

Goethe-Universität  
Frankfurt am Main



**Untersuchung der besonderen  
Transduktionseigenschaften eines  $SIV_{smm}$ PBj Vektors  
und  
Etablierung eines davon abgeleiteten  
Dreiplasmid-Vektorsystems**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Nina Wolfrum  
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2005  
(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:.....Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter:.....Prof. Dr. Bernd Ludwig

Gutachter:.....Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation: 27. 03. 2006

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Gentherapie.....	1
1.1.1 Anwendungen und Methoden der Gentherapie.....	1
1.1.2 Mononukleäre Phagozyten als wichtige Zielzellen der Gentherapie.....	4
1.2. Lentiviren.....	6
1.2.1 Grundlagen.....	6
1.2.2 Die akzessorische Proteine.....	8
1.2.3 SIV <sub>smm</sub> PBj.....	10
1.3 Aufbau eines lentiviralen Vektors.....	11
1.4 Transduktionseigenschaften von SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteten Vektoren.....	13
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	15
2. Materialien und Methoden.....	16
2.1 Chemikalien.....	16
2.3 Antibiotika.....	17
2.2 Enzyme.....	17
2.4 Plasmide.....	18
2.5 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.5.1 Verwendete Puffer.....	23
2.5.2 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen.....	23
2.5.3 Isolierung von RNA aus viralen Partikeln bzw. Vektorpartikeln.....	24
2.5.4 Restriktion von Plasmid DNA.....	24
2.5.5 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten.....	24
2.5.6 Dephosphorylierung von DNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP).....	25
2.5.7 Erzeugung von „glatten Enden“ durch das Klenow Fragment.....	25
2.5.8 DNA-Reinigung.....	25
2.5.9 Konzentrationsbestimmung der von Nukleinsäuren.....	26
2.5.10 Ligation.....	26
2.5.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	27
2.5.12 Fusions-PCR.....	29
2.5.13 Reverse Transkriptions-PCR.....	29
2.6 Mikrobiologische Methoden.....	34
2.6.1 Verwendete Puffer und Medien.....	34
2.6.2 Verwendete Bakterienstämme.....	35
2.6.3 Herstellung kompetenter Bakterien durch chemische Modifikation.....	36

2.6.4 Transformation kompetenter Bakterien.....	36
2.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	36
2.7 Zellbiologische Methoden.....	37
2.7.1 Verwendete Puffer und Medien.....	37
2.7.2 Zelllinien.....	38
2.7.3 Kultivierung von adhärennten Zelllinien.....	38
2.7.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen.....	39
2.7.5 Zellzyklus-Arretierung von adhärennten Zellen.....	39
2.7.5.1 Arretierung in G <sub>1</sub> -Phase des Zellzyklus.....	39
2.7.5.2 Arretierung in der G <sub>0</sub> -Phase des Zellzyklus.....	40
2.7.6 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC).....	40
2.7.7 Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten.....	41
2.7.7.1 Isolierung durch magnetische Zell-Separierung mit MACS.....	41
2.7.7.2 Isolierung durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads®.....	41
2.7.8 Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen.....	42
2.7.9 Differenzierung von humanen Monozyten zu Dendritischen Zellen.....	42
2.7.10 Isolierung humaner T-Zellen.....	42
2.7.11 Stimulierung humaner T-Zellen.....	43
2.7.11.1 Stimulierung mit Phythämaglutinin (PHA) und IL-2.....	43
2.7.11.2 Stimulierung mit anti CD3- und anti CD28-Antikörpern.....	43
2.7.12 Transfektion durch Lipofection.....	43
2.7.13 Präparation von Vektorpartikeln und Anreicherung durch Ultrazentrifugation...	44
2.7.14 Beschichtung von Zellkulturplatten mit RetroNectin.....	44
2.7.15 Multiplicity of Infection (moi).....	45
2.7.16 Titration von retroviralen Vektoren.....	45
2.7.17 Transduktion von Suspensionszellen.....	45
2.7.18 Transduktion von adhärennten Zelllinien.....	46
2.7.19 Transduktion von primären humanen Monozyten.....	46
2.8 Proteinbiochemische Methoden.....	46
2.8.1 Verwendete Puffer.....	46
2.8.2 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper.....	48
2.8.3 Zellyse.....	49
2.8.4 Lysieren von Vektorpartikeln.....	49
2.8.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	49
2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	50
2.8.7 Western Blot-Analyse.....	50

2.9 Analytische Methoden.....	51
2.9.1 Verwendete Puffer.....	51
2.9.2 Verwendete Antikörper.....	53
2.9.3 Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated Cell-Sorting; FACS).....	53
2.9.4 Nachweis von Oberflächenproteinen.....	53
2.9.5 Nachweis von <i>egfp</i> -exprimierenden Zellen.....	54
2.9.6 DNA-Färbung zur Analyse des Zellzyklus.....	54
2.9.7 DNA/RNA-Färbung zur Analyse des Zellzyklus.....	55
2.9.8 Immun-Peroxidase-Färbung (Immun-Peroxidase-Assay, IPA).....	55
2.9.9 $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal-Färbung).....	56
2.9.10 May-Grünwald-Giemsa bzw. Pappenheim Färbung.....	56
3. Ergebnisse.....	57
3.1 Transduktion von humanen CD4 <sup>+</sup> T-Zellen.....	57
3.2 Charakterisierung von humanen Monozyten und Makrophagen.....	59
3.2.1 Reinheit der Monozyten.....	59
3.2.2 Morphologische Charakterisierung.....	60
3.2.3 Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen.....	61
3.2.4 Differenzierung von transduzierten Monozyten zu Dendritischen Zellen.....	63
3.3 Der Einfluß der viralen akzessorischen Proteine Vif, Vpx, Vpr und Nef auf die Transduktionseigenschaften von SIV <sub>smm</sub> PBj.....	65
3.3.1 Klonierung einer SIV <sub>smm</sub> PBj Mutante mit funktionalen Deletionen aller akzessorischen Gene (pPBj 4xko).....	66
3.3.2 Untersuchung der Expression der mutierten akzessorischen Gene.....	68
3.3.3 Arretierung von Zielzellen.....	69
3.3.4 Transduktionseigenschaften von SIV <sub>smm</sub> PBj 4xko im Vergleich zu anderen lenti- und gammaretroviralen Vektoren.....	71
3.4 Einfluss von Vpx auf die Transduktion von primären humanen Monozyten.....	74
3.4.1 Klonierung verschiedener Vpx-Expressionskonstrukte.....	75
3.4.2 Verpackung von Vpx in SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleitete Vektoren.....	76
3.4.3 Transduktion von Monozyten mit Vpx-supplementierten SIV <sub>smm</sub> PBj 4x ko Vektoren.....	77
3.4.4 Läßt sich die Fähigkeit zur Transduktion primärer Monozyten durch PBj Vpx auf HIV-1-abgeleitete Vektoren übertragen?.....	79
3.4.5 Inkorporation von SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx durch Modifikation von HIV-1 Vektorpartikeln 3.4.5.1 Verpackung von SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx in modifizierte HIV-1 Vektorpartikel.....	80

3.4.5.2 Verpackung eines HIV-1 Vpr/ SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx-Fusionsproteins in HIV-1 Vektorpartikel.....	82
3.4.5.3 Transduktion von Monozyten mit Vpx-supplementierten HIV-1-abgeleiteten Vektoren.....	83
3.5 Konstruktion eines von SIV <sub>smm</sub> PBj abgeleiteten Dreiplasmid-Vektor-Systems.....	84
3.5.1 Konstruktion des Transfervektors pPBj trans.....	85
3.5.2 Konstruktion des Verpackungskonstrukts.....	89
3.5.2.1 Konstruktion von pPBj pago.....	89
3.5.2.2 Konstruktion von pPBj pack.....	90
3.5.3 Titration der PBj-Vektoren.....	92
3.5.4 Titer von SIV <sub>smm</sub> PBj Vektoren auf verschiedenen Zelllinien im Vergleich zu anderen Vektoren.....	93
3.5.5 Kreuzverpackung von HIV-1 und SIV <sub>smm</sub> PBj Vektoren.....	94
3.5.6 Klonierung der Verpackungskonstrukte pPBj Psi1 - 11.....	95
3.5.7 Titration der verschiedenen Vektorkonstrukte.....	96
3.5.8 Übertragung von Transfervektor und Verpackungskonstrukt in Zielzellen.....	97
3.5.9 Nachweis von replikationskompetenten Retroviren (RCR, replication competent retrovirus).....	99
3.5.10 Transduktion von Monozyten mit einem neuen SIV <sub>smm</sub> PBj Vektor.....	100
4. Diskussion.....	103
4.1 Transduktion von humanen CD4 <sup>+</sup> Zellen mittels SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteter Vektoren.....	103
4.2 Charakterisierung und Transduktion von Monozyten.....	104
4.3 Transduktion arretierter Zelllinien mittels eines SIV <sub>smm</sub> PBj Vektor mit funktionaler Deletion aller akzessorischen Gene.....	106
4.4 Einfluss von Vpx auf die Transduktion von Monozyten.....	107
4.5 Eine Übertragung der Vpx-Funktion auf HIV-1 Vektoren ist nicht möglich.....	108
4.6 Etablierung eines SIV <sub>smm</sub> PBj Dreiplasmid-Vektorsystems.....	111
4.7 Effiziente Transduktion von Monozyten mit dem neu etablierten SIV <sub>smm</sub> PBj Dreiplasmid-Vektorsystem.....	114
5. Zusammenfassung.....	116
6. Verzeichnisse.....	118
6.1 Literaturverzeichnis.....	118

6.2 Abbildungsverzeichnis.....	136
6.3 Tabellenverzeichnis.....	138
6.4 Abkürzungsverzeichnis.....	139
6.4.1 Einheiten.....	139
6.4.2 Weitere verwendete Abkürzungen.....	139
6.5 Anglizismenverzeichnis.....	141
7. Danksagung.....	142
<i>Curriculum vitae</i> .....	143

# 1. Einleitung

## 1.1 Gentherapie

### 1.1.1 Anwendungen und Methoden der Gentherapie

Ziel der Gentherapie ist es, vererbte genetisch bedingte Krankheiten und erworbene Erkrankungen durch Einschleusung von gesunden Genen in die entsprechenden Zielzellen zu heilen. Prinzipiell wird zwischen zwei Formen der Gentherapie unterschieden. Zum einen die Keimbahntherapie, bei der die genetische Information der Geschlechtszellen verändert wird und diese Veränderung somit von den Eltern auf die Kinder übertragen werden kann. Die zweite Form ist die somatische Gentherapie, bei der ausschließlich die genetische Information von Körperzellen verändert wird und die Geschlechtszellen unverändert bleiben. Zurzeit werden ausschließlich klinische Studien zur somatischen Gentherapie durchgeführt.

Unabhängig von der gewählten Methode des Gentransfers, kann dieser auf zwei Wegen erfolgen: 1.) über den *ex vivo* Gentransfer, bei dem die gewünschten Zielzellen aus dem Körper isoliert, außerhalb des Körpers genetisch verändert werden und anschließend reimplantiert werden, 2.) über den *in vivo* Gentransfer, bei dem das Therapeutikum systemisch appliziert oder direkt in das betroffene Organ bzw. den Tumor injiziert wird (*in situ* Applikation).

Um den Transfer eines bestimmten Gens in Körperzellen zu bewerkstelligen, stehen diverse Techniken zur Verfügung. Neben einer Vielzahl chemischer bzw. physischer DNA-Transfer-Methoden ist eine weitere Strategie die Verwendung viraler Systeme, die auf der natürlichen Fähigkeit von Viren beruht, Zellen zu infizieren. So genannte virale Vektoren weisen einige systemimmanente Vorzüge auf, wie etwa die spezifische Bindung an und die Aufnahme in Zellen, den Transport der DNA zum Zellkern und den Schutz der transferierten Nukleinsäuren vor einem Abbau in der Zelle (Kay *et al.*, 2001). Das Übertragen genetischer Information mittels eines viralen Vektors bezeichnet man als Transduktion und ist definiert als eine unvollständige (nicht-replikative) Infektion. Die Viren, von denen die einzelnen Vektoren abgeleitet sind, werden so verändert, dass die zum Teil pathogenen viralen Faktoren eliminiert werden und die Viren sich nicht vermehren können (replikationsdefiziente Viren). Die derzeit in klinischen Studien verwendeten Vektoren sind in Tab. 1.1 zusammengefasst.

Tab. 1.1 Vektoren in klinischen Gentherapiestudien weltweit.

<b>Vektoren</b>	<b>Prozentualer Anteil in klinischen Studien [%]</b>	<b>Gesamtanzahl der klinischen Studien</b>
Gamma-Retrovirus	25,6	261
Adenovirus	25,5	260
Pocken Virus	5,5	56
Vakzinia Virus	3,5	36
Herpes Simplex Virus	3,1	32
Adeno-assoziiertes Virus	2,6	27
Pockenvirus/ Vakzinia Virus	1,7	17
Lentivirus	0,3	3
Adenovirus/ Retrovirus	0,2	2
Masernvirus	0,1	1
Semliki Forest Virus	0,1	1
nichtvirale Methoden	31,8	314

Angegeben sind die Viren, von denen diverse Gentherapie-Vektoren abgeleitet sind, deren prozentuale Anteile in derzeitigen klinischen Studien und die Gesamtzahl an klinischen Studien mit den jeweiligen Vektoren. Nach „The Journal of Gene Medicine, © 2005 John Wiley and Sons Ltd“; <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, werden retro- und adenovirale Vektoren am häufigsten eingesetzt. Diese beiden Vektoren unterscheiden sich in einem grundlegenden Punkt: Retroviren integrieren das von ihnen transferierte genetische Material stabil in das Genom der Zielzelle. Im Gegensatz dazu erfolgt der Gentransfer durch einen adenoviralen Vektor nur transient, die Expression des Transgens persistiert in der Regel nur wenige Wochen (Yang und Wilson, 1995). Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Vektoren ist die Fähigkeit zur Transduktion von nicht-proliferierenden Zellen. Retrovirale Vektoren wie z.B. die häufig verwendeten vom Murinen Leukämie Virus-abgeleiteten Vektoren können nur proliferierende Zellen transduzieren, da sie nicht dazu in der Lage sind, die intakte Kernmembran zu überqueren (Robbins und Ghivizzani, 1998). Im Gegensatz dazu können adenovirale Vektoren auch nicht-proliferierende Zellen transduzieren, was wie bereits erwähnt nur zu einer transienten Genexpression in der Zielzelle führt. Lentivirale Vektoren,

die bisher kaum Anwendung finden (0,3% der klinischen Studien), vereinbaren beide Eigenschaften. Sie können nicht-proliferierende Zellen transduzieren und die übertragene genetische Information stabil in das Genom der Zielzelle integrieren, was zu einer langfristigen Expression des Transgens führt.

Für die einzelnen Vektor-Typen ergeben sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften diverse Vor- und Nachteile. Je nach Anwendung kann z.B. eine Integration des Transgens erwünscht oder aber auch unerwünscht sein. So würde für den Transfer eines Suizidgens in Tumorzellen eine transiente Expression genügen, wohingegen die Substitution eines fehlerhaften körpereigenen Gens dauerhaft erfolgen sollte. Ähnlich verhält es sich mit der Fähigkeit, Zellen in bestimmten Zellzyklusstadien zu transduzieren. Oft genügt die Kapazität eines retroviralen Vektors, der ausschließlich proliferierende Zellen transduzieren kann. So sind z.B. Tumorzellen teilungsaktive Zellen. Diese stellen zurzeit den größten Anteil potentieller Zielzellen von klinischen Gentherapiestudien (über 60% aller klinischen Gentherapiestudien befassen sich mit der Therapie von Krebs; „The Journal of Gene Medicine, © 2005 John Wiley and Sons Ltd“; <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>). Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer Anwendungsgebiete, von denen einige in Tabelle 1.2 zusammengefasst sind.

Tab. 1.2 Anwendungsgebiete für Gentransfervektoren.

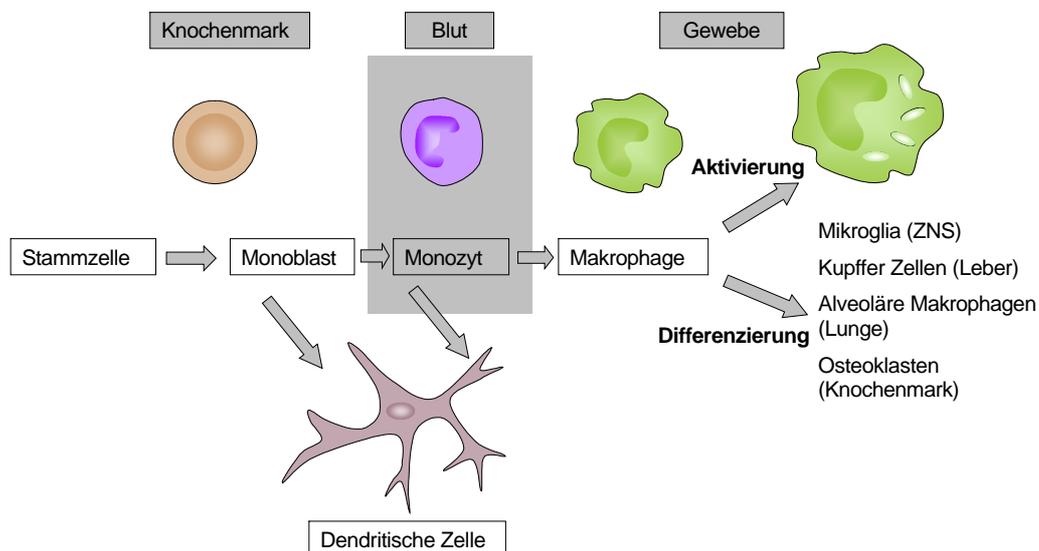
Erkrankung	Zielzellen für die Gentherapie	retroviraler Gentransfer möglich	Zellzyklusphase der Zielzellen	Literatur
SCID-X1	Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (stimuliert)	Ja	G <sub>1</sub>	Hacein-Bey-Abina <i>et al.</i> , 2002
	Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (unstimuliert)	Nein	G <sub>0</sub>	_____
	Unstimulierte T-Zellen	Nein	G <sub>0</sub>	_____
Zystische Fibrose	Mesenchymale Stammzellen	Ja	G <sub>1</sub> /proliferierend	Wang <i>et al.</i> , 2005
	Lungen-Epithelzellen	Ja	G <sub>1</sub>	Weiss <i>et al.</i> , 2002
Parkinson	Neuronen	Ja	G <sub>1</sub>	Lo Bianco <i>et al.</i> , 2004
Tumore	Tumorzellen	Ja	proliferierend	Caruso <i>et al.</i> , 1993
	Antigen-präsentierende Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen, B-Zellen)	Ja/Nein	G <sub>1</sub> /G <sub>0</sub>	Mühlebach, Wolfrum <i>et al.</i> , 2005

Neben den zu therapierenden Krankheiten sind als Zielzellen in Frage kommenden Zelltypen und deren Zellzyklusstatus angegeben.

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, sind die potentiellen Zielzellen einer Gentherapie sehr vielfältig. Einige von ihnen sind durch bisher erprobte retrovirale Vektoren transduzierbar. Andere Zellen, die ebenfalls ideale Ziele für eine Gentherapie darstellen, sind allerdings für bisher bekannte retrovirale Vektoren nicht zugänglich. Dazu zählen unstimulierte hämatopoetische Stammzellen, unstimulierte T-Zellen und Monozyten.

### 1.1.2 Mononukleäre Phagozyten als wichtige Zielzellen der Gentherapie

Die Zellen des mononukleären Phagozyten-Systems entstehen im Knochenmark und zirkulieren dann im Blut, von wo aus sie in verschiedene Gewebe einwandern. Der erste Zelltyp, der den peripheren Blutstrom erreicht, ist noch nicht vollständig differenziert und wird als Monozyt bezeichnet (Abb. 1.1). Sobald sich diese Zellen in bestimmten Geweben ansiedeln, beginnen sie zu reifen und werden Makrophagen. Diese Zellen finden sich in allen Organen und Geweben und haben je nach Lage spezielle Bezeichnungen. Makrophagen des zentralen Nervensystems heißen Mikrogliazellen, die der Leber Kupfer-Zellen, und Makrophagen der pulmonalen Atemwege sind alveoläre Makrophagen. Zur Hauptaufgabe der Makrophagen zählen die Phagozytose von Mikroben und die anschließende Präsentation von mikrobiellen Antigenen an differenzierte Effektor- T-Zellen, wodurch sie zur zellvermittelten Immunantwort beitragen.



**Abb. 1.1 Reifung mononukleärer Phagozyten.** Mononukleäre Phagozyten entstehen im Knochenmark, zirkulieren im Blut als Monozyten und finden sich in differenzierter Form in vielen Geweben. Außer zu Makrophagen differenzieren die myeloiden Vorläufer auch zu Dendritischen Zellen. ZNS; zentrales Nervensystem. Nach „Cellular and Molecular Immunology“, Abbas A.K. fourth edition 2000.

Eine weitere wichtige Gruppe von Antigen-präsentierenden Zellen (APC, antigen presenting cell) sind Dendritische Zellen (DC; dendritic cell). Die meisten von ihnen sind myeloide Dendritische Zellen, welche die gleichen Vorläufer haben wie Makrophagen. Unreife DCs befinden sich im Epithelgewebe der Haut, des Gastrointestinaltraktes und des respiratorischen Systems. Dort nehmen die Zellen Antigene auf und transportieren diese zu den Lymphknoten. Auf dem Weg dort hin reifen die DCs und erlangen dadurch die Fähigkeit noch effizienter Antigene präsentieren zu können.

