate Vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J Virol* Nov 2001; 75(22):10991-11001.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997; 15: 617- 648.
- Douek DC, Kwong PD, Nabel GJ. The rational design of an AIDS Vaccine. *Cell* 2006; 124: 677-681.
- Dulude D, Berchiche YA, Gendron K, Brakier-Gingras L, Heveker N. Decreasing the frameshift efficiency translates into an equivalent reduction of the replication of the human immunodeficiency virus type 1. *Virology* Feb 2006; 345(1):127-36.
- Dunham SP. Lessons from the cat: Development of vaccines against lentiviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 112: 67-77.
- Eigen M, Nieselt-Struw K. How old is the immunodeficiency virus? *AIDS* 1990; 4: 85-95.
- Fackler OT, d'Aloja P, Baur AS, Federico M, Peterlin BM. Nef from Human Immunodeficiency Virus Type 1 F12 Inhibits Viral Production and Infectivity. *J of Vir* July 2001; Vol. 75, No. 14, 6601-6608.
- Fang G, Weiser B, Kuiken C, Philpott S, Rowland-Jones S, Plummer F, Kimani J, Chen CH, Shi B, Kaul R, Bwayo J, Anzala O and Burger H, Recombination following superinfection by HIV-1, (Abstractbook IAS Conference Paris 2003, International Medical Press, Abstract No. 17, S.202); *AIDS* 18(2):153-160, 2004.
- Fiore JR, Lepera A, Di Stefano M, Saracino A, Favia A, Pastore G, Angarano G. Frequent cervicovaginal shedding of HIV-1 in asymptomatic, non severely immunodeficient women. *AIDS* 1999; 13: 626- 627.
- Freed EO. HIV- 1 Replication. *Somatic cells and Molecular Genetics* 2001; 26: 13- 33.
- Freed EO, Martin MA. Role of HIV-1 envelope glycoproteins in virus infection. *Journal of biological chemistry* 1995; Vol. 270, No. 41: 23883-23886.
- Frøland SS, Jenum P, Lindboe CF, Wefring KW, Linnestad PJ, BöhmerT. HIV-1 infection in Norwegian family before 1970. *Lancet* 1988; ii: 1344-1345.
- Fujii Y, Otake K, Tashiro M, Adachi A. Soluble Nef antigen of HIV-1 is cytotoxic for human CD4⁺ T cells. *FEBS* 17466, *FEBS Letters* 1996; 393, 93-96.
- Gandhi R, Bartlett J, Linkinhoker M. Life Cycle of HIV Infection. Johns Hopkins University Division of Infectious Diseases and AIDS Service, Medical Illustrator May 1999.
- Gao, F. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 1999; 397: 436-441.
- Gao F, Li Y, Decker JM, Peyerl FW, Bibollet-Ruche F, Rodenburg CM, Chen Y, Shaw DR, Allen S, Musonda R, Shaw GM, Zajac AJ, Letvin N, Hahn BH. Short communication: Codon Usage Optimization of HIV Type I Subtype C *gag*, *pol*, *env* and *nef* Genes: In Vitro Expression and Immune Responses in DNA-Vaccinated Mice. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2003; Vol. 19, No. 9, 817-823.
- Gilles. Proteases I: HIV Protease. *BIOC* Feb. 2005; 801, Lecture 23.
- Girard MP, Osmanov SK, Kieny MP. A review of vaccine research and development: The human immunodeficiency virus (HIV). *Vaccine* 2006; 24: 4062-4081.

- Gómez CE, Nájera JL, Jiménez EP, Jiménez V, Wagner R, Graf M, Frachette MJ, Liljeström P, Pantaleo G, Esteban M Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine* 2007; 12; 25(15):2863-85.
- Gotch F, Rutebemberwa A, Jones G, Imami N, Gilmour J, Kaleebu P, Whitworth J. Vaccines for the control of HIV/AIDS. *Tropical Medicine and International Health* 2000; Vol.5 No.7 A 16-21.
- Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HW, Weismann JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previous healthy homosexual men. *N Engl J Med* 1981; 305: 1425-1431.
- Graham BS. Clinical Trials of HIV Vaccines. *Annu. Rev. Med.* 2002; 53: 207-221.
- Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Wolf H, Wagner R. Concerted Action of Multiple cis-Acting Sequences Is Required for Rev Dependence of Late Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gene Expression. *Journal of Virology* Nov. 2000; p. 10822-10826 Vol. 74, No. 22.
- Graf M, Deml L, Wagner R. Codon- Optimized Genes that Enable Increased Heterologous Expression in Mammalian Cells and Elicit Efficient Immune Responses in Mice after Vaccination of Naked DNA. *Methods in Molecular Medicine* 2004, Volume 94, IV, 197-210.
- Greene WC. AIDS und das Immunsystem, *Spektrum der Wissenschaft* 1993, 92-100.
- Greene WC, Peterlin BM. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nature Medicine* 2002; 8: 673-680.
- Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, Cornall A, Lidman M. HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication. *J. Biosci* April 2003; Vol. 28, No. 3, 323-335.
- Gürtler, Rockstroh JK. *Klinischer Leitfaden HIV*. Abboth GmbH Diagnostika, Wiesbaden 2000; i: 8.
- Harrer T, Harrer E, Kalams SA et al.. Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection- Breadth and specificity of the response and relation to in vivo viral quasiespecies in a person with prolonged infection and low viral load. *J Immunol* 1996; 156: 2616-2623.
- Hirao LA, Wu L, Khan AS, Satishchandran A, Draghia-Akli R, Weiner DB. Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid delivery and potency in pigs and rhesus macaques. *Vaccine* 2008; 26, 440-448.
- Hunt RC, *Human Immunodeficiency Virus*. *Medical Microbiology MBIM* 2009; 650/720; Lectures 74, 75.
- Ho DD, Neumann AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373 Jan 12, (6510):123-126.
- Hope T, Trono D. Structure, Expression and Regulation of the HIV Genome. *HIV InSite Knowledge Base Chapter* 2000.
- IAVI. Ongoing trials of preventive AIDS vaccines. Feb 2008; www.iavireport.org/trialsdb.
- Jannssens W, Heyndrickx L, van der Auwera G, Nkengasong J, Beirnaert E, Vereecken K, Coppens S, Willems B, Franssen K, Peeters M, Ndumbe P, Delaporte E, van der Groen G. Interpatient genetic variability of HIV-1 group O. *AIDS* 1999; 13: 41-48.

- Jonassen TØ, Johansen KS, Berg ES, Hungnes O, Lindboe CF, Frøland SS, Grinde B. Sequence analysis of HIV-1 group O from Norwegian patients infected in the 1960s. *Virology* 1997; 231: 43-47.
- Keele BF, et al. Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science* 2006; 313 (5786): 523-6.
- Kibler KV, Gomez CE, Perdiguero B, Wong S, Huynh T, Holechek S, Arndt W, Jimenez V, Gonzalez-Sanz R, Denzler K, Haddad EK, Wagner R, Sékaly RP, Tartaglia J, Pantaleo G, Jacobs BL, Esteban M. Improved NYVAC-based vaccine vectors. *PLoS One*. 2011; 6 (11).
- Kofman A, Graf M, Bojak A, Deml L, Bieler K, Kharazova A, Wolf H, Wagner R. HIV-1 *gag* expression is quantitatively dependent on the ratio of native and optimized genes. *Zytologia*. 2003; Vol. 45, No. 1.
- Kong WP, Huang Y, Yang ZY, Chakrabarti BK, Moodie Z, Nabel GJ. Immunogenicity of Multiple Gene and Clade Human Immunodeficiency Virus Typ I DNA Vaccines. *Journal of Virology* Dec. 2003; Vol. 77, No. 23, 12764-12772.
- Korber B, Foley B, Leitner T, McCutchan F, Hahn B, Mellors JW, Myers G, Kuiken C. Human Retroviruses and AIDS 1998. A compilation and analysis of nucleic and amino acid sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico Lehner T. Innate and adaptive mucosal immunity in protection against HIV infection. *Vaccine* 2003; 21, S2: 68-76.
- Lee, Edd. Introduction to HIV vaccines. AVAC.
- Lehner T, et al. European Union and EDCTP strategy in the global context; Recommendations for preventive HIV/AIDS vaccines research. *Vaccine* 2005; 23: 5551- 5556.
- Letvin NL. Progress towards an HIV vaccine. *Annu. Rev. Med.* 2005; 56: 213-223.
- Levy JA. Features of human immunodeficiency virus infection and disease. *Pediatr.Res.* 1993; 33, S 63- 69.
- Levy JA. HIV and the pathogenesis of AIDS. ASM Press Washington, 1998; 2nd Edition.
- Nahmias AJ, Weiss J, Zao X, Lee F, Kodzi R, Schanfield M, Matthews T, Bolognesi D, Durrack D, Motulsky A, Kanki P, Essex M. Evidence for human infection with a HTLV-III/LAV like virus in Central Africa, 1959. *Lancet* 1986; i: 1279-1280.
- Nathanson N, Mathieson BJ. Biological Considerations in the Development of a Human Immunodeficiency Virus Vaccine. *J of Infectious Diseases* 2000; 182: 579-589.
- Newell ML, Dunn DT, Peckham CS, Semprini AE, Pardi G. Vertical transmission of HIV-1: maternal immune status and obstetric factors. The European collaborative study. *AIDS* 1996; 10: 1695- 1681.
- Nkolola JP, Essex M. Review: Progress towards an HIV-1 subtype C vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 391-401.
- Majumder B , Gray B, McBurney S, Schaefer TM, Dentchev T, Mahalingam S, Reinhart TA, Ayyavoo V. Attenuated nef DNA vaccine construct induces cellular immune response: role in HIV-1 multiprotein vaccine. *Immunology Letters* 2003; 89, 207-214.
- McCormack S, Stöhr W, Barber T, Bart P-A, Harari A, Moog C, Ciuffreda D, Celleraï c, Cowen M, Gamboni R, Burnet S, Legg K, Brodnicki E, Wolf H, Wagner R, Heeney J, Frachette M-J, Tartaglia J, Babiker A, Pantaleo G, Weber J. EV02: A Phase I trial to compare the safety and immunogenicity of HIV DNA-C prime-NYVAC-C boost to NYVAC-C alone. *Vaccine* 2008; 26, 3162-3174.
- McCutchan FE. Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* 2000; 14 (Suppl.) 31- 44.

- zur Megede J, Otten GR, Doe B, Liu H, Leun L, Ulmer JB, Donnelly JJ, Barnett SW. Expression and Immunogenicity of Sequence-Modified Human Immunodeficiency Virus Type I Subtype B pol and gag-pol DNA Vaccines. *Journal of Virology* 2003; Vol. 77, No. 11, 6197-6207.
- Modrow S, Falke D, Truyen U. *Molekulare Virologie. Retroviren.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH 2002.
- Mofenson LM, Fowler MG. Interruption of materno-fetal transmission. *IADS* 1999; 13 (suppl A) 205-214. Nabel GJ. HIV vaccine strategies. *Vaccine* 2002; 20: 1945-1947.
- Mooij P, Balla-Jhagjhoorsingh SS, Beenhakker N, van Haaften P, Baak I, Nieuwenhuis IG, Heidari S, Wolf H, Frchette M-J, Bieler K, Sheppard N, Harari A, Bart P-A, Liljeström P, Wagner R, Pantaleo G and Heeney JL. Comparison of Human and Rhesus Macaque T-Cell Responses Elicited by Boosting with NYVAC Encoding Human Immunodeficiency Virus Type 1 Clade C Immunogens. *Journal of Virology* 2009; 83(11):5881.
- Nabel GJ. HIV vaccine strategies. *Vaccine* 2002; 20: 1945-1947.
- Nabel GJ. Mapping the future of HIV vaccines. *Nature* Jul 2007; Vol. 5: 482-484.
- O'Brien TR, Blattner WA, Waters D, Eyster E, Hilgartner MW, Cohen AR, Luban N, Hatzakis A, Aledort LM, Rosenberg PS, Miley WJ, Kroner BL, Goedert JJ. Serum HIV-1 RNA levels and time to development of AIDS in the Multicenter Haemophilia Cohort Study. *JAMA* Jul 1996; 276(2) 105-10.
- de Oliveira T, Engelbrecht S, van Rensburg EJ, Gordon M, Bishop K, zur Megede J, Barnett SW, Cassol S. *Journal of Virology* Sept. 2003; Vol. 77, No. 17, 9422-9430.
- Otten GR, Schaefer M, Doe B, Liu H, zur Megede J, Donnelly J, Rabussay D, Barnett S, Ulmer JB. Potent immunogenicity of an HIV-1 gag-pol fusion DNA vaccine delivered by in vivo electroporation. *Vaccine* 2006; 24, 4503-4509.
- Pantaleo G, Graziosi C, Butini L et al.. Lymphoid organs function as major reservoirs for human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9838- 9842.
- Park J, Morrow CD. Overexpression of the gag-pol Precursor from Human Immunodeficiency Virus Type I Proviral Genomes Results in Efficient Proteolytic Processing in the Absence of Virion Production. *Journal of Virology* Sept. 1991; Vol. 65, No. 9, 5111-5117.
- Parkin JM, Nye KE. *HIV und AIDS.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1995.
- Paulus S, Hellebrand S, Tessmer U, Wolf H, Kräusslich H-G, Wagner R. Competitive inhibition of the Human Immunodeficiency Virus Type I Protease by the Gag-Pol Transframe Protein. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; Vol. 274, No. 31, 21539-21543.
- Peerenboom E. *Selbstmord der T4-Helferzellen bei AIDS,* Spektrum Akademischer Verlag GmbH 1992.
- Peeters M, Sharp PM. Genetic diversity of HIV-1: the moving target. *AIDS* 2000; 14 (Suppl.) 129-140.
- Perelson A, Neumann AU, Markowitz M, Leonard JM, Ho DD. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* 1996; 271, 1582-1586.
- Peterlin BM, Luciw PA. Replication of the Human Immunodeficiency Virus: Strategies for Inhibition. *Bio/Technology* 1988; 6, 794-799.

- Peterman TA, Stoneburner RL, Allen JR, Jaffe HW, Curran JW. Risk of human immunodeficiencyvirus transmission from heterosexual adults with transfusion associated infections. *J Am Med Ass* 1988; 259: 55-58.
- Pettit SC, Gulnik S, Everitt L, Kaplan AH. The Dimer Interfaces of Protease and Extra-Protease Domains Influence the Activation of Protease and the Specificity of GagPol Cleavage. *Journal of Virology* Jan. 2003; Vol. 77, No. 1, 366-374.
- Pettit SC, Everitt LE, Choudhury S, Dunn BM, Kaplan AH. Initial Cleavage of the Human Immunodeficiency Virus Type I GagPol Precursor by its Activated Protease Occurs by Intramolecular Mechanism. *Journal of Virology* Aug. 2004; Vol. 78, No. 16, 8477-8485.
- Pettit SC, Clemente JC, Jeung JA, Dunn BM, Kaplan AH. Ordered Processing of the Human Immunodeficiency Virus Type I GagPol Precursor Is Influenced by the Context of the Embedded Viral Protease. *Journal of Virology* Aug 2005; Vol. 79, No. 16, 10601-10607.
- Piot P, Goemann J, Laga M. The epidemiology of HIV and AIDS in Africa. In *AIDS in Africa*. Essex M, Mboup S, Kanki PJ, Kalengayi MR eds. Raven Press 1994; 157-171.
- Poli G, Pantaleo G, Fauci AS. Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis* 1993; 17 (Suppl) 224-229.
- Pressekonferenz: „Auf Erfolgskurs: Das Kompetenznetz HIV/AIDS.“ Perspektiven für die Entwicklung einer HIV- Vakzine. *Deutsches Ärzteblatt* 2002; 28-29, Seite A-1962, B-1656, C-1550.
- Preiser, W. HIV: causative viruses and pathogenesis. *London school of hygiene and tropical medicine* 2005; AIDS 1.
- Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter Verlag 1998; 1638.
- Puax AL, Michel ML. New gene-based approaches for an AIDS vaccine. *Comparative immunology microbiology and infectious diseases* 2003; 26: 357-372.
- Rajcáni J, Mosko T, Rezuchová I. Current developments in viral DNA vaccines: shall they solve the unsolved? *Rev. Med. Virol.* 2005; 15: 303-325.
- Ranjan Das S, Jameel S. Biology of the HIV Nef protein. *Indian J Med Res.* April 2005; 121, 315-332.
- Ratner L, Fisher A, Jagodzinski LL, Mitsuya H, Liou RS, Gallo RC, Wong Staal F. Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 1987; 3, 57-69.
- Rerks-Ngarm S, Pitisuttithum P, Nitayaphan S, Kaewkungwal J, Chiu J, Paris R, Prensri N, Namwat C, de Souza M, Adams E, Benenson M, Gurunathan S, Tartaglia J, McNeil JG, Francis DP, Stablein D, Birx DL, Chunsuttiwat S, Khamboonruang C, Thongcharoen P, Robb ML, Michael NL, Kunasol P, and Kim JH for the MOPH-TAVEG Investigators. Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *The new England journal of medicine* Dec 3, 2009 vol. 361 no. 23.
- Rinaldo C, Huang XL, Fan ZF, Ding M, Beltz L, Logar A, Panicali D, Mazzara G, Liebmann J, Cottrill M and et al. High levels of anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) memory cytotoxic T-lymphocyte activity and low viral load are associated with lack of disease in HIV-1-infected long-term nonprogressors. *J. Virol.* 1995; 69, 5838-5842.
- Rockstroh JK, Spengler U: *Opportunistische Infektionen und Tumore im Verlauf der HIV-Infektion*. UniMed Verlag, Bremen 1999: 1-190.