Diese Eigenschaft ist bei der Tumor-Immunität von großer Bedeutung, denn Antigen-präsentierende Zellen – in erster Linie DCs – aktivieren sowohl Zytotoxische T-Zellen (CTL; cytotoxic T lymphocyte) als auch T-Helfer-Zellen (Dranoff *et al.*, 1993; Porgador *et al.*, 1995). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass beide T-Zell-Typen eine effektive anti-Tumor-Immunität vermitteln (Huang *et al.*, 1994). Zur Bekämpfung von Tumoren versucht man, diese natürliche anti-Tumor-Aktivität zu verstärken. Um dies zu erreichen, bestanden die ersten Ansätze darin, bestrahlte, autologe Tumorzellen zu injizieren (Ghose *et al.*, 1976; Miller *et al.*, 1985; Oettgen *et al.*, 1991). Die Möglichkeit, DCs zu kultivieren, führte zu zahlreichen Studien, diese *ex vivo* mit Tumor-Antigenen zu beladen. Zunächst wurden die Zellen einfach mit Antigenen „gepulst“, d.h. die Zellen wurden mit den entsprechenden Antigenen kultiviert, die dabei durch Endozytose von den DCs aufgenommen wurden. Selbst mit dieser relativ ineffizienten Methode konnten anti-Tumor-Aktivitäten induziert werden (Mayordomo *et al.*, 1995; Porgador *et al.*, 1995). Die Entwicklung besserer Gentransfervektoren führte dazu, kultivierte DCs mit Genen zu transduzieren, die ein Tumor-Antigen kodieren. Auch für diese Ansätze konnte im Maus-Modell eine anti-Tumor-Aktivität gezeigt werden (Specht *et al.*, 1997; Dyllal *et al.*, 2001). Um eine möglichst effiziente Antigenpräsentation zu gewährleisten, werden in der Regel stimulierte Stammzellen transduziert, die anschließend *ex vivo* zu DCs differenziert werden. Dieses Vorgehen beinhaltet eine weitere Manipulation der Zielzellen (die Stimulation), die nach Möglichkeit vermieden werden sollte. Um das zu umgehen, wäre es ein großer Vorteil, die Stammzellen ohne vorherige Stimulation transduzieren zu können, bzw. einen direkten Vorläufer der DCs, wie z.B. Monozyten zu transduzieren.

Bei allen erwähnten Ansätzen ist der Differenzierungsstatus der Dendritischen Zellen von großer Bedeutung. Werden voll differenzierte bzw. aktivierte Zellen reimplantiert, besteht die Gefahr, dass diese nicht zu den Lymphknoten gelangen, um dort die T-Zellen zu aktivieren. Werden allerdings unreife DCs injiziert, kann dies zu Toleranz oder der Unterdrückung einer Antigen-spezifischen Antwort führen (Dhodapkar *et al.*, 2001).

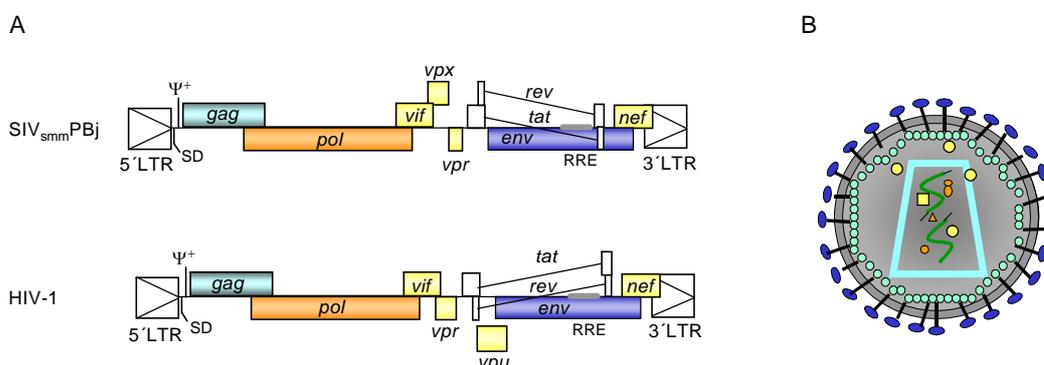
Einen Vorteil könnte daher die Transduktion von direkten Vorläuferzellen darstellen, die dann als solche reimplantiert werden.

Der Gentransfer in Monozyten durch bisher bekannte retrovirale Vektoren ist nicht möglich. Auch HIV-1-abgeleitete Vektoren können erst bereits differenzierte Zellen transduzieren. In der Arbeitsgruppe „Medizinische Biotechnologie“ am Paul-Ehrlich-Institut konnte gezeigt werden, dass der Transfer eines Gens in Monozyten, durch die Verwendung eines SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektors ermöglicht werden kann (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005; siehe auch 1.5). SIV<sub>smm</sub> zählt zu der Gruppe der Lentiviren. Daher wird im Folgenden näher auf diese Viren eingegangen.

## 1.2. Lentiviren

### 1.2.1 Grundlagen

Das bekannteste Lentivirus ist das humane Immundefizienzvirus (HIV), welches zu den Lentiviren der Primaten zählt. Diese werden in fünf phylogenetisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt: HIV-1/SIV<sub>cpz</sub> (Huet *et al.*, 1990; Peeters *et al.*, 1989), HIV-2/SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub> (Hirsch *et al.*, 1989), SIV<sub>agm</sub> (Daniel *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 1990), SIV<sub>md</sub> (Tsujiimoto *et al.*, 1989) und SIV<sub>syk</sub> (Hirsch *et al.*, 1993). Auch wenn sich die einzelnen Gruppen von ihrer Genomstruktur sehr ähneln, so liegt die Aminosäuresequenz-Homologie von z.B. HIV-1 und HIV-2 bei nur 45%-50% (Ratner *et al.*, 1985; Wain-Hobson *et al.*, 1985). Die Genomstruktur von zwei klassischen Lentiviren ist in Abb.1.2 dargestellt.



**Abb. 1.2 Lentiviren.** A) Genomstruktur von Lentiviren am Beispiel von SIV<sub>smm</sub>PBj und HIV-1. B) Schematische Darstellung eines viralen Partikels. Die Farben der in A dargestellten Gene entsprechen den jeweiligen Bestandteilen des in B gezeigten viralen Partikels. Ψ, Verpackungssignal; RRE, Rev responsive Element; SD, Spleißdonor; LTR, long terminal repeat

Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und besitzen ein Positiv-(Einzel-)Strang RNA-Genom. Jedes Viruspartikel enthält zwei Kopien dieser etwa 10 kb großen RNA. Das virale Genom befindet sich im Nukleokapsid, welches wiederum von einem konischen Kapsid umschlossen ist. Dieses ist von einer Membran umhüllt, in welche Hüllproteine eingelagert sind, die durch spezifische Bindung an Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle den Tropismus des Virus bestimmen. Ein solches virales Partikel hat einen Durchmesser von 80 bis 120 nm (Coffin *et al.* 1997). Die Lentiviren gehören zu den komplexen Retroviren, da sie neben den Struktur- und Hüllprotein-kodierenden Genen zusätzlich regulatorische und akzessorische Gene besitzen. Die Strukturgebenden Proteine Matrix, Kapsid und Nukleokapsid werden von dem viralen Gen *gag* kodiert. Die Enzyme Protease, Reverse Transkriptase und Integrase werden von dem *pol*-Gen kodiert. Das *env*-Gen kodiert für das den Tropismus vermittelnde Hüllprotein (Abb. 1.2). Neben diesen Genen exprimieren Lentiviren noch zwei regulatorische Gene (*tat* und *rev*) und vier akzessorische Gene (*vif*, *vpx* bzw. *vpu*, *vpr*, *nef*) auf die im nächsten Kapitel ausführlicher eingegangen wird. Die Kodierung dieser zusätzlichen Gene unterscheidet Lentiviren von klassischen oder einfachen Retroviren; sie werden auch als komplexe Retroviren bezeichnet.

Wie alle Retroviren besitzen auch die Lentiviren eine RNA abhängige DNA Polymerase. Dieses Enzym, die Reverse Transkriptase, ermöglicht das Umschreiben der virale RNA in DNA nachdem das Virus in die Zielzelle eingedrungen ist. Anschließend wird die DNA in den Zellkern transportiert, wo die virale genetische Information in die DNA der Wirtszelle integriert wird. Dabei sind Gamma-Retroviren wie das Murine Leukämievirus (MLV) auf die mitotische Teilung der Zellen angewiesen, bei der die Kernmembran aufgelöst wird und die virale DNA so Zugang zu dem Wirtszellgenom hat (Miller *et al.*, 1990; Roe *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1994). Lentiviren hingegen sind für die Etablierung eines Provirus nicht auf die Mitose angewiesen (Katz *et al.*, 2003). Nach der reversen Transkription bildet sich ein so genannter Präintegrations-Komplex (PIC; preintegration complex), zu dessen Komponenten sowohl virale als auch zelluläre Proteine zählen (Fouchier *et al.*, 1999). Der genaue Mechanismus, der zum Kernimport führt, ist allerdings unbekannt. Der aktive Kernimport der viralen DNA ermöglicht es den Lentiviren, nicht-proliferierende Zellen zu infizieren. Diese Eigenschaft bietet große Vorteile für die Gentherapie, da Gene mittels lentiviraler Vektoren stabil in Zellen transferiert werden können, die sich in einem ruhenden Zellzyklusstadium befinden.

## 1.2.2 Die akzessorische Proteine

Alle Lentiviren kodieren akzessorische Proteine. Bei HIV-1 sind es Vif, Vpr, Vpu und Nef. Bei der SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub>/HIV-2 Gruppe sind es Vif, Vpr, Vpx und Nef. Die Expression dieser Proteine ist für eine effiziente Replikation in den meisten *in vitro* Systemen nicht nötig. Im Gegensatz dazu spielen diese Proteine bei der Replikation und Pathogenese *in vivo* eine bedeutende Rolle. Den einzelnen Proteinen sind viele verschiedene Aufgaben zugeordnet. Auf die für diese Arbeit relevanten wird im Folgenden näher eingegangen.

Vif zählt zu den am besten charakterisierten akzessorischen Proteinen der Lentiviren. Bereits 1987 konnte gezeigt werden, dass Vif für die Replikation von HIV-1 in verschiedenen Zellen, zum Beispiel in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC; peripheral blood mononuclear cell), essentiell ist (Fisher *et al.*, 1987; Strebel *et al.*, 1987; Gabuzda *et al.*, 1992). Dies spiegelt sich auch in dem Namen des Proteins wider. Vif steht für „virion infectivity factor“. Erst 2002 wurde der Mechanismus beschrieben, der diese Beobachtung erklärt. Vif interagiert mit dem zellulären APOBEC3G, einem wesentlichen Restriktionsfaktor des lentiviralen Replikationszyklus (Sheehy *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2003; Mangeat *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Durch diese Interaktion wird ein Einbau von APOBEC3G in virale Partikel verhindert. Für Vif-defiziente HIV-1 Mutanten konnte gezeigt werden, dass Apobec3G in Viruspartikel verpackt wird und in der Zielzelle bei der reversen Transkription zu einer Deaminierung des synthetisierten DNA-Minusstrangs führt; es wird 2'-Deoxyuridin anstelle von 2'-Deoxycytidin eingebaut. Diese Modifikation kann in einer Deglykosylierung der viralen DNA resultieren, was wiederum die Synthese des DNA-Plusstrangs negativ beeinflusst (Klarmann *et al.*, 2003) oder gar zu Strangbrüchen führt. Selbst wenn virale doppelsträngige DNA synthetisiert wird, entstehen auf Grund der G-zu-A-Hypermutationen im Allgemeinen keine replikationsfähigen Viren (Gu *et al.*, 2003).

Für Vpr ist Vielzahl von Funktionen während des viralen Replikationszyklus beschrieben. Der für diese Arbeit wichtigste Punkt ist der Einfluss von Vpr auf die Genauigkeit der reversen Transkription. In Vpr-defizienten Mutanten kommt es zu einer mehr als vierfach höheren Mutationsrate als bei Wildtypviren (Mansky *et al.*, 1995; Mansky *et al.*, 1996). In Monozyten-abgeleiteten Makrophagen (MDM; monocyte derived macrophages) ist die Mutationsrate sogar um das 18-fache höher (Chen *et al.*, 2004). Diese Beobachtung wird durch eine spezifische Interaktion von Vpr erklärt, die zur Verpackung der zellulären Uracil DNA Glykosylase (UNG2) führt (Mansky *et al.*, 2000). Dieses Enzym entfernt Uracil aus DNA. Uracil entsteht entweder durch Cytosin Deaminierung oder wird versehentlich in DNA eingebaut. Die daraus resultierenden Folgen sind bereits oben beschrieben. Bei

Makrophagen kommt es besonders häufig zu Uracil-Inkorporationen, da diese nur wenig UNG exprimieren, aber eine sehr große Menge dUTP enthalten (Chen *et al.*, 2002). Die durch Vpr vermittelte Verpackung von UNG2 ist somit ein essentieller Beitrag zur Replikationsfähigkeit in Makrophagen. Des Weiteren spielt Vpr auch beim Kernimport der viralen DNA als Komponente des viralen Präintegrationskomplexes eine Rolle (Accola *et al.*, 1999). Es wird vermutet, dass Vpr die Kernmembran perforiert und so die DNA in den Kern gelangen kann (Noronha *et al.*, 2001). Neben diesen Eigenschaften führt die Expression von Vpr in proliferierenden Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase (Di Marzio *et al.*, 1995; Jowett *et al.*, 1995; Fletcher *et al.*, 1996). Der Übergang in die M-Phase wird durch die Vpr-inhibierte Aktivierung des p34cdc2-Cyclin B Kinase-Komplexes verhindert (He *et al.*, 1995; Re *et al.*, 1995). Dies führt zu einer optimierten Virusproduktion, da der Eintritt in Apoptose verhindert und die klonale Expansion infizierter Zellen reduziert wird (Coffin *et al.*, 1997). Des Weiteren ist Vpr ein Transaktivator der LTR (Levy *et al.*, 1995).

Über eine Interaktion mit der p6-Domäne des Gag Proteins wird Vpr in Partikel verpackt und gelangt so in die Zielzelle (Yuan *et al.*, 1990). Darüber hinaus befindet sich am C-terminalen Ende des Proteins ein Arginin-reicher Bereich, der Ähnlichkeit mit Protein-Transduktions-Domänen (PTD) aufweist. Dieser Bereich ermöglicht somit evtl. auch das Durchdringen von Zellmembranen (Kichler *et al.*, 2000; Sherman *et al.*, 2002; Coeytaux *et al.*, 2003).

Nef (negative factor) gilt als eine der Hauptpathogenitätsdeterminanten (Cheng-Mayer *et al.*, 1989; Kestler *et al.*, 1991). Es wird angenommen, dass die hohe Pathogenität von SIV<sub>smm</sub>PBj in Zusammenhang mit seinen besonderen Replikationseigenschaften in ruhenden Zellen steht. Wie alle anderen akzessorischen Proteine wird auch Nef in Viruspartikel verpackt. Im Gegensatz zu den anderen Proteinen wird Nef während der Reifung des Partikels durch die virale Protease prozessiert (Welker *et al.*, 1996; Pandori *et al.*, 1996; Pandori *et al.*, 1998). Nef bewirkt eine Veränderung des intrazellulären Proteintransports, was z.B. eine geringere Oberflächenexpression von CD4, MHC I und CD28 zur Folge hat (Garcia, Miller, 1991; Schwartz *et al.*, 1996; Swigut *et al.*, 2001). Außerdem erhöht Nef die Infektiosität der Virionen (Spina *et al.*, 1994; Miller *et al.*, 1994) und es führt zu einer Zellaktivierung von T-Zellen (Schrager, Marsh, 1999; Simmons *et al.*, 2001).

Vpx (viral protein X) wird nur von Lentiviren der SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub>/HIV-2 Guppe kodiert. Da es große Homologien zu Vpr aufweist, wird vermutet, dass es aus einer Genduplikation hervorgegangen ist (Modrow *et al.*, 1997). Wie Vpr ist auch Vpx eine Komponente des viralen Präintegrationskomplexes und daher evtl. ebenfalls am Kernimport beteiligt (Wu *et al.*, 1994; Fletcher *et al.*, 1996). Allerdings konnte für Vpx bisher nicht gezeigt werden, dass

es einen Einfluss auf den Zellzyklus hat (Re *et al.*, 1995). Eine Eigenschaft von Vpx wird in der vorliegenden Arbeit besonders untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Vpx essentiell für die Replikation von SIV<sub>smm</sub>PBj in primären Makaken-Makrophagen ist (Hirsch *et al.*, 1998). Die Eigenschaft von SIV<sub>smm</sub>PBj, in unstimulierten PBMC zu replizieren, die einzigartig unter den Lentiviren ist, geht bei einer Deletion von Vpx ebenfalls verloren, wohingegen die Replikation in stimulierten PBMC nicht beeinflusst wird. Dies deutet darauf hin, dass die Anwesenheit von infizierten Makrophagen benötigt wird, um eine Replikation in PBMC zu gewährleisten (Du *et al.*; 1995). Wahrscheinlich führt die Infektion von Makrophagen zur Freisetzung von Chemokinen, die wiederum die Infektion von Lymphozyten begünstigen.

In infizierten Zellen ist Vpx sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert, wo es mit der p6-Domäne von Gag assoziiert und dadurch in virale Partikel verpackt wird.

Wie kürzlich gezeigt wurde, wird Vpx von ERK-2/MAPK phosphoryliert, was eine Inhibition des Kernimports von Vpx und eine stark verminderte Replikationsfähigkeit in Makaken Makrophagen zur Folge hat. Dabei ist zu bemerken, dass ERK-2/MAPK durch Vpx selbst mit in Partikel verpackt wird, was möglicherweise eine abnorme Signaltransduktion in der Zielzelle zur Folge hat (Rajendra Kumar *et al.*, 2005).

### 1.2.3 SIV<sub>smm</sub>PBj

SIV<sub>smm</sub>PBj ist ein Stamm der Simianen Immundefizienzviren, der durch Passagieren eines apathogenen Virus (SIV<sub>smm</sub>9 aus der Grauen Schopfmangabe; Sooty mangabey monkey; *Cercocebus torquatus atys*) in einem Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) entstanden ist (Fultz *et al.*, 1989). Das aus diesem Affen isolierte Virus (SIV<sub>smm</sub>PBj14) führt im Gegensatz zum parentalen SIV<sub>smm</sub>9 bei einer Infektion von Affen zu starkem, blutigem Durchfall. Die Symptome sind so stark, dass sie bei einigen Tieren innerhalb von Tagen bzw. wenigen Wochen zum Tod führen. Diese starke Pathogenität scheint zu einem gewissen Grad speziesspezifisch zu sein, denn es wurde beobachtet, dass bei infizierten Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) oder Halsbandmangaben (*Cercocebus torquatus atys*) die Sterblichkeit innerhalb der ersten Wochen bei über 50 % liegt. Im Gegensatz dazu zeigen infizierte Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) weniger starke Symptome und die akute Phase der Infektion wird von vielen Tieren überlebt (Fultz *et al.*, 1989; Dewhurst *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1992).

Eine weitere Besonderheit von SIV<sub>smm</sub>PBj ist die Eigenschaft, *in vitro* in unstimulierten PBMC zu replizieren (Fultz *et al.*, 1991; Schwiebert *et al.*, 1994). Diese Eigenschaft ist unter den

Lentiviren einzigartig. Sowohl das parentale Virus SIV<sub>smm</sub>9 als auch SIV<sub>mac</sub>251 und HIV-2, die phylogenetisch am nächsten mit SIV<sub>smm</sub> verwandt sind, besitzen diese Fähigkeit nicht.

Auf genomischer Ebene unterscheidet sich SIV<sub>smm</sub>PBj durch 57 Punktmutationen und zwei Insertionen vom Parentalvirus. Eine der Insertionen ist eine Verdopplung der NF $\kappa$ B-Bindungsstelle in der LTR (Long Terminal Repeat). Von den 57 Punktmutationen, die über das gesamte Genom verteilt auftreten, führen 36 zu einer Aminosäureänderung (Cournaud *et al.*, 1992).

Der in dieser Arbeit verwendete Molekularklon SIV<sub>smm</sub>PBj1.9 wurde mittels PCR (polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion) generiert (Dewhurst *et al.*, 1990). Dabei wurden die 5'- und die 3'-Hälfte des viralen Genoms von SIV<sub>smm</sub>14 amplifiziert und anschließend zu verschiedenen Molekularklonen zusammengesetzt. SIV<sub>smm</sub>PBj1.9 ist einer von drei Klonen, die dieselben Eigenschaften aufweisen wie das pathogene Virusisolat von dem sie abgeleitet sind.

### 1.3 Aufbau eines lentiviralen Vektors

Zur Konstruktion eines retroviralen Vektorsystems wird die genetische Information des Virus auf drei Plasmide aufgeteilt (Abb. 1.4.1). Die drei entstehenden Konstrukte sind der Transfervektor, das Verpackungskonstrukt und ein für das Hüllprotein kodierendes Plasmid. Werden diese drei Plasmide in eine Verpackungszelle kotransfiziert, können alle zur Generierung eines Vektors wichtigen Proteine synthetisiert werden. Die Vektorpartikel selbst beinhalten aber nur noch die genetische Information, die auf dem Transfervektor kodiert ist.

Das Hüllprotein-Expressions-Plasmid besteht aus einem Promotor, dem entsprechenden Hüllproteingen und einer poly A-Sequenz.

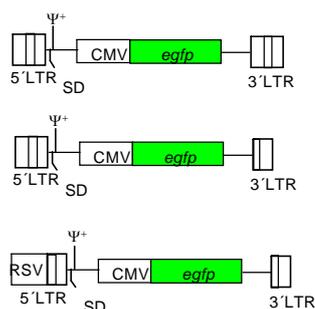
Der Einfachste Transfervektor besteht aus den viralen LTRs, die für reverse Transkription und die Integration wichtig sind, einem Verpackungssignal ( $\Psi$ ), das zur Verpackung in Vektorpartikel führt, und dem zu transferierenden Gen. Dieses kann entweder durch die viralen LTRs oder durch einen heterologen Promotor reguliert werden. Bei diesen Vektoren besteht die Gefahr, dass nach der Integration in das Wirtszellgenom durch die Promotoraktivität der 3' LTR benachbarte Gene exprimiert werden können. Um dies zu verhindern wurden „selbst inaktivierende“ (SIN) Vektoren generiert, bei denen im U3-Bereich der 3' LTR eine Deletion eingefügt wurde. Diese Deletion wird bei der reversen Transkription

in der Zielzelle an die 5' LTR transferiert, wodurch auch der 5'-gelegene Promotor zerstört wird (Miyoshi *et al.*, 1998). Eine weitere Modifikation besteht darin, den U3 Bereich der 5' LTR durch einen heterologen Promotor zu ersetzen. Dadurch wird der virale Promotor deletiert. Außerdem wird dadurch auch die so genannte TAR-Region deletiert, die im U3-Bereich liegt. An diese Region bindet während des natürlichen Replikationszyklus das Tat-Protein und begünstigt durch einen nicht genau bekannten Mechanismus die Transkription der viralen RNA (Jones und Peterlin *et al.*, 1994). Wird diese Region deletiert und durch einen heterologen Promotor ersetzt, ist das resultierende Konstrukt Tat-unabhängig.

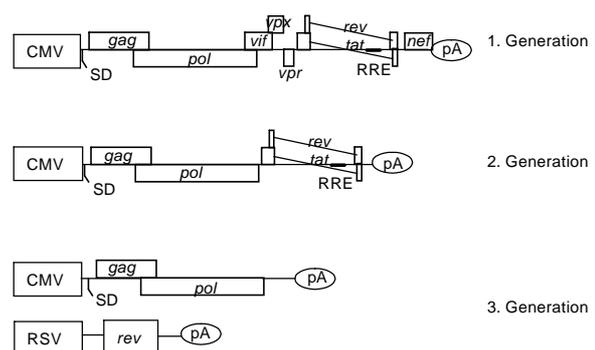
#### A Hüllprotein-Expressions-Plasmid



#### B Transfervektoren



#### C Verpackungskonstrukte



**Abb 1.3 Dreiplasmid-Vektorsystem zur Generierung von lentiviralen Vektoren.** A) Hüllprotein-Expressionskonstrukt B) Transfervektoren. Die Vektoren beinhalten alle cis-aktiven Sequenzen, die für RNA Prozessierung, Verpackung ( $\Psi$ ), reverse Transkription und Integration benötigt werden. C) Verpackungskonstrukte. Diese Konstrukte exprimieren die dargestellten viralen Proteine, aber es fehlen die cis-aktiven Sequenzen, die für Verpackung ( $\Psi$ ), reverse Transkription und Integration nötig sind. SD, Spleißdonor; SIN, selbst inaktivierend; RRE, Rev responsives Element.

Durch das Verpackungskonstrukt, das im Wesentlichen für die Gene *gag* und *pol* kodiert, werden in der Verpackungszelle die viralen Strukturproteine und Enzyme zur Verfügung gestellt. Das wichtigste an einem Verpackungskonstrukt ist die Deletion des Verpackungssignals, damit die genetische Information nicht selbst in entstehende Vektor-Partikel verpackt wird. Die Verpackungskonstrukte der so genannten 1. Generationsvektoren beinhalteten das gesamte virale Genom, bei dem nur die LTRs, das Verpackungssignal und das Hüll-Gen deletiert waren.

Anstelle der 5' LTR kontrollierte ein CMV Promotor die Proteinexpression. Die 3' LTR wurde durch ein poly A-Signal ersetzt. Die *cis*-aktiven Sequenzen, die für Verpackung ( $\Psi$ ), reverse Transkription (PBS, Primer Binde Stelle) und Integration (LTR) wichtig sind, sind in diesem Konstrukt deletiert. Es werden aber die Strukturproteine Gag und Pol, die akzessorischen und regulatorischen Proteine exprimiert (Naldini *et al.*, 1996). Um die biologische Sicherheit zu erhöhen wurden bei den 2. Generationsvektoren alle akzessorischen Gene deletiert (Zuffrey *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998), denn diese werden zum Teil mit der Virulenz bzw. Pathogenität der Viren in Verbindung gebracht. Bei den 3. Generationsvektoren wurden zusätzlich zu den akzessorischen Genen auch die regulatorischen Gene *tat* und *rev* deletiert. Dies ist nur möglich, wenn auch in dem korrespondierenden Transfektor der virale Promotor durch einen Tat-unabhängigen Promotor ersetzt wurde (Kim *et al.*, 1998). Das Rev Protein ist essentiell für den RNA Transport aus dem Zellkern, für welchen eine Interaktion von Rev mit dem Rev-responsive Element (RRE) nötig ist. Wegen dieser wichtigen Funktion wurde *rev* zunächst zwar aus dem Verpackungskonstrukt entfernt aber dafür auf einem weiteren Plasmid zur Verfügung gestellt (Dull *et al.*, 1998). Die Möglichkeit völlig auf *rev* zu verzichten wurde ebenfalls untersucht, indem das RRE durch andere RNA-Transportelemente ersetzt wurde (Gasmi *et al.*, 1999). Diese von dem *Mason-Pfizer monkey virus (MPMV)* oder Hepatitis B Virus (HBV) abgeleiteten Elemente sind auf endogene Faktoren in der Zielzelle angewiesen und müssten somit die Rev Abhängigkeit umgehen. Allerdings führten diese Versuche zu keinen befriedigenden Ergebnissen; das HBV-Element funktionierte gar nicht und das *MPMV*-Element führte zur fünf- bis zehnfach geringeren Produktion von Partikeln.

#### **1.4 Transduktionseigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektoren**

Herkömmliche lentivirale Vektoren sind dazu in der Lage, nicht-proliferierende Zellen zu transduzieren, allerdings ist der Gentransfer in einige ruhende Zellen auch mit solchen Vektoren nicht zu erreichen. Wie bereits beschrieben (siehe 1.2.3) kann SIV<sub>smm</sub>PBj, *in vitro* in unstimulierten PBMC replizieren (Fultz *et al.*, 1991; Schwiebert *et al.*, 1994). Diese Eigenschaft ließ vermuten, dass von diesem Virus abgeleitete Vektoren evtl. Vorteile in Bezug auf die Transduktionsfähigkeit ruhender Zellen, gegenüber anderen lentiviralen Vektoren bieten könnten.

In der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ wurde ein SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor entwickelt, der außer dem *env*-Gen alle viralen Gene kodiert. Im ehemaligen *env*-Leserahmen wird ein von einem CMV-Promotor reguliertes *egfp*-Gen kodiert. Dieses

Zweiplasmid-Vektorsystem ermöglicht die Generierung von Vektoren, die dazu in der Lage sind, heterologe Gene in humane diploide Fibroblasten und Zelllinien zu transferieren, die in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert sind. Diese Eigenschaft ist unabhängig von dem dabei verwendeten Hüllprotein. Darüber hinaus ermöglicht der SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektor den Gentransfer in frisch isolierte humane Monozyten. Diese sind gegenüber einer Transduktion durch andere lentivirale Vektoren refraktär. Für alle getesteten ruhenden Zellen konnte gezeigt werden, dass das virale Genom in das der Wirtszelle integriert. Diese Daten wurden zusammen mit einem Teil der im Folgenden beschriebenen Ergebnisse bereits publiziert (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005).

Zur Untersuchung der Faktoren, die für diese spezielle Transduktionseigenschaft verantwortlich sein könnten, wurde zunächst der Einfluss der akzessorischen Proteine genauer analysiert. Es wurden Konstrukte generiert, bei denen die Expression jeweils eines akzessorischen Gens inhibiert war. Es konnte gezeigt werden, dass keines der akzessorischen Proteine allein einen Einfluss auf die Transduktion von in G<sub>0</sub>-arretierten humanen Fibroblasten oder Zelllinien hat (Wolfrum, 2002).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein Vektor, der keines der akzessorischen Proteine enthält, die Eigenschaft zur Transduktion primärer humaner Monozyten verloren hat (Kaiser, 2004).

Die Mechanismen, die SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren befähigen ruhende Zellen zu transduzieren, sind nach wie vor unbekannt und bedürfen genauerer Untersuchungen.

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits in der Arbeitsgruppe „Medizinische Biotechnologie“ gezeigt werden konnte, ist ein einfacher SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor dazu in der Lage sowohl in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretierte Zelllinien als auch primäre humane Monozyten zu transduzieren. Diese Fähigkeit besitzen andere lentivirale Vektoren wie z.B. HIV-1-abgeleitete nicht.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieser SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektor genauer charakterisiert und weiterentwickelt werden. Zunächst sollten die transduzierten Monozyten genauer analysiert werden; insbesondere sollte geprüft werden, ob sie noch in der Lage sind, zu Dendritischen Zellen zu differenzieren. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich neben Monozyten auch andere primäre, ruhende Zellen durch einen SIV<sub>smm</sub>PBj Vektor transduzieren lassen.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Frage, ob eines oder eine Kombination der akzessorischen Proteine (Vif, Vpx, Vpr oder Nef) notwendig für die Transduktion ruhender Zellen, insbesondere von Monozyten, ist. Hierzu sollte ein PBj Vektor generiert werden, bei dem die Expression aller akzessorischen Gene verhindert ist. Falls dieser Vektor die Fähigkeit zur Transduktion ruhender Zellen nicht mehr besitzt, sollte das bzw. die akzessorischen Proteine identifiziert werden, die für die besonderen Transduktionseigenschaften von PBj-Vektoren verantwortlich sind.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte, aufbauend auf den Ergebnissen des ersten Teils, ein „Dreiplasmid-Vektorsystem“ entwickelt werden, mit dem nur noch das Transgen, aber keines der viralen Gene mehr in Zielzellen übertragen wird. Dazu sollte das virale Genom auf drei Plasmide (Verpackungskonstrukt, Transfervektor, Hüllproteinkonstrukt) aufgeteilt werden. Für die Generierung des Verpackungskonstrukts sollte das Verpackungssignal definiert und anschließend deletiert werden. Sowohl von dem Verpackungskonstrukt als auch vom Transfervektor sollten nicht-essentielle virale Komponenten entfernt werden. Zur genaueren Charakterisierung des fertigen „Dreiplasmid-Vektorsystems“, sollten Studien zur Transduktion von verschiedenen Zelllinien und primäreren Zellen durchgeführt sowie die Kompatibilität mit Vektorkomponenten von anderen Lentiviren untersucht werden (Kreuzverpackbarkeit).

## 2. Materialien und Methoden

## 2.1 Chemikalien

Substanz/ Kit	Bezugsquelle
1-kb/100-bp DNA Marker	New England Biolabs, Beverly, USA
Aphidicolin	Fluka, Steinheim
APS	Sigma, Taufkirchen
Agar Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Cambrex, Rocklande, USA
7-Actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
7-Amino-actinomycin D	Sigma, Taufkirchen
3-Amino-9-ethyl-Carbazol	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal)	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	AppliChem, Darmstadt
CD4 <sup>+</sup> T cell isolation Kit II	Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTP)	Sigma, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNAcon3-staining Kit	DAKO Cytomation, Glostrup, DK
Dynal <sup>®</sup> Monocyte Negative Isolation Kit	Dynal Biotech Ltd., Bromborough, UK
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin
Giemsa-Lösung	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Merck, Darmstadt
HBSS-Puffer	Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
HCl, 37%	Merck, Darmstadt
JetSorb DNA extraction Kit	Genomed, Löhne
Kalziumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma, Taufkirchen
Lipofectamine <sup>™</sup> Transfection Reagent	Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
May-Grünwald-Lösung	Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Natrium- $\beta$ -Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NaOH 2N	Roth, Karlsruhe
NP40	USB, Cleveland, USA
Oligonucleotide	MWG Biotech, Ebersberg
p27 Antigen Elisa	ZeptoMetrix, Buffalo, USA
Paraformaldehyd	SERVA, Heidelberg
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Plus <sup>™</sup> Reagent	Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
Protaminsulfat	Sigma, Taufkirchen

Protease inhibitor cocktail, Complete Mini, EDTA free	Roche, Mannheim
Pyronin Y	Sigma, Taufkirchen
QIAamp UltraSens Virus Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN OneStep RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
RetroNectin <sup>®</sup>	Takara Bio Europe S.A., Gennevilliers, F
Rubidiumchlorid (RbCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Saccharose	Merck, Darmstadt
Saponin	Sigma, Taufkirchen
SeeBlue Plus2 Pre Stained Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Temed	Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck, Darmstadt
Triton-X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Tween20	Roth, Karlsruhe

Ein Großteil der Puffer wurde von der zentralen Medienküche des PEI angesetzt.

### 2.3 Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Bezugsquelle
Ampicillin	50 mg/ml	50 µg/ml	SERVA, Heidelberg
Gentamicin (G418)	40 mg/ml	800 µg/ml	MP Biomedicals, Irvine, USA
Kanamycin	10 mg/ml	50 µg/ml	Roche, Mannheim
Penicillin	2,5 x 10 <sup>5</sup> Einheiten/ml	100 Einheiten/ml	SERVA, Heidelberg
Streptomycin	12,5 mg/ml	50 µg/ml	SERVA, Heidelberg

### 2.2 Enzyme

Enzym	Puffer	optimal Aktivitäts Temperatur	Bezugsquelle
<b>Ligase</b>			
T4 DNA Ligase	T4 Ligase Puffer	20 – 25°C	New England Biolabs
<b>Phosphatase</b>			
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	NEB 3	37°C	New England Biolabs
<b>Polymerasen</b>			
Klenow Fragment	EcoPol Puffer	25°C	New England Biolabs
PfuUltra <sup>™</sup>	Pfu Puffer	72°C	Stratagene
Ampli Taq DNA Polymerase	Taq Puffer	72°C	Roche, Mannheim

<b>DNase</b>			
RQ1 DNase	DNase Puffer	37°C	Promega, Madison, USA
<b>Restriktionsendonukleasen</b>			
AfeI	NEB4	37°C	New England Biolabs
BclI	NEB 3	50°C	New England Biolabs
BsaBI	NEB2	60°C	New England Biolabs
BsmI	NEB 2	65°C	New England Biolabs
BsmBI	NEB 3	55°C	New England Biolabs
BsrGI	NEB2 +BSA	37°C	New England Biolabs
BstZ17I	NEB 3	37°C	New England Biolabs
DraI	NEB 4	37°C	New England Biolabs
Eco47III	Buffer O	37°C	Fermentas
EcoRI	EcoRI Puffer	37°C	New England Biolabs
HindIII	NEB2	37°C	New England Biolabs
KasI	NEB 2 + BSA	37°C	New England Biolabs
MscI	NEB4	37°C	New England Biolabs
NotI	NEB 3 + BSA	37°C	New England Biolabs
PmlI	NEB 1 + BSA	37°C	New England Biolabs
SacII	NEB4	37°C	New England Biolabs
SbfI	NEB4	37°C	New England Biolabs
SnaBI	NEB 4 + BSA	37°C	New England Biolabs
SpeI	NEB 2 + BSA	37°C	New England Biolabs
XhoI	NEB 2 + BSA	37°C	New England Biolabs

## 2.4 Plasmide

<b>Expressionsplasmide</b>		
<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Aufbau</b>	<b>Bezugsquelle/ Literatur</b>
pEGFP-N1	Expressionsplasmid für eukaryotische Zellen. Es enthält einen Cytomegalovirus Promoter und ein SV40-Polyadenylierungssignal. Dazwischen befindet sich ein für egfp kodierendes Gen. Desweiteren enthält das Plasmid ein Kanamycin bzw. Neomycin Resistenzgen.	Biosciences, Clontech, San Jose, USA
pcVpx	Expressionsplasmid für das Vpx-Protein von SIV <sub>smm</sub> PBj1.9. Basiert auf pEGFP-N1	diese Arbeit
pHAVpx	Expressionsplasmid für das Vpx-Protein von SIV <sub>smm</sub> PBj1.9. Vpx trägt N-terminal eine HA-tag. Basiert auf pEGFP-N1	diese Arbeit

pVpxCterHA	Expressionsplasmid für das Vpx-Protein von SIV <sub>smm</sub> PBj1.9. Vpx trägt C-terminal eine HA-tag. Basiert auf pEGFP-N1	diese Arbeit
pvprPrXHA	Expressionsplasmid für ein Fusionsprotein aus dem N-terminalen Bereich (AS 1-73 von 96) von HIV-1 Vpr und Vpx von SIV <sub>smm</sub> PBj1.9 mit einer dazwischen liegenden HIV-Protease Schnittstelle und einem C-terminalen HA-tag am Vpx. Basiert auf pEGFP-N1.	diese Arbeit

<b>Klonierungsvektoren und Subklone</b>		
<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Aufbau</b>	<b>Bezugsquelle/ Literatur</b>
pcDNA3.1(+)	Das Plasmid enthält einen Cytomegalovirus Promotor und ein BGH Polyadenylierungssignal. Dazwischen liegt eine MCS. Desweiteren enthält das Plasmid ein Ampicilin bzw. Neomycin Resistenzgen.	Invitrogen, Carlsbad, USA
pZeoSV2(+)	Das Plasmid enthält einen SV40 Promotor und ein BGH Polyadenylierungssignal. Dazwischen liegt eine MCS. Desweiteren enthält das Plasmid ein Zeocin Resistenzgen.	Invitrogen, Carlsbad, USA
pZeoΔvif	Das Plasmid basiert auf pZeoSV2(+) und kodiert für Sequenzen aus pPBj1.9 mit einer Mutation im <i>vif</i> Start ATG.	Wolfrum, N. (2001)
pZeoΔvpx	Das Plasmid basiert auf pZeoSV2(+) und kodiert für Sequenzen aus pPBj1.9 mit einer Mutation im <i>vpx</i> Start ATG.	Wolfrum, N. (2001)
pZeoΔvpr	Das Plasmid basiert auf pZeoSV2(+) und kodiert für Sequenzen aus pPBj1.9 mit einer Mutation im <i>vpr</i> Start ATG.	Wolfrum, N. (2001)

Env-deletierte Proviren		
Name	Eigenschaften/Aufbau	Bezugsquelle/ Literatur
pPBj $\Delta$ env	Volllängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen.	Mühlebach und Wolfrum <i>et al.</i> , 2005
pPBj $\Delta$ E.EGFP7	Volllängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen und einem an dieser Stelle inseriertem <i>egfp</i> -Gen unter Kontrolle eines CMV Promotors.	Mühlebach und Wolfrum <i>et al.</i> , 2005
pNL <sub>4-3</sub> $\Delta$ env	Volllängen Genom des HIV-1 NL4-3 mit einer 1,2 kb großen Deletion im env-Leserahmen.	Mühlebach und Wolfrum <i>et al.</i> , 2005
pNL <sub>4-3</sub> .luc.R <sup>-</sup> E <sup>-</sup>	Genom des HIV-1 NL4-3 mit Leserahmenverschiebung im vpr- und env-Gen. Luciferase-Reporter gen im nef-Leserahmen.	Flory (PEI)/ Connor <i>et al.</i> , 1995
pNL <sub>4-3</sub> $\Delta$ E.EGFP4	Volllängen Genom des HIV-1 NL4-3 mit einer 1,2 kb großen Deletion im env-Leserahmen und einem an dieser Stelle inseriertem <i>egfp</i> -Gen unter Kontrolle eines CMV Promotors.	Mühlebach und Wolfrum <i>et al.</i> , 2005
pNLp6	Basiert auf pNL <sub>4-3</sub> $\Delta$ E.EGFP4. Die gesamte p6 Region (bp 2134 - 2293) ist gegen den entsprechenden Bereich von pPBj1.9 ausgetauscht.	diese Arbeit
pNLp6LC	Basiert auf pNL <sub>4-3</sub> $\Delta$ E.EGFP4. Nur der N-terminale Bereich der p6 Domäne ist gegen die entsprechende Region von pPBj1.9 ausgetauscht.	diese Arbeit
pPBj $\Delta$ E. $\Delta$ ATGnef	Volllängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen und einer Mutation des <i>nef</i> Start ATG	Mühlebach und Wolfrum <i>et al.</i> , 2005
pPBjvif <sup>-</sup> /x <sup>-</sup> /r <sup>-</sup>	Volllängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen und Mutationen in den Start ATGs von <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i>	diese Arbeit

pPBj 4x ko	Vollängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen und Mutationen der Start ATGs von <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i> , <i>nef</i>	diese Arbeit
pPBj 4x ko EGFP	Vollängen Genom des SIVsmmPBj1.9 mit einer 1 kb großen Deletion im env-Leserahmen und einem an dieser Stelle inseriertem <i>egfp</i> -Gen unter Kontrolle eines CMV Promotors. Die Start ATGs von <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i> , <i>nef</i> sind mutiert.	Kaiser, 2004

<b>Transfervektoren und deren Vorläufer</b>		
<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Aufbau</b>	<b>Bezugsquelle/ Literatur</b>
pMG-SIdelS-βGal	Auf MLV basierender Transfektor der für β-Galaktosidase kodiert.	Steidl <i>et al.</i> , 2002
pPBjΔATG	Basiert auf pPBjΔenv. Das Start ATG von <i>gag</i> ist mutiert.	diese Arbeit
pPBjΔATG. EGFP	Basiert auf pPBjΔATG. Enthält im env-deletierten Bereich ein <i>egfp</i> -Gen unter Kontrolle eines CMV Promotors.	diese Arbeit
pPBjΔgapoEGFP	Basiert auf pPBjΔATG. EGFP. Ein 2,8 kb großer Bereich aus dem <i>gag/pol</i> -Leserahmen ist deletiert.	diese Arbeit
pPBjΔgapoac EGFP	Basiert auf pPBjΔgapoEGFP. Das 3' Ende von <i>pol</i> so wie <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i> , <i>tat</i> Exon 1 und <i>rev</i> Exon 1 sind deletiert.	diese Arbeit
pPBjΔgapoacSA	Basiert auf pPBjΔgapoac EGFP. Zwischen RRE und dem CMV Promotor des <i>egfp</i> -Gens ist ein Spleißakzeptor inseriert.	diese Arbeit
pPBj trans	Basiert auf pPBjΔgapoacSA. Deletion der Basen -1 bis 276 des <i>nef</i> Gens	diese Arbeit

<b>Verpackungskonstrukte und deren Vorläufer</b>		
<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Aufbau</b>	<b>Bezugsquelle/ Literatur</b>
pHit60	Expressionsplasmid für MLV gag/pol. Es enthält einen CMV Promotor und ein Polyadenylierungssignal, sowie einen SV40 Ori.	Kingsman (Oxford)/ Soneoka <i>et al.</i> , 1995
pPBj-pack1	Basiert auf pPBj $\Delta$ env. Anstelle der LTRs ein CMV Promotor am 5' Ende und am 3' Ende eine poly A Sequenz des bovinen Wachstumshormons, $\Delta$ 591-744	Mühlebach, 2004
pPBj pack6trac	Basiert auf pPBj-pack1. Die Gene <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i> sind deletiert.	diese Arbeit
pPBj pago	Basiert auf pPBj-pack6 trac. Neben <i>vif</i> , <i>vpx</i> , <i>vpr</i> ist auch <i>nef</i> deletiert.	diese Arbeit
pCMV 4x ko	Basiert auf pPBj 4xko. Anstelle der 5' LTR ein Promotor des CMV Promotor	diese Arbeit
pCMV pago	Wie pPBj pago. Keine Deletion im 5' Bereich.	diese Arbeit
pPBj pack	Basiert auf pCMV pago, $\Delta$ 854-912	diese Arbeit
pPsi 1	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 661-841	diese Arbeit
pPsi 2	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 701-841	diese Arbeit
pPsi 3	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 742-841	diese Arbeit
pPsi 4	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 780-841	diese Arbeit
pPsi 5	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 820-841	diese Arbeit
pPsi 6	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 701-765	diese Arbeit
pPsi7	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 655-689	diese Arbeit
pPsi8	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 655-721	diese Arbeit
pPsi9	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 655-751	diese Arbeit
pPsi10	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 655-780	diese Arbeit
pPsi11	Basiert auf pPBj pack, $\Delta$ 854-912, $\Delta$ 655-810	diese Arbeit

<b>Hüllprotein-Expressionsplasmide</b>		
<b>Name</b>	<b>Eigenschaften/Aufbau</b>	<b>Bezugsquelle/ Literatur</b>
pMD.G	Expressionsplasmid für das Glycoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Es enthält einen CMV Promotor, Sequenzen des humanen Betaglobin (Exon 2 und 3) und ein Polyadenylierungssignal.	Blömer (Kiel)/ Ory <i>et al.</i> , 1996

## 2.5 Molekularbiologische Methoden

### 2.5.1 Verwendete Puffer

TAE pH 8,0

Tris-Acetat                    40 mM

EDTA                            1 mM

6x Agarosegel Probenpuffer

Glycerin                    33 % (v/v)

Bromphenolblau            0,25 % (w/v)

### 2.5.2 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen wurde das DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurde nach Anweisungen des Herstellers verfahren. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte kurz beschrieben. Die DNA wurde aus  $1-2 \times 10^6$  Zellen isoliert. Diese Zellen wurden in einem ersten Schritt durch Proteinase K lysiert. Das Lysat wurde auf eine Silica-Gel-Säule aufgetragen. Während einer Zentrifugation wurde die DNA selektiv an das Silica-Gel gebunden, während andere Zellbestandteile durchliefen. Durch zwei Waschschrte wurden verbleibende Kontaminationen beseitigt und die gebrauchsfertige DNA wurde in H<sub>2</sub>O oder in dem mitgelieferten Puffer eluiert.

### **2.5.3 Isolierung von RNA aus viralen Partikeln bzw. Vektorpartikeln**

Zur Isolierung von RNA aus Vektorpartikeln wurde das QIAamp® UltraSens™ Virus Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurde nach Anweisungen des Herstellers verfahren. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte kurz beschrieben. Es wurde 1 ml Vektorhaltiger Zellkulturüberstand als Ausgangsmaterial eingesetzt. Diesem wurden Puffer AC und eine Träger-RNA zugefügt und nach einer kurzen Inkubation bei niedriger g-Zahl zentrifugiert, um die entstandenen Nukleinsäurekomplexe zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Puffer AR und Proteinase K aufgenommen und bei 40°C inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf eine Silica-Gel-Säule aufgetragen. Während einer Zentrifugation wurde die DNA selektiv an das Silica-Gel gebunden, während andere Zellbestandteile durchliefen. Durch zwei Waschschrte wurden verbleibende Kontaminationen beseitigt und die gebrauchsfertige DNA wurde in einem Puffer mit niedrigem Salzgehalt eluiert.

### **2.5.4 Restriktion von Plasmid DNA**

Für einen analytischen Verdau wurde max. 1 µg DNA pro Ansatz in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt. Für einen präparativen Verdau wurden max. 5 µg in einem Gesamtvolumen von 50 µl bzw. 100 µl eingesetzt. Es wurden Restriktionsendonucleasen der Firmen New England Biolabs (NEB, Schwalbach) oder Fermentas (Ontario, Kanada) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Restriktion wurde anschließend durch Auftrennung über ein Agarosegel verifiziert.

### **2.5.5 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten**

Es wurden Gele mit einem Agarosanteil zwischen 0,7% und 1,3% benutzt, je nach Größe der zu trennenden Fragmente; dabei galt > 8 kb: 0,7%, 0,8 – 8 kb: 1%, < 0,8 kb: 1,3%. Die entsprechende Menge Agarose wird in TAE-Puffer durch kurzes Aufkochen gelöst und 50 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten, wurde die enzymatisch verdaute DNA bzw. der PCR-Ansatz mit Probenpuffer versetzt, auf das Agarosegel aufgetragen und durch Anlegen von 10 – 150 V Gleichstrom über einen Zeitraum von 1-12 h getrennt. Als Referenz wurden der 1 kb- bzw. 100 bp-DNA-Marker von NEB aufgetragen.

Zur Analyse wurde das Gel unter einer UV-Lampe betrachtet und fotografisch dokumentiert bzw. zur weiteren Bearbeitung das entsprechende DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses wurde mittels dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) oder mit Jet Sorb (Genomed, Löhne) nach Angaben des Herstellers aus dem Gel isoliert.

### **2.5.6 Dephosphorylierung von DNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP)**

Zur Dephosphorylierung von DNA wurde bei dieser Arbeit die Calf Intestinal Phosphatase von New England Biolabs (NEB, Schwalbach) verwendet. Diese hydrolysiert 5'-endständige Phosphatgruppen und kann so verhindern, dass es zur Religation des linearisierten Klonierungsvektors kommt.

Die gewünschte Menge DNA wurde mit H<sub>2</sub>O auf 89 µl aufgefüllt und der Lösung 10 µl NEB-Puffer 3 und 1 µl CIP zugesetzt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend über das PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt.

### **2.5.7 Erzeugung von „glatten Enden“ durch das Klenow Fragment**

Das Klenow Fragment der DNA Polymerase I besitzt die Fähigkeit DNA-Überhänge in 5' nach 3' Richtung aufzufüllen und dadurch glatte Enden zu erzeugen.

Dazu wurden der gewünschten Menge DNA 10 µl EcoPol-Puffer, 4mM dNTPs, 5 Units Klenow zugesetzt und auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und für 15 min bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung über das PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden).

### **2.5.8 DNA-Reinigung**

Um DNA aus enzymatischen Reaktionsansätzen bzw. PCR-Produkte zu Reinigen wurde das PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) benutzt und nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reinigung erfolgt durch die Bindung der DNA an ein Trägermaterial, welches in Form einer Säule vorliegt. Andere Substanzen wie Enzyme oder im Puffer enthaltene Bestandteile können nicht von der Säule gebunden werden und. Nach zwei Waschschrinen wird die DNA

durch Zugabe von H<sub>2</sub>O von der Säule gelöst und liegt dann ohne weitere Verunreinigungen vor.

### 2.5.9 Konzentrationsbestimmung der von Nukleinsäuren

Die photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration beruht auf der Absorption von Licht der Wellenlänge 260 nm durch die aromatischen Ringe der Basen von Nukleinsäuren. Die Extinktion wurde in einer Quarzküvette im Photometer bestimmt und die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$c[\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times V \times F$$

E = Extinktion

c = Konzentration

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA, 33 für ssRNA)

Über das Verhältnis  $E_{260}/E_{280}$  kann eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung gemacht werden, da das Absorptionsmaximum der aromatischen Aminosäurereste von Proteinen bei 280 nm liegt. Für eine reine DNA-Lösung ist der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  1,8.

### 2.5.10 Ligation

Zum Ligieren von zwei DNA-Fragmenten wurden immer mehrere Ansätze vorbereitet, bei denen unterschiedliche Verhältnisse von Vektorrückgrat und „Insert“ eingesetzt wurden, wobei grundsätzlich die Menge an „Insert“ überwog. Die Menge an eingesetzter DNA betrug zwischen 200 und 500 ng in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Als Negativkontrollen dienten ein Ansatz in dem nur das Vektorrückgrat ohne „Insert“ eingesetzt wurde und ein Ansatz mit Vektorrückgrat und „Insert“ aber ohne Ligase. Es wurden pro Ansatz 400 Units T4 DNA-Ligase von NEB (Schwalbach) verwendet und über Nacht bei 14°C bzw. 16°C inkubiert. Die Hälfte des Ligationsansatzes wurde für eine Transformation von Bakterien eingesetzt.

### 2.5.11 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Amplifikation und anschließenden Klonierung von bestimmten DNA-Fragmenten, wurde mit der *PfuUltra*<sup>TM</sup> DNA Polymerase von Stratagene gearbeitet. Diese Polymerase ist eine genetisch veränderte Variante der *Pfu* Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, die dadurch eine extrem geringe Fehlerrate hat. Bei der Amplifikation eines 500 bp großen Fragments treten bei nur 0,5% der Produkte Fehler auf. Des Weiteren ist diese Polymerase auch dazu in der Lage, lange DNA-Fragmente zuverlässig zu amplifizieren. Die für die PCR benötigten Desoxyribonukleotide wurden von der Firma Sigma bezogen. Von diesen wurde eine Stammlösung angesetzt die je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP enthält. Die Reaktion wurde in dünnwandigen PCR-Gefäßen in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt:

Denaturierung	95°C	2 min	} 20-30 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 sec	
Primer-Anlagerung	50-60°C	30 sec	
Elongation	72°C	30-90 sec	
Elongation	72°C	10 min	
	-2°C	unendlich	

Standartansatz:

10-50 ng Plasmid-DNA  
 10 mM Desoxynucleotide  
 10 pmol Plus-Primer  
 10 pmol Minus-Primer  
 10 µl PCR-Puffer  
 0,5 µl *PfuUltra*<sup>TM</sup> (1,25 Units)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

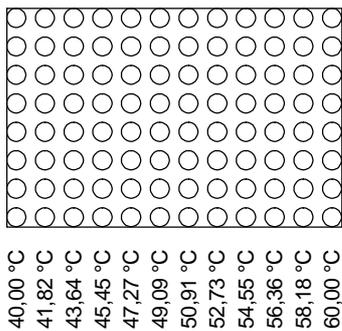
Bei dem gewählten Protokoll ist zu beachten, dass die Temperatur der Primer-Anlagerung von den gewählten Primern abhängt und die Elongationszeit von der Größe des zu amplifizierenden Fragments abhängig ist.

Wurde die PCR nicht zur Amplifikation bestimmter Fragmente aus Plasmid-DNA verwendet, sondern zum Nachweis bestimmter Plasmid-Sequenzen in zellulärer DNA, so wurden nicht

die Polymerase PfuUltra™ verwendet, sondern die Taq DNA Polymerase. Die PCR-Bedingungen wurden zunächst durch eine Gradienten-PCR optimiert. Dabei werden 12 identische Proben in einem Gerät zeitgleich 12 unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen ausgesetzt. Die Reaktion wurde in dünnwandigen PCR-Gefäßen in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen für die Gradienten PCR wurden wie folgt gewählt:

Denaturierung	95°C	2 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95°C	45 sec	
Primer-Anlagerung	40-60°C	45 sec	
Elongation	72°C	3 min	
Elongation	72°C	10 min	
	-2°C	unendlich	



**Abb. 2.1 Schematische Darstellung des PCR-Blocks.** Angegeben sind die Temperaturen je Spalte.

Die Ansätze waren wie folgt:

10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 500 ng genomische DNA

10 mM Desoxynucleotide

10 pmol Plus-Primer

10 pmol Minus-Primer

10 µl PCR-Puffer

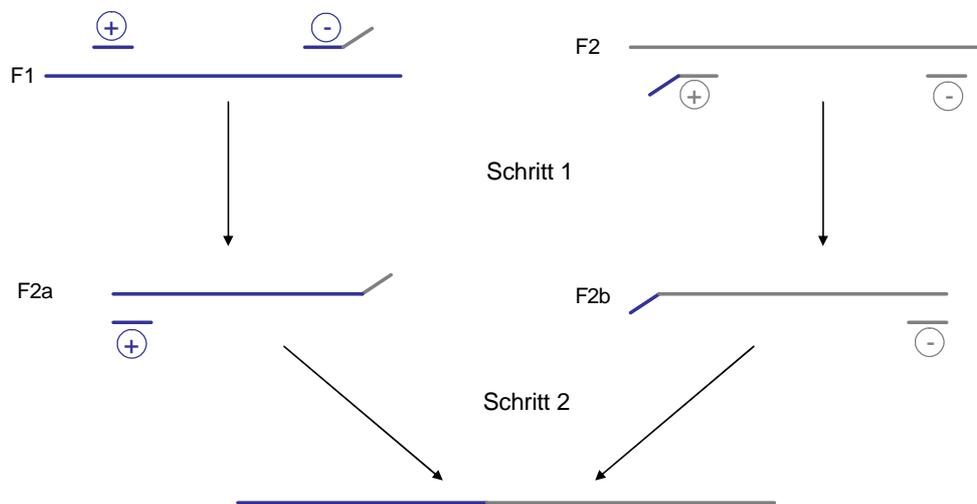
0,5 µl Taq (1,0 Units)

ad 50 µl H<sub>2</sub>O

### 2.5.12 Fusions-PCR

Die Fusions-PCR stellt eine spezielle Variante der PCR dar, bei der zwei DNA-Fragmente aneinander fusioniert werden können. Eine schematische Darstellung dieser Strategie ist in Abb. 2.2 gezeigt.

Sie besteht im Wesentlichen aus zwei Amplifikationsschritten, wobei im ersten Schritt die zu fusionierenden Fragmente hergestellt werden. Hierfür werden die Primer so gewählt, dass zur Generierung von Fragment F2a das 3'-Ende des Minus-Primers komplementär zum 5'-Bereich von Fragment F2 ist und zur Amplifikation von Fragment F2b muss das 5'-Ende des



**Abb. 2.2 Schematische Darstellung einer Fusions-PCR.** Amplifikation der Fragmente F1 und F2 mit anschließender Fusion der entstandenen Fragmente F2a und F2 (+ Vorwärts-Primer (- Rückwärts-Primer)

Plus-Primers komplementär zum 3'-Bereich von F1 sein. Nach dieser ersten PCR liegen zwei Fragmente vor, die jeweils einen Überhang haben der zu einem Teil des anderen Fragments komplementär ist. In einem zweiten Schritt werden diese Fragmente (F2a und F2b) durch die Verwendung der beiden äußeren Primer fusioniert. Dies ist möglich, da sich die komplementären Bereiche der beiden Fragmente aneinander lagern.

### 2.5.13 Reverse Transkriptions-PCR

Dies ist ein Verfahren zum Umschreiben und anschließenden Amplifizieren von RNA. Es wurde mit dem OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) gearbeitet. Bei diesem Kit laufen Reverse Transkription und PCR in einem Schritt ab, da der enthaltene Enzym-Mix sowohl

die Reverse Transkriptase als auch eine Taq-Polymerase enthält. Das PCR-Programm wurde so gewählt, dass zunächst die Reverse Transkription abläuft und erst anschließend die Taq-Polymerase durch eine Temperaturerhöhung aktiviert wurde, um dann die Amplifikation der nun vorhandenen DNA zu gewährleisten. Die Reaktion wurde in dünnwandigen PCR-Gefäßen in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research) durchgeführt.

Im Folgenden sind ein Standardansatz und das verwendete PCR-Programm angegeben.

2-4 µl RNA  
 10 mM Desoxynucleotide  
 3,3 mM Plus-Primer  
 3,3 mM Minus-Primer  
 10 µl PCR-Puffer  
 10 µl Q-Solution  
 0,5 µl Enzym-Mix (1,0 Units)  
 ad 50 µl H<sub>2</sub>O

Reverse Transkription	50°C	30 min	
Denaturierung	95°C		
Denaturierung	95°C		} 30 Zyklen
Primer-Anlagerung	55°C		
Elongation	72°C		
Elongation	72°C		
	-2°C	unendlich	

In dieser Arbeit verwendete Primer

Klonierung von pPBjvif<sup>+/x</sup>/r<sup>-</sup>

Bcl(+)	5'-GAAAGATTAGTCAATATGATCACCACAGAAC-3'
vif/vpx(+)	5'-CTTGCTTTTCAGAGGGAGAAGTACGAAGGG-3'
vif/vpx(-)	5'-CCCTTCGTA CTCTCCCTCTGAAAAGCAAG-3'
vpx/vpr(+)	5'-CAGTCAGCTACACTAAATACAGATACTTGTGC-3'
vpx/vpr(-)	5'-GCACAAGTATCTGTATTTAGTGTAGCTGACTG-3'
Bst(-)	5'-CTTATTAGTTCCCGTATACCATAGAATACTG-3'

## Klonierung der Vpx-Expressionskonstrukte

## pVpx

vpxEco(+) 5'-CCGGAATTCGAGCCATGTCAGATC-3'

vpxXhoII(-) 5'-CCGCTCGAGTCATTATGTCC-3'

## pHAvpx

EcoHA(+) 5'-CCCATGAATTCATGTATCCATATGATGTTCCAGATT  
ATGCTTCAGATC CCAGGGAGAG-3'

XhoHA(-) 5'-CCGATCTCGAGTGGGGCTTCATCTTATGGAGGTC-3'

## pvpxCterHA

CEcoHA(+) 5'-CCCATGAATTCGCCATGTCAGATCCCAGGGAGAG-3'

CXhoHA(-) 5'-GGTCTCGAGTTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATATGCTAGTC  
CTGGAGGGGGAG-3'

## pVprPrXHA

EcoVpr(+) 5'-GCTCGTAAGCGGCCGCATGGAACAAGCCCCAGAAGACCAAGGG-3'

VprLC(-) 5'-GTTCTGCACTATAGGGTAATTTGGCTGACGAAATGGATAAACAGCA  
GTTGTTGCAGAATTCTTA-3'VpxLC(+) 5'-GTCAGCCAAAATTACCCTATAGTGCAGAACTCAGATCCCAGGGAGA  
GAATCCCACCTGG-3'XhoVpx(-) 5'-GATCTCGAGTTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATATGCTAGTC  
CTGGAGGGGGAGGAGG-3'

## Klonierung der p6-Austauschkonstrukte

## pNLp6

SpeB(+) 5'-CAAGGGGAAGTGACATAGCA-3'

p6D(-) 5'-CCATGGGGAAATTGCCTGGCCTTCCCTTGTG-3'

p6D(+) 5'-CACAAGGGGAAGGCCAGGCAATTTCCCATGG-3'

p6revB(-) 5'-CCCTATCTTTATTGGTCTTCTCC-3'

p6revB(+) 5'-GGAGAAGACCAATAAAGATAGGG-3'

Sbf(-) 5'-GTTTTAACCTGCAGGATGTGG-3'

## pNLp6LC

Spe(+) 5'-GGAACTACTAGTACCCTTCAGGAAC-3'

HIVp6(-) 5'-GTAATTCTTCAGAAACCTGAAGCTCTCTTCTGG-3'

p6LC(+) 5'-GAGCTTCAGGTTTCTGAAGAATTACATGAAGATGG-3'

p6LC(-) 5'-GTTGTCTCTTCCCCGAGGTGCAGCAAATCCTCCGTTAC-3'  
 HIVp6(+) 5'-TTTGCTGCACCTCGGGGAAGAGACAACAACACTC-3'  
 Sbf(-) 5'-GTTTTAACCTGCAGGATGTGG-3'

Klonierung der Transfervektoren

Klonierung von pPBj $\Delta$ ATG

Kas(+) 5'-CCTAGCAGGTTGGCGCCCCGAACAGG-3'  
 Mut1(+) 5'-GAGTAGGAGAGTGGGAGACGGGCGCGAGAAACTCCGTC-3'  
 Mut1(-) 5'-GACGGAGTTTCTCGCGCCCGTCTCCCACTCTCCTACTC-3'  
 Dra(-) 5'-CCTTTGCCACTAGGTGGCGCTGTTGG-3'

Klonierung von pPBj $\Delta$ gapoacSA

SA(+) 5'-CCAAATGACCTGCGCTTGGTAACTATATCTATGATAGACATGGAGAC  
 ACCCTTGAAGGAG-3'  
 SA(-) 5'-CTCCTTCAAGGGTGACTCCATGTCTATCATAGATAT AGTTACCAAG  
 CGCAGCTTGG-3'

Klonierung von pPBj trans

BsaBI(+) 5'-GCTTATGTTTCAGCAGATCCCTATCC-3'  
 Sbf(-) 5'-CCTGCAGGCTGTAGGTAGGCTATCTGAACTC-3'  
 Sbf(+) 5'-CCTGCAGGCTGACTTAGTAGGTTGTCC-3'  
 Not(-) 5'-CACCGCGGTGGCGGCCGCTC-3'

Klonierung von pPBj SIN

SinII(+) 5'-GCTTATGTTTCAGCAGATCCC-3'  
 SINA(-) 5'-CCTGCTGTGCGAGACATGTCTATTGCC-3'  
 SinLC(+) 5'-CAATAGACATGTGCGACAGCAGGGACTTTCC-3'  
 Not(-) 5'-CACCGCGGTGGCGGCCGCTC-3'

Klonierung der Verpackungskonstrukte

Klonierung von pPBj pack6trac

BsrG-pack(+) 5'-GGACTTGGCAAATGGACTGTACACACCTAGAG-3'  
 fus-pack(+) 5'-CTCATCAAACACCACCGGTCCAGAAGATGAAGC-3'  
 fus-pack(-) 5'-GCTTCATCTTCTGGACCGGTGGTGTGTTGATGAG-3'  
 Bst-pack(-) 5'-GTTTCAGTCTTATTAGTTCCCGTATACCATAGAATAC-3'

## Klonierung von pPBj pago

vorNot(+) 5'-GGAAGAAGCACAAATTCAGC-3'  
 neffusII(+) 5'-CTACCTACAGGCTAAGACAGC-3'  
 neffusII(-) 5'-GCTGTCTTAGCCTGTAGGTAG-3'  
 nBsmII(-) 5'-CGGTGGCGGCCGCTC-3'

## Klonierung von pCMV 4x ko

CMV(+) 5'-CGATAAGCTTCGATGTACGGGCCAG-3'  
 CMVrevC(-) 5'-GATTTTCCTGCCTCGCCCTATAGTGAGTCG-3'  
 CMCrevC(+) 5'-CGACTCACTATAGGGCGAGGCAGGAAAATTC-3'  
 SDGAGII(-) 5'-GGGAGTGCAGCCTTCTGATAGCGCTTG-3'

Klonierung von pPBjpack $\Delta$ 854-912

CMVSDIb(+) 5'-CGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCG-3'  
 CMVSDIIa(-) 5'-GCTAGCACTTACCTGCAACCGGAGGCCTCTCCG-3'  
 SDGAGNhe(+) 5'-GCAGGTAAGTGCTAGCGATGGGCGCGAGAAAC-3'

## Klonierung von pPsi1-pPsi11

Hind(+) 5'-CGACGGTATCGATAAGCTTCG-3'  
 Psi1(-) 5'-GCACTTACCTGCCCCGGGTATTAATTTTCGATAAGCC-3'  
 Psi2(-) 5'-GCACTTACCTGCCCCGGGTCCCTGTTTCGGGC-3'  
 Psi3(-) 5'-GCACTTACCTGCCCCGGGCCTTCACTCAGCCGTAC-3'  
 Psi4(-) 5'-GCACTTACCTGCCCCGGGAGCACTCCGTCGTG-3'  
 Psi5(-) 5'-GCACTTACCTGCCCCGGGCCGCTCCTCACTCC-3'  
 Psi6(-) 5'-CTCCGTCGTGCCCCGGGTCCCTGTTTCGGGC-3'  
 Psi6(+) 5'-GAACAGGGACCCGGGCACGACGGAGTGCTCC-3'  
 Psi7(+) 5'-TTAATACCCGGGCCGAACAGGGACTTGAAG-3'  
 Psi8(+) 5'-TTAATACCCGGGCTGAGTACGGCTGAGTGAAG-3'  
 Psi9(+) 5'-TTAATACCCGGGCGGCAGGAACAAACCACG-3'  
 Psi10(+) 5'-TTAATACCCGGGCTATAAAGGCGCGGGCCG-3'  
 Psi11(+) 5'-TTAATACCCGGGGTGAGGAGCGGGAGTCGG-3'  
 CMV(-) 5'-CCCGGGTATTAATTTTCGATAAGCCAGTAAGC-3'  
 SD(+) 5'-GCAGGTAAGTGCTAGCGATGGGCG-3'  
 Eco47(-) 5'-GAGTGCAGCCTTCTGATAGCGCTTG-3'

Analyse von replikationskompetenten bzw. rekombinierten Vektoren

LTR(+)	5'-CCAGTGTGTGTTCCCATCTCTCC-3'
CMV(+)	5'-CCACTTGGCAGTACATCAAGTG-3'
gag(-)	5'-GTAGATCCACAGCTGGATCCTCTG-3'
gag(+)	5'-GCTGCTGATTGGGATTTACAACACC-3'
EGFP(-)	5'-CACCTCGGCGCGGGTCTTGTAG-3'

## 2.6 Mikrobiologische Methoden

### 2.6.1 Verwendete Puffer und Medien

LB-Medium

Bacto-Trypton	10 g/l
Bacto-Hefeextrakt	10 g/l
NaCl	10 g/l

S.O.C.-Medium

Bakto-Trypton	2,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM

TFB1-Puffer

Kaliumacetat	30 mM
RbCl	100 mM
CaCl <sub>2</sub> /H <sub>2</sub> O	10 mM
MnCl <sub>2</sub> /4H <sub>2</sub> O	50 mM
Glycerol	15 mM

mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert

→ auf 500 ml auffüllen

## TFB2-Puffer

MOPS 10 mM

CaCl<sub>2</sub> 75 mMRbCl<sub>2</sub> 10 mM

Glycerol 15 mM

mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert

→ auf 100 ml auffüllen

## 2.6.2 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> TOP 10 F'	F' { <i>lacI<sup>q</sup></i> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} <i>mcrA</i> , Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> TOP 10	F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10B	F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>ara</i> Δ139 Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU</i> <i>galK</i> λ <sup>-</sup> <i>rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	F' Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>hsdR17</i> ( <i>r<sub>k</sub><sup>-</sup></i> , <i>m<sub>k</sub><sup>+</sup></i> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> <i>relA1</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> GM2163	<i>dam13::Tn9</i> (Cam <sup>R</sup> ) <i>dcm-6</i> <i>hsdR2</i> <i>leuB6</i> <i>hisG4</i> <i>thi-1</i> <i>ara-14</i> <i>lacY1</i> <i>glnV44</i> <i>galK2</i> <i>galT22</i> <i>xylA5</i> <i>mtl-1</i> <i>rpsL136</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>tsx78</i> <i>mcrA</i> <i>mcrB1</i> <i>fhuA31</i> <i>rfbD1</i> R( <i>zgb210::Tn10</i> ) TetS <i>endA1</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> Stable2	F' <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>lon</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>supE44</i> <i>relA1</i> λ <sup>-</sup> Δ ( <i>lac-proAB</i> )	Invitrogen

### **2.6.3 Herstellung kompetenter Bakterien durch chemische Modifikation**

Es wurden 5 ml LB-Medium mit dem gewünschten Bakterienstamm angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 2,5 ml der „über Nacht Kultur“ angeimpft. Die Bakterien wurden so lange unter schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine Dichte von  $OD_{550}$  von 0,5 bis 0,55 erreicht war. Die Bakteriensuspension wurde 5 min auf Eis gestellt und anschließend auf je 50 ml aufgeteilt. Diese wurden zentrifugiert (6000 upm, 4°C, 10 min) und das Pellet in je 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakteriensuspensionen wurden erneut zentrifugiert (6000 upm, 4°C, 10 min) und das Pellet in je 2 ml TFB2-Puffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die nun chemisch kompetenten Bakterien wurden in 100 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

### **2.6.4 Transformation kompetenter Bakterien**

Um Plasmid DNA in Bakterien einzubringen, wurden 100 µl kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend in ein Polypropylen-Röhrchen überführt. Zu den Bakterien wurde die betreffende Plasmid DNA pipettiert und durch Rühren gemischt. Es folgte eine Inkubation von 1 h auf Eis. Danach wurde die Bakteriensuspension für 45 sek. bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Nach Zugabe von 500 µl S.O.C.-Medium wurden die Bakterien je nach transformiertem Plasmid für 1 h bei 37°C oder für 3 h bei 25°C geschüttelt und anschließend auf Agarplatten ausgestrichen und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. War die Transformation erfolgreich, konnten nach 24 h bzw. 48 h Kolonien von der Agarplatte „gepickt“ werden.

### **2.6.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Um Plasmid-DNA aus Bakterien zu isolieren, wurden 5 ml bzw. 200 ml LB-Medium, welches das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielt, mit Bakterien angeimpft. Dies erfolgte entweder durch das „picken“ einer Kolonie von einer Agarplatte oder durch das Überimpfen einer Bakterienkultur oder ausgehend von einem Bakterien-Glycerin-Stock. Die Bakterienkultur wurde dann für 24 h bei 37°C bzw. für 48 h bei 25°C im Schüttler inkubiert. Sollte ein Bakterien-Glycerin-Stock angelegt werden, wurden aus der dichtgewachsenen Bakterienkultur 800 µl entnommen und mit 200 µl Glycerin gemischt und anschließend bei -80°C gelagert. Die DNA Isolierung erfolgte Hilfe des Qiagen Plasmid Purification Kits

(Qiagen, Hilden). Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers zur Mini-DNA-Präparation (für eine Bakterienkultur von 5 ml) oder zur Maxi-DNA-Präparation (für eine Bakterienkultur von 200 ml) gearbeitet. Nach Beendigung der Aufreinigung wurde die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und die DNA bei -20°C gelagert.

## 2.7 Zellbiologische Methoden

### 2.7.1 Verwendete Puffer und Medien

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)  
(Dulbecco et al., 1959; Smith et al., 1963)

RPMI-1640  
(Moore et al., 1967)

CellGro® DC Medium (CellGenix, Freiburg)

OptiMEM1 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)

Einfriermedium

DMSO                    10% (v/v)

FKS                        20% (v/v)

in DMEM bzw. RPMI-1640

Dynal-Puffer

EDTA                     2 mM

BSA                       0,1% (w/v)

in PBS

HBSS-Puffer (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA)

KCl                        5,33 mM

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                0,44 mM

NaHCO<sub>3</sub>               4,17 mM

NaCl                      137,93 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>              0,34 mM

## MACS-Puffer

EDTA	2 mM
BSA	0,5% (w/v)
in PBS	

## PBS

NaCl	137,0 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM

## STE-Puffer (pH 8,0)

Tris-Cl	10,0 mM
NaCl	0,1 mM
EDTA	1,0 mM

## 2.7.2 Zelllinien

Name	Charakterisierung	Literatur/ Bezug
293T	humanen embryonalen Nierenzelllinie, transformiert mit dem „large T antigen“	DuBridge <i>et al.</i> , 1987
Alpha-1	humane diploide Fibroblasten	Neumann-Häfelin <i>et al.</i> , 1983 (Univ. Freiburg)
Ghost CXCR4	humane Osteosarkomzelllinie; stabil transformiert mit huCD4-Rezeptor und huCXCR4 Korezeptor; Tat-abhängige GFP-Expression	Owen <i>et al.</i> , 1998
HT1080	humanen Fibrosarkomzelllinie	ECACC No 85111505
NIH 3T3	murinen, embryonale Fibrosarkomzelllinie	ATCC Nr.: CRL-1658 Jainchill <i>et al.</i> , 1969
N2a	murine Neuroblastomzelllinie	ATCC Nr.: CCL-131 Olmsted <i>et al.</i> , 1970
CV-1	simiane (Afrikanische Grüne Meerkatze, <i>Cercopithecus aethiops</i> ) Fibroblasten der Niere	ATCC Nr.: CCL-70 Jensen <i>et al.</i> , 1964
Frhl-2	simiane (Rhesus Affe, <i>Macaca mulatta</i> ) Fibroblasten der Lunge	ATCC Nr.: CL-160 Petriccioni <i>et al.</i> , 1977

## 2.7.3 Kultivierung von adhärennten Zelllinien

Alle verwendeten adhärennten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% komplementinaktiviertem (30 min, 56°C) fötalem Kälberserum (FKS), 2 mM

L-Glutamin und den Antibiotika Streptomycin (100 Einheiten/ml) und Penicillin (50 µg/ml) kultiviert. Für die GHOST Zelllinie wurden dem Medium zusätzlich Neomycin (100 µg/ml), Hygromycin (100 µg/ml), Puromycin (1 µg/ml) und Genticin (G418; 500 µg/ml) zugesetzt. Die Zellen wurden in einem Inkubator (Cytoperm, Heraeus) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% Wasserdampf kultiviert.

Zwei mal pro Woche wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:20 ausgedünnt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde so viel 1 mM EDTA (in PBS) zugegeben, dass die Zellen davon bedeckt waren und für 5 min bei 37°C inkubiert. Die noch nicht gelösten Zellen wurden durch sanftes schütteln abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in Medium aufgenommen und 1/20 der Lösung wurde zur Weiterkultivierung verwendet wohingegen der Rest verworfen wurde. Die Zellsuspension wurde mit frischem Medium auf das Ausgangsvolumen aufgefüllt und weiter kultiviert. Nach maximal 25 Passagen wurden die Zellen entsorgt.

### **2.7.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen**

Zur Lagerung von Zellen wurden diese eingefroren. Adhärenente Zellen wurden dazu wie beschrieben abgelöst; Suspensionszellen konnten direkt benutzt werden. Nach einer Zentrifugation (10 min, 250 x g, 4°C) wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 250 x g, 4°C). Die Zellen wurden auf Eis in Einfriermedium resuspendiert (5 x10<sup>6</sup>/1,5ml Einfriermedium) und als 1,5 ml Aliquots in einem Einfriergerät (Cryo Container, Nalge Nunc International, USA) 24 h bei -80°C gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt.

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension unmittelbar nach dem Auftauen in 30 ml PBS überführt und zentrifugiert (10 min, 250 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde anschließend in frischem Medium resuspendiert.

### **2.7.5 Zellzyklus-Arretierung von adhärenenten Zellen**

#### **2.7.5.1 Arretierung in G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus**

Zur Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus, wurden die Zellen (Ghost CXCR4, Alpha-1) in einer Dichte ausgesät, dass sie nach 24 h zu ca. 90% dicht gewachsen waren. Dann

wurde das Medium durch Aphidicolin-haltiges (10 µg/ml) Medium ersetzt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert.

#### **2.7.5.2 Arretierung in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus**

Um die Ghost CXCR4 Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase zu arretieren, wurden die konfluent gewachsenen Zellen in DMEM Medium kultiviert, welches 0,3% FKS enthält. Nach drei Tagen Inkubation wurden diesem Medium 200 mM Ethanol zugesetzt und die Zellen für weitere 24 h inkubiert.

Zur Arretierung der Alpha-1 Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase lies man diese dicht wachsen und kultivierte sie dann in DMEM Medium mit 0,3% FKS für 21 Tage.

#### **2.7.6 Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cells, PBMC)**

Als Ausgang zur Gewinnung von PBMCs diente Spenderblut, das als Gerinnungshämmer Citrat enthält oder buffy coats (DRK-Blutspendedienst, Frankfurt a. M., Germany). Das Spenderblut wurde unverdünnt eingesetzt, ein *buffy coat* wurde 1:2 mit PBS verdünnt. In 50 ml Röhrchen (BD Falcon, New Jersey, USA) wurden 15 ml 25°C warmes Ficoll Histopaque®-1077 vorgelegt und dann mit maximal 25 ml Blut überschichtet und zentrifugiert (35 min, 400 x g ohne Bremse, 20°C). Die PBMC sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase zwischen Überstand (Plasma/ Thrombozyten) und Ficoll-Histopaque®-1077 an. Das Zellsediment bildeten Erythrozyten und Granulozyten, die eine höhere Dichte besitzen. Handelte es sich um unverdünntes Blut, wurde die Plasmaphase abgenommen, 30 min bei 56°C komplementinaktiviert und steril filtriert. Bei einem verdünnten buffy coat, wurde die obere Phase verworfen. Der darunter liegende Lymphozyten Ring wurde vorsichtig abgenommen und in 30 ml PBS überführt und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 20°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert (15 min, 200 x g, 20°C). Zur Lyse der evtl. noch vorhandenen Erythrozyten, wurde das Pellet in 5 ml 0,86% NH<sub>4</sub>Cl aufgenommen und 10 min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert (10 min, 200 x g, 20°C). Daraufhin folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellen in Medium bzw. dem jeweils zur Weiterverarbeitung benötigten Puffer aufgenommen.

## **2.7.7 Isolierung und Kultivierung von humanen Monozyten**

### **2.7.7.1 Isolierung durch magnetische Zell-Separierung mit MACS**

Zur Isolierung von Monozyten wurde u.a. mit dem Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) gearbeitet. Alle Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei 4°C ausgeführt. Zunächst wurde die Anzahl der zuvor isolierten PBMCs bestimmt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 30 µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließende wurden je 10µl FcR-Blocking Reagent und der Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben, gut gemischt und 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 30 µl MACS-Puffer und 20 µl Anti-Biotin Micro Beads zugegeben, gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgt die Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer und eine Zentrifugation (10 min, 300 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde durch einen Separationsfilter auf die zuvor mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrierte MACS-LS Säule gegeben. Es wurde mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült und das Eluat aufgefangen. Die darin enthaltenen Monozyten wurden gezählt und Proben für eine FACS Analyse entnommen.

### **2.7.7.2 Isolierung durch magnetische Zell-Separierung mit Dynabeads®**

Zur Isolierung mit dem Dynal® Monocyte Negative Isolation Kit (DynaL Biotech Ltd, Bromborough, UK), wurden  $1 \times 10^7$  Zellen der zuvor isolierten PBMC in 100 µl Dynal-Puffer aufgenommen und in ein 5 ml Polystyrolröhrchen überführt. Nachdem je 20 µl Blocking-Reagenz und Antikörper-Mix dazugegeben wurden, wurde für 20 min bei 4°C unter leichtem Rotieren inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Dynal-Puffer zugefügt und zentrifugiert (8 min, 500 x g, 4°C). Die Zellen wurden in 900 µl Dynal-Puffer resuspendiert und 100 µl der zuvor gewaschenen Dynabeads® wurden dazugegeben und für 15 min bei 4°C unter leichtem Rotieren inkubiert. Die dabei entstandenen Rosetten wurden durch vorsichtiges Pipettieren gelöst. Nach der Zugabe von 1 ml Dynal-Puffer wurde das Röhrchen für 4 min in den Dynal MPC®-1 Magneten gesetzt. Während das Röhrchen noch in dem Magneten stand, wurde die Flüssigkeit mit den darin enthaltenen Monozyten abgenommen. Die darin enthaltenen Zellen wurden gezählt und Proben für eine FACS Analyse entnommen.

### **2.7.8 Differenzierung humaner Monozyten zu Makrophagen**

Zur Kultivierung wurden  $1 \times 10^6$  Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät bzw.  $1 \times 10^5$  Zellen pro Loch einer 24-Loch-Platte. Die Zellen wurden in RPMI-1640 mit 10% komplementinaktiviertem (30 min,  $56^\circ\text{C}$ ) autologem Plasma und 0,5% komplementinaktiviertem FKS kultiviert. Die Zellen konnten so ohne einen weiteren Mediumwechsel bis zu 3 Wochen in einem Inkubator ( $37^\circ\text{C}$ , 7%  $\text{CO}_2$ , 96% Wasserdampf) kultiviert werden.

### **2.7.9 Differenzierung von humanen Monozyten zu Dendritischen Zellen**

Zur Kultivierung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 2 ml CellGro® mit 20 ng/ml IL-4 und 100 ng/ml GM-CSF pro Loch einer 12-Loch-Platte ausgesät, wobei maximal 8 Löcher benutzt wurden und die restlichen mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt wurden, um eine möglichst hohe Luftfeuchtigkeit zu gewähren. Nach drei Tagen waren die Zellen zu unreifen Dendritischen Zellen differenziert. Um sie zu reifen Dendritischen Zellen weiter zu differenzieren, wurde das Medium durch CellGro® mit 20 ng/ml  $\text{TNF}\alpha$  und 10 ng/ml IL- $1\beta$  ersetzt und für 24 h weiter kultiviert.

### **2.7.10 Isolierung humaner T-Zellen**

Zur Isolierung von T-Zellen wurde mit dem  $\text{CD4}^+$  T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) gearbeitet. Alle Arbeiten wurden auf Eis bzw. bei  $4^\circ\text{C}$  ausgeführt. Zunächst wurde die Anzahl der zuvor isolierten PBMCs bestimmt.  $1 \times 10^7$  Zellen wurden in 40  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  des Biotin-Antikörper-Cocktail zugegeben, gut gemischt und 10 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Danach wurden 30  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  Anti-Biotin Micro Beads zugegeben, gemischt und 15 min bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. Es folgte die Zugabe von 1-2 ml MACS-Puffer und eine Zentrifugation (10 min,  $300 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$ ). Das Zellpellet wurde in 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer aufgenommen. Zwischenzeitlich wurde eine MACS-LS Säule mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Die Zellsuspension wurde durch ein Separationsfilter auf die Säule gegeben. Es wurde mit 3 x 3 ml MACS-Puffer gespült und das Eluat aufgefangen. Die darin enthaltenen T-Zellen wurden gezählt und Proben für eine FACS Analyse entnommen.

Sollten die T-Zellen nicht weiter stimuliert werden, wurden sie in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro ml Medium in RPMI mit 10% komplementinaktiviertem FKS, 2 mM L-Glutamin und

den Antibiotika Streptomycin (100 Einheiten/ml) und Penicillin (50 µg/ml) kultiviert. Die Stimulierung wurde durch zwei unterschiedliche Methoden erreicht.

### **2.7.11 Stimulierung humaner T-Zellen**

#### **2.7.11.1 Stimulierung mit Phythämagglutinin (PHA) und IL-2**

Die Zellen wurden in einer Dichte von  $2 \times 10^6$ /ml RPMI Medium mit 10% FKS, 1 µg/ml PHA und 15 U/ml IL-2 kultiviert. Nach 24 h wird das Medium ersetzt durch nur noch IL-2-enhaltendes RPMI Medium mit 10% FKS.

#### **2.7.11.2 Stimulierung mit anti CD3- und anti CD28-Antikörpern**

24 h vor dem Aussäen der Zellen wurden in jedes Loch einer 6-Loch-Platte je 10 µg/ml anti CD3- und anti CD28-Antikörpern in PBS gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde vor Nutzung der Platte abgenommen und das Loch mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Nach zwei Tagen wurden die Zellen in IL-2-haltiges (15 U) RPMI Medium mit 10% FKS überführt.

### **2.7.12 Transfektion durch Lipofection**

Plasmid-DNA wurde mittels Lipofektion in eukaryotische Zellen eingebracht. Als Empfängerzellen wurden in dieser Arbeit ausschließlich 293T Zellen benutzt. Einen Tag vor Transfektion wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät, so dass sie 24 h später zu 80-90% konfluent gewachsen waren. In einem Polystyrolröhrchen wurden die entsprechenden Mengen Plasmid (max. 3 µg), 100 µl OptiMEM1 (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) und 6 µl Plus<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden weitere 100 µl OptiMEM1 und 5 µl Lipofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) zugegeben, gemischt und erneut für 15 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 800 µl OptiMEM1 bedeckt. Danach wurde der komplette Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben. Nach 4 h im Zellinkubator (37°C, 7%CO<sub>2</sub>, 96% Wasserdampf) werden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches DMEM-Medium zugefügt.

Wurde in größeren Maßstäben gearbeitet mussten die jeweiligen Mengen entsprechend angeglichen werden.

### 2.7.13 Präparation von Vektorpartikeln und Anreicherung durch Ultrazentrifugation

48 h nach Transfektion wurden die nun vektorhaltigen Zellkulturüberstände abgenommen und durch einen 45 µm-Filter filtriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Sollten die Vektoren konzentriert werden, so wurde nach dem Filtrieren ein 20%iges Saccharosekissen in einem Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Palo Alto, USA) mit den Überständen überschichtete (2 ml 20% Saccharose, 9 ml Überstand bzw. 5 ml Saccharose, 30 ml Überstand). Die Ultrazentrifugation erfolgte je nach verwendetem Rotor bei 35000 upm und 4°C für 90 min (Rotor SW41, L-80 Ultracentrifuge, Beckmann, Palo Alto USA) oder bei 25000 upm und 4°C für 2 h (Rotor SW28, L-80 Ultracentrifuge, Beckmann, Palo Alto USA). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Vektoren in einem entsprechenden Volumen (90 µl bzw. 200 µl) PBS aufgenommen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.7.14 Beschichtung von Zellkulturplatten mit RetroNectin®

Um die Transduktionseffizienz von Suspensionszellen zu erhöhen, wurden die Zellkulturplatten vor Gebrauch mit RetroNectin® beschichtet. RetroNectin® ist ein chimäres Peptid des humanen Fibronectin, das in *E.coli* synthetisiert wird. Es wird vermutet, dass die Transduktionseffizienz dadurch erhöht wird, dass Vektoren und Zielzellen in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, da beide an RetroNectin® binden.

RetroNectin® wurde zunächst nach Angaben des Herstellers gelöst und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl verdünnt. Je 250 µl dieser Lösung wurden in ein Loch einer 24-Loch-Platte gegeben und 1,5 h offen unter UV-Licht gestellt. Anschließend weitere 30 min mit geschlossenem Deckel. Danach wurde das RetroNectin® abgenommen und 2% BSA in PBS in die Löcher pipettiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die BSA-Lösung wurde abgenommen und mit HBSS-Puffer (Gibco Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) gewaschen und anschließend wurden in jedes Loch 500 µl PBS gegeben. Die so beschichteten Platten konnten bis zu einer Woche bei 4°C gelagert werden.

### 2.7.15 Multiplicity of Infection (moi)

Die Anzahl an Partikeln pro Zelle in einem spezifischen Experiment bezeichnet man als moi. Die Zahl der infektiösen Partikel wurde durch eine im Folgenden beschriebene Titrationen bestimmt.

### 2.7.16 Titration von retroviralen Vektoren

Die Titration von allen in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren erfolgte auf HT1080 Zellen. Dazu wurden  $6 \times 10^4$  Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät. Diese waren nach 24 h zu 80% konfluent gewachsen. Nun wurden die Zielzellen mit PBS gewaschen und anschließend Vektorüberstände in verschiedenen Verdünnungen pro Loch zugegeben. In der Regel wurden fünf Verdünnungsstufen gewählt. Nach einer Inkubation von 3 h im Zellinkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Medium zugefügt. 48 h nach Transduktion erfolgte die Analyse. Dazu wurden die transduzierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Um möglichst genaue Werte zu erhalten wurden jeweils zehn Gesichtsfelder von mindestens zwei Verdünnungsstufen ausgezählt. Der Titer wurde dann nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert gezählter Zellen} \left( \frac{\text{Fläche eines Lochs}}{\text{Fläche eines Gesichtsfeldes}} \right) \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Volumen an Vektor}} = \text{i.E./ml}$$

### 2.7.17 Transduktion von Suspensionszellen

Die Transduktion von Suspensionszellen wurde in mit RetroNectin<sup>®</sup> beschichteten 24-Loch-Platten durchgeführt. Zunächst wurde die Platte mit PBS gewaschen und die entsprechende Menge an Vektorpartikeln pro Loch zugefügt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert (20 min, 500 x g, 4°C). Nach dem Zentrifugieren, wurde pro Loch die entsprechende Anzahl Zielzellen, Vektorüberstand und 4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen) zugegeben und zentrifugiert (90 min, 300 x g, 30°C). Anschließend folgte eine Inkubation für 3 h im Zellinkubator und danach ein Halbmediumwechsel.

### 2.7.18 Transduktion von adhärennten Zelllinien

Die Transduktionen wurden in 12- oder 24-Loch-Platten durchgeführt. Die entsprechenden Zielzellen wurden 24 h zuvor ausgesät. Vor der Transduktion wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend eine entsprechende Partikelzahl zugegeben (moi) oder je Loch verschiedene Verdünnungen verwendet. Nach einer Inkubation von 3 h im Zellinkubator wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann frisches Medium zugegeben. 3 Tage nach Transduktion wurden die Zellen analysiert.

### 2.7.19 Transduktion von primären humanen Monozyten

Die Monozyten wurden in 24-Loch-Platten ausgesät und 1, 2, 3, 4, 7 und 11 Tage nach Isolierung mit einer definierten moi transduziert. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und dann die entsprechende Vektormenge in 200 µl Medium zugegeben und für 8 h in einem Zellinkubator inkubiert. Die Zellen wurden anschließend drei Mal mit PBS gewaschen und in frischem Medium für sieben Tage kultiviert. Daraufhin erfolgte die Analyse der transduzierten Zellen.

## 2.8 Proteinbiochemische Methoden

### 2.8.1 Verwendete Puffer

#### RIPA-Lysis-Puffer

Tris pH 8,0	25 mM
NaCl	137 mM
EDTA	2 mM
Glycerol	1,0%
SDS	0,1%
Na-Deoxycholat (DOC)	0,5%
NP40	1,0%

frisch zugeben:

1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pro 10 ml

Triton-Lysis-Puffer (TLB)

Tris pH 7,4	20 mM
NaCl	137 mM
EDTA	2 mM
Na-β-Glycerophosphat	50 mM
Glyzerin	1%
Triton-X-100	1%

frisch zugeben:

1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (Roche) pro 10 ml

Puffer für Sammelgel

Tris pH 6,8	140 mM
Temed	0,11%
SDS	0,11%

Puffer für Trenngel

Tris	1,5 M
Temed	0,4%
SDS	0,4%

Die SDS-Polyacrylamid-Gele wurden nach folgendem Schema angesetzt. Die angegebenen Mengen reichen für zwei Gele der Größe 10 cm x 7 cm x 0,1 cm.

Trenngel

	10%	12%	13%
30 % Acrylamid	3,4 ml	4,0 ml	4,4 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Aqua bidest	4,0 ml	3,4 ml	3,0 ml
10 % APS	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	10 µl	10 µl	10 µl

Sammelgel

	3,75%
30% Acrylamid	650 µl
Sammelgel-Puffer	4,5 ml
10% APS	50 µl
Temed	10 µl

3x-SDS-Proben-Puffer

Tris pH 6,8	125 mM
Glycerin	30% (v/v)
SDS	6% (w/v)
Bromphenolblau	0,06% (w/v)
β-Mercaptoethanol	5% (v/v)

## SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycerin	250 mM
SDS	0,1%

## Blotting-Puffer

Tris pH 8,0	48 mM
Glycerin	39 mM
SDS	0,037%

## TBST

Tris pH 8,0	1 mM
NaCl	15 mM
Tween20	1%

## Blockierungs-Puffer

Magermilchpulver	5% (w/v)
------------------	----------

in TBST

## 2.8.2 Für Western Blot-Analysen verwendete Antikörper

Primär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Bezugsquelle
$\alpha$ -HA monoklonal	1:1000	Covance , Princeton, NJ, USA	$\alpha$ -Maus-HRP	1:7500	Amersham
$\alpha$ -HIV-2 Vpx monoklonal	1:50	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, USA	$\alpha$ -Maus-HRP	1:7500	Amersham
$\alpha$ -HIV-2 Nef (Hom-HB5)	1:20	O.T. Fackler, Univ. Heidelberg	$\alpha$ -Ratte-HRP	1:2500	Amersham
$\alpha$ -SIV Vif Immunserum	1:50	B.H. Hahn, J.C. Kappes, Univ. of Alabama	$\alpha$ -Hase-HRP	1:7500	Amersham
$\alpha$ -SIV Vpr Immunserum	1:500	B.H. Hahn, J.C. Kappes, Univ. of Alabama	$\alpha$ -Hase-HRP	1:7500	Amersham
$\alpha$ -SIV Gag p27 (KK60) monoklonal	1:100	NIBSC Centralised Facility for AIDS Reagents, Hertfordshire, UK	$\alpha$ -Maus-HRP	1:7500	Amersham
$\alpha$ - HIV-1 Gag p24 monoklonal Ak from Hybridoma 183-H12-5C	1 : 50	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, USA	$\alpha$ -Maus-HRP	1 : 7500	Amersham

### **2.8.3 Zellyse**

Um transfizierte Zellen zu lysieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und mit PBS mit 1 mM EDTA abgelöst und zentrifugiert (10 min, 300 x g, 4°C). Anschließend wurden die Zellen in Lysispuffer gründlich resuspendiert ( $5 \times 10^6$  in 200  $\mu$ l) und 5-15 min auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden zentrifugiert (5 min, 13000 upm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) oder auf eine QIAShredder Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde bestimmt und entsprechende Mengen aliquotiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

### **2.8.4 Lysieren von Vektorpartikeln**

Vektorhaltige Zellkulturüberstände wurden wie bereits beschrieben durch Ultrazentrifugation konzentriert. Das Pellet wurde jedoch nicht in PBS aufgenommen sondern in 20 – 100  $\mu$ l Lysis-Puffer resuspendiert. Nun wurde die Proteinkonzentration bestimmt und entsprechende Mengen aliquotiert, mit SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

### **2.8.5 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Bei der Bindung von Coomassie-Brillantblau G-250 an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Die Zunahme der Absorption ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Die fertige Bradford-Lösung besteht aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure und wird vor Gebrauch 1:5 mit Wasser verdünnt. Die Probelösung wird 1:200 mit der verdünnten Bradford-Lösung gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 595 nm im Photometer (Gene Quant RNA/DNA Calculator, Amersham, Buckinghamshire, UK) gemessen. Anhand einer Eichkurve, die zuvor mit bekannten Mengen eines bestimmten Proteins erstellt wurde, kann die Proteinkonzentration ermittelt werden.

### **2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-PAGE werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Dies funktioniert, da das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) die Eigenladung der Proteine überdeckt. Dadurch wird die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Gel unabhängig von ihrer Eigenladung. Die Proben werden vor der Elektrophorese mit einem SDS-haltigen Probenpuffer für 5 min auf 95°C erhitzt, wobei die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspaltung der Wasserstoffbrücken verloren gehen. Durch die Zugaben von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden enthaltene Disulfidbrücken reduziert.

Es wurde mit dem Mini-Protean 3 Electrophoresis System (Bio-Rad, München) gearbeitet. Je nach Größe der zu trennenden Proteine wurden Trenngele mit einem Acrylamidgehalt zwischen 10 und 13% benutzt. Es wurden 10 cm x 7 cm große Glasplatten benutzt mit einem „Spacer“ von 1 mm. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Aqua bidest überschichtet. Nachdem das Gel polymerisiert war (15 – 30 min) wurde das Wasser abgeschüttet und die Reste mit Filterpapier abgesaugt. Nun wurde das Sammelgel darüber gegossen und ein Kamm mit 10 Taschen eingesteckt. Nach dem Polymerisieren des Sammelgels wurde die Apparatur vollständig zusammengebaut und die wie bereits beschrieben vorbereiteten Proben aufgetragen. Die Proteine wurden durch das Anlegen von 130 V Gleichstrom über einen Zeitraum von ca. 2 h getrennt, bis die Farbstofffront das Gelende erreicht hatte.

### **2.8.7 Western Blot-Analyse**

Bei der Western Blot-Analyse werden die zuvor in einem Gel aufgetrennten Proteine über einen Elektrotransfer auf einem Träger (z.B. Nitrocellulosemembran) immobilisiert. Die Proteine befinden sich in derselben geometrischen Anordnung auf dem Trägermaterial wie zuvor im Gel. Nach der Immobilisierung wird die Membran mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Durch einen Sekundärantikörper, der an eine Peroxidase gekoppelt ist, kann über Chemilumineszenz das gesuchte Protein detektiert werden.

Um die im Gel aufgetrennten Proteine auf einer Nitrozellulosemembran (Hybons-C Extra, Amersham, Buckinghamshire, UK) zu immobilisieren wurde mit der Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, München) gearbeitet. Dazu wurde die Membran ohne Bildung von Luftblasen auf das Gel gelegt. Beides wurde flankiert von je einem Filterpapier

und einem Schwamm in die entsprechende Vorrichtung eingelegt. Die Kammer wurde vollständig mit Blotting-Puffer gefüllt und der Proteintransfer erfolgte bei 4°C und 300 mA für 1 h. Alle Inkubationsschritte der Membran wurden auf einem Kippschüttler durchgeführt. Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Membran zur Blockierung von unspezifischen Bindungen in Blockierungspuffer inkubiert (1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierungspuffer (2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C). Danach wurde die Membran drei Mal für je 10 min mit TBST gewaschen und dann erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (in 2/3 TBST, 1/3 Blockierungspuffer, 1 h bei Raumtemperatur). Es folgte erneut ein dreimaliges Waschen der Membran mit TBST. Die Detektion erfolgte mit dem ECL Western Blotting Detection System bzw. mit dem ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham, Buckinghamshire, UK) nach Angaben des Herstellers.

## 2.9 Analytische Methoden

### 2.9.1 Verwendete Puffer

#### PBS

NaCl	137,0 mM
KCl	2,7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,1 mM

#### IPA-Blocking-Puffer

BSA	1,00% (w/v)
in PBS	

#### Substrat (IPA)

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	4,0 mg/ml
in Dimethylformamid	

#### Substratlösung (IPA)

Substrat	2,5% (w/v)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0,1% (v/v)

Fixierlösung		
Formaldehyd	2,0% (v/v)	
Glutaraldehyd	0,2% (v/v)	
X-Gal Lösung		
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid		40 mg/ml
in DMSO		
X-Gal Reaktionsmix		
X-Gal Lösung	2,5%	
Ferricyanid	5,0 mM	
Ferrocyanid	5,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	
in PBS		
FACS-Waschpuffer		
FKS	1,00% (v/v)	
NaN <sub>3</sub>	0,01% (v/v)	
in PBS		
FACS-Fixierpuffer		
Paraformaldehyd	1,00% (w/v)	
in PBS		
PBSS		
Saponin	0,02% (v/v)	
in PBS		
Hypotonischer-Lysis-Puffer (HLB)		
Tris pH 8,0	10,0 mM	
MgCl <sub>2</sub>	1,0 mM	
$\beta$ -Mercaptoethanol	3,5 mM	
KCl	10,0 mM	
MnCl <sub>2</sub>	1,0 mM	
NP40	0,1%	

### 2.9.2 Verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle	Markierung	Isotypkontrolle	Bezugsquelle
$\alpha$ -CD1a	eBioscience, San Diego, USA	PE	IgG1/PE	eBioscience, San Diego, USA
$\alpha$ -CD3	DAKO Cytomation, Glostrup, DK	FITC	IgG1/FITC	DAKO Cytomation, Glostrup, DK
$\alpha$ -CD4	BD Biosciences, San Jose, USA	PE	IgG1/PE	BD Biosciences, San Jose, USA
$\alpha$ -CD14	DAKO Cytomation, Glostrup, DK	PE	IgG2a/PE	DAKO Cytomation, Glostrup, DK
$\alpha$ -CD25	DAKO Cytomation, Glostrup, DK	FITC	IgG1/FITC	DAKO Cytomation, Glostrup, DK
$\alpha$ -CD69	DAKO Cytomation, Glostrup, DK	FITC	IgG1/FITC	DAKO Cytomation, Glostrup, DK
$\alpha$ -CD83	BD Biosciences, San Jose, USA	PE	IgG1/PE	BD Biosciences, San Jose, USA
$\alpha$ -CD86	eBioscience, San Diego, USA	Cy5	IgG2b/Cy5	eBioscience, San Diego, USA
$\alpha$ -CD86	BD Biosciences, San Jose, USA	FITC	IgG1/FITC	BD Biosciences, San Jose, USA

### 2.9.3 Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated Cell-Sorting; FACS)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung individueller Zellen innerhalb eines Zellgemisches. Dabei können Zellen u.a. nach ihrer Größe und Granularität getrennt werden. Dies ist möglich, indem die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom nacheinander an einem Laserstrahl vorbei geleitet und die entstehende Lichtbeugung und -streuung sowie emittierte Fluoreszenz von Detektoren aufgenommen und anschließend verrechnet wird. Des Weiteren können Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert werden. Dadurch lassen sich diese Zellen über die Expression von Oberflächenproteinen charakterisieren.

### 2.9.4 Nachweis von Oberflächenproteinen

Zur Identifizierung bestimmter Zelltypen, macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, dass bestimmte Oberflächenproteine spezifisch von nur einem Zelltyp exprimiert werden. Benutzt man spezifische Antikörper, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, können die Oberflächenproteine durch die Bindung der Antikörper im FACS-Gerät (Becton Dickinson, FACScan™) detektiert werden.

Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 500  $\mu\text{l}$  FACS-Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert (5 min, 13000 upm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) und anschließend in 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer resuspendiert. Handelte es sich um Monozyten, wurden diese zunächst mit 4  $\mu\text{l}$  1:10 verdünntem FcR-Blocking Reagent (Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach) für 15 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper an die von Monozyten exprimierten Fc-Rezeptoren zu verhindern. Bei Zellen, die keine Fc-Rezeptoren exprimieren wurden die entsprechenden Antikörper direkt zugegeben. Je nach Antikörper zwischen 2  $\mu\text{l}$  und 5  $\mu\text{l}$ . Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einem unspezifischen Immunglobulin des Gleichen Typs (Isotyp) wie der spezifische Antikörper inkubiert. Nach 45 min bei 4°C wurden 400  $\mu\text{l}$  FACS-Waschpuffer zugefügt und zentrifugiert (5 min, 13000 upm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode). Daraufhin folgten zwei weitere Waschschriffe. Zuletzt wurden die Zellen in 200  $\mu\text{l}$  FACS-Fixierpuffer aufgenommen und so bis zu einer Woche bei 4°C gelagert.

### 2.9.5 Nachweis von *egfp*-exprimierenden Zellen

Zur Quantifizierung von *egfp*-exprimierenden Zellen können diese entweder unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt werden oder im FACS vermessen werden. Gerade bei Suspensionszellen bietet sich die Auswertung in einem FACS-Gerät an. Dazu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen mit FACS-Waschpuffer aufgenommen, zentrifugiert (5 min, 13000 upm, 4°C, Biofuge Fresco, Heraeus, Osterode) und in FACS-Fixierpuffer resuspendiert. So konnten die Zellen bis zu drei Tagen im Dunklen bei 4°C gelagert werden. Um bei der Analyse falschpositive Ergebnisse auszuschließen, verwendet man als Negativkontrolle Zellen, die kein *egfp* exprimieren.

### 2.9.6 DNA-Färbung zur Analyse des Zellzyklus

Durch Anfärben der DNA und anschließende Messung des DNA-Gehalts, lassen sich Rückschlüsse auf die Zellzyklusphase ziehen, in der sich die betreffenden Zellen befinden. Direkt nach der Teilung – in der  $G_1$ -Phase – enthält eine Körperzelle einen diploiden Chromosomensatz, den man mit  $2n$  bezeichnet und einen DNA-Gehalt von  $2c$ . Nach der Synthese-Phase (S-Phase) und während der Mitose enthält die Zelle einen doppelten DNA-Gehalt ( $2n4c$ ). In der so genannten  $G_0$ -Phase, in der die Zelle keinen Replikationszyklus durchläuft und sich in einer Ruhephase befindet, enthält die Zelle ebenfalls einen Chromosomensatz bzw. DNA-Gehalt von  $2n2c$ . Daher lässt sich durch die Bestimmung des DNA-Gehalts nicht zwischen  $G_1$ - und  $G_0$ -Phase unterscheiden.

Die DNA-Färbung wurde mit dem DNAcon3-staining Kit (DAKO Cytomation, Glostrup, DK) durchgeführt. Dazu wurden die betreffenden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl PBS resuspendiert. Das in den Röhrchen des DNAcon3-staining Kit enthaltene Lyophilisat wurde in 1 ml Propidiumiodid gelöst (vortexen, 5 min inkubieren) und  $1 \times 10^6$  der zuvor gewaschenen Zellen zugegeben. Dieser Ansatz wurde für 1-2 h bei 4°C inkubiert und anschließend der DNA-Gehalt im FACS-Gerät bestimmt.

### **2.9.7 DNA/RNA-Färbung zur Analyse des Zellzyklus**

Aufgrund der reduzierten Stoffwechselaktivität von Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase ist der RNA-Gehalt solcher Zellen im Gegensatz zu Zellen in G<sub>1</sub>-Phase stark reduziert. Um nun zwischen G<sub>1</sub>- und G<sub>0</sub>-Phase unterscheiden zu können, färbt man zusätzlich zur DNA auch die RNA. Eine Methode ist die Verwendung von 7-Actinoaminomycin D (7-AAD), welches die RNA färbt und anschließende Färbung der DNA mit Pyronin Y.

Dazu wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit PBS gewaschen, in 500 µl PBSS resuspendiert und 10 µg/ml 7-AAD zugefügt. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen und erneut in 500 µl PBSS resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µg/ml 7-Actinomycin D wurde für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 µl einer 0,1 mg/ml Stammlösung Pyronin Y zugegeben, gevortext und vor der Analyse mindestens für 10 min auf Eis inkubiert.

### **2.9.8 Immun-Peroxidase-Färbung (Immun-Peroxidase-Assay, IPA)**

Zur Dedektion von viralen Antigenen in Zellen wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit Methanol bei -20°C für 30 min fixiert. Das Methanol wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Minimierung von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit IPA-Blocking-Puffer inkubiert. Der IPA-Blocking-Puffer wurde abgenommen und die Zellen für 1 h bei 37°C mit dem Primärantikörper inkubiert (in der vorliegenden Arbeit wurde mit HIV-1- oder HIV-2-Serum gearbeitet; 1:400 in IPA-Blocking-Puffer verdünnt). Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe des Peroxidase-markierten Zweitantikörpers (anti-Human-IgG; Sigma A-8775; 1:500 in IPA-Blocking-Puffer verdünnt) und eine Inkubation von 1 h bei 37°C. Erneut wurden die Zellen

dreimal mit PBS gewaschen und dann die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung unter dem Mikroskop verfolgt (ca. 10-30 min). Zum Stoppen der Reaktion wurde der Substratlösung etwas Wasser zugefügt.

### **2.9.9 $\beta$ -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal-Färbung)**

Das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse verschiedener  $\beta$ -Galaktoside. Ein solches ist 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl- $\beta$ -D-Galaktopyranosid (X-Gal). Bei dessen Hydrolyse entsteht unter Sauerstoffeinfluss ein wasserunlöslicher blauer Farbstoff (5-Bromo-4-chloro-indigo). Das  $\beta$ -Galaktosidase-Gen wurde in der Vorliegenden Arbeit als Reporter gen durch retrovirale Vektoren in Zellen eingebracht.

Um  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität nachzuweisen, wurden die Zellen zunächst gewaschen und anschließend 5 min mit Fixierlösung inkubiert. Diese wurde abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit der Färbelösung bedeckt und bei 37°C für einige Stunden inkubiert.

### **2.9.10 May-Grünwald-Giemsa bzw. Pappenheim Färbung**

Diese Histologische Färbung dient dazu die morphologischen Strukturen von Blutzellen zu verdeutlichen. Zellkerne erscheinen in gefärbten Ausstrichen durch eine Komplexbildung der Farbstoffe mit der DNA purpurrot. Das Zytoplasma wird meist bläulich dargestellt. Diese Färbung ist aufgrund ihrer pH-abhängigen Farbgebung besonders für die Anfärbung von granulären Strukturen geeignet. Basophile Granula erscheinen im lichtmikroskopischen Bild durch die Anfärbung mit Methylenblau tiefblau bis violett, während saure Granula Eosin anreichern und damit leuchtend rot erscheinen. Neutrale Granula weisen nach Färbung einen hell- bis purpurroten, blassen Farbton auf.

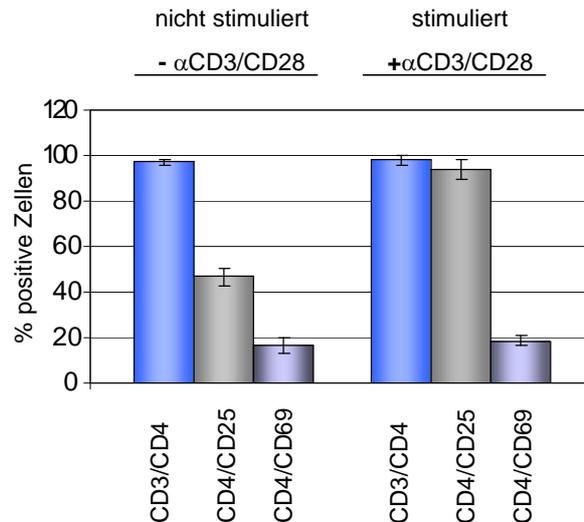
Um die Zellen anzufärben, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit der May-Grünwald-Lösung bedeckt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und die Zellen gründlich mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nachdem die Zellen getrocknet waren, wurden die Zellen mit einer 1:20 in H<sub>2</sub>O verdünnten Giemsa-Lösung bedeckt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte erneut gründliches Waschen mit H<sub>2</sub>O.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Transduktion von humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen

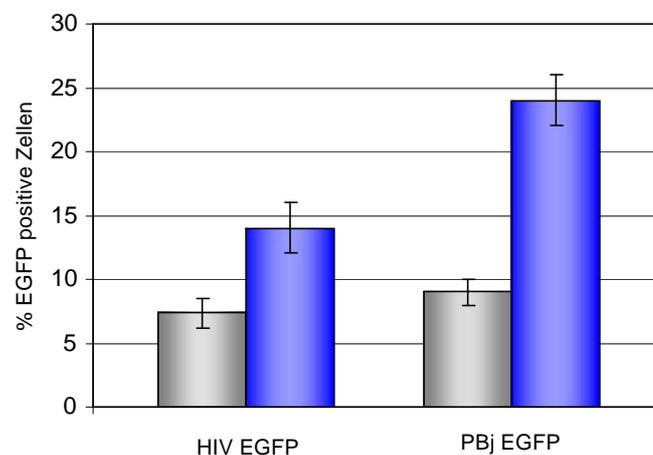
SIV<sub>smm</sub>PBj1.9 besitzt die Eigenschaft, in unstimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) von Primaten zu replizieren (Fultz *et al.*, 1991; Schwiebert *et al.*, 1994). Darüber hinaus konnte in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ gezeigt werden, dass SIV<sub>smm</sub>PBj1.9 nicht nur in unstimulierten PBMC von Primaten sondern auch in unstimulierten humanen PBMC replizieren kann. Die Fähigkeit zur Replikation in ruhenden Zellen ist unter den bisher bekannten Lentiviren einzigartig. Da man vermutet, dass die Replikationseigenschaft des parentalen Virus eng mit der Transduktionscharakteristik des davon abgeleiteten Vektors zusammenhängt, und aufgrund vorangegangener Arbeiten, in denen gezeigt werden konnte, dass ein SIV<sub>smm</sub>PBj Vektor sowohl in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretierte Zelllinien und Fibroblasten als auch primäre humane Monozyten transduzieren kann (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005), sollte im Folgenden untersucht werden, ob ein von SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor auch dazu in der Lage ist, unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu transduzieren. Diese Zellen stellen neben Monozyten ein interessantes Ziel der Gentherapie dar.

Es wurden PBMC aus *buffy coats* von drei verschiedenen Spendern über einen Ficoll-Gradient isoliert und daraus über eine Negativdepletion mittels magnetischer Zellsortierung CD4<sup>+</sup> Zellen isoliert. Die Hälfte der Zellen wurde zunächst zwei Tage mit anti CD3- und anti CD28-Antikörpern und weitere drei Tage durch IL-2 stimuliert. Um den Aktivierungsstatus der Zellen zu bestimmen, wurde vor der Transduktion die Expression der Oberflächenrezeptoren CD25 und CD69 im FACS (FACS, fluorescent activated cellsorter; Becton Dickinson, FACScan<sup>TM</sup>) gemessen. CD25 ist ein „später“ und CD69 ein „früher“ zellulärer Aktivierungsmarker (Testi *et al.*, 1994), d.h. sie werden nach einem Stimulus nacheinander exprimiert (Antas *et al.*, 2002). In Abb. 3.1 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse dargestellt. Sowohl die stimulierte als auch die unstimulierte Zellpopulation besteht aus knapp 100% CD3/CD4-doppeltpositiven Zellen. Der „späte“ Aktivierungsmarker wurde auch auf unstimulierten Zellen exprimiert, allerdings nur auf etwa halb so vielen (46%) wie bei den stimulierten Zellen (94%). Für den „frühen“ Aktivierungsmarker CD69 waren keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen zu erkennen (19%, 16%). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Expression von CD69 bereits wieder herunterreguliert wurde (Simms *et al.*, 1996). Messungen zu einem früheren Zeitpunkt wurden nicht durchgeführt.



**Abb. 3.1 Expression der Aktivierungsmarker auf CD4<sup>+</sup> Zellen mit und ohne Stimulation.** Nach Negativdepletion wurden die Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert oder ohne Stimulus kultiviert. Die Expression der Aktivierungsmarker wurde im FACS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Zunächst wurden durch Kotransfektion der SIV<sub>smm</sub>PBj oder HIV-1 Konstrukte zusammen mit einem VSV-G-kodierendem Plasmid in 293T Zellen Vektoren generiert. Diese wurden auf HT1080 Zellen titriert und anschließend mit einer moi von 10 zur Transduktion von stimulierten und unstimulierten T-Zellen eingesetzt. Vier Tage nach Transduktion wurde die



**Abb. 3.2 Transduktion unstimulierter und stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit HIV-1- und SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektoren.** Die Zellen wurden vier Tage nach Transduktion im FACS analysiert. Gezeigt ist der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten.

■ unstimuliert, ■ stimuliert.

*egfp*-Expression der T-Zellen im FACS gemessen. Diese Ergebnisse sind in Abb. 3.2 dargestellt. Auf unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erreichen beide Vektoren eine vergleichbare Effizienz von etwa 8%. Wurden die Zellen vor der Transduktion stimuliert, lag die Transduktionseffizienz für den HIV-1-abgeleiteten Vektor bei knapp 15 % und für den

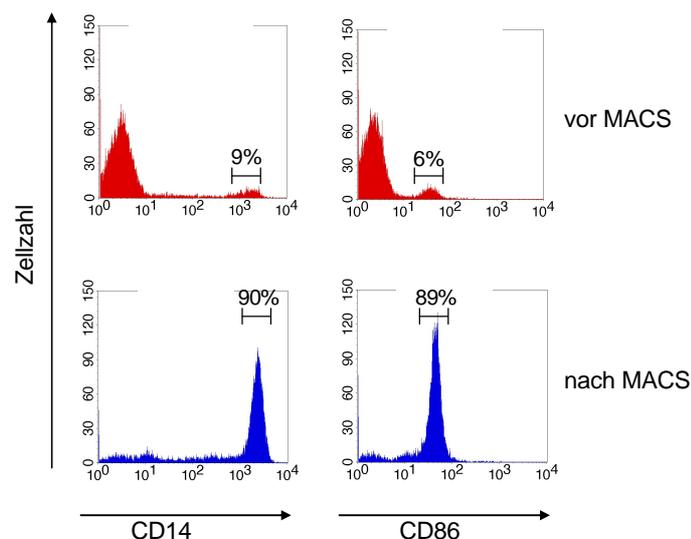
SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektor bei etwa 25%. Die durch die HIV-1 Vektoren erzielten Ergebnisse entsprechen in etwa bereits publizierten Daten (Costello *et al.*, 2000; Mühlebach *et al.*, 2003). Obwohl der PBj-abgeleitete Vektor auf stimulierten T-Zellen eine deutlich höhere Transduktionseffizienz erreicht, ergibt sich auf unstimulierten Zellen kein Unterschied zu HIV-1 transduzierten T-Zellen.

### 3.2 Charakterisierung von humanen Monozyten und Makrophagen

Im Gegensatz zu unstimulierten T-Zellen können primäre humane Monozyten mittels des SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektors PBj EGFP transduziert werden (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Diese Fähigkeit besitzen HIV-1-abgeleitete Vektoren nicht. Diese können Monozyten erst dann transduzieren, wenn sie beginnen zu differenzieren. Monozyten selbst oder daraus differenzierte Makrophagen und Dendritische Zellen sind interessante Ziele einer Gentherapie. Daher wurden die Zellzykluseigenschaften und das Differenzierungspotential dieser Zellen eingehender untersucht.

#### 3.2.1 Reinheit der Monozyten

Um die Differenzierung von Monozyten genauer zu untersuchen wurden diese Zellen aus peripherem Blut isoliert. Dazu wurden zunächst die PBMC von drei freiwilligen, gesunden

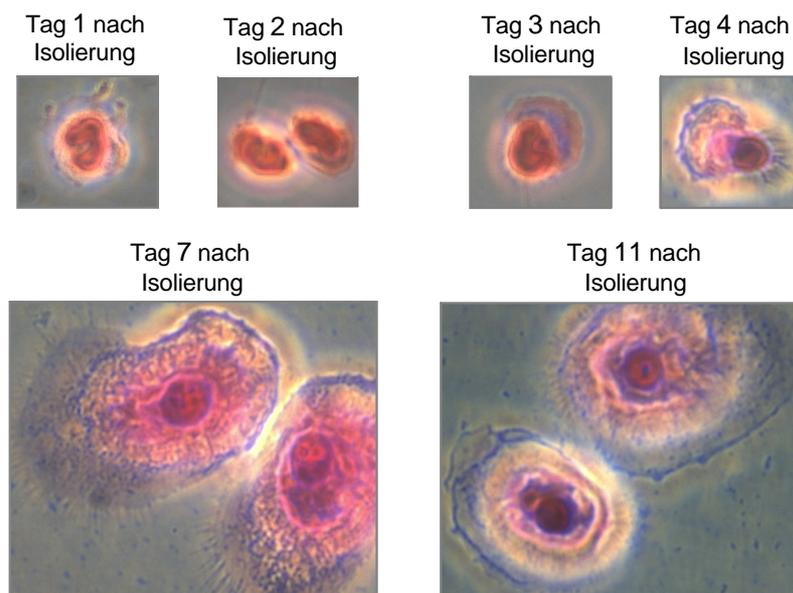


**Abb. 3.3 Oberflächenexpression der Monozyten-Marker CD14 und CD86.** Gezeigt ist eine repräsentative FACS-Messung. In rot ist eine Messung vor der Sortierung dargestellt und blau zeigt die Analyse nach MACS-Konzentrierung

Spendern über einen Ficoll-Gradient isoliert und daraus über eine Negativdepletion mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) Monozyten isoliert. Um die Effizienz der Isolierung festzustellen, wurden die Zellen nach jeder Isolierung auf die Expression der monozyten-spezifischen Oberflächenmarker CD14 und CD86 im FACS analysiert. Ein exemplarisches FACS-Ergebnis ist in Abb. 3.3 dargestellt. Im Durchschnitt erhielt man eine Zellpopulation, die zu etwa 90% aus Monozyten bestand.

### 3.2.2 Morphologische Charakterisierung

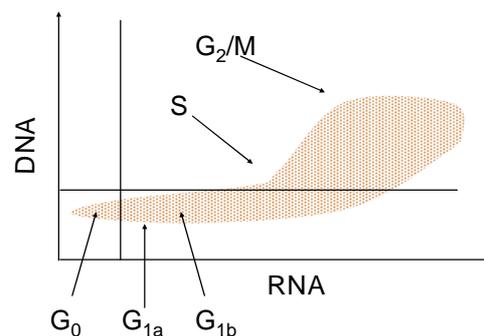
Die Differenzierung der Monozyten beginnt unter den hier verwendeten Kultivierungsbedingungen (siehe Materialien und Methoden 2.7.8) an Tag 4 nach Isolierung. Die morphologischen Veränderungen während der Differenzierung sind mikroskopisch gut zu verfolgen (Abb. 3.4). Damit man die zellulären Kompartimente deutlicher erkennen kann, wurden die Monozyten eines Spenders exemplarisch an verschiedenen Tagen nach Isolierung nach der Pappenheim-Färbemethode gefärbt. Am ersten Tag nach der Isolierung erkennt man deutlich den „klassischen Monozyten“. Charakteristisch für diese Zellen ist der große bohnen- oder hufeisenförmige Zellkern. Ab dem dritten Tag der Kultivierung ist ein breiter Plasmasaum zu erkennen. Der Kern weist immer noch die bohnenförmige Form auf. Die Zellen werden mit zunehmender Differenzierung größer, der Kern nimmt eine runde bis gelappte Struktur an und der Plasmasaum wird immer breiter. An Tag sieben nach Isolierung sind die Makrophagen vollständig differenziert.



**Abb. 3.4 Morphologie von kultivierten Monozyten und Makrophagen.** Die Monozyten wurden an verschiedenen Tagen nach Isolierung nach der Pappenheim-Methode gefärbt. 400x Vergrößerung.

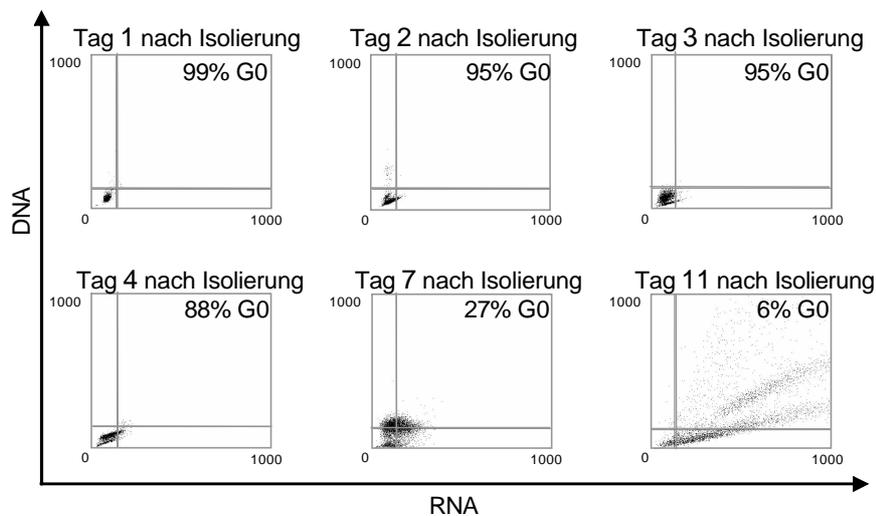
### 3.2.3 Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen

Neben der rein morphologischen Charakterisierung wurde auch der Zellzyklus der sich differenzierenden Monozyten bestimmt. Da sowohl der DNA- als auch der RNA-Gehalt der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen variiert, lassen sich die einzelnen Phasen des Zellzyklus durch eine semiquantitative Analyse des Nukleinsäuregehalts bestimmen. Dazu wurde die DNA in den Zellen mit 7-Aktinoaminomyzin D und die RNA mit Pyronin Y gefärbt und anschließend in einem Fluoreszenzaktiviertem Zellsortierer analysiert. In Abbildung 3.5 ist eine schematische Darstellung der FACS-Analyse einer Zellpopulation gezeigt, die sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen enthält. In der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus ist sowohl der RNA- als auch der DNA-Gehalt der Zellen gering. Daher erscheint diese Zellpopulation in der untersten linken Ecke. In der  $G_{1a}/G_{1b}$ -Phase ist der DNA-Gehalt nach wie vor gering, aber die RNA-Menge nimmt aufgrund einer höheren Stoffwechselaktivität der Zelle zu. Erst in der S-Phase, wenn die DNA für eine bevorstehende Teilung synthetisiert wird, nimmt auch der DNA-Gehalt zu. Nach Abschluss der S-Phase – in der  $G_2$ - oder der M-Phase – enthalten die Zellen den doppelten DNA-Gehalt.



**Abb. 3.5 Schematische Darstellung einer FACS-Messung zur Analyse des DNA/RNA-Gehalts von Zellen.** Die rot schattierte Fläche entspricht der erwarteten Verteilung einer Zellpopulation, die sowohl proliferierende als auch ruhende Zellen beinhaltet.

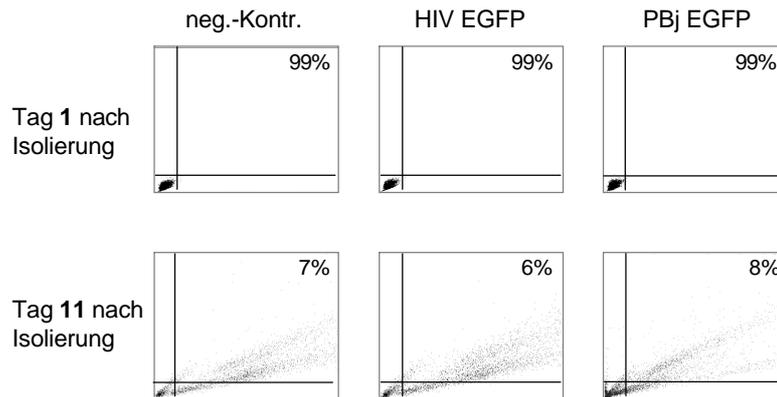
In Abb. 3.6 sind die Ergebnisse einer repräsentativen DNA/RNA-Analyse von Monozyten dargestellt. Die Zellen von drei freiwilligen, gesunden Spendern wurden an verschiedenen Tagen nach Isolierung auf ihren Gehalt an DNA und RNA analysiert. In den ersten drei Tagen nach Isolierung befanden sich nahezu alle Zellen in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus. Ab Tag vier der Kultivierung begann dieser Anteil der Zellen abzunehmen, bis sich am elften Tag der Kultivierung nur noch 6% der Zellen in der  $G_0$ -Phase befanden.



**Abb. 3.6 Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen.** Durch vorherige Färbung der DNA mit 7-Aktinoaminomyzin D und der RNA mit Pyronin Y wurde der Nukleinsäure Gehalt der Zellen im FACS bestimmt. In der Oberen rechten Ecke ist der prozentuale Anteil der Zellen in G<sub>0</sub>-Phase angegeben, die sich im Quadrant links unten befinden.

Offensichtlich gibt es eine Korrelation zwischen der Differenzierung der Monozyten und den Zellzyklusphasen. Neben der morphologischen Charakterisierung der Differenzierung wurde bereits gezeigt, dass die Differenzierung der Monozyten mit einer veränderten Expression von Oberflächenproteinen einhergeht. Der Oberflächenrezeptor CD86 nimmt mit zunehmender Differenzierung zu Makrophagen ab (Ryncarz und Anasetti, 1998; Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Diese Abnahme beginnt etwa am vierten Tag der Kultivierung. Ebenfalls ab dem vierten Tag der Kultivierung vermindert sich der Anteil der Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus, und dies ist auch der früheste Zeitpunkt an dem eine Transduktion durch eine HIV-1-abgeleiteten Vektor erfolgen kann. SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren zeigen diese Abhängigkeiten nicht. Sie scheinen unabhängig von der Zellzyklusphase bzw. des Differenzierungsstadiums der Zellen zu sein.

Um zu untersuchen, ob die Transduktion von Monozyten einen Einfluss auf den Zellzyklus hat, wurde die DNA/RNA-Färbung auch bei transduzierten Zellen vorgenommen. Wie in Abb. 3.7 dargestellt ist, ergaben sich keine Unterschiede zwischen SIV<sub>smm</sub>PBj transduzierten und nicht bzw. mit HIV-1 transduzierten Zellen.

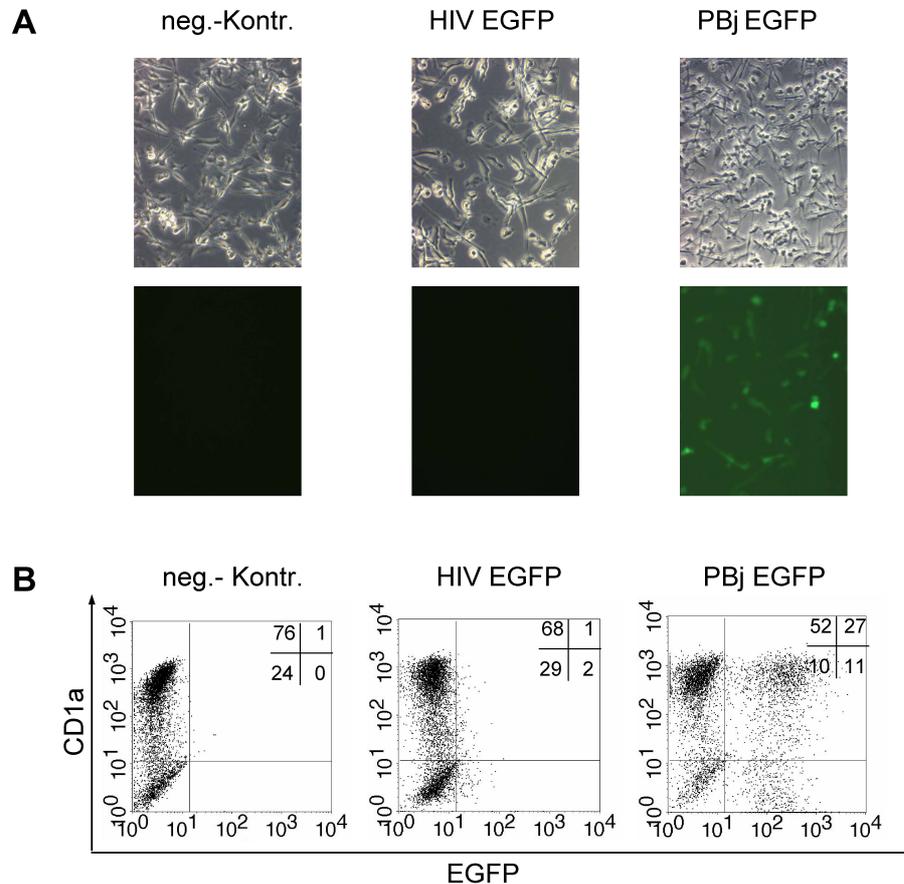


**Abb. 3.7 Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen nach Transduktion mit den angegebenen Vektoren.** Durch vorherige Färbung der DNA mit 7-Aktinoaminomyzin D und der RNA mit Pylonin Y wurde der Nukleinsäure Gehalt der Zellen im FACS bestimmt. In der Oberen rechten Ecke ist der prozentuale Anteil der Zellen in  $G_0$ -Phase angegeben, die sich im Quadrant links unten befinden.

### 3.2.4 Differenzierung von transduzierten Monozyten zu Dendritischen Zellen

Monozyten können außer zu Makrophagen auch zu Dendritischen Zellen (DC, dendritic cell) differenzieren. Die Differenzierung zu DCs ist für einige gentherapeutische Anwendungen von großer Bedeutung, denn diese Zellen können eine effiziente Antigenantwort in T-Zellen auslösen. Dies bietet eine Möglichkeit zur gezielten Stimulierung des Immunsystems. So könnte durch einen  $SIV_{smm}$ PBj-abgeleiteten Vektor ein Antigen in Monozyten eingebracht werden, dass dann von den differenzierten DCs präsentiert wird. Es sollte untersucht werden, ob diese Differenzierung noch möglich ist, nachdem die Monozyten durch einen  $SIV_{smm}$ PBj-abgeleiteten Vektor transduziert wurden. Dazu wurden Monozyten nach dem etablierten Protokoll isoliert und direkt anschließend, also an Tag 0 mit dem  $SIV_{smm}$ PBj Vektor, der noch alle akzessorischen Proteine enthält, transduziert. Vor der Transduktion und Stimulierung durch die Zytokine wurde durch eine FACS-Analyse die Expression des Oberflächenrezeptors CD1a bestimmt. Dieser Rezeptor wird nicht auf Monozyten jedoch auf DCs exprimiert. Die Analyse zeigte, dass maximal 3% der Zellen nach Isolierung CD1a-positiv waren. Somit konnte gezeigt werden, dass sich zum Zeitpunkt der Transduktion praktisch noch keine DCs in der Zellpopulation befanden. Nach der Transduktion wurden die Monozyten in einem speziellen Medium, das IL-4 und GM-CSF enthielt, für vier Tage kultiviert. Unter diesen Bedingungen entwickelten sich die Monozyten zu unreifen DCs. Für eine völlige Reifung der DCs wurden diese für einen weiteren Tag in Anwesenheit von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  kultiviert. Nicht-transduzierte Monozyten dienten als Kontrolle. Als weitere Kontrolle dienten Monozyten, die mit einem HIV-1-abgeleiteten Vektor transduziert wurden. Am fünften Tag nach Transduktion wurden die Zellen im FACS analysiert. Gemessen wurde

die Transduktionseffizienz anhand der EGFP Expression. Die Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen wurde durch die Messung des Oberflächenrezeptors CD1a bestimmt.



**Abb. 3.8 Differenzierung von transduzierten Monozyten zu Dendritischen Zellen.** Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei Versuchen. Die Analyse erfolgte fünf Tage nach Transduktion und Stimulierung. A) Mikroskopische Analyse der stimulierten und transduzierten Zellen. Obere Reihe: Durchlichtaufnahmen; untere Reihe: Fluoreszenzaufnahmen. B) FACS-Messung der CD1a- und EGFP-Expression.

In Abb. 3.8 A sind zunächst mikroskopische Aufnahmen von Zellen am fünften Tag nach Transduktion und Zytokinstimulation gezeigt. In den Durchlichtbildern sind deutlich die morphologischen Änderungen der Zellen zu erkennen. Diese waren unabhängig davon, ob die Zellen nicht transduziert wurden, oder mit einem HIV-1- bzw. PBj- abgeleiteten Vektor transduziert wurden. Die Zellen weisen einen spindelförmigen Zellkörper mit den typischen dendritischen Ausläufern auf. Auf den Fluoreszenzaufnahmen ist deutlich zu erkennen, dass nur die Transduktion durch den PBj EGFP Vektor erfolgreich war.

Nach Isolierung und vor Transduktion und Zytokinstimulierung wiesen maximal 3% der Monozyten eine Expression von CD1a auf. In Abb. 3.8 B ist die FACS-Analyse von stimulierten und z.T. transduzierten Zellen gezeigt. Die FACS-Analyse ergab, dass von den

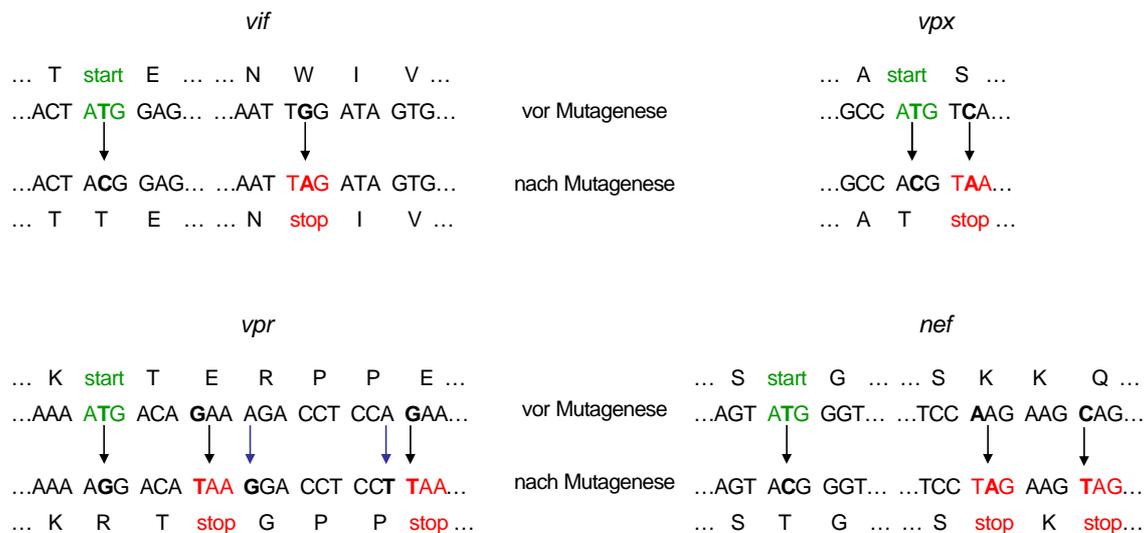
nicht transduzierten Zellen - nach Stimulation mit IL-4, GM-CSF, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  - ca. 75 % der Zellen CD1a exprimierten, was auf eine erfolgreich Differenzierung zu DCs schließen lässt. Durch den HIV-1 Vektor konnte keine Transduktion erzielt werden aber auch hier exprimierten knapp 70% der Zellen CD1a. Von den durch den SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektor transduzierten Zellen wiesen etwa 80% der Zellen eine Expression von CD1a auf. Von diesen CD1a-positiven Zellen waren 27% ebenfalls EGFP-positiv. Diese Zellen wurden also erfolgreich durch den PBj EGFP Vektor transduziert und besaßen weiterhin das Potential zur Differenzierung zu DCs.

### **3.3 Der Einfluß der viralen akzessorischen Proteine Vif, Vpx, Vpr und Nef auf die Transduktionseigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj**

Wie in Abschnitt 3.1 beschrieben, bietet ein SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor bei der Transduktion von unstimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen keine Vorteile gegenüber einem HIV-1-abgeleiteten Vektor. Es besteht allerdings ein Unterschied in der Transduktionseffizienz anderer ruhender Zellen. So ermöglicht ein auf SIV<sub>smm</sub>PBj- basierender Vektor, im Gegensatz zu HIV-1-abgeleiteten Vektoren, einen erfolgreichen Gentransfer sowohl in G<sub>0</sub>-arretierte Zelllinien und Fibroblasten als auch in primäre humane Monozyten. Der Grund für diese Besonderheit ist bisher nicht bekannt. Ein Weg zur Erforschung der Unterschiede zwischen HIV-1 und SIV<sub>smm</sub>PBj war die genauere Untersuchung der akzessorischen Gene/Proteine, denn neben verschiedenen anderen Sequenzunterschieden variieren HIV-1 und SIV<sub>smm</sub>PBj auch in ihren akzessorischen Genen und deren Eigenschaften. Wie ich bereits in meiner Diplomarbeit (Wolfrum, 2002) zeigen konnte, ist keines der akzessorischen Proteine allein essentiell für die Transduktion von G<sub>0</sub>-arretierten Zellen durch einen SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektor. Für diese Versuche wurden Vektoren benutzt, bei denen die Expression von jeweils einem der insgesamt vier akzessorischen Proteine durch Mutationen der Start-Kodons inhibiert war. Da es nicht auszuschließen ist, dass eines der noch exprimierten Proteine die Aufgabe eines der ausgeschalteten kompensiert, sollte nun ein Vektorkonstrukt kloniert werden, bei dem keines der akzessorischen Proteine exprimiert werden kann. Dieses Konstrukt sollte auf verschiedenen G<sub>0</sub>-arretierten Zelllinien zur Transduktion eingesetzt und mit Vektoren, die von SIV<sub>smm</sub>PBj wt, HIV-1 und MLV abgeleitet sind, verglichen werden.

### 3.3.1 Klonierung einer SIV<sub>smm</sub>PBj Mutante mit funktionalen Deletionen aller akzessorischen Gene (pPBj 4xko)

Um den Einfluss der akzessorischen Proteine auf die Transduktions-Eigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren zu testen, sollte die Expression aller akzessorischen Proteine durch Mutation der Start ATGs und Einfügen von jeweils mindestens einem zusätzlichen Stop-Codon verhindert werden. Die Mutationen wurden so gewählt, dass sich in den überlappenden Leserahmen keine Aminosäureänderungen ergaben. Die eingefügten Mutationen sind in Abb. 3.9 dargestellt.

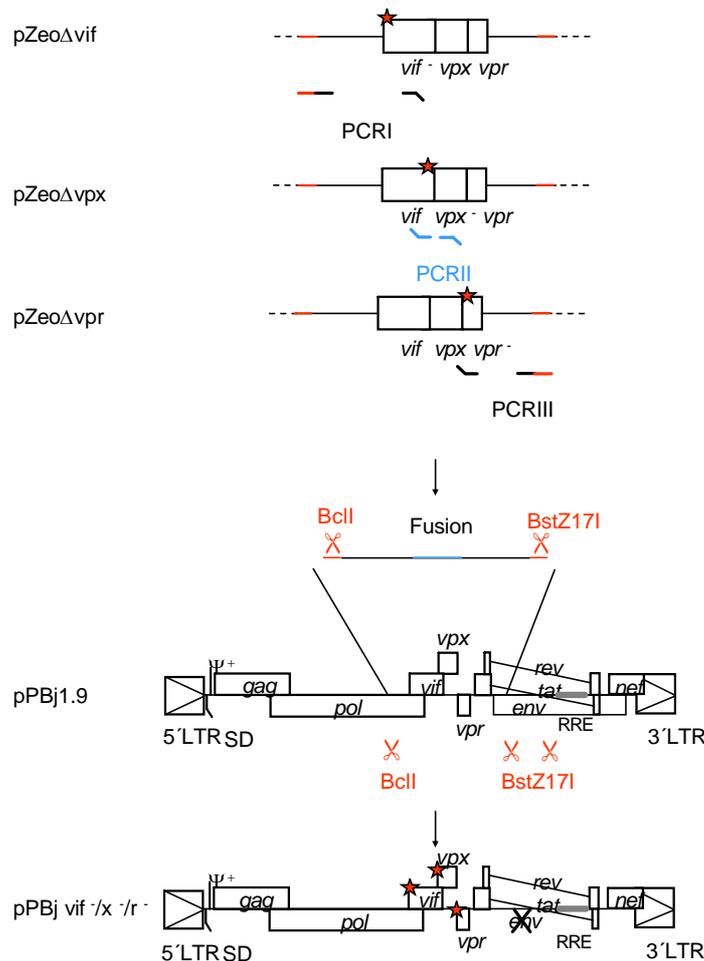


**Abb. 3.9 Mutationen zur funktionalen Deletion der akzessorischen Gene.** Dargestellt sind die Nucleotid- und Aminosäuresequenzen vor und nach der Mutagenese. Grün hervorgehoben sind die Start-ATG und rot die Stop-Kodons. Die blauen Pfeile geben unbeabsichtigte Mutationen an.

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, entstanden bei der Insertion der Mutationen in das *vpr* Gen zwei zusätzliche Mutationen. Da *vpr* mit keinem anderen Gen überlappt und die Expression dieser Gene ausgeschaltet werden sollte, konnten diese beiden Mutationen vernachlässigt werden.

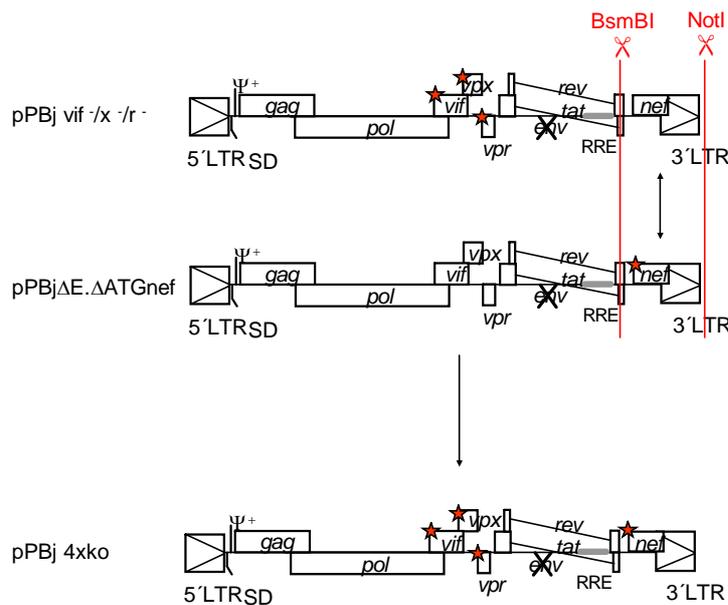
Um nun alle Gene in einem Konstrukt auszuschalten wurden aus den Subklonen pZeoΔ*vif*, pZeoΔ*vpx* und pZeoΔ*vpr*, die jeweils eines der akzessorischen Gene mit beschriebenen Mutationen kodieren (Wolfrum, 2002), über eine Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) die entsprechenden Fragmente amplifiziert. Diese wurden anschließend durch eine weitere PCR fusioniert. Da die flankierenden Primer so gewählt wurden, dass sie über den in den pZeo-Konstrukten enthaltenen *Bcl*I und *Bst*Z171-Schnittstellen liegen, konnte das PCR Fusionsfragment ebenfalls mit *Bcl*I und *Bst*Z171 restringiert werden. Das SIV<sub>smm</sub>PBj parental Konstrukt pPBj1.9 wurde mit den

Restriktionsenzymen *Bcl* und *BstZ171* geschnitten. Dabei wurde automatisch ein 1 kb großes Fragment aus dem *env* Leserahmen deletiert. Anschließend wurde das PCR-Fragment mit dem geschnittenen pPBj1.9 ligiert. Daraus resultiert pPBjvif /x /r . Die Klonierung ist schematisch in Abb. 3.10 dargestellt.



**Abb. 3.10 Schematische Darstellung der Klonierung von pPBj vif /x /r .** Amplifikation der mutierten Elemente aus den entsprechenden Subklonen (*pZeoΔvif*, *pZeoΔvpx*, *pZeoΔvpr*). Fusion dieser Fragmente und anschließende Insertion über *BclI* und *BstZ171* in *pPBj1.9*. ★ funktionale Deletion des Gens, ✂ Restriktionsschnittstelle.

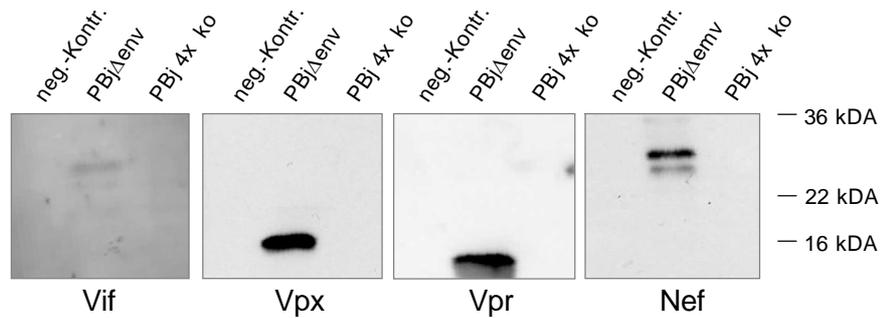
Um die Mutation des Start ATGs von *nef* einzufügen wurden die Plasmide *pPBjΔE.ΔATGnef*, das diese Mutation bereits enthält, und *pPBjvif /x /r* mit den Restriktionsenzymen *BsmBI* und *NotI* geschnitten. Das betreffende native Fragment wurde gegen das mit dem mutierten *nef* ATG substituiert. Das aus dieser Klonierung entstandene Plasmid *pPBj 4x ko* enthält keines der Start ATGs der akzessorischen Gene *vif*, *vpx*, *vpr* und *nef*, aber stattdessen mindestens ein zusätzliches Stop Kodon. Die Klonierung wurde durch eine Sequenzanalyse (MWGBiotech, Ebersberg) auf ihre Richtigkeit überprüft. Eine schematische Darstellung der Klonierung ist in Abb. 3.11 gezeigt.



**Abb. 3.11 Schematische Darstellung der Klonierung von pPBj 4x ko.** Austausch des *nef*-Gens durch ein Start-ATG-mutiertes *nef*-Gen über die Restriktionsschnittstellen *BsmBI* und *NotI*. ★ funktionale Deletion des Gens, ✂ Restriktionsschnittstelle

### 3.3.2 Untersuchung der Expression der mutierten akzessorischen Gene

Auf Grund der deletierten Start ATGs und der zusätzlich eingefügten Stop-Kodons sollte eine Expression der betreffenden Proteine ausgeschlossen sein. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Zunächst wurden das 4x ko Konstrukt und ein VSV-G-kodierendes Plasmid in 293T Zellen kotransfiziert. Zwei Tage später wurden die im Überstand enthaltenen Vektorpartikel durch Ultrazentrifugation konzentriert, lysiert und anschließend normierte Proteinmengen für die Westernblot-Analyse eingesetzt. Neben der vierfach-Deletionsmutante (PBj 4x ko) wurde als Positivkontrolle der PBjΔenv Vektor verwendet, da dieser noch alle akzessorischen Proteine beinhaltet. Als Negativkontrolle wurden Überstände von nicht-transfizierten Zellen eingesetzt. Zur Detektierung der einzelnen Proteine wurden kreuzreaktive monoklonale Antikörper gegen HIV-2 