- Saxinger WC, Levine PH, Dean AG, de Thé G, Wantzin GL, Moghissi J, Laurent F, Hoh M, Sarngadharan MG, Gallo RC. Evidence for exposure to HTLV-III in Uganda before 1973. *Science* 1985; 227: 1036-1038.
- Scarlara S, Carter C. Review: Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003; 1614, 62-72.
- Schwartz DWM, Simson G, Baumgarten K, Fabritz H, Riggert J, Neumeyer H, Mayr WR, Köhler M. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV-negative blood components in Germany and Austria. *Ann Hematol.* 1995; 70: 109-213.
- Sekaly RP. The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *JEM* Jan 2008; No. 1, Vol. 205: 7-12.
- Shacklett BL. Can the New Humanized Mouse Model Give HIV Research a Boost? *PLOS Medicine* Jan 2008, Vol. 5, Issue 1, e13, 0016-0017.
- Shehu- Xhilaga M, Crowe SM, Mak J. Maintenance of Gag/ GagPol Ratio Is Important for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA Dimerization and Viral Infectivity. *Journal of Virology* Feb. 2001; Vol. 75, No. 4, 1834-1841.
- Sher R, Antunes S, Reid B, Falcke H. Seroepidemiology of human immunodeficiency virus in Africa from 1970 to 1974. *N Engl J Med* 1987; 371: 450-451.
- Singh M. No vaccine against HIV yet- are we not perfectly equipped? Review. *Virology Journal* 2006; 3, 60: 1-7.
- Simon F, Maucière P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Trtwin MCM, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barré-Sinoussi F, Brun-Vézinet F. Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med.* 1998; 4:1032-1037.
- Step Study, Editorial.: disappointing, but not a failure. *The Lancet* Nov 2007; Vol. 370, 1665.
- Stumptner-Cuvelette P, Morchoisne S, Dugast M, Le Gall S, a Raposo G, Schwartz O and Benaroch P. HIV-1 Nef impairs MHC class II antigen presentation and surface expression. *PNAS* Oct. 2001; Vol. 98, No. 21 12144–12149.
- Stumptner-Cuvelette P, Jouve M, Helft J, Dugast M, Glouzman A-S, Jooss K, a Raposo G and Benaroch P. Human Immunodeficiency Virus-1 Nef Expression Induces Intracellular Accumulation of Multivesicular Bodies and Major Histocompatibility Complex Class II Complexes: Potential Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Molecular Biology of the Cell* Dec 2003; Vol. 14, 4857–4870.
- Stott J, Almond N. Assessing animal models of AIDS. *Nat Med* 1995; 1: 295-297.
- Su L, Graf M, Zhang Y, von Briesen H, Xing H, Köstler J, Melzl H, Wolf H, Shao Y and Wagner R. Characterization of a Virtually Full-Length Human Immunodeficiency Virus Type 1 Genome of a Prevalent Intersubtype (C/B') Recombinant Strain in China. *Journal of Virology* 2000; 74(23):11367.
- Verrier B. Therapeutic vaccination for chronic infectious diseases: Lessons from HIV-1. *Journal of Clinical Virology* 2005; 34, Suppl 1: 9-12.
- Wagner R, Graf M, Bieler K, Wolf H, Grunwald T, Foley P, Überla K. Rev-independent expression of synthetic *gag-pol* genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implication for the safety of lentiviral vectors. *Human gene therapy* Nov 20 2000; 11:2403-13.
- Wild J, Wagner R. Stand und gegenwärtige Strategien der HIV-Vakzineentwicklung. *Internist.* 2003; 44: 711-718.
- Wild J, Bieler K, Köstler J, Frachette M-J, Jeffs S, Vieira S, Esteban M, Liljeström P, Pantaleo G, Wolf H, Wagner R. Preclinical evaluation of the immunogenicity of C-

- Type HIV-1-based DNA and NYVAC vaccines in the Balb/C mouse model. *Virology* 2009; Vol 22 No 5.
- Zhu, T. et al. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 1998; 391:594-597.
- 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* Dec 18 1992; 41 (RR-17): 1-17.

Lebenslauf

Name Lydia Röttger geb. Pitzschler
Geburtsdatum 12. März 1980
Geburtsort Werdau
Familienstand verheiratet
Konfession evangelisch

Wohnort Matthias-Claudius-Weg 12
21365 Adendorf

Aktuelle Tätigkeit

seit Mai 2011 angestellte Ärztin im Rahmen der Facharztausbildung für Allgemeinmedizin, Allgemeinarztpraxis Dr. Berling/ Bette/ Otto, Adendorf

Klinische Tätigkeit

Abteilung für Innere Medizin, Ketteler-Krankenhaus Offenbach am Main
April 2008 – März 2010 Medizinische Klinik I (Klinik für Gastroenterologie, Onkologie)
April 2010 – März 2011 Medizinische Klinik II (Klinik für Kardiologie, Pulmologie)

Dissertation

Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Uniklinik Regensburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Ralf Wagner

Thema "Vergleichende molekularbiologische und immunologische Analysen sequenzmodifizierter HIV- 1 Subtyp B *gagpolnef* DNA Vakzinekandidaten"

Hochschulausbildung

Herbst 2007 Zweite Ärztliche Prüfung
Herbst 2002 Erste Ärztliche Prüfung (Physikum)
2000 – 2007 Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg

Auslandsaufenthalte

- Juli – Oktober 2006 Tertian im Rahmen des Praktischen Jahres, Abteilung für Innere Medizin, Kantonsspital Aarau, Schweiz
- Juli – August 2004 Famulatur: Abteilung für Pädiatrie, Taranaki Base Hospital, New Plymouth, Neuseeland

Schulbildung

- Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife
- 1992 – 2000 Markgraf-Georg-Friedrich-Gymnasium, Kulmbach
- 1991 – 1992 Eichendorff-Gymnasium, Bamberg
- 1986 – 1991 Dr. Theodor-Neubauer-Schule, Zwickau

Danksagung

Prof. Dr. Ralf Wagner danke ich für die Bereitstellung des Themas für meine Doktorarbeit, die Finanzierung und die Betreuung der Arbeit sowie für die Übernahme des Erstgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Hans Wolf und Herrn Prof. Dr. Dr. André Gessner danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Regensburg.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Kurt Bieler für die hervorragende Betreuung, die wertvollen Tipps während der praktischen Arbeiten und dafür, daß er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein großer Dank geht an Dr. Jens Wild für das große Engagement, der stetigen Hilfsbereitschaft sowie der unermüdlichen konstruktiven Kritik und das Korrekturlesen der Arbeit.

Desweiteren danke ich der gesamten AG Wagner für die gute Zusammenarbeit und das angenehme und kollegiale Arbeitsklima.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern und Familie, die immer an mich geglaubt haben und durch ihre ideelle und finanzielle Unterstützung den Grundstein für mein Studium und den erfolgreichen Abschluß meiner Dissertation gelegt haben.

Schließlich möchte ich meinem Mann Ernst-August für die Geduld und das Vertrauen in mich sowie die Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

8. Anhang

8.1. Oligonukleotide

Name Sequenz 5' -> 3'

Oligonukleotide zur Herstellung der V3-Konstruktvarianten

GPN kpn nhe (f)	GCGGTACCTGGCTAGCGACTTCAACCTGCCTCCCGTG
GPN (b)	GTTGTTGGGTCTTGTACAATTCCACAGGAATGGGGGCTCCTTC
V3 (f)	GAAGGAGCCCCATTCTGTGGAATTGTACAAGACCCAACAAC
V3 Xho Xba Sac (b)	CGAGCTCTCTAGACTCGAGTTAGTTACAATGTGCTTGTCTC

Oligonukleotide zur Herstellung der PolNef-Konstruktvarianten

PN hin 2 Isabell (f)	GCAGAATTcgccgCCACCATGTTTAGGGAAGATCTGGCCTTCCTAC AAGGG
PN hin 3 (f)	GCAGAATTCATGTTTAGGGAAGATCTGG
PN sac xba (b)	GCGAGCTCTCTAGATTACCACAGGAATGGGGGCTCCTTCTGTGC

Quickchange-Oligonukleotide zur Punktmutation von PR- in PR+

Quick durchlese PR+(f)	CTTCCTCCGGGACGACCtGTGGCCGCGGCTGCTG
Quick durchlese PR+(b)	CAGCAGCCGCGGCCACaGGTCGTCCCGGAGGAAG

Sequenzier-Oligonukleotide

P1:300 rev	CTCCTTGGTGTCCCTTGATC
P2: 700 rev	CGCGGGGCTCCCTCATCTG
P3:1130 rev	GTGTTGGTCACCTGGCTCATG
P4:2000 rev	GCTGTCCCTTCTTCTTGATGG
P5: 2450 rev	GTTTTTCCAGGTCTCGAGATG
P6: 2899 rev	GGTAGGTCCACTGGCCCTG
P7: 3300 rev	GGTGGTGTGGTCAGGGGC
P8: 1500 rev	CGCGGCAGTTCCTGGCGGTGTGGC
P9: 3700 rev	CTGGCTGTCCGTCACGATGTTC
P7 hin1	GGCGTGTACTACGACCCCAGCAAG
P7 hin2	GGGGCAAGACtCctAAGTTCAAG
P gagpol V3 2500	GGGTCCTCTTGTTTCAGCTCCCTG
P durchlese P- V3 3850	CCTGATGCCGGCGCTCACCAGC
P FS P- V3 1400	CTTGTAGGAAGGCCAGATCTTCCC
durchIP+V3-300	CTAGTTCCTGTGGTTCCTC
durchIP+V3-700	GTCTACTCCCTCGGGGCGC
durchIP+V3-1130	GTA CTCCGTTCCACTGGTTGTG
durchIP+V3-2000	GGTAGTTCCTTCTTCTGTCG
durchIP+V3-2450	GTAGAGCTCTGGACCTTTTTG
durchIP+V3-2899	GTCCCGGTCACCTGGATGG
durchIP+V3-3300	CGGGGACTGGTTGTGGTGG

6. 3. Peptide

Aminosäuresequenz	Name	Maus	
LVGPTPVNI	Pol1	H-2 ^d	CN54
YYDPSKDLI	Pol2	H-2 ^d	CN54
PADPNPQEM	Env	H-2 ^d	CN54
RGPGRAFVTI	R10I	H-2 ^d	Env-III B
AMQMLKETI	A9I	H-2 ^d	Gag-III B
SERIQRGPGRAFVTIGKI	V3-16mer	H-2 ^d	Env-III B
NCTRPNNNTRKSERIQR?	V3-38mer	H-2 ^d	Env-III B
AAMQILKDTINEEAA	Gag	H-2 ^d	CN54

8.4. Vektoren

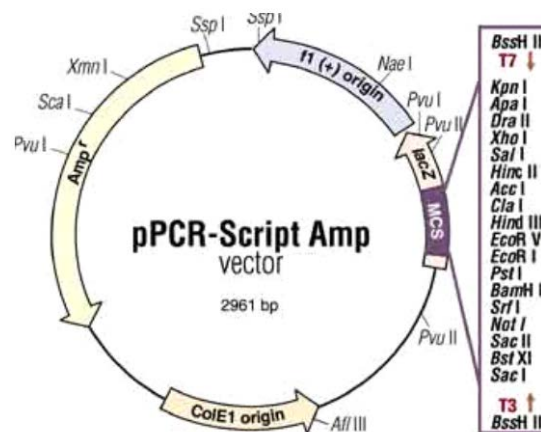


Abb. 8.1: Schematische Darstellung des pCR-Script-Vektors

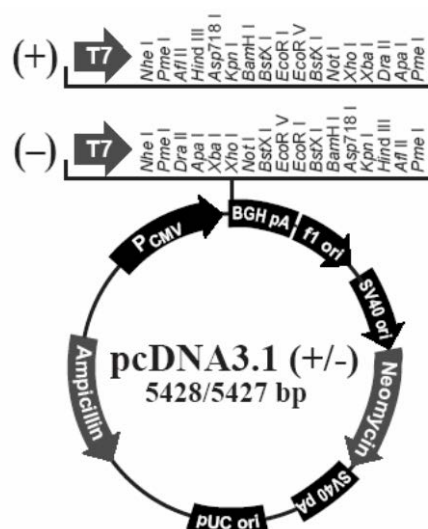


Abb. 8.2: Schematische Darstellung des pcDNA3.1 Vektors (Invitrogen) www.invitrogen.com

8.4. Nukleotidsequenzen

8.4.1. V3-Sequenz

1 AATGTACAA GACCCAACAA CAATACAAGA AAAAGTATCC GTATCCAGAG AGGACCAGGGA
GAGCATTTGT TACAATAGGA AAAATAGGAA ATATGAGACA AGCACATTGT GAAC

8.3.2. GPN FS PR- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGTC AGTACATCAA TGGGCGTGA TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCC
961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTGCTG AGCGGCGGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAAG
1021 ATCAGGCTGA GGCCCGGCGG CAAGAAGAAG TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGGCCAGC
1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTTCGC CGTGAACCCC GGCTTGCTGG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCCAGCTG CAGACCGGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG
1201 TACAACACCG TGGCCACCTT GACTGCGTG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
1321 GCCCGGCACA CCGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAAT ACCCCATCGT CAGAACATC
1381 CAGGGCCAGA TGGTGCACCA GCCCATCAGC CCCAGGACCC TGAACGCCTG GGTGAAGGTG
1441 GTGGAGGAGA AGGCCTTCAG CCCCAGGTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
1501 GCCACCCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCGTGG GCGGCCACCA GGCCGCCATG
1561 CAGATGCTGA AGGAGACCAT CAACGAGGAG GCCGCCGAGT GGGACAGGGT GCACCCCGTG
1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
1681 ACCACCAGCA CCCTGCAGGA GCAGATCGG TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
1741 GCGGAAATCT AAGAGAGGTG GATCCTCCTG GGCCTGAACA AGATCGTGAG GATGTCAGC
1801 CCCACCAGCA TCCTGGATAT CAGGCAGGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTACGTGGAC
1861 AGGTTCTACA AGACCTGCG CGCCGAGCAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGGATGACC
1921 GAGACCCTGC TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GGCCCTGGGA
1981 CCCGCCGCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCCAGCCAC
2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ATACAGCTAC CATAATGATG
2101 CAGAGGCA ATTTTAGGAA CCAAAGAAG ATGGTTAAGT GTTTCAATG TGGCAAAGAA
2161 GGGCACACAG CCAGAAATG CAGGGCCCTT AGGAAAAGG GCTGTTGGAA ATGTGGAAG
2221 GAAGGACACC AAATGAAAGA TTGTACTGAG AGACAGGCTA ATTTTTTAGG GAAGATCTGG
2281 CCTTCTACA AGGGAAGGCC AGGGAATTTT CTTGAGAGCA GACCAGAGCC AACAGCCCCA
2341 CCATTTCTTC AGAGCAGACC AGAGCCAACA GCCCACCAG AAGAGAGCTT CAGGTCTGGG
2401 GTAGAGACAA CAACTCCCC TCAGAAGCAG GAGCCGATAG ACAAGGAACT GTATCCTTTA
2461 ACTTCCCTCA GATCACTCTT TGGCAACGAC CCCTCGTCAC AATAAAGATA GGGGGGCAAC
2521 TAAAGGAAGC TCTATTAGCT ACAGGAGCAG ATGATACAGT ATTAGAAGAA ATGATTTTGC
2581 CAGGAAGATG GAAACCAAAA ATGATAGGGG GAATTGGAGG TTTTATCAAA GTAAGACAGT
2641 ATGATCAGAT ACTCATAGAA ATCTGTGGAC ATAAAGCTAT AGGTACAGTA TTAGTAGGAC
2701 CTACACCTGT CAACATAATT GGAAGAAATC TGTTGACTCA GATTGGTTGC ACTTTAAATT
2761 TTCCCATTAG CCCTATTGAG ACTGTACCAG TAAAATTAAA GCCAGGAATG GATGGCCCTA
2821 AGGTGAAGCA GTGGCCCTG ACCGAGGAGA AGATCAAGGC CCTGGTGGAG ATCTGCACCG
2881 AGATGGAGAA GGAGGCAAG ATCAGCAAGA TCGGCCCCGA GAACCCCTAC AACACCCCG
2941 TGTTCCGCAT CAAGAAGAAG CAGAGCACA AGTGGAGGAA GCTGGTGGAC TTCAGGAGC
3001 TGAACAAGAG GACCCAGGAC TTCTGGGAGG TGCAGCTGGG CATCCCCAC CCCGCCGGCC
3061 TGAAGAAGAA GAAGAGCGTG ACCGTGCTGG ACGTGGGCGA CGCCTACTTC AGCGTGCCCC
3121 TGGACGAGGA CTTGAGGAG TATACCCCTT TAAGACCAAT GACTTACAAG GCAGCTGTAG
3181 ATCTTAGCCA CTTTTTAAAA GAAAAGGGGG GACTGGGAGG GCTAATTAC TCCCAAAGAA
3241 GACAAGATAT CCTTGATCTG TGGATCTACC ACACACAAGG CTACTTCCCT GATCCAAGGA
3301 TGGGTGGCAA GTGGTCAAAA AGTAGTGTGG TTGGATGGCC TGCTGTAAGG GAAAGAATGA
3361 GACGACCTGA CCGAGCAGCA GATGGGTGG GAGCAGCATC TCGAGACCTG GAAAAACATG
3421 GAGCAATCAC AAGTAGCAAT ACAGCAGCTA CCAATGCTGC TTGTGCCTGG CTAGAAGCAC
3481 AAGAGGAGGA GGAGGTGGGT TTTCCAGTCA CACCTCAAGT ACCATTCCTG TGGATGGCT

3541 ACGAGCTGCA CCCCACAAAG TGGACCGTGC AGCCCATCGT GCTGCCCGAG AAGGACAGCT
 3601 GGACCGTGAA CGACATTCAG AAGCTGGTGG GCAAGCTGAA CTGGGCCAGC CAGATCTACC
 3661 CTGGCATCAA GGTGAGGCAG CTGTGCAAGC TGCTGAGGGG CACAAAGGCT CTGACCCGAGG
 3721 TGATCCCCCT GACCCGAGGAG GCCGAGCTGG AGCTGGCCGA GAACAGGGAG ATCCTGAAGG
 3781 AGCCCGTGCA CGGCGTGTAC TACGACCCCA GCAAGGACCT GATCGCCGAG ATCCAGAAGC
 3841 AGGGCCAGGG CCAGTGGACC TACCAGATCT ACCAGGAGCC CTTCAAGAAC CTGAAGACCG
 3901 GCAAGTACGC CCGCATGCGC GCGGCCACA CCAACGACGT GAAGCAGCTG ACCGAGGCCG
 3961 TGCAGAAGAT CACCACCGAG AGCATCGTGA TCTGGGGCAA GACTCCCTAAG TTCAAGCTGC
 4021 CCATCCAGAA GGAGACCTGG GAGACCTGGT GGACCGAGTA CTGGCAGGCC ACCTGGATTG
 4081 CCGAGTGGGA GTTCGTGAAC ACCCTCCCC TGGTGAAGCT GTGGTATCAG CTGGAGAAGG
 4141 AGCCCATCGT GGGCGCCGAG ACCTTCTACG TGGACGGCGC CGCCAACAGG GAGACCAAGC
 4201 TGGGCAAGGC CGGCTACGTG ACCAACAAGG GCCGCCAGAA GGTGGTGCCC CTGACCAACA
 4261 CCACCAACCA GAAGACCGAG CTGCAGGCTA TCTACCTGGC CCTGCAGGAC TCAGGCCTGG
 4321 AGGTGAACAT CGTGACCGAC AGCCAGTACG CCCTGGGCAT CATCCAGGCC CAGCCCAGCA
 4381 AGAGCGAGAG CGAGCTGGTG AACCAGATCA TCGAGCAGCT GATCAAGAA GAGAAGGTGT
 4441 ACCTGGCCTG GGTGCCCGCC CACAAGGGCA TCGGCCGCAA CGAGCAGGTG GACAAGCTGG
 4501 TGAGCGCCGG CATCAGGAAG ATCCTGTTC TGGACGGCAT CGACAAGGCC CAGGACGAGC
 4561 ACGAGAAGTA CCACAGCAAC TGGAGGGCTA TGGCTAGCGA CTTCAACCTG CCTCCCGTGG
 4621 TGGCTAAGGA GATCGTGGCC AGCGCCTTCA CCATCCCAG CATCAACAAC GAGACCCCCG
 4681 GCATCCGCTA CCAGTACAAC GTGCTGCCCC AGGGCTGGAA GGGCAGCCCC GCCATCTTCC
 4741 AGAGCAGCAT GACAAAGATC CTGGAGCCCT TCAAGAAGCA GAACCCCGAC ATCGTGATCT
 4801 ATCAGTACAT GGACGACCTG TACGTGGGCA GCGACCTGGA GATCGGCCAG CACAGGACCA
 4861 AGATCGAGGA GCTGAGGCAG CACCTGGCTA GGTGGGGCT GACCACCCC GACAAGAAGC
 4921 ACCAGAAGGA GCCCCAATTC CTGTGGAATT GTACAAGACC CAACAACAAT ACAAGAAGAA
 4981 GTATCCGTAT CCAGAGAGGA CCAGGGAGAG CATTGTGTAC AATAGGAAAA ATAGGAAATA
 5041 TGAGACAAGC ACATTGTAAC TAACTCGAGT CTAGAGGGCC CGTTTAAACC CGCTGATCAG
 5101 CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTG CCCCCTCCCC GTGCCCTCCT
 5161 TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATCGC
 5221 ATTGTCTGAG TAGTGTCAT TCTATTTCTG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG
 5281 AGGATTTGGG AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG GCTTCTGAGG
 5341 CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCTAGGGGGT ATCCCCACGC GCCCTGTAGC GCGCCATTAA
 5401 GCGCGCGGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC
 5461 CCGCTCCTTT CGCTTTCTTC CCTTCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG
 5521 CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA
 5581 AAAAAGTTGA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTC
 5641 GCCCTTTGAC GTTGGAGTCC ACGTCTTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCTA ACTGGAACAA
 5701 CACTCAACCC TATCTCGGTC TATTTCTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTCCGGCT
 5761 ATTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC GAATTAATTC TGTGGAATGT
 5821 GTGTCAGTTA GGGTGTGGAA AGTCCCCAGG CTCCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT
 5881 GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCAGGTGTGG AAAGTCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG
 5941 TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCATAGTC CCGCCCCCTAA CTCGGCCAT
 6001 CCGCCCCCTA ACTCCGCCCA GTTCCGCCCA TTCTCCGCC CATGGCTGAC TAATTTTTTT
 6061 TATTTATGCA GAGCCGAGG CCGCCTCTGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT AGTGAAGGAG
 6121 CTTTTTTTGA GCGCTAGGCT TTTGCAAAAA GCTCCCGGGA GCTTGTATAT CCATTTTCGG
 6181 ATCTGATCAA GAGACAGGAT GAGGATCGTT TCGCATGATT GAACAAGATG GATTGCACGC
 6241 AGGTTCTCCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC AACAGACAAT
 6301 CGGCTGCTCT GATGCCGCGG TGTTCCGGCT GTCAGCGCAG GGGCGCCCGG TTCTTTTTGT
 6361 CAAGACCGAC CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAGGAC GAGGCAGCGC GGCTATCGTG
 6421 GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG AAGCGGGAAG
 6481 GGATGGCTG CTATTGGGCG AAGTGGCCGG GCAGGATCTC CTGTCACTC ACCTTGCTCC
 6541 TGCCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGCGG CTGCATACGC TTGATCCGGC
 6601 TACCTGCCCA TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA CTCGGATGGA
 6661 AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG CGCCAGCCGA
 6721 ACTGTTCCGC AGGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTCG TGACCCATGG
 6781 CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGGTGGG AAATGGCCGC TTTTCTGGAT TCATCGACTG
 6841 TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC GTGATATTGC
 6901 TGAAGAGCTT GCGGCGAAT GGGCTGACCG CTTCCCTCGTG CTTTACGATA TCGCCGCTCC
 6961 CGATTGCGAG CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG CGGGACTCTG
 7021 GGGTTGCGAA TGACCGACCA AGCGACGCC AACCTGCCAT CACGAGATTT CGATTCCACC
 7081 GCCGCCTTCT ATGAAAGGTT GGGCTTCGGA ATCGTTTTCC GGGACGCCGG CTGGATGATC
 7141 CTCCAGCGCG GGGATCTCAT GCTGGAGTTC TTCGCCACC CCAACTTGTT TATTGCAGCT
 7201 TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA
 7261 CTGCATTTCTA GTTGTGGTTF GTCCAAATC ATCAATGFAT CTTATCATGT CTGTATACCG
 7321 TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GCGTAATCA TGGTCAATAG TGTTCCTGT GTGAAATTTGT
 7381 TATCCGCTCA CAATTCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT
 7441 GCCTAATGAG TGAGCTAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG
 7501 GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG
 7561 CGTATTGGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG
 7621 CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCC GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
 7681 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAAGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC

7741 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
7801 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
7861 AGTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
7921 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTCCGTGTG
7981 TAGGTCGTTC GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
8041 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
8101 GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
8161 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CCGCTACACT AGAAGAACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
8221 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
8281 GCTGGTAGCG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
8341 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGTCTT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTTAA
8401 GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA
8461 TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
8521 TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGCTATTTTC GTTCATCCAT AGTTGCCTGA
8581 CTCCCGTCTG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA
8641 ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
8701 GGAAGGCGCG AGCGCAGAAG TGGTCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
8761 TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCCCAA CGTTGTGGCC
8821 ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
8881 TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTAGCTCC
8941 TTCGGTCTCT CGATCGTTGT CAGAAGTAAG TTGGCCGAG TGTATCACT CATGGTTATG
9001 GCAGCACTGC ATAATCTCT TACTGTCTATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
9061 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG
9121 GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACCT TAAAAGTGCT CATCATGGGA
9181 AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG
9241 TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
9301 TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
9361 TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
9421 ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
9481 TTTCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTC

8.4.3. GPN FS PR+ V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181 TTAGGTTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCCGG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCCG GTTTACATAA CTTACGTTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCAACGACC
361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGCGTGGA TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGTATAG
901 GTTTAAACTT AAGCTTGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCC
961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTCTG AGCGGCGGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAAG
1021 ATCAGGCTGA GCGCCGGCGG CAAGAAGAA TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGCCAGC
1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTCCG CGTGAACCCC GGCCTGTGG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCAGCCTG CAGACCGGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG
1201 TACAACACCG TGGCCACCCT GACTGCGTG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
1321 GCCCGCCACA CCGGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAACT ACCCCATCGT GCAGAACATC
1381 CAGGGCCAGA TGGTGACCA GGCATCAGC CCCAGGACCC TGAACGCCTG GGTGAAGGTG
1441 GTGGAGGAGA AGGCCTTAG CCCCAGGTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
1501 GCCACCCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCGTGG GCGGCCACCA GGCCGCCATG
1561 CAGATGCTGA AGGAGACCAT CAACGAGGAG GCCGCCGAGT GGGACAGGGT GCACCCCGTG
1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
1681 ACCACCAGCA CCCTGCAGGA GCAGATCGGC TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
1741 GCGCAAACTT ACAAGAGGTG GATCATCTTG GGCCTGAACA AGATCGTGAG GATGTACAGC
1801 CCCACCAGCA TCCCTGGATAT CAGGCAGGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTAGTGGAC
1861 AGGTTCTACA AGACCCTCG CCGCAGGAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGGATGACC
1921 GAGACCCCTG TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GGCCCTGGGA
1981 CCCGCCGCCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCCAGCCAC
2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ATACAGCTAC CATAATGATG
2101 CAGAGAGGCA ATTTTAGGAA CCAAAGAAAG ATGTTAAGT GTTTCATTTG TGGCAAAGAA

2161 GGGCACACAG CCAGAAATG CAGGGCCCT AGGAAAAGG GCTGTTGGAA ATGTGAAAAG
 2221 GAAGGACACC AAATGAAAGA TTGTACTGAG AGACAGGCTA ATTTTTTAGG GAAGATCTGG
 2281 CCTTCCTACA AGGGAAGGCC AGGGAATTTT CTTCAGAGCA GACCAGAGCC AACAGCCCCA
 2341 CCATTTCTTC AGAGCAGACC AGAGCCAACA GCCCCACCAG AAGAGAGCTT CAGGTCTGGG
 2401 GTAGAGACAA CAACTCCCCC TCAGAAGCAG GAGCCGATAG ACAAGGAACT GTATCCTTTA
 2461 ACTTCCCTCA GATCACTCTT TGGCAACGAC CCCTCGTCAC AATAAAGATA GGGGGGCAAC
 2521 TAAAGGAAGC TCTATTAGAT ACAGGAGCAG ATGATACAGT ATTAGAAGAA ATGAGTTTGC
 2581 CAGGAAGATG GAAACCAAAA ATGATAGGGG GAATTGGAGG TTTTATCAAA GTAAGACAGT
 2641 ATGATCAGAT ACTCATAGAA ATCTGTGGAC ATAAAGCTAT AGGTACAGTA TTAGTAGGAC
 2701 CTACACCTGT CAACATAATT GGAAGAAATC TGTTGACTCA GATTGGTTGC ACTTTAAATT
 2761 TTCCCATTAG CCCTATTGAG ACTGTACCAG TAAAATTAAA GCCAGGAATG GATGGCCCTA
 2821 AGGTGAAGCA GTGGCCCTG ACCGAGGAGA AGATCAAGGC CCTGGTGGAG ATCTGCACCG
 2881 AGATGGAGAA GGAGGGCAAG ATCAGCAAGA TCGGCCCGA GAACCCCTAC AACACCCCG
 2941 TGTTCCGCCAT CAAGAAGAAG GACAGCACC AAGTGGAGG GCTGGTGGAC TTCAGGGAGC
 3001 TGAACAAGAG GACCCAGGAC TTCTGGGAGG TGCAGCTGGG CATCCCCAC CCCGCCGGCC
 3061 TGAAGAAGAA GAAGAGCGTG ACCGTGCTGG ACGTGGGCGA CGCCTACTTC AGCGTGGCCC
 3121 TGGACGAGGA CTTCAGGAAG TATACCCCTT TAAGACCAAT GACTTACAAG GATGGCTTAG
 3181 ATCTTAGCCA CTTTTTAAAA GAAAAGGGGG GACTGGAAGG GCTAATTAC TCCCAAAGAA
 3241 GACAAGATAT CCTTGATCTG TGGATCTACC ACACACAAGG CTACTTCCCT GATCCAAGGA
 3301 TGGGTGGCAA GTGGTCAAAA AGTAGTGTGG TTGGATGGCC TGCTGTAAGG GAAAGAATGA
 3361 GACGAGCTGA GCCAGCAGCA GATGGGTGG GAGCAGCATC TCGAGACCTG GAAAAACATG
 3421 GAGCAATCAC AAGTAGCAAT ACAGCAGCTA CCAATGCTGC TTGTGCCTGG CTAGAAGCAC
 3481 AAGAGGAGGA GGAGGTGGGT TTTCCAGTCA CACCTCAAGT ACCATTCTCTG TGGATGGGCT
 3541 ACGAGCTGCA CCCCAGCAAG TGGACCTGTC AGCCCATCGT AGCCCGGAG GCTGCCCGAG AAGGACGCT
 3601 GGACCGTGAA CGACATTCAG AAGCTGGTGG GCAAGCTGAA CTGGGCCAGC CAGATCTACC
 3661 CTGGCATCAA GGTGAGGCAG CTGTGCAAGC TGCTGAGGGG CACAAAGGCT CTGACCGAGG
 3721 TGATCCCCCT GACCGAGGAG GCCGAGCTGG AGCTGGCCGA GAACAGGGAG ATCCTGAAGG
 3781 AGCCCGTGCA CGGCGTGTAC TACGACCCCA GCAAGGACCT GATCGCCGAG ATCCAGAAGC
 3841 AGGGCCAGGG CCAGTGGACC TACCAGATCT ACCAGGAGCC CTTCAAGAAC CTGAAGACCG
 3901 GCAAGTACGC CGCATGCGC GGCGCCACA CCAACGACGT GAAGCAGCTG ACCGAGCCCG
 3961 TGCAGAAGAT CACCACCGAG AGCATCGTGA TCTGGGGCAA GACTCCTAAG TTCAAGCTGC
 4021 CCATCCAGAA GGAGACCTGG GAGACCTGGT GGACCGAGTA CTGGCAGGCC ACCTGGATTC
 4081 CCGAGTGGGA GTTCGTGAAC ACCCTCCCC TGGTGAAGCT GTGGTATCAG CTGGAGAAGG
 4141 AGCCCATCGT GGGCGCCGAG ACCTTCTACG TGGACGGCGC CGCCAACAGG GAGACCAAGC
 4201 TGGGCAAGGC CGGTACGTG ACCAACAAGG GCCGCCAGAA GGTGGTGCCC CTGACCAACA
 4261 CCACCAACCA GAAGACCGAG CTGCAGGCTA TCTACCTGGC CTTGCAGGAC TCAGGCTCTGG
 4321 AGGTGAACAT CGTGACCGAC AGCCAGTACG CCCTGGGCAT CATCCAGGCC CAGCCCTACA
 4381 AGAGCGAGAG CGAGCTGGTG AACCAGATCA TCGAGCAGCT GATCAAGAA GAGAAGGTGT
 4441 ACCTGGCCTG GGTGCCCGCC CACAAGGGCA TCGGCGGCAA CGAGCAGGTG GACAAGCTGG
 4501 TGAGCGCCGG CATCAGGAAG ATCCTGTTCC TGGACGGCAT CGACAAGGCC CAGGACGAGC
 4561 ACGAGAAGTA CCACAGCAAC TGGAGGGCTA TGGCTAGCGA CTTCAACCTG CCTCCCCTGG
 4621 TGGCTAAGGA CACTGTGGCC AGCGCCTTCA CCATCCCCAG CATCAACAAC GAGACCCCCG
 4681 GCATCCGCTA CGGTACAAC GTGCTGCCCC AGGGCTGGAA GGGCAGCCCC GCCATCTTCC
 4741 AGAGCAGCAT GACAAAGATC CTGGAGCCCT TCAAGAAGCA GAACCCCGAC ATCGTATCT
 4801 ATCAGTACAT GGACGACCTG TACGTGGGCA GCGACCTGGA GATCGGCCAG CACAGGACCA
 4861 AGATCGAGGA GCTGAGGCAG CACCTGCTGA GGTGGGGCCT GACCACCCC GACAAGAAGC
 4921 ACCAGAAGGA GCCCCCATTC CTGTGGAATT GTACAAGACC CAACAACAAT ACAAGAAAAA
 4981 GTATCCGTAT CCAGAGAGGA CCAGGGAGAG CATTTGTTAC AATAGGAAAA ATAGGAAATA
 5041 TGAGACAAGC ACATGTAAAC TAACTCGAGT CTAGAGGGCC CGTTTTAAAC CGCTGATCAG
 5101 CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCAT CTGTTGTTG CCCCCTCCCC GTGCCCTCCT
 5161 TGACCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCCTAATA AAATGAGGAA ATTGCATCGC
 5221 ATTGTCTGAG TAGGTGTCAT TCTATTTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC AGCAAGGGGG
 5281 AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG GCTTCTGAGG
 5341 CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCTAGGGGGT ATCCCCACGC GCCCTGTAGC GGCAGATTAA
 5401 GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC GCCCTAGCGC
 5461 CCGCTCCTTT CGCTTTCTTC CCTTCCCTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT CCCCCTCAAG
 5521 CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC CTCGACCCCA
 5581 AAAAAGTTGA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC GCCCTGATAG ACGGTTTTTC
 5641 GCCCTTTGAC GTTGGAGTCC ACGTTCCTTA ATAGTGGACT CTTGTTCCAA ACTGGAACAA
 5701 CACTCAACCC TATCTCGGTC TATTCCTTTG ATTTATAAGG GATTTTGCCG ATTTCCGGCT
 5761 ATTGGTTAAA AAATGAGCTG ATTTAACAAA AATTTAACGC GAATTAATTC TGTGGAATGT
 5821 GTGTCAGTTA GGGTGTGGAA AGTCCCCAGC CTCCCAGCA GGCAGAAGTA TGCAAAGCAT
 5881 GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCAGGTGTTG AAAGTCCCA GGCCTCCAG CCGCAGAAG
 5941 TATGCAAAGC ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCATAGTC CCGCCCTAA CTCGCCCAT
 6001 CCCGCCCTA ACTCCGCCA GTTCCGCCA TTCTCCGCC CATGGCTGAC TAATTTTTTT
 6061 TATTTATGCA GAGGCCGAGG CCGCCTCTGC CTCTGAGCTA TTCCAGAAGT AGTGAGGAGG
 6121 CTTTTTTGGA GGCCTAGGCT TTTGCAAAA GCTCCCGGGA GCTTGTATAT CCATTTTCGG
 6181 ATCTGATCAA GAGACAGGAT GAGGATCGTT TCGCATGATT GAACAAGATG GATTGCACGC
 6241 AGGTTCTCCG GCCGCTTGGG TGGAGAGGCT ATTCGGCTAT GACTGGGCAC AACAGACAAT
 6301 CGGCTGCTCT GATGCCGCCG TGTTCCGGCT GTCAGCGCAG GGGCGCCCG TTTCTTTTGT

6361 CAAGACCGAC CTGTCCGGTG CCCTGAATGA ACTGCAGGAC GAGGCAGCGC GGCTATCGTG
6421 GCTGGCCACG ACGGGCGTTC CTTGCGCAGC TGTGCTCGAC GTTGTCACTG AAGCGGGGAA
6481 GGACTGGCTG CTATTGGGCG AAGTGCCGGG GCAGGATCTC CTGTCACTC ACCTTGCTCC
6541 TGCCGAGAAA GTATCCATCA TGGCTGATGC AATGCGGGCG CTGCATACGC TTGATCCGGC
6601 TACCTGCCCA TTCGACCACC AAGCGAAACA TCGCATCGAG CGAGCACGTA CTCGGATGGA
6661 AGCCGGTCTT GTCGATCAGG ATGATCTGGA CGAAGAGCAT CAGGGGCTCG CGCCAGCCGA
6721 ACTGTTCCGC AGGCTCAAGG CGCGCATGCC CGACGGCGAG GATCTCGTCG TGACCCATGG
6781 CGATGCCTGC TTGCCGAATA TCATGGTGA AAATGGCCGC TTTTCTGGAT TCATCGACTG
6841 TGGCCGGCTG GGTGTGGCGG ACCGCTATCA GGACATAGCG TTGGCTACCC GTGATATTGC
6901 TGAAGAGCTT GCGGGCGAAT GGGCTGACCG CTTCCCTCGT TTTTACGGTA TCGCCGCTCC
6961 CGATTTCGAG CGCATCGCCT TCTATCGCCT TCTTGACGAG TTCTTCTGAG CCGGACTCTG
7021 GGGTTCGAAA TGACCGACCA AGCGACGCC AACCTGCCAT CACGAGATTT CGATTCCACC
7081 GCCGCCTTCT ATGAAAGGTT GGGCTTCGGA ATCGTTTTCC GGGACGCCGG CTGGATGATC
7141 CTCCAGCGCG GGGATCTCAT GCTGGAGTTC TTCGCCACC CCAACTTGTT TATTGCAGCT
7201 TATAATGGTT ACAAATAAAG CAATAGCATC ACAAATTTCA CAAATAAAGC ATTTTTTTCA
7261 CTGCATTCTA GTTGTGGTTT GTCCAACTC ATCAATGTAT CTTATCATGT CTGTATACCG
7321 TCGACCTCTA GCTAGAGCTT GCGTAATCA TGGTCATAG TGTTCCTGT GTGAAATGT
7381 TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA TAAAGTGTA AGCCTGGGGT
7441 GCCTAATGAG TGAGCTAAT CACATTAAT GCGTTGCGCT CACTGCCCGC TTTCCAGTCG
7501 GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC GCGCGGGGAG AGGCGGTTTG
7561 CGTATTGGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGTTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT CGTTCGGCTG
7621 CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT
7681 AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGG CAGCAAAAGG CCAGGAACCC TAAAAAGGCC
7741 GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC
7801 TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
7861 AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCTTT
7921 CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG
7981 TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
8041 GCCTTATCCG GTAACATATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG
8101 GCAGCACCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGATTTC
8161 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CCGGTACACT AGAAGAACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG
8221 CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC
8281 GCTGGTAGCG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA AGGATCTCAA
8341 GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGTCT GACGCTCAGT GGAACGAAAA CTCACGTAA
8401 GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAATAA
8461 TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC
8521 TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGCTATTTT GTTCATCCAT AGTTGCCTGA
8581 CTCCCCGTCG TGTAGATAAC TACGATACGG GAGGGCTTAC CATCTGGCCC CAGTGTGCA
8641 ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC
8701 GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCTGCA ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT
8761 TGTTGCCGGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCG CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC
8821 ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG TCGTTTGGTA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT
8881 TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTTAGTCTC
8941 TTCGGTCCCT CGATCGTTGT CAGAAGTAA TTGGCCGCGAG TGTATCACT ATGGTTATG
9001 GCAGCACTGC ATAATCTCT TACTGTCTATG CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT
9061 GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG
9121 GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTGGA
9181 AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG
9241 TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG
9301 TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT
9361 TGAATACTCA TACTCTTCTT TTTTCAATAT TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC
9421 ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA
9481 TTTCCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTC

8.4.4. GPN PR- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGGC
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGTTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCAACGACC
361 CCCGCCATT GACGTCATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGCACTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGTT AAATGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGTAT GGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGG TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGGC

781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
 841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
 901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCC
 961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTGTGT AGCGGCGGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAAG
 1021 ATCAGGCTGA GGCCCGGCGG CAAGAAGAAG TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGGCCAGC
 1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTTCGC CGTGAACCCC GGCTTGTCTG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
 1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCCAGCCTG CAGACCAGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG
 1201 TACAACACCG TGGCCACCTT GTACTGCGTG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
 1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
 1321 GCCGCCGACA CCGGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAACT ACCCCATCGT GCAGAACATC
 1381 CAGGGCCAGA TGGTGCACCA GGCCATCAGC CCCAGGACCC TGAACGCCTG GGTGAAGGTG
 1441 GTGGAGGAGA AGGCCTTCAG CCCCAGGTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
 1501 GCCACCCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCGTGG GCGGCCACCA GGCCGCCATG
 1561 CAGATGCTGA AGGAGACCAT CAACGAGGAG GCCGCCGAGT GGGACAGGGT GCACCCCGTG
 1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
 1681 ACCACCAGCA CCTTGCAGGA GCAGATCGCG TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
 1741 GGCGAAATCT ACAAGAGGTG GATCATCCTG GGCTGAACA AGATCGTGAG GATGTACAGC
 1801 CCCACCAGCA TCCTGGATAT CAGGCAGGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTACGTGGAC
 1861 AGGTTCTACA AGACCTTGCG CGCCGAGCAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGGATGACC
 1921 GAGACCCTGC TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GGCCCTGGGA
 1981 CCCGCCGCCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCCAGCCAC
 2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ACACCGCCAC CATCATGATG
 2101 CAGAGGGGCA ACTTCAGGAA CCAGAGGAAG ATGGTGAAGT GCTTCAACTG CGGCAAGGAG
 2161 GGCCACACCG CCAGGAACTG CCGCGCCCCC AGGAAGAAGG GCTGCTGGAA GTGCGGCAAG
 2221 GAGGGCCACC AGATGAAGGA CTGCACCGAG AGACAGGCTA ATTTTtaggga AGATCTGGCC
 2281 TTCCTACAAG GGAAGGCCAG GGAATTTTCT TCAGAGCAGA CCAGAGCCAA CAGCCCCACC
 2341 ATTTCTTCAG AGCAGACCAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA GAGAGCTTCA GGTCTGGGGT
 2401 AGAGACAACA ACTCCCCCTC AGAAGCAGGA GCCGATAGAC AAGGAACTGT ATCCTTTAAC
 2461 TTCCTCAGA TCACTCTTTG GCAACGCACC CTCGTACAAA TAAAGATCGG TGGCCAGCTG
 2521 AAGGAGCCCC TGCTGGCCAC CGCGCCGAC GACACCGTGC TGGAGGAGAT GAGCCCTCCC
 2581 GGCAGGTGGA AGCCCAAGAT GATCGGCGGC ATCGGCGGCT TCATCAAGGT GAGGCAGTAC
 2641 GACCAGATCC TGATCGAGAT CTGCGGCCAC AAGGCCATCG GCACCGTGCT GGTGGGACCT
 2701 ACACCTGTGA ACATCATCGG CAGGAACCTG CTGACCCAGA TCGGCTGCAC CCTGAACTTC
 2761 CCCATCAGCC CCATCGAGAC CGTGCCCTGT AAGCTGAAGC CCGGCATGGA CGGCCCTAAG
 2821 GTGAAGCAGT GGCCCTTGAC CGAGGAGAAG ATCAAGGCCC TGGTGGAGAT CTGCACCAGG
 2881 ATGGAGAAGG AGGGCAAGAT CAGCAAGATC GGCCCGAGA ACCCTACAA CACCCCGTGT
 2941 TTCGCCATCA AGAAGAAGGA CAGCACCAAG TGGAGGAAGC TGGTGGACTT CAGGGAGCTG
 3001 AACAAGAGGA CCCAGGACTT CTGGGAGGTG CAGCTGGGCA TCCCCACCC CGCCGGCCTG
 3061 AAGAAGAAGA AGAGCGTGAC CGTGTCTGGAC GTGGGCGACG CCTACTTCAG CGTGCCCTG
 3121 GACGAGGACT TCAGGAAGTA TACCCCTTTA AGACCAATGA CTTACAAGGC AGCTGTAGAT
 3181 CTTAGCCACT TTTTAAAGA AAAGGGGGGA CTGGAAGGGC TAATTCCTC CCAAAGAAGA
 3241 CAAGATATCC TTGATCTGTG GATCTACCAC ACACAAGGCT ACTTCCCTGA TCCAAGGATG
 3301 GGTGGCAAGT GGTCAAAAAG TAGTGTGGTT GGATGGCCTG CTGTAAGGGA AAGAATGAGA
 3361 CGAGCTGAGC CAGCAGCAGA TGGGGTGGGA GCAGCATCTC GAGACCTGGA AAAACATGGA
 3421 GCAATCACAA GTAGCAATAC AGCAGCTACC AATGCTGCTT GTGCCTGGCT AGAAGCACAA
 3481 GAGGAGGAGG AGGTGGGTTT TCCAGTCACA CCTCAAGTAC CATTCCTGTG GATGGGCTAC
 3541 GAGCTGCACC CCGACAAGTG GACCGTGAGC CCCATCGTGC TGCCCGAGAA GGACAGCTGG
 3601 ACCGTGAACG ACATTCAGAA GCTGGTGGGC AAGCTGAACT GGGCCAGCCA GATCTACCCT
 3661 GGCATCAAGG TGAGGCAGCT GTGCAAGCTC CTGAGGGGCA CAAAGGCTCT GACCGAGGTG
 3721 ATCCCCCTGA CCGAGGAGGC CGAGCTGGAG CTGGCCGAGA ACAGGGAGAT CTGAAGGAG
 3781 CCCGTGCACG GCGTGTACTA CGACCCAGC AAGGACCTGA TCGCCGAGAT CCAGAAGCAG
 3841 GGCCAGGGCC AGTGGACCTA CCAGATCTAC CAGGAGCCCT TCAAGAACCT GAAGACCGGC
 3901 AAGTACGCC GCATGCGCGG CGCCACACC AACGACGTGA AGCAGCTGAC CGAGGCCGTG
 3961 CAGAAGATCA CCACCGAGAG CATCGTGATC TGGGGCAAGA CTCCTAAGTT CAAGCTGCCC
 4021 ATCCAGAAGG AGACCTGGGA GACCTGGTGG ACCGAGTACT GGCAGGCCAC CTGGATTCCC
 4081 GAGTGGGAGT TCGTGAACAC CCTCCCCTG GTGAAGCTGT GGTATCAGCT GGAGAAGGAG
 4141 CCCATCGTGG GCGCCGAGAC CTTCTACGTG GACGGCGCCG CCAACAGGGA GACCAAGCTG
 4201 GGCAAGGCCG GCTACGTGAC CAACAAGGGC CGCCAGAAGG TGGTGGCCCT GACCAACACC
 4261 ACCAACCAGA AGACCGAGCT GCAGGCTATC TACCTGGCCC TGCAGGACTC AGGCCTGGAG
 4321 GTGAACATCG TGACCGACAG CCAGTACGCC CTGGGCATCA TCCAGGCCCA GCCCGACAAG
 4381 AGCGAGAGCG AGCTGGTGA AAGATCATC GAGCAGCTGA TCAAGAAGGA GAAGGTGTAT
 4441 CTGGCCCTGGG TGCCCGCCCA CAAGGTCATC GGCGGCAACG AGCAGGTGGA CAAGCTGGTG
 4501 AGCGCCGGCA TCGGAAGAT CAGTGTCTGT GACGGCATCG ACAAGGCCA GACGAGCAC
 4561 GAGAAGTACC ACAGCAACTG GAGGGCTATG GCTAGCGACT TCAACCTGCC TCCCGTGGTG
 4621 GCTAAGGAGA TCGTGGCCAG CGCCTTCACC ATCCCCAGCA TCAACAACGA GACCCCGGC
 4681 ATCCGCTACC AGTACAACGT GCTGCCCCAG GGCTGGAAGG GCAGCCCGC CATCTTCCAG
 4741 AGCAGCATGA CAAAGATCCT GGAGCCCTTC AAGAAGCAGA ACCCCGACAT CGTGATCTAT
 4801 CAGTACATGG ACGACCTGTA CGTGGGCAGC GACCTGGAGA TCGGCCAGCA CAGGACCAAG
 4861 ATCGAGGAGC TGAGGCAGCA CCTGCTGAGG TGGGGCTGA CCACCCCGA CAAGAAGCAC
 4921 CAGAAGGAGC CCCATTCTCT GTGGAATTGT ACAAGACCCA ACAACAATAC AAGAAAAGT

4981 ATCCGTATCC AGAGAGGACC AGGGAGAGCA TTTGTTACAA TAGGAAAAAT AGGAAATATG
 5041 AGACAAGCAC ATTGTAACATA ACTCGAGTCT AGAGGGCCCC TTTAAACCCG CTGATCAGCC
 5101 TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CTTCCCCCGT GCCTTCCTTG
 5161 ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCTTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT
 5221 TGTCTGAGTA GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG
 5281 GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGC TTCTGAGGCG
 5341 GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCCACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAAGC
 5401 GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC
 5461 GCTCCTTTCCG CTTTCTTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTCC CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT
 5521 CTAATTCGGG GGCTCCCTTT AGGGTTCGGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA
 5581 AAACCTTGAT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC
 5641 CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC TGGAACAACA
 5701 CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT
 5761 TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA ATTAATTCTG TGGAATGTGT
 5821 GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
 5881 ATCTCAATTA GTCAGCAACC AGGTGTGGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA
 5941 TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCTAACT CCGCCCATCC
 6001 CGCCCCAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA
 6061 TTTATGCAGA GGCCGAGGCC GCCTCTGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT
 6121 TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAGC TCCCGGGAGC TTGTATATCC ATTTTCGGAT
 6181 CTGATCAAGA GACAGGATGA GGATCGTTTC GCATGATGA ACAAGATGGA TTGCACCGAG
 6241 GTTCTCCGGC CGCTTGGGTG GAGAGGCTAT TCGGCTATGA CTGGGCACAA CAGACAATCG
 6301 GCTGCTCTGA TGCCGCCGTG TTCGGCTGT CAGCGCAGG GCGCCCGGT CTTTTTGTCA
 6361 AGACCCACT TCCCGGTGCC CTGAATGAAC TGCAGGACGA GGCAGCGCG CTATCGTGGC
 6421 TGGCCACGAC GGGCGTTCCT TGCGCAGCTG TGCTCGACGT TGCTACTGAA GCGGGAAGGG
 6481 ACTGGCTGCT ATTGGGCGAA GTGCCGGGGC AGGATCTCCT GTCATCTCAC CTTGCTCCTG
 6541 CCGAGAAAGT ATCCATCATG GCTGATGCAA TGCGGCGGCT GCATACGCTT GATCCGGCTA
 6601 CCTGCCCATT CGACCACCAA GCGAAACATC GCATCGAGCG AGCACGTACT CGGATGGAAAG
 6661 CCGGTCTTGT CGATCAGGAT GATCTGGACC AAGAGCATCA GGGGCTCGCG CCAGCCGAAC
 6721 TGTTCGCCAG GCTCAAGCGC GCGATGCCCG ACGGCGAGGA TCTCGTCGTG ACCCATGGCG
 6781 ATGCCTGCTT GCCGAATATC ATGGTGAAA ATGGCCGCTT TTCTGGATTC ATCGACTGTG
 6841 GCCGGCTGGG TGTGGCGGAC CGCTATCAGG ACATAGCGTT GGCTACCCGT GATATTGCTG
 6901 AAGAGCTTGG CGGCGAATGG GCTGACCGCT TCCTCGTGCT TTACGGTATC GCCGCTCCCG
 6961 ATTCGCAGCG CATCGCCTTC TATCGCCTTC TTGACGAGTT CTTCTGAGCG GGACTCTGGG
 7021 GTTCGAAATG ACCGACCAA CGACGCCCAA CCTGCCATCA CGAGATTTCCG ATTCCACCCG
 7081 CGCCTTCTAT GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT CGTTTTCCGG GACGCCGGCT GGATGATCCT
 7141 CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTCTT CCGCCACCCC AACTTGTFTA TTGCAGCTTA
 7201 TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT
 7261 GCATTCTAGT TGTGGTTTTGT CCAAACATCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GTATAACCGT
 7321 GACCTCTAGC TAGAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCCGTGTG GAAATTGTTA
 7381 TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAAG CCTGGGGTGC
 7441 CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT TCCAGTCCGG
 7501 AAACCTGTGC TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CCGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGGC
 7561 TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGTCTAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCG TTCGGTCCG
 7621 GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA
 7681 CGCAGGAAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
 7741 GTTGCTGGCG TTTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC
 7801 AAGTCAGAGG TGCGGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG
 7861 CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCGACCTT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCTTTCT
 7921 CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGA
 7981 GGTGCTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
 8041 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
 8101 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT
 8161 GAAGTGTTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
 8221 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCCG
 8281 TGGTACCGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
 8341 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC TACGTTAAGG
 8401 GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAATAATG
 8461 AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
 8521 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
 8581 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT
 8641 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAC AGCCAGCCGG
 8701 AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCCTCAGC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
 8761 TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
 8821 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
 8881 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT
 8941 CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA TGGTTATGGC
 9001 AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGGTGA
 9061 GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGCGCA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
 9121 GTCAATACCG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA

9181 ACGTTCCTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
 9241 ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG
 9301 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAATGTGTG
 9361 AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
 9421 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
 9481 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTC

8.4.5. GPN PR+/- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
 61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
 121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTCG
 181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
 241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
 301 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
 361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
 421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
 481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
 541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGA GTACATCTAC GTATTAGTCA
 601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGA TAGCGGTTTG
 661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
 721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
 781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
 841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
 901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCG
 961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTGTG AGCGGGCGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAAG
 1021 ATCAGGCTGA GGCCCGGCG CAAGAAGAAG TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGGCCAGC
 1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTGCG CGTGAACCCC GGCTGCTGG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
 1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCCAGCCTG CAGACCGGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG
 1201 TACAACACCG TGGCCACCTT GACTGCGTGG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
 1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
 1321 GCCGCCGACA CCGGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAACT ACCCCATCGT GCAGAACATC
 1381 CAGGGCCAGA TGGTGCACCA GGCCATCAGC CCCAGGACCC TGAACGCCTG GTGAAGGTG
 1441 GTGGAGGAGA AGGCCTTCAG CCCCAGGTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
 1501 GCCACCCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCGTGG GCGGCCACCA GGCCGCCATG
 1561 CAGATGCTGA AGGAGACCAT CAACGAGGAG GCCGCCGAGT GGGACAGGGT GCACCCCGTG
 1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
 1681 ACCACCAGCA CCCTGCAGGA GCAGATCGGC TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
 1741 GGCAGAACTT ACAAGAGGTG GATCATCTGT GGCCGAAACA AGATCGTGAG GATGTACAGC
 1801 CCCACAGCA TCCTGGATAT CAGGCACGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTACGTGAC
 1861 AGGTTCTACA AGACCTGCG CGCCGAGCAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGGATGACC
 1921 GAGACCCTGC TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GGCCCTGGGA
 1981 CCCGCCGCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCCAGCCAC
 2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ACACCGCCAC CATCATGATG
 2101 CAGAGGGGCA ACTTCAGGAA CCAGAGGAA ATGGTGAAGT GCTTCAACTG CGGCAAGGAG
 2161 GGCCACACCG CTAGGAACTG CCGCCGCCCC AGGAAGAAGG GCTGCTGGAA GTGCGGCAAG
 2221 GAGGGCCACC AGATGAAGGA CTGCACCGAG AGACAGGCTA ATTTTAGGGA AGATCTGGCC
 2281 TTCCTACAAG GGAAGGCCAG GGAATTTTCT TCAGAGCAGA CCAGAGCCAA CAGCCCCACC
 2341 ATTTCTTCAG AGCAGACCAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA GAGAGCTTCA GGTCTGGGGT
 2401 AGAGACAACA ACTCCCCCTC AGAAGCAGGA GCCGATAGAC AAGGAACTGT ATCCTTTAAC
 2461 TTCCCTCAGA TCACTCTTTG GCAACGACCC CTCGTACAAA TAAAGATCGG TGGCCAGCTG
 2521 AAGGAGGCC TGCTGGACAG CGGCGCCGAC GACACCGTGC TGGAGGAGAT GAGCTGCCC
 2581 GCGAGGTGGA AGCCCAAGAT GATCGGCGGC ATCGGCGGCT TCATCAAGGT GAGGCATAC
 2641 GACCAGATCC TGATCGAGAT CTGCGGCCAC AAGGCCATCG GCACCGTGCT GGTGGGACCT
 2701 ACACCTGTGA ACATCATCGG CAGGAACCTG CTGACCCAGA TCGGCTGCAC CCTGAACTTC
 2761 CCCATCAGCC CCATCGAGAC CGTGCCCGTG AAGCTGAAGC CCGGCATGGA CGGCCCTAAG
 2821 GTGAAGCAGT GGCCCTGAC CGAGGAGAAG ATCAAGGCC TGGTGGAGAT CTGCACCGAG
 2881 ATGGAGAAGG AGGGCAAGAT CAGCAAGATC GGCCCGGAGA ACCCTACAA CACCCCGTG
 2941 TTCGCCATCA AGAAGAAGGA CAGCACCAAG TGGAGGAAGC TGGTGGACTT CAGGGACTCG
 3001 AACAAGAGGA ACCAGGACTT CTGGGAGGTG CAGCTGGGCA TCCCCACCC CGCCGGCCTG
 3061 AAGAAGAAGA AGAGCGTGAC CGTGCTGGAC GTGGGCGACG CCTACTTCAG CGTGCCCTG
 3121 GACGAGGACT TCAGGAAGTA TACCCCTTTA AGACCAATGA CTTACAAGGC AGCTGTAGAT
 3181 CTTAGCCACT TTTTAAAAGA AAAGGGGGGA CTGGAAGGGC TAATTCCTC CCAAAGAGA
 3241 CAAGATATCC TTGATCTGTG GATCTACCAC ACACAAGGCT ACTTCCCTGA TCCAAGGATG
 3301 GGTGGCAAGT GGTCAAAAAG TAGTGTGGTT GGATGGCCTG CTGTAAGGGA AAGAATGAGA
 3361 CGAGCTGAGC CAGCAGCAGA TGGGGTGGGA GCAGCATCTC GAGACCTGGA AAAACATGGA
 3421 GCAATCACAA GTAGCAATAC AGCAGCTACC AATGCTGCTT GTGCCTGGCT AGAAGCACAA
 3481 GAGGAGGAGG AGGTGGGTTT TCCAGTCACA CCTCAAGTAC CATTCCTGTG GATGGGCTAC
 3541 GAGCTGCACC CCGACAAGTG GACCGTGACG CCCATCGTGC TGCCCGAGAA GGACAGCTGG

3601 ACCGTGAACG ACATTCAGAA GCTGGTGGGC AAGCTGAACT GGGCCAGCCA GATCTACCTT
3661 GGCATCAAGG TGAGGCAGCT GTGCAAGCTG CTGAGGGGCA CAAAGGCTCT GACCGAGGTG
3721 ATCCCCCTGA CCGGAGGAGC CGAGCTGGAG CTGGCCGAGA ACAGGGAGAT CCTGAAGGAG
3781 CCCGTGCACG CCGTGTACTA CGACCCAGC AAGGACCTGA TCGCCGAGAT CCAGAAGCAG
3841 GGCCAGGGCC AGTGGACCCTA CCAGATCTAC CAGGAGCCCT TCAAGAACCT GAAGACCGGC
3901 AAGTACGCCC GCATGCGCGG CGCCACACC AACGACGTGA AGCAGCTGAC CGAGGCCGTG
3961 CAGAAGATCA CCACCGAGAG CATCGTGATC TGGGGCAAGA CTCTAAGTT CAAGCTGCCC
4021 ATCCAGAAGG AGACCTGGGA GACCTGGTGG ACCGAGTACT GGCAGGCCAC CTGGATTCCC
4081 GAGTGGGAGT TCGTGAACAC CCCTCCCCTG GTGAAGCTGT GGTATCAGCT GGAGAAGGAG
4141 CCCATCGTGG GCGCCGAGAC CTTCTACGTG GACGGCGCCG CCAACAGGGA GACCAAGCTG
4201 GGCAAGGCCG GCTACGTGAC CAACAAGGGC CGCCAGAAG TGGTGCCCTT GACCAACACC
4261 ACCAACCAGA AGACCGAGCT GCAGGCTATC TACCTGGCCC TGCAGGACTC AGGCCTGGAG
4321 GTGAACATCG TGACCGACAG CCAGTACGCC CTGGGCATCA TCCAGGCCCA GCCCGACAAG
4381 AGCGAGAGCG AGCTGGTGAA CCAGATCATC GAGCAGCTGA TCAAGAAGGA GAAGGTGTAC
4441 CTGGCCTGGG TGCCCGCCCA CAAGGGCATC GGCGGCAACG AGCAGGTGGA CAAGCTGGTG
4501 AGCGCCGGCA TCAGGAAGAT CCTGTTCCCTG GACGGCATCG ACAAGGCCCA GGACGAGCAC
4561 GAGAAGTACC ACAGCAACTG GAGGGCTATG GCTAGCGACT TCAACCTGCC TCCCGTGGTG
4621 GCTAAGGAGA TCGTGGCCAG CGCCTTCAAC ATCCCCAGCA TCAACAACGA GACCCCGGGC
4681 ATCCGCTACC AGTACAACGT GCTGCCCCAG GGCTGGAAGG GCAGCCCCGC CATCTTCCAG
4741 AGCAGCATGA CAAAGATCCT GGAGCCCTTC AAGAAGCAGA ACCCCGACAT CGTGATCTAT
4801 CAGTACATGG ACGACCTGTA CGTGGGCAGC GACCTGGAGA TCGGCCAGCA CAGGACCAAG
4861 ATCGAGGAGC TGAGGCAGCA CCTGCTGAGG TGGGGCTGA CCACCCCGCA CAAGAAGCAC
4921 CAGAAGGAGC CCCCATTCCT GTGGAATTGT ACAAGACCA ACAACAATAC AAGAAAAAGT
4981 ATCCGTATCC AGAGAGGACC AGGGAGGACA TTTGTTACAA TAGGAAAAAT AGGAAATATG
5041 AGACAAGCAC ATTGTAACCTA ACTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTTAAACCCG CTGATCAGCC
5101 TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG
5161 ACCCTGGGAG GTGCCACTCC CACTGTCTTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT
5221 TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG
5281 GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGC TTCTGAGGCG
5341 GAAAGAACCA CTGCGGGCTC TAGGGGTAT CCCCACGCGC CCTGTAGCGG CGCATTAAAG
5401 GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC TTGCCAGCGC CCTATGCCCC
5461 GCTCCTTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTTC CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT
5521 CTAAATCGGG GGCTCCCTTT AGGGTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA
5581 AAACCTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTTCG
5641 CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCAAAAC TGAACAACA
5701 CTCAACCCTA TCTCGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT
5761 TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTTAACGCGA ATTAATTCTG TGAATGTGT
5821 GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
5881 ATCTCAATTA GTCAGCAACC AGGTGTGGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA
5941 TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT CCGCCATCC
6001 CGCCCCAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT CTCCGCCCA TGGCTGACTA ATTTTTTTTA
6061 TTTATGCAGA GGCCGAGGCC GCCTCTGCCT CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT
6121 TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT TGCAAAAAGC TCCCGGGAGC TTGTATATCC ATTTTCGAT
6181 CTGATCAAGA GACAGGATGA GGATCGTTTC GCATGATTGA ACAAGATGGA TTGCACGAG
6241 GTTCTCCGGC CGCTTGGGTG GAGAGGCTAT TCGGCTATGA CTGGGCACAA CAGACAATCG
6301 GCTGCTCTGA TGCCGCCGTG TTCGGCTGT CAGCGCAGGG GCGCCCGGTT CTTTTTGTCA
6361 AGACCGACCT GTCCGGTGCC CTGAATGAAC TGCAGGACGA GGCAGCGCGG CTATCGTGGC
6421 TGCCACGAC GGGCGTTCCT TGCGCAGCTG TGCTCGACGT TGCTACTGAA GCGGGAAGGG
6481 ACTGCTGCTT ATTGGCGAA GTGCCGGGGC AGGATCTCCT GTCATCTCAC CTTGCTCCTG
6541 CCGAGAAAAGT ATCCATCATG GCTGATGCAA TGCGGCGGCT GCATACGCTT GATCCGGCTA
6601 CCTGCCATT CGACCACCAA GCGAAACATC GCATCGAGCG AGCACGACT CCGATGGAAAG
6661 CCGGTCTTGT CGATCAGGAT GATCTGGACG AAGAGCATCA GGGGCTCGCG CCAGCCGAAC
6721 TGTTCCGCCG GCTCAAGGCG CGCATGCCCG ACGGCGAGGA TCTCGTCGTG ACCCATGGCG
6781 ATGCCTGCTT GCCGAATATC ATGGTGGAAA ATGGCCGCTT TTCTGGATT CACTGCTGTG
6841 GCCGGCTGGG TGTGGCGGAC CGCTATCAGG ACATAGCGTT GGCTACCCGT GATATTGCTG
6901 AAGAGCTTGG CCGGAATGG GCTGACCGCT TCCTCGTGCT TTACGGTATC GCCCTCCCG
6961 ATTCGACGCG CATCGCCTTC TATCGCCTTC TTAGCAGTGT TTAGCAGGTT GACTCTGGG
7021 GTTCGAAATG ACCGACCAAG CGACGCCCAA CCTGCCATCA CGAGATTTTC ATTCCACCGC
7081 CGCCTTCTAT GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT CGTTTTCCGG GACGCCGGCT GGATGATCCT
7141 CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTTCTT CGCCACCCC AACTTGTFTA TTGCAGCTTA
7201 TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTTACA AATAAAGCAT TTTTTTCACT
7261 GCATCTAGT TGTGGTTTGT CCAAATCAT CAATGTATCT TATCATGTCT GTATAACGTC
7321 GACCTTAGC TAGAGCTTGG GTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATGTFTA
7381 TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC
7441 CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATG GTTGCGCTCA CTGCCGCTT TCCAGTCGGG
7501 AAACCTGTCT TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTTCG
7561 TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTCG TTCGGCTGCG
7621 GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAA CAGGGGATAA
7681 CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCG
7741 GTTGCTGGCG TTTTCCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAA ATCGACGCTC

7801 AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG
7861 CTCCCTCGTG CGCTCTCTCTG TTCCGACCCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT
7921 CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTG
7981 GGTCTGTTCCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
8041 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT CGCCACTGGC
8101 AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT
8161 GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
8221 GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC
8281 TGGTAGCGGT TTTTTTGTFT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
8341 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT CACGTTAAGG
8401 GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAATAATG
8461 AAGTTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT
8521 AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
8581 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCA GTGCTGCAAT
8641 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAC AGCCAGCCGG
8701 AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG
8761 TTGCCGGGAA GGGCGAAAAC TCTCAAGTAT AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT
8821 TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCAATCA GCTCCGGTTC
8881 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT
8941 CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCACTG TTACTACTCA TGGTTATGGC
9001 AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGACTGTGTA
9061 GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC
9121 GTCATAACCG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTAA AAAGTGCTCA TCATTTGAAA
9181 ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGTAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
9241 ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG TTTCTGGGTG
9301 AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAATGTTG
9361 AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT
9421 GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
9481 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTC

8.4.6. GP FS Δ nef V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
361 CCGGCCATT CAGCTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG CAGCTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCG CAATTTGACG CAAATGGGCG
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCC
961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTGCTG AGCGGCGGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAAG
1021 ATCAGGCTGA GGCCCGGCGG CAAGAAGAAG TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGGCCAGC
1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTTCG CGTGAACCCC GGCTTGCTGG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCCAGCCTG CAGACCGGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG
1201 TACAACACCG TGGCCACCCT GACTTGCCTG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
1321 GCCGCCGACA CCGGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAACT ACCCATCGT GCAGAACATC
1381 CAGGGCCAGA TGGTGCACCA GGCCATCAGC CCCAGGACCC TGAACGCCTG GGTGAAGGTG
1441 GTGGAGGAGA AGGCCTTCAG CCCCAGGTTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
1501 GCCACCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCTGG CCGGCCACCA GCGCCCATG
1561 CAGATGCTGA AGGAGCCAT CAACGAGGAG GCCCGCGAGT GGGACAGGGT GCACCCGCTG
1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
1681 ACCACCAGCA CCCTGCAGGA GCAGATCGGC TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
1741 GCGGAAATCT ACAAGAGGTG GATCATCCTG GGCTTGAACA AGATCGTGAG GATGTACAGC
1801 CCCACCAGCA TCCTGGATAT CAGGCAGGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTACGTGGAC
1861 AGGTTCTACA AGACCTGCG CGCCGAGCAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGATGACC
1921 GAGACCCTGC TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GCGCTGGGA
1981 CCCGCCGCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCCAGCCAC
2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ACACCGCCAC CATCATGATG
2101 CAGAGGGGCA ACTTCAGGAA CCAGAGGAAG ATGGTGAAGT GCTTCAACTG CCGCAAGGAG
2161 GGCCACACCG CCAGGAACTG CCGCGCCCC AGGAAGAAGG GCTGCTGGAA GTGCGGCAAG

2221 GAGGGCCACC AGATGAAGGA CTGCACCGAG AGACAGGCTA ATTTTAGGGA AGATCTGGCC
 2281 TTCCTACAAG GGAAGGCCAG GGAATTTTCT TCAGAGCAGA CCAGAGCCAA CAGCCCGCC
 2341 ATTTCTTCAG AGCAGACCAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA GAGAGCTTCA GGTCTGGGGT
 2401 AGAGACAACA ACTCCCCTC AGAAGCAGGA GCCGATAGAC AAGGAACTGT ATCCTTTAAC
 2461 TTCCCTCAGA TCACTCTTTG GCAACGACCC CTCGTACAAA TAAAGATCGG TGGCCAGCTG
 2521 AAGGAGGCC TGTCTGGCCAC CGGCGCCGAC GACACCGTGC TGGAGGAGAT GAGCCTGCCC
 2581 GGCAGGTGGA AGCCCAAGAT GATCGGCGGC ATCGGCGGCT TCATCAAGGT GAGGCAGTAC
 2641 GACCAGATCC TGATCGAGAT CTGCGGCCAC AAGGCCATCG GCACCGTGCT GGTGGGACTT
 2701 ACACCTGTGA ACATCATCGG CAGGAACCTG CTGACCCAGA TCGGCTGCAC CCTGAACTTC
 2761 CCCATCAGCC CCATCGAGAC CGTGCCCTG GAGCTGAAGC CCGGCATGGA CGGCCCTAAG
 2821 GTGAAGCAGT GGCCCTGAC CGAGGAGAAG ATCAAGGCC TGGTGGAGAT CTGCACCGAG
 2881 ATGGAGAAGG AGGGCAAGAT CAGCAAGATC GGCCCGAGA ACCCCTACAA CACCCCGTG
 2941 TTCGCCATCA AGAAGAAGGA CAGCACCAG TGGAGGAAGC TGGTGGACTT CAGGGAGCTG
 3001 AACAAGAGGA CCCAGGACTT CTGGGAGGTG CAGCTGGGCA TCCCCACCC CGCCGCGCTG
 3061 AAGAAGAAGA AGAGCGTGAC CGTGCTGGAC GTGGGCGACG CCTACTTCAG CGTGCCCTG
 3121 GACGAGGACT TCAGGAAGTA TACCCATTCT CTGTGGATGG GCTACGAGCT GCACCCGAC
 3181 AAGTGGACCG TGCAGCCCAT CGTGCTGCC GAGAAGGACA GCTGGACCGT GAACGACATT
 3241 CAGAAGCTGG TGGGCAAGCT GAACTGGGCC AGCCAGATCT ACCCTGGCAT CAAGGTGAGG
 3301 CAGCTGTGCA AGCTGCTGAG GGGCACAAAG GCTCTGACCG AGGTGATCCC CCTGACCGAG
 3361 GAGGCCGAGC TGGAGCTGGC CGAGAACAGG GAGATCCTGA AGGAGCCCGT GCACGGCGTG
 3421 TACTACGACC CCAGCAAGGA CCTGATCCCC GAGATCCAGA AGCAGGGCCA GGGCCAGTGG
 3481 ACCTACCAGA TCTACCAGGA GCCCTTCAAG AACCTGAAGA CCGGCAAGTA CGCCCGCATG
 3541 CGCGGCGCC ACACCAACGA CGTGAAGCAG CTGACCGAGG CCGTGCAGAA GATCACCACC
 3601 GAGAGCATCG TGATCTGGGG CAAGACTCCT AAGTTCGAAG TGCCCATCCA GAAGGAGACC
 3661 TGGGAGACCT GGTGGACCGA GTACTGGCAG GCCACCTGGA TTCCCGAGTG GGAGTTCGTG
 3721 AACACCCCTC CCCTGGTGAA GCTGTGGTAT CAGCTGGAGA AGGAGCCCAT CGTGGGCGCC
 3781 GAGACCTTCT ACGTGGACGG CGCCGCCAAC AGGGAGACCA AGCTGGGCAA GGCCGGTAC
 3841 GTGACCAACA AGGGCCGCCA GAAGGTGGTG CCCCTGACCA ACACCACCAA CCAGAAGACC
 3901 GAGCTGCAGG CTATCTACCT GGCCCTGCAG GACTCAGGCC TGGAGGTGAA CATCGTGACC
 3961 GACAGCCAGT ACGCCCTGGG CATCATCCAG GCCCAGCCCG ACAAGAGCGA GAGCGAGCTG
 4021 GTGAACCAGA TCATCGAGCA GCTGATCAAG AAGGAGAAGG TGTACCTGGC CTGGGTCCCC
 4081 GCCACAAGG GCATCGGCGG CAACGAGCAG GTGGACAAGC TGGTGAAGCG CGGCATCAGG
 4141 AAGATCCTGT TCCTGGACGG CATCGACAAG GCCCAGGACG AGCACGAGAA GTACCACAGC
 4201 AACTGGAGGG CTATGGCTAG CGACTTCAAC CTGCCTCCCG TGGTGGCTAA GGAGATCGTG
 4261 GCCAGCGCCT TCACCATCCC CAGCATCAAC AACGAGACCC CCGGCATCCG CTACCAGTAC
 4321 AACGTGCTGC CCCAGGGCTG GAAGGGCAGC CCCGCCATCT TCCAGAGCA CATGACAAAAG
 4381 ATCCTGGAGC CTTTCAAGAA GCAGAACCCC GACATCGTGA TCTATCAGTA CATGGACGAC
 4441 CTGTACGTGG GCAGCGACCT GGAGATCGGC CAGCACAGGA CCAAGATCGA GGAGCTGAGG
 4501 CAGCACCTGC TGAGGTGGGG CCTGACCACC CCCGACAAGA AGCACCAGAA GGAGCCCCA
 4561 TTCCTGTGGA ATTGTACAAG ACCCAACAAC AATACAAGAA AAAGTATCCG TATCCAGAGA
 4621 GGACCAGGGA GAGCATTGT TACAATAGGA AAAATAGGAA ATATGAGACA AGCACATTGT
 4681 AACTAECTCG AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT
 4741 AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGTGCC
 4801 ACTCCCCTG TCCTTCTTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT GATAGTGTG
 4861 CATTCTATTC TGGGGGGTGG GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT
 4921 AGCAGGCATG CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGG
 4981 GGCTCTAGGG GGTATCCCA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT TAAGCGCGGC GGGTGTGGTG
 5041 GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG CGCCCGCTCC TTTCCGTTTC
 5101 TTCCCTTCTC TTCTCGCCAC GTTCGCGCG GTTCCCGCTC AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC
 5161 CCTTTAGGTT TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC CCAAAAAACT TGATTAGGTT
 5221 GATGGTTTAC GTAGTGGGCC ATCGCCCTGA TAGACGGTTT TTCGCCCTTT GACGTTGGAG
 5281 TCCACGTTCT TTAATAGTGG ACTCTTGTTC CAAACTGGAA CAACACTCAA CCCTATCTCG
 5341 GTCTATTCTT TTGATTTATA AGGGATTTTG CCGATTTCCG CCTATTGGTT AAAAAATGAG
 5401 CTGATTTAAC AAAAAATTTAA CGCGAATTTA TTCTGTGGAA TGTGTGTCAG TTAGGTTGTG
 5461 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
 5521 CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGCTCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC
 5581 TCAATTAGTC AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACCTCCG
 5641 CCAGTCCCGC CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT GCAGAGGCCG
 5701 AGGCCGCTC TGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG
 5761 GCTTTTGCAA AAAGCTCCCG GGAGCTTGT TATCCATTTT CGGATCTGAT CAAGAGACAG
 5821 GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT
 5881 GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG
 5941 CCGTGTCCG GCTGTCAGC CAGGGCGCC CGGTTCTTTT TGTCAGGACC GACCTGCCC
 6001 GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGCG
 6061 TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG
 6121 GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA
 6181 TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTCCGAC
 6241 ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTGATC
 6301 AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGC TCGCGCCAGC CGAACTGTTT GCCAGGCTCA
 6361 AGCGCGCAT GCCCGACGCG GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTGCCGA

6421 ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG
6481 CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGCGC
6541 AATGGCTATG CCGCTTCCTC GTGCTTTTACG GTATCGCCGC TCCCGATTCC CAGCGCATCG
6601 CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT CTGGGGTTCG AAATGACCGA
6661 CCAAGCGACG CCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC ACCGCCCTCT TCTATGAAAAG
6721 GTTGGGCTTC GGAATCGTTF TCCGGGACGC CGGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGGATCT
6781 CATGCTGGAG TTCTTCGCC ACCCCAACCT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
6841 AAGCAATAGC ATCACAAAT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG
6901 TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGTATA CCGTCGACCT CTAGCTAGAG
6961 CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTTATCCGC TCACAATTC
7021 ACACAACATA CGAGCCGAA GCATAAAATG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA
7081 ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA
7141 GCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG GAGAGGCGGT TTGCGTATG GCGCCTCTC
7201 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTGCTTCGG CTGCGGCGAG CCGTATCAGC
7261 TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
7321 GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT
7381 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
7441 AAACCCGACA GGAATAAAA GATACCAGGC GTTTCCCTCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
7501 TCCTGTTCGG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CCGGAAGCGT
7561 GCGCCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCAA
7621 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACCTA
7681 TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCATGGTAA
7741 CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCTTAA
7801 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACTCT
7861 CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTTTTTT
7921 TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
7981 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAATCAGCT TAAGGGATT TGGTCAAGAG
8041 ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA AAATGAAGT TTAATCAAT
8101 CTAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
8161 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGACTCCCG TCGTGTAGAT
8221 AACTACGATA CGGGAGGCT TACCATTGG CCCCAGTCT GCAATGATAC CCGGAGACCC
8281 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG
8341 AAGTGGTCTT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG
8401 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTCCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT
8461 GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG
8521 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCGATCGT
8581 TGTACAGAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATT
8641 TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
8701 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA
8761 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGCG
8821 AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGACC
8881 CAACATGATC TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG
8941 GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
9001 CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
9061 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC
9121 ACCTGACGTC

8.4.7. GP Δ nef V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGTTAA ATGGCCCGC TGGCTGACCG CCAACGACC
361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAATGCCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGCCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGTATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTCGCC
961 GCCAGCATGG CCGCCAGGGC CAGCGTGTG AGCGGCGCG AGCTGGACAG GTGGGAGAA
1021 ATCAGGCTGA GGCCCGGCG CAAGAAGAAG TATAAGCTGA AGCACATCGT GTGGGCCAGC
1081 AGGGAGCTGG AGAGGTTTCG CGTGAACCCC GGCCTGCTGG AGACCAGCGA GGGCTGCAGG
1141 CAGATCCTGG GCCAGCTGCA GCCAGCCTG CAGACCGGCA GCGAGGAGCT GAGGAGCCTG

1201 TACAACACCG TGGCCACCTT GTACTGCGTG CACCAGAGGA TCGAGATCAA GGACACCAAG
1261 GAGGCCCTGG ACAAGATCGA GGAGGAGCAG AACAAGTCCA AGAAGAAGGC CCAGCAGGCC
1321 GCCGCCGACA CCGGCCACAG CAGCCAGGTG AGCCAGAACT ACCCCATCGT GCAGAACATC
1381 CAGGGCCAGA TGGTGCACCA GGGCCATGAG CCCAGGACCC TGAACGCCTG GGTGAAGGTG
1441 GTGGAGGAGA AGGCC'TTCAG CCCCAGGGTG ATCCCCATGT TCAGCGCCCT GAGCGAGGGA
1501 GCCACCCCCC AGGACCTGAA CACCATGCTG AACACCGTGG GCGGCCACCA GGCCGCCATG
1561 CAGATGCTGA AGGAGACCAT CAACGAGGAG GCCGCCGAGT GGGACAGGGT GCACCCCGTG
1621 CACGCCGGCC CCATCGCCCC CGGCCAGATG AGGGAGCCCC GCGGCAGCGA CATCGCCGGC
1681 ACCACCAGCA CCCTGCAGGA GCAGATCGGC TGGATGACCA ACAACCCCCC CATCCCCGTG
1741 GGCGAATCT ACAAGAGGTG GATCATCCTG GGCC'TGAACA AGATCGTGAG GATGTACAGC
1801 CCCACCAGCA TCCTGGATAT CAGGCAGGGC CCCAAAGAGC CCTTCAGGGA CTACGTGGAC
1861 AGGTTCTACA AGACCC'TGCG CGCCGAGCAG GCCAGCCAGG AGGTGAAGAA CTGGATGACC
1921 GAGACCCTGC TGGTGCAGAA CGCCAACCCC GACTGCAAGA CCATCCTGAA GGCCCTGGGA
1981 CCCGCCGCCA CCCTGGAGGA GATGATGACC GCCTGCCAGG GCGTGGGCGG CCCC'GGCCAC
2041 AAGGCCAGGG TGCTGGCCGA GGCCATGAGC CAGGTGACCA ACACCGCCAC CATCATGATG
2101 CAGAGGGGCA ACTTCAGGAA CCAGAGGAAG ATGGTGAAGT GCTTCAACTG CGGCAAGGAG
2161 GGCCACACCG CCAGGAAC'TG CCGCGCCCCC AGGAAGAAGG GCTGCTG'GAA GTGCGGCAAG
2221 GAGGGCCACC AGATGAAGGA CTGCACCGAG AGACAGGCTA ATTTTAGGGA AGATCTGGCC
2281 TTCCTACAAG GGAAGGCCAG GGAATTTTCT TCAGAGCAGA CCAGAGCCAA CAGCCCCACC
2341 ATTTCTTCAG AGCAGACCAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA GAGAGCTTCA GGTCTGGGGT
2401 AGAGACAACA ACTCCCCCTC AGAAGCAGGA GCCGATAGAC AAGGAAC'TGT ATCCTTTAAC
2461 TTCCTCAGA TCACTCTTTG GCAACGACCC CTCGTACAAA TAAAGATCGG TGGCCAGCTG
2521 AAGGAGCCCT TGCTGGCCAC CGCGCCCGAC GACACCGTGC TGGAGGAGAT GAGCC'TGCC
2581 GGCAGGTGGA AGCCCAAGAT GATCGGCGGC ATCGGCGGCT TCATCAAGGT GAGGCAGTAC
2641 GACCAGATCC TGATCGAGAT CTGCGGCCAC AAGGCCATCG GCACCGTGCT GGTGGGACCT
2701 ACACCTGTGA ACATCATCGG CAGGAACCTG CTGACCCAGA TCGGCTGCAC CCTGAACTTC
2761 CCCATCAGCC CCATCGAGAC CGTGCCCGTG AAGCTGAAGC CCGGCATGGA CGGCCCTAAG
2821 GTGAAGCAGT GGCCCTGAC CGAGGAGAAG ATCAAGGCCC TGGTGGAGAT CTGCACCGAG
2881 ATGGACAAGG AGGGCAAGAT CAGCAAGATC GGCCCCGAGA ACCCTACAA CACCCCGTG
2941 TTCGCCATCA AGAAGAAGGA CAGCAACAAG TGGAGGAAGC TGGTGGACTT CAGGGACTG
3001 AACAAGAGGA CCCAGGACTT CTGGGAGGTG CAGCTGGGCA TCCCCCACC CGCCGGCCTG
3061 AAGAAGAAGA AGAGCGTGAC CGTGCTGGAC GTGGGCGACG CCTACTTCAG CGTGCCCTG
3121 GACGAGGACT TCAGGAAGTA TACCCCATTC CTGTGGATGG GCTACGAGCT GCACCCGAC
3181 AAGTGGACCG TGCAGCCCAT CGTGCTGCC GAGAAGGACA GCTGGACCGT GAACGACATT
3241 CAGAAGCTGG TGGGCAAGCT GAACTGGGCC AGCCAGATCT ACCCTGGCAT CAAGGTGAGG
3301 CAGCTGTGCA AGTGTCTGAG GGGCACAAA GCTCTGACCG AGGTGATCCC CCTGACCGAG
3361 GAGGCCGAGC TGGAGCTGGC CGAGAACAGG GAGATCCTGA AGGAGCCCGT GCACGCGGTG
3421 TACTACGACC CCAGCAAGGA CCTGATCGCC GAGATCCAGA AGCAGGGCCA GGGCCAGTGG
3481 ACCTACCAGA TCTACCAGGA GCCCTTCAAG AACCTGAAGA CCGGCAAGTA CGCCCGCATG
3541 CGCGGCGCCC ACACCAACGA CGTGAAGCAG CTGACCGAGG CCGTGCAGAA GATCACCACC
3601 GAGAGCATCG TGATCTGGGG CAAGACTCCT AAGTTCAAGC TGCCCATCCA GAAGGAGACC
3661 TGGGAGACCT GGTGACC'GA GTACTGGCAG GCCACCTGGA TTCCCGAGTG GGAGTTCTGT
3721 AACACCCCTC CCCTGGTGAA GCTGTGGTAT CAGCTGGAGA AGGAGCCCAT CGTGCCCGCC
3781 GAGACCTTCT ACGTGGACGG CGCCCGCAAT AGGGAGACCA AGCTGGGCAA GGCCGGCTAC
3841 GTGACCAACA AGGGCCGCCA GAAGTGGTG CCCCTGACCA ACACCACCAA CCAGAAGACC
3901 GAGCTGCAGG CTATCTACCT GGCCCTGCAG GACTCAGGCC TGGAGGTGAA CATCGTGACC
3961 GACAGCCAGT ACGCCCTGGG CATCATCCAG GCCCAGCCCG ACAAGAGCGA GAGCGAGCTG
4021 GTGAACCAGA TCATCGAGCA GCTGATCAAG AAGGAGAAGG TGTACCTGGC CTGGGTGCC
4081 GCCACAAGG GCATCGGCGG CAACGAGCAG GTGGACAAGC TGGT'GAGCGC CGGCATCAGG
4141 AAGATCCTGT TCCTGGACGG CATCGACAAG GCCCAGGACG AGCACGAGAA GTACCAAGC
4201 AACTGGAGGG CTATGGCTAG CGACTTCAAC CTGCCTCCCG TGGTGGCTAA GGAGATCGTG
4261 GCCAGCGCCT TCACCATCCC CAGCATCAAC AACGAGACCC CCGGCATCCG CTACCAGTAC
4321 AACGTGCTGC CCCAGGGCTG GAAGGGCAGC CCCGCCATCT TCCAGAGCAG CATGACAAAG
4381 ATCCTGGAGC CCTTCAAGAA GCAGAACCCC GACATCGTGA TCTATCAGTA CATGGACGAC
4441 CTGTACGTGG GCAGCGACCT GGAGATCGGC CAGCACAGGA CCAAGATCGA GGAGCTGAGG
4501 CAGACCTGC TGAGGTGGGG CCTGACCACC CCCGACAAGA AGCACCAGAA GGAGCCCCA
4561 TTCCTGTGGA ATTTGACAAG ACCCAACAAC AATACAAGAA AAAGTATCCG TATCCAGAGA
4621 GGACCAGGGA GAGCATTTGT TACAATAGGA AAAATAGGAA ATATGAGACA AGCACATTGT
4681 AACTA'ACTCG AGTCTAGAGG GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCC'TTCT
4741 AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCTT GGAAGGTGCC
4801 ACTCCC'ACTG TCCTTTCCTA ATAAAATGAG GAAAT'TGCAT CGCAT'TGTCT GAGTAGGTGT
4861 CATTCTATTC TGGGGGGTGG GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT
4921 AGCAGGCATG CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCCCTGG
4981 GGCTCTAGGG GGTATCCCA CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT TAAGCGCGGC GGGTGTGGTG
5041 GTTACGCGCA GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG CGCCCGCTCC TTT'CGCTTTC
5101 TTCCTTTCCT TTCTCGCCAC GTTCGCCGGC TTTCCCGTTC AAGCTCTAAA TCGGGGGCTC
5161 CCTTTAGGGT TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC CCAAAAAACT TGATTAGGGT
5221 GATGGTTCAC GTAGTGGGCC ATCGCCCTGA TAGACGGTTT TTCGCCCTTT GACGTTGGAG
5281 TCCACGTTCT TTAATAGTGG ACTCTTGTTT CAAACTG'GAA CAACACTCAA CCCTATCTCG
5341 GTCTATTCTT TTGATTTATA AGGGATTTG CCGATTT'CGG CCTATTGGTT AAAAAATGAG

5401 CTGATTTAAC AAAAATTTAA CGCGAATTAA TTCTGTGGAA TGTGTGTCAG TTAGGGTGTG
 5461 GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG
 5521 CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC
 5581 TCAATTAGTC AGCAACCATA GTCCCGCCCC TAACCTCCGC CATCCCGCCC CTAACCTCCG
 5641 CCAGTTCGCG CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTAT GCAGAGGCCG
 5701 AGGCCGCTC TGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT GGAGGCCTAG
 5761 GCTTTTGCAA AAAGCTCCCG GGAGCTTGTA TATCCATTTT CGGATCTGAT CAAGAGACAG
 5821 GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCCTT
 5881 GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG
 5941 CCGTGTCCG GCTGTACGG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG
 6001 GTGCCCTGAA TGAAC TGACAG GACGAGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGCAGGCCG
 6061 TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG
 6121 GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA
 6181 TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTGACC
 6241 ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTGATC
 6301 AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGG TCGCGCCAGC CGAACTGTTT GCCAGGCTCA
 6361 AGGCGCGCAT GCCCGACGCG GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTCCGGA
 6421 ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG
 6481 CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATA TGTGGAAGAG CTTGGCGGCG
 6541 AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC TCCCGATTCC CAGCGCATCG
 6601 CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTCTTCT GAGCGGACT CTGGGGTTCG AAATGACCGA
 6661 CCAAGCGACG GCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC ACCGCCCTT TCTATGAAA
 6721 GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGATCT
 6781 CATGTGGAG TTCTTCGCC ACCCAACTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA
 6841 AAGCAATAGC ATCACAAT ATCACAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG
 6901 TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGTATA CCGTCGACCT CTAGCTAGAG
 6961 CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT TGTATCCGC TCACAATCC
 7021 ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA
 7081 ACTCACATTA ATTGCGTTGC GCTCAGTGC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTGCTGCCA
 7141 GCTGCATTA TGAATCGGCC AACCGCGGG GAGAGCGGT TTGCGTATG GCGCTCTTC
 7201 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTCTTCGG CTGCGGCGAG CCGTATCAGC
 7261 TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT
 7321 GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCTTGC TGGCGTTTTT
 7381 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG
 7441 AAACCCGACA GACTATAAAA GATACCAGGC GTTTCCTCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC
 7501 TCCTGTTCGG ACCCTGCCGC TTACCGGATA CCTGTCCGCT TTTCTCCCTT CCGGAAGCGT
 7561 GCGCTTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGTA TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGTCCAA
 7621 GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA GCCCGACCGC TCGCCTTAT CCGGTACTA
 7681 TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA
 7741 CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
 7801 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT
 7861 CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTTTTTT
 7921 TGTTTGCAAG GACGAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGTATCTT
 7981 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA AAACCTACGT TAAGGGATTT TGGTATGAG
 8041 ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA AAATGAAGTT TTAATCAAT
 8101 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
 8161 TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT
 8221 AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGC TCAATGATAC CGCGAGACCC
 8281 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG
 8341 AAGTGGTCTT CCAACTTAT CCGCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG
 8401 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTA CAGGCATCGT
 8461 GGTGTCACGC TCGTCTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG
 8521 AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
 8581 TGTCAGAAAG AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC
 8641 TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
 8701 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCAGCCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA TACGGGATAA
 8761 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCCGGGCG
 8821 AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
 8881 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG
 8941 GCAAAATGCC GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGTAATAC TCATACTCTT
 9001 CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
 9061 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC
 9121 ACCTGACGTC

8.4.8. PN PR- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
 61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
 121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC

181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
 241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
 301 TGGAGTCCG CGTTACATAA GTTACGGTAA ATGGCCCCG TGGCTGACCG CCCAACGACC
 361 CCCGCCCATF GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGCATTTCC
 421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
 481 ATCATATGCC AAGTACGCCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
 541 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
 601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CCGTTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA TAGCGGTTTG
 661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
 721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATTCCTGA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
 781 GTAGGCCTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
 841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
 901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATTTCCA
 961 CCATGTTTAC GGAAGATCTG GCCTTCCTAC AAGGGAAGGC CAGGGAATTT TCTTCAGAGC
 1021 AGACCAGAGC CAACAGCCCC ACCATTTCTT CAGAGCAGAC CAGAGCCAAAC AGCCCCACCA
 1081 GAAGAGAGCT TCAGGTCTGG GGTAGAGACA ACAACTCCCC CTCAGAAGCA GGAGCCGATA
 1141 GACAAGGAAC TGTATCCTTT AACTTCCCTC AGATCACTCT TTGGCAACGA CCCCTCGTCA
 1201 CAATAAAGAT CGGTGGCCAG CTGAAGGAGG CCCTGCTGGC CACCGGCGCC GACGACACCG
 1261 TGCTGGAGGA GATGAGCCTG CCCGGCAGGT GGAAGCCCAA GATGATCGGC GGCATCGGCG
 1321 GCTTCATCAA GGTGAGGACG TACGACCAGA TCCTGATCGA GATCTGCGGC CACAAGCCA
 1381 TCGGCACCGT GCTGGTGGGA CCTACACCTG TGAACATCAT CGGCAGGAAC CTGCTGACCC
 1441 AGATCGGCTG CACCTGAAC TTCCCATCA GCCCATCGA GACCGTGCCC GTGAAGCTGA
 1501 AGCCCGCAT GGACGGCCCT AAGGTGAAGC AGTGGCCCTT GACCGAGGAG AAGATCAAGG
 1561 CCCTGGTGA GATCTGCACC GAGATGGAGA AGGAGGGCAA GATCAGCAAG ATCGGCCCGC
 1621 AGAACCCCTA CAACACCCCC GTGTTTCGCCA TCAAGAAGAA GGACAGCACC AAGTGGAGGA
 1681 AGCTGGTGA CTTCAGGGAG CTGAACAAGA GGACCCAGGA CTTCTGGGAG GTGCAGCTGG
 1741 GCATCCCCCA CCCCGCCGCG CTGAAGAAGA AGAAGAGCGT GACCGTGCTG GACGTGGGCG
 1801 ACGCCTACTT CAGCGTGCCC CTGGACGAGG ACTTCAGGAA GTATACCCCT TTAAGACCAA
 1861 TGACTTACAA GGCAGCTGTA GATCTTAGCC ACTTTTTTAAA AGAAAAGGGG GGACTGGAAG
 1921 GGCTAATTCA TCCCCAAAGA AGACAAGTA TCCTTGATCT GTGGATCTAC CACACACAAG
 1981 GCTACTTCCC TGATCCAAGG ATGGGTGGCA AGTGGTCAAA AAGTAGTGTG GTTGGATGGC
 2041 CTGCTGTAAG GGAAAGAATG AGACGAGCTG AGCCAGCAGC AGATGGGGTG GGAGCAGCAT
 2101 CTCGAGACCT GGAAAAACAT GGAGCAATCA CAAGTAGCAA TACAGCAGCT ACCAATGCTG
 2161 CTTGTGCCTG GCTAGAAGCA CAAGAGGAGG AGGAGGTGGG TTTTCCAGTC ACACCTCAAG
 2221 TACCATTCCCT GTGGATGGGC TACGAGCTGC ACCCCGACAA GTGGACCGTG CAGCCCATCG
 2281 TGCTGCCGA GAAGGACAGC TGGACCGTGA ACGACATTA GAAGCTGGTG GGAAGTGAAG
 2341 ACTGGGCCAG CCAGATCTAC CCTGGCATCA AGGTGAGGCA GCTGTGCAAG CTGCTGAGGG
 2401 GCACAAAGGC TCTGACCGAG GTGATCCCCC TGACCGAGGA GGCCGAGCTG GAGCTGGCCG
 2461 AGAACAGGGA GATCCTGAAG GAGCCCCTGC ACGGCGTGTG CTACGACCCC AGCAAGGACC
 2521 TGATCGCCGA GATCCAGAAG CAGGGCCAGG GCCAGTGGAC CTACCAGATC TACCAGGAGC
 2581 CCTTCAAGAA CCTGAAGACC GGCAAGTACG CCCGCATGCG CCGCGCCAC ACCAACGACG
 2641 TGAAGCAGCT GACCGAGGCC GTGCAGAAGA TCACCACCGA GAGCATCGTG ATCTGGGGCA
 2701 AGATCCCTAA GTTCAAGCTG CCCATCAGA AGGAGACCTG GGAGACCTGG TGGACCGAGT
 2761 ACTGGCAGC CACCTGGATT CCCGAGTGGG AGTTCGTGAA CACCCCTCCC CTGGTGAAGC
 2821 TGTGGTATCA GCTGGAGAAG GAGCCCATCG TGGGCGCCGA GACCTTCTAC GTGGACGGCG
 2881 CCGCCAACAG GGAGACCAAG CTGGGCAAGG CCGGCTACGT GACCAACAAG GGCCGCCAGA
 2941 AGGTGGTGCC CCTGACCAAC ACCACCAACC AGAAGACCGA GCTGCAGGCT ATCTACCTGG
 3001 CCCTGCAGGA CTCAGGCCCTG GAGGTGAACA TCGTGACCGA CAGCCAGTAC GCCCTGGGCA
 3061 TCATCCAGGC CGAGCCCGAC AAGAGCGAGA GCGAGCTGGT GAACCAGATC ATCGAGCAGC
 3121 TGATCAAGAA GGAGAAGGTG TACCTGGCCT GGGTGCCCGC CCACAAGGGC ATCGGGCCGA
 3181 ACGAGCAGGT GGACAAGCTG GTGAGCGCCG GCATCAGGAA GATCCTGTTC CTGGACGGCA
 3241 TCGACAAGGC CCAGGACGAG CACGAGAAGT ACCACAGCAA CTGGAGGGCT ATGGCTAGCG
 3301 ACTTCAACCT GCCTCCCGTG GTGGCTAAGG AGATCGTGGC CAGCGCCTTC ACCATCCCCA
 3361 GCATCAACAA CGAGACCCCC GGCATCCGCT ACCAGTACAA CGTGCTGCCC CAGGGCTGGA
 3421 AGGGCAGCCC CGCCATCTTC CAGAGCAGCA TGACAAAGAT CCTGGAGCCC TTCAAGAAGC
 3481 AGAACCCCGA CATCGTGATC TATCAGTACA TGGACGACCT GTACGTGGGG AGCGACCTGG
 3541 AGATCGGCCA GCACAGGACC AAGATCGAGG AGCTGAGGCA GCACCTGCTG AAGTGGGGCC
 3601 TGACCACCCC CGACAAGAAG CACCAGAAGG AGCCCCATT CCTGTGGAAT TGTACAAGAC
 3661 CCAACAACAA TACAAGAAA AGTATCCGTA TCCAGAGAGG ACCAGGGAGA GCATTTGTTA
 3721 CAATAGGAAA AATAGGAAAT ATGAGACAAG CACATTTGTA CTAACCTCGAG TCTAGAGGGC
 3781 CCGTTTAAAC CGCTGATCA GCCTCGACTG TGCCCTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT
 3841 GCCCCCCCC CGTGCCCTTC TTGACCTTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC CTTTCTTAAT
 3901 AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTC TTTATTCTG GGGGTGGGG
 3961 TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG
 4021 TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG TATCCCCACG
 4081 CGCCCTGTAG CGGCGCATTA AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCGCTA
 4141 CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT CCCTTCCTTT CTCGCCACGT
 4201 TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG
 4261 CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGCCAT
 4321 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGAC

4381 TCTTGTTC AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT CTATTCTTTT GATTTATAAG
 4441 GGATTTTGCC GATTTTCGGC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA AAATTTAACG
 4501 CGAATTAAT CTGTGGAATG TGTGTCACT AGGGTGTGGA AAGTCCCAG GCTCCCAGC
 4561 AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG GAAAGTCCCC
 4621 AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT
 4681 CCCGCCCTA ACTCCGCCCA TCCCGCCCCT AACTCCGCCC AGTTCGCCCC ATTCTCCGCC
 4741 CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCTCTG CCTCTGAGCT
 4801 ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGGC TTTTGCAAAA AGCTCCCAGG
 4861 AGCTTGATA TCCATTTTCG GATCTGATCA AGAGACAGGA TGAGGATCGT TTCGCATGAT
 4921 TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCGGCTA
 4981 TGACCTGGCA CAACAGACAA TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCCGGC TGTCAGGCA
 5041 GGGGCGCCCG GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAGGA
 5101 CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CCTTGCGCAG CTGTGCTCGA
 5161 CGTTGTCACT GAAGCGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGGC GAAGTGCCGG GGCAGGATCT
 5221 CCTGTCACT CACCTTGCTC CTGCCGAGAA AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG
 5281 GCTGCATACG CTTGATCCGG CTACCTGCCC ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA
 5341 GCGAGCACGT ACTCGGATGG AAGCCGCTCT TGTCGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
 5401 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTTCG CAGGCTCAAG GCGCGCATGC CCGACGCGCA
 5461 GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCCTG CTTGCCGAAT ATCATGGTGG AAAATGGCCG
 5521 CTTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGGCT GGGTGTGGCG GACCGCTATC AGGACATAGC
 5581 GTTGGCTACC CGTGATATG CTGAAGAGCT TGGCGCGGAA TGGGCTGACC GCTTCTCTGT
 5641 GCTTTACGGT ATCGCCGCTC CCGATTCCGA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACCA
 5701 GTTCTTCTGA GCGGACTCT GGGTTTCGAA ATGACCGACC AAGCGACGCC CAACCTGCCA
 5761 TCACGAGATT TCGATTCCAC CGCCGCTTTC TATGAAAGGT TGGGCTTCGG AATCGTTTTT
 5821 CGGGACGCCG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTGCCCCAC
 5881 CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT
 5941 ACAAATAAAG CTTTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAAC CATCAATGTA
 6001 TCTTATCATG TCTGTATACC GTCGACCTCT AGCTAGAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG
 6061 CTGTTTCTTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATCCAC ACAACATACG AGCCGGAAAGC
 6121 ATAAAGTGTA AAGCCTGGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCGTTGGCG
 6181 TCACTGCCCG CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA
 6241 CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCTGCT CACTGACTCG
 6301 CTGCGCTCGG TCGTTCCGGT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAAATACGG
 6361 TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
 6421 GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
 6481 GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
 6541 TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGTTT
 6601 ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGTTTTCTCA TAGCTCACGC
 6661 TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
 6721 CCCGTTACAG CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA
 6781 AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGCG ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
 6841 GTAGGCGGTG CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAC TAGAAGAACA
 6901 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGTCTT
 6961 TGATCCGGCA ACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
 7021 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG
 7081 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC
 7141 TAGATCCTTT TAAATTAATA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 7201 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT
 7261 CGTTTATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 7321 CCATCTGGCC CCAGTGTGTC AATGATACCG CGAGACCAC GCTCACCGGC GCTCAGTTTA
 7381 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGTC AACTTTATCC
 7441 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 7501 AGTTTGCACA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT
 7561 ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
 7621 TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTCCGTTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
 7681 GTGTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCACTG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA
 7741 AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATCGCG
 7801 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
 7861 TTAAGAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 7921 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT
 7981 ACTTTCACCA GCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA
 8041 ATAAGGGCGA CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
 8101 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA GAAAAATAAA
 8161 CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCGCA AAAGTGCCAC CTGACGTC

8.4.10. PN PR+/- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG
 61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG

121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC
 181 TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
 241 GATTATTGAC TAGTTATTAA CTGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATACA
 301 TGGAGTTCCG GGTTCACATA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
 361 CCCGCCCAT T GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
 421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
 481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
 541 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGA GTACATCTAC GTATTAGTCA
 601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CCGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGTA TAGCGGTTTG
 661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTTG TTTTGGCACC
 721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAAATGGGCG
 781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
 841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
 901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATCCCA
 961 CCATGTTTAG GGAAGATCTG GCCTTCCTAC AAGGGAAGGC CAGGGAATTT TCTTCAGAGC
 1021 AGACCAGAGC CAACAGCCCC ACCATTTCTT CAGAGCAGAC CAGAGCCAAAC AGCCCCACCA
 1081 GAAGAGAGCT TCAGGTCTGG GGTAGAGACA ACAACTCCCC CTCAGAAGCA GGAGCCGATA
 1141 GACAAGGAAC TGTATCCTTT AACTTCCCTC AGATCACTCT TTGGCAACGA CCCCTCGTCA
 1201 CAATAAAGAT CGGTGGCCAG CTGAAGGAGG CCCTGCTGGA CAGCGGCGCC GACGACACCG
 1261 TGCTGGAGGA GATGAGCCTG CCCGGCAGGT GGAAGCCAA GATGATCGGC GGCATCGGCG
 1321 GCTTCATCAA GGTGAGGAG TACGACCAGA TCCTGATCGA GATCTGCGGC CACAAGGCCA
 1381 TCGGCACCGT GCTGGTGGGA CCTACACCTG TGAACATCAT CGGCAGGAACT CTGCTGACCC
 1441 AGATCGGCTG CACCTGAACT TTCCCATCA GCCCCATCGA GACCGTGCCC GTGAAGCTGA
 1501 AGCCCGGAT GGACGGCCCT AAGGTGAAGC AGTGGCCCTT GACCGAGGAG AAGATCAAGG
 1561 CCCTGGTGGG GATCTGCACC GAGATGGAGA AGGAGGGCAA GATCAGCAAG ATCGGCCCCG
 1621 AGAACCCCTA CAACACCCCT GTGTTCCGCA TCAAGAAGAA GGACAGCACC AAGTGGAGGA
 1681 AGCTGGTGGG CTTGAGGAG CTGAACAAGA GGACCCAGGA CTTCTGGGAG GTGCAGCTGG
 1741 GCATCCCCCA CCCCGCCGGC CTGAAGAAGA AGAAGAGCGT GACCGTGCTG GACGTGGGCG
 1801 ACGCTTACTT CAGCGTGCCC CTGGACGAGG ACTTCAGGAA GTATACCCCT TTAAGACCAA
 1861 TGACTTACAA GGCAGCTGTA GATCTTAGCC ACTTTTTTAA AGAAAAGGGG GGACTGGAAG
 1921 GGCTAATTCA CTCCCAAAGA AGACAAGATA TCCTTGATCT GTGGATCTAC CACACACAAG
 1981 GCTACTTCCC TGATCCAAGG ATGGGTGGCA AGTGGTCAA AAGTAGTGTG GTTGGATGGC
 2041 CTGCTGTAAG GGAAGAATG AGACGAGCTG AGCCAGCAGC AGATGGGGTG GGAGCAGCAT
 2101 CTCGAGACCT GGAAAAACAT GGAGCAATCA CAAGTAGCAA TACAGCAGCT ACCAATGCTG
 2161 CTTGTGCCTG GCTAGAAGCA CAAGAGGAGG AGGAGGTGGG TTTTCCAGTC ACACCTCAAG
 2221 TACCATTCTT GTGGATGGGC TACGAGCTGC ACCCCGACAA GTGGACCGTG CAGCCCATCG
 2281 TGCTGCCCGA GAAGGACAGC TGGACCTTCA ACGACATTCA GAAGCTGGTG GGCAAGCTGA
 2341 ACTGGGCCAG CCAGATCTAC CCTGGCATCA AGGTGAGGCA GCTGTGCAAG CTGCTGAGGG
 2401 GCACAAAGGC TCTGACCGAG GTGATCCCC TGACCGAGGA GGCCGAGCTG GAGCTGGCCG
 2461 AGAACAGGGA GATCCTGAAG GAGCCCGTGC ACGGCGTGTG CTACGACCCC AGCAAGGACC
 2521 TGATCGCCGA GATCCAGAAG CAGGGCCAGG GCCAGTGGAC CTACCAGATC TACCAGGAGC
 2581 CCTTCAAGAA CCTGAAGACC GGCAAGTACG CCCGCATGCG CGGCGCCAC ACCAACGACG
 2641 TGAAGCAGCT GACCGAGGCC GTGCAGAAGA TCACCACCGA GAGCATCTG ATCTGGGGCA
 2701 AGACTCCTAA GTTCAAGCTG CCCATCCAGA AGGAGACCTG GGAGACCTGG TGGACAGT
 2761 ACTGGCAGGC CACCTGGATT CCCGAGTGGG AGTTCGTGAA CACCCCTCCC CTGGTGAAGC
 2821 TGTGGTATCA GCTGGAGAAG GAGCCCATCG TGGGCGCCGA GACCTTCTAC GTGGACGGCG
 2881 CCGCCAACAG GGAGACCAAG CTGGGCAAGG CCGGCTACGT GACCAACAAG GGCCGCCAGA
 2941 AGGTGGTGCC CCTGACCAAC ACCACCAACC AGAAGACCGA GCTGCAGGCT ATCTACCTGG
 3001 CCTGCGAGGA CTCAGGCCTG GAGGTGAACA TCGTGACCGA CAGCCAGTAC GCCCTGGGCA
 3061 TCATCCAGGC CACGCCGAC AAGAGCGAGA GCGAGCTGGT GAACCAGATC ATCGAGCAGC
 3121 TGATCAAGAA GGAGAAGGTG TACCTGGCCT GGGTGCCCGC CCACAAGGGC ATCGGCCGCA
 3181 ACGAGCAGGT GGACAAGCTG GTGAGCGCCG GCATCAGGAA GATCCTGTTC CTGGACGGCA
 3241 TCGACAAGGC CCAGGACGAG CACGAGAAGT ACCACAGCAA CTGGAGGGCT ATGGCTAGCG
 3301 ACTTCAACCT GCCTCCCGTG GTGGCTAAGG AGATCGTGGC CAGCGCCTTC ACCATCCCCA
 3361 GCATCAACAA CGAGACCCCT GGCATCCGCT ACCAGTACAA CGTGTGCCC CAGGGCTGGA
 3421 AGGGCAGCCC CGCCATCTC CAGAGCAGCA TGACAAAGAT CCTGGAGCCC TTCAAGAAGC
 3481 AGAACCCCGA CATCGTGATC TATCAGTACA TGGACGACCT GTACGTGGGC AGCGACCTGG
 3541 AGATCGGCCA GCACAGGACC AAGATCGAGG AGCTGAGGCA GCACCTGCTG AGGTGGGGCC
 3601 TGACCACCCC CGACAAGAAG CACCAGAAGG AGCCCCATT CCTGTGGAAT TGTACAAGAC
 3661 CCAACAACAA TACAAGAAA AGTATCCGTA TCCAGAGAGG ACCAGGGAGA GCATTTGTTA
 3721 CAATAGGAAA AATAGGAAAT ATGAGACAAG CACATTTGTA CTAACCTGAG TCTAGAGGGC
 3781 CCGTTTAAAC CGCTGTATCA GCCTCGACTG TGCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT
 3841 GCCCTCCCC CGTGCCCTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGCTC CTTTCTTAAT
 3901 AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG GGGGGTGGGG
 3961 TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT GGGGATGCGG
 4021 TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG TATCCCCACG
 4081 CGCCCTGTAG CGGCGCATTA AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCCGTA
 4141 CACTTGCCAG CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTCTT CCCTTCCTTT CTCGCCACGT
 4201 TCGCCGGCTT TCCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG
 4261 CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCACGT AGTGGGCCAT

4321 CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC
 4381 TCTTGTTCCTA AACTGGAACA AACTCAACC CTATCTCGGT CTATCTTTTT GATTTATAAG
 4441 GGATTTTGCC GATTTTCGGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACAA AAATTTAACG
 4501 CGAATTAATF CTGTGGAATG TGTGTGAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCAG GCTCCCAGC
 4561 AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCAGGTGTG GAAAGTCCCC
 4621 AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT
 4681 CCCGCCCTA ACTCCGCCCA TCCCGCCCCT AACTCCGCC AGTTCGCCCC ATTCTCCGCC
 4741 CCATGGCTGA CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGGCCGAG GCCGCCCTCTG CCTCTGAGCT
 4801 ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGGC TTTTGCAAAA AGCTCCCCGG
 4861 AGTTGTGATA TCCATTTTCG GATCTGATCA AGAGACAGGA TGAGGATCGT TTCGCATGAT
 4921 TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCCGCTA
 4981 TGACTGGGCA CAACAGACAA TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCCGGC TGTCAGCGCA
 5041 GGGGCGCCCG GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAGGA
 5101 CGAGGCAGCG CGGCTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CCTTGCGCAG CTGTGCTCGA
 5161 CGTTGTCACT GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTTGGC GAAGTGCCGG GGCAGGATCT
 5221 CCTGTCACTC CACTTTGCTC CTGCCGAGAA AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATCGCGCG
 5281 GCTGCATACG CTTGATCCGG CTACCTGCCC ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA
 5341 GCGAGCACGT ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTCGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
 5401 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTTCG CAGGCTCAAG GCGCGCATGC CCGACGGCGA
 5461 GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCTG CTTGCCGAAT ATCATGGTGG AAAATGGCCG
 5521 CTTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGCT GGGTGTGGCG GACCCGTATC AGGACATAGC
 5581 GTTGGCTACC CGTGATATTG CTGAAGAGCT TGGCGCGGAA TGGGCTGACC GCTTCTCTGT
 5641 GCTTTACGGT ATCGCCGCTC CCGATTCGCA CCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA
 5701 GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTCGAA ATGACCGACC AAGCGACGCC CAACCTGCCA
 5761 TCACGAGATT TCGATTCACG CGCCGCCTTC TATGAAAGGT TGGGCTTCGG AATCGTTTTT
 5821 CGGGACGCCG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTCCGCCAC
 5881 CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT
 5941 ACAAATAAAG CATTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA
 6001 TCTTATCATG TCTGTATACC GTCGACCCTC AGCTAGAGCT TGGCGTAATC ATGGCTATAG
 6061 CTGTTTCTCTG TGTGAAATG TTATCCGCTC ACAATTCAC ACAACATAC AGCCGGAAGC
 6121 ATAAAGTGTG AAGCCTGGGG TGCCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TCGGTTGCGC
 6181 TCACTGCCCG CTTTCCAGTC GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA
 6241 CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCTGCT CACTGACTCG
 6301 CTGCGCTCGG TCGTTCCGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC GGTAATACGG
 6361 TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAATATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG
 6421 GCCAGGAACC GTA AAAAGGC CGCGTTGCTG CCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCCTGAC
 6481 GAGCATCACA AAAATCGACG CTCAAAGTCA AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA
 6541 TACCAGGCGT TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
 6601 ACCGGATACC TGTCCGCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGTTTTCTCA TAGCTCACGC
 6661 TGTAGGTATC TCAGTTCGCT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC
 6721 CCCGTTACAG CCGACCGCTG CGCCTTATCC GGTAACATATC GTCTTGTAGT CAACCCGGTA
 6781 AGACACGACT TATCGCCACT GGCAGCAGC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT
 6841 GTAGCGGTG TACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCTAAC ACGGCTACAC TAGAAGAACA
 6901 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT CTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT
 6961 TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GGTTTTTTTG TTTGCAAGCA GCAGATTACG
 7021 CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG
 7081 TGGAACGAAA ACTCACGTTA AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC
 7141 TAGATCCTTT TAAATTA AAA ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
 7201 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATTT
 7261 CGTTTATCCA TAGTTGCTG ACTCCCCGTC GGCAGCATG GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGCTTA
 7321 CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA
 7381 TCAGCAATAA ACCAGCCAGC CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTCTG AACTTTATCC
 7441 GCCTCCATCC AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
 7501 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTACGCTC GTCGTTTGGT
 7561 ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGCCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG
 7621 TGCAAAAAAG CGTTAGCTC CTTCCGTTCT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA
 7681 GTTTATCAC TCATGGTTAT GGCAGCATG CATAATTCTC TTACTGTCAT GCCATCCGTA
 7741 AGATGCTTTT CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
 7801 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT
 7861 TTA AAAAGTGC TCATCATGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG
 7921 CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT
 7981 ACTTTACCA CCGTTTCTGG GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAGGGA
 8041 ATAAGGGCGA CACGAAAATG TTGAATCTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
 8101 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTTG AATGTATTTA GAAAAATAA
 8161 CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCCCGA AAAGTGCCAC CTGACGTC

8.4.11. Pol Δnef PR- V3 in pcDNA

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC TGCTCTGATG

61 CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG
121 CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTCG
181 TTAGCGTTAG GCGTTTTGCG CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT
241 GATTATTGAC TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG CCCAACGACC
361 CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT AACGCCAATA GGGACTTTCC
421 ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT AAAGTGCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT
481 ATCATATGCC AAGTACGCC CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT
541 ATGCCCAGTA CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CCGTTTTGCG AGTACATCAA TGGCGTGA TAGCGGTTTG
661 ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTG TTTTGGCACC
721 AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCGTA ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG
781 GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA
841 CTGCTTACTG GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG ATCCACTAGT CCAGTGTGGT GGAATCCCA
961 CCATGTTTAG GGAAGATCTG GCCTTCCTAC AAGGGAAGGC CAGGGAATTT TCTTCAGAGC
1021 AGACCAGAGC CAACAGCCCC ACCATTTCTT CAGAGCAGAC CAGAGCCAAC AGCCCCACCA
1081 GAAGAGAGCT TCAGGTCTGG GGTAGAGACA ACAACTCCCC CTCAGAAGCA GGAGCCGATA
1141 GACAAGGAAC TGTATCCTTT AACTTCCCTC AGATCACTCT TTGGCAACGA CCCCTCGTCA
1201 CAATAAAGAT CGGTGGCCAG CTGAAGGAGG CCCTGCTGGC CACCGGCGCC GACGACCCG
1261 TGCTGGAGGA GATGAGCCTG CCCGGCAGGT GGAAGCCCAA GATGATCGGC GGCATCGCGC
1321 GCTTCATCAA GGTGAGGCAG TACGACCAGA TCCTGATCGA GATCTGCGGC CACAAGGCCA
1381 TCGGCACCGT GCTGGTGGGA CCTACACTG TGAACATCAT CGGCAGGAAC CTGCTGACCC
1441 AGATCGGCTG CACCCCTGAAC TTCCCCATCA GCCCCATCGA GACCGTGCCC GTGAAGCTGA
1501 AGCCCGGCAT GGACGGCCCT AAGGTGAAGC AGTGGCCCT GACCGAGGAG AAGATCAAGG
1561 CCCTGGTGGG GATCTGCACC GAGATGGAGA AGGAGGGCAA GATCAGCAAG ATCGGCCCCG
1621 AGAACCCCTA CAACACCCCC GTGTTCCGCA TCAAGAAGAA GGACAGCACC AAGTGGAGGA
1681 AGCTGGTGGG CTTCAGGGAG CTGAACAAGA GGACCCAGGA CTTCTGGGAG GTGCAGCTGG
1741 GCATCCCCCA CCCCGCCGCG CTGAAGAAGA AGAAGAGCGT GACCGTGCTG GACCTGGGCG
1801 ACGCCTACTT CAGCGTGCCC CTGGCAGAGG ACTTCAGGAA GTATACCCCA TTCTGTGGA
1861 TGGGCTACGA GCTGCACCCC GACAAGTGA CCGTGCAGCC CATCGTGCTG CCCGAGAAGG
1921 ACAGCTGGAC CGTGAACGAC ATTCAGAAGC TGGTGGGCAA GCTGAACTGG GCCAGCCAGA
1981 TCTACCCTGG CATCAAGGTG AGGCAGCTGT GCAAGCTGCT GAGGGGCACA AAGGCTCTGA
2041 CCGAGGTGAT CCCCCTGACC GAGGAGGCGG AGCTGGAGCT GGCCGAGAAC AGGGAGATCC
2101 TGAAGGAGCC CGTGCACGGC GTGTACTACG ACCCCAGCAA GGACCTGATC GCCGAGATCC
2161 AGAAGCAGGG CCAGGGCCAG TGGACCTACC AGATCTACCA GGAGCCCTTC AAGAACCTGA
2221 AGACCGGCAA GTACGCCCGC ATGCGCGCGG CCCACACCAA CGAGCTGAAG CAGCTGACCG
2281 AGGCCGTGCA GAAGATCACC ACCGAGAGCA TCGTGATCTG GGGCAAGACT CCTAAGTTCA
2341 AGCTGCCCAT CCAGAAGGAG ACCTGGGAGA CCTGGTGGAC CGAGTACTGG CAGGCCACCT
2401 GGATTCCCGA GTGGGAGTTC GTGAACACCC CTCCCCTGGT GAAGCTGTGG TATCAGCTGG
2461 AGAAGGAGCC CATCGTGGGC GCCGAGACCT TCTACGTGGA CGGCGCCGCC AACAGGAGA
2521 CCAAGCTGGG CAAGGCCGGC TACGTGACCA ACAAGGGCCG CCAGAAGGTG GTGCCCTGA
2581 CCAACCACCA CAACCAGAAG ACCGAGCTGC AGGCTATCTA CCTGGCCCTG CAGGACTCAG
2641 GCCTGGAGGT GAACATCGTG ACCGACGCC AGTACGCCCT GGGCATCATC CAGGCCACG
2701 CCGACAAGAG CGAGAGCGAG CTGGTGAACC AGATCATCGA GCAGCTGATC AAGAAGGAGA
2761 AGGTGTACCT GGCCTGGGTG CCCGCCACA AGGCATCGG CGGCAACGAG CAGGTGGACA
2821 AGCTGGTGGG CGCCGGCATC AGGAAGATCC TGTTCCCTGGA CGGCATCGAC AAGGCCCAGG
2881 ACGAGCACGA GAAGTACCAC AGCAACTGGA GGGCTATGGC TAGCGACTTC AACCTGCCTC
2941 CCGTGGTGGC TAAGGAGATC GTGGCCAGCG CCTTCACCAT CCCCAGCATC AACACCGGA
3001 CCCCCTGGAT CCGTACCAG TACAACGTGC TGCCCCAGGG CTGGAAGGGC AGCCCCGACA
3061 TCTTCCAGAG CAGCATGACA AAGATCCTGG AGCCCTTCAA GAAGCAGAAC CCCGACATCG
3121 TGATCTATCA GTACATGGAC GACCTGTACG TGGGCAGCGA CCTGGAGATC GGCCAGCACA
3181 GGACCAAGAT CGAGGAGCTG AGGCAGCACC TGCTGAGGTG GGGCCTGACC ACCCCGACA
3241 AGAAGCACA GAAGGAGCCC CCATTCCTGT GGAATTGTAC AAGACCCAAC AACAAATCAA
3301 GAAAAAGTAT CCGTATCCAG AGAGGACCAG GGAGAGCATT TGTTACAATA GAAAAATAG
3361 GAAATATGAG ACAAGCACAT TGTAACATA TCGAGTCTAG AGGGCCCGTT TAAACCCGCT
3421 GATCAGCCTC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCTGC
3481 CTTCTTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG
3541 CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATCTA TTCTGGGGG TGGGGTGGG CAGGACAGCA
3601 AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCTT
3661 CTGAGGCGGA AAGAACCAGC TGGGGTCTA GGGGGTATCC CCACGCGCCC TGTAGCGGCG
3721 CATTAAAGCG GCGGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCACGCCC
3781 TAGCCGCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTTCTCGC CACGTTCCGC GCGTTTCCCC
3841 GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTTAG GGTTCGGATT TAGTGCTTTA CGGCACCTCG
3901 ACCCCAAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGTT CACGTAGTGG GCCATCGCCC TGATAGACGG
3961 TTTTTCGCCC TTTGACGTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTG TTCCAACTG
4021 GAACAACACT CAACCCTATC TCGGTCTATT CTTTTGATTT ATAAGGGATT TTGCCGATTT
4081 CGGCCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAAT TAACGCGAAT TAATCTGTG
4141 GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA GAAGTATGCA
4201 AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG GTGTGAAAG TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG

4261 CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC
 4321 GCCCATCCCG CCCCTAACTC CGCCCAGTTC CGCCCATTCT CCGCCCCATG GCTGACTAAT
 4381 TTTTTTTTAT TATGCAGAGG CCGAGGCCCG CTCTGCCTCT GAGCTATTCC AGAAGTAGTG
 4441 AGGAGGCCTT TTTGGAGGCC TAGGCCTTTG CAAAAAGCTC CCGGGAGCTT GTATATCCAT
 4501 TTTCCGGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG ATCGTTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT
 4561 GCACGCAGGT TCTCCGGCCG CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAAACA
 4621 GACAATCGGC TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT
 4681 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG CAGCGCGCT
 4741 ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG CTCGACGTTG TCACCTGAAGC
 4801 GGGAAAGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT GCCGGGGCAG GATCTCTGTG CATCTCACCT
 4861 TGACTCCTGCC GAGAAAAGTAT CCATCATGGC TGATGCAATG CCGCGGCTGC ATACGCTTGA
 4921 TCCGGCTACC TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG
 4981 GATGGAAGCC GGTCTTGTCTG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG GGCTCGCGCC
 5041 AGCCGAAC TGTCGCCAGG TCAAGGCGCG CATGCCCGAC GGCGAGGATC TCGTCGTGAC
 5101 CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTTCAT
 5161 CGACTGTGGC CGGCTGGGTG TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA
 5221 TATTGCTGAA GAGCTTGGCG GCGAATGGCG TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC
 5281 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCTT GACGAGTTCT TCTGAGCGGG
 5341 ACTCTGGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAACC TGCCATCACG AGATTTTCGAT
 5401 TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG
 5461 ATGATCCTCC AGCGCGGGGA TCTCATGCTG GAGTCTTCG CCCACCCCAA CTTGTTTATT
 5521 GCAGCTTATA ATGGTTACAA ATAAAGCAAT AGCATCACAA ATTTACAAA TAAAGCATTT
 5581 TTTTCACTGC ATTTCTAGTTG TGGTTTGTCC AAACCTCATCA ATGTATCTTA TCATGTCTGT
 5641 ATACCGTCGA CCTCTAGCTA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCTGTGTGTA
 5701 AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAGCC
 5761 TGGGGTGCCT AATGAGTGAG CTAACCTACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC
 5821 CAGTCGGGAA ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAACTG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC
 5881 GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT
 5941 CGGCTGCGCG GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTA TACGGTTATC CACAGAATCA
 6001 GGGGTAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG AAGCCTTAAA
 6061 AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT
 6121 CGACGCTCAA GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTCCTCC
 6181 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC
 6241 GCCTTCTCTC CTTCCGGGAA CGTGGCGCTT TCTCATAGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT
 6301 TCGGTGTAGG TCGTTCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC
 6361 CGTTCGCGCT TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG
 6421 CCCTGCGCAG CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGTACAC
 6481 GAGTCTTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GAACAGTATT TGGTATCTGC
 6541 GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAACAA
 6601 ACCACCGCTG GTAGCGGTTT TTTTGTTCG AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAGGA
 6661 TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGA CAAAACTCA
 6721 CGTTAAGGGA TTTTGGTTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT
 6781 TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC TGACAGTTAC
 6841 CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTT ATCCATAGTT
 6901 GCCTGACTCC CCGTCTGTGA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT
 6961 GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAACCAG
 7021 CCAGCCGGA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCTC CATCCAGTCT
 7081 ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT GCGCAACGTT
 7141 GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCTG TTGGTATGGC TTCATTACAGC
 7201 TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCA TGTGTGCAA AAAAGCGGTT
 7261 AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGT ATCACTCATG
 7321 GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG
 7381 ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC GAGTTGCTCT
 7441 TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA AGTGCTCATC
 7501 ATTGAAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT
 7561 TCGATGTAA CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT
 7621 TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAA AGGGAATAAG GCGCACCGG
 7681 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA TCAGGGTTAT
 7741 TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT AGGGGTTCCG
 GCACATTTCCC GAAAAGT GCCACCTGAC GTC

8.5. Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption oder Ampere
Abb.	Abbildung

Ad	Adenovirus
AIDS	erworbenes Immundefizienz Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
Bp.	Basenpaar
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CA	Kapsid-Protein (<i>capsid</i>)
ca.	cirka
cm	Zentimeter
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
d	Desoxy
Da	Dalton
<i>dam</i>	Methylierungseffekt in <i>E. coli</i> (<i>dam</i> -Methylase)
DMEM	<i>Dulbecco's Mod Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (TitrplexIII)
ELISA	enzym-linked immunosorbent assay
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ERG	Eppendorf Reaktionsgefäß
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	é cétéra
FKS	fötale Kälberserum
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GPN	GagPolNef
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser aus einer Millipore-Anlage
HIV-1/-2	humanes Immunschwäche Virus Typ 1 / 2
IN	Integrase
k	Kilo
kDa	Kilodalton

l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LPS	Lipopolysaccharide
Lsg.	Lösung
m	milli
M	Molar (mol pro Liter)
mA	Milliampere
Min.	Minute
ml	Milliliter
n	Nano (10^{-9})
NaAc	Natriumacetat
nef	<i>negative regulator</i>
OD	optische Dichte
ori	<i>origin of replication</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pen	Penicillin
Pfu	DNA-abhängige DNA-Polymerase
pH	Konzentration der H^+ -Ionen in einer Lösung
PN	PolNef
Pol	Polymerase
poly(A)	polyadenyliertes 3'-Ende von RNA-Transkripten
PR	HI-virale Protease
RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek.	Sekunde
SIV	Affen-Immundefizienz-Virus (<i>simian immunodeficiency virus</i>)
ss	einzelsträngig
Std.	Stunde
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
TTBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (<i>Tween-Tris buffered saline</i>)

U	Enzymeinheit (<i>Units</i>)
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
V3	immundominante und hypervariable Schleifenstruktur des gp120 Env (<i>V3-loop</i>)
zB	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10^6)

Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
C	Cystein	F	Phenylalanin
Q	Glutamin	P	Prolin
E	Glutaminsäure	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
D	Asparaginsäure	V	Valin

DNA-Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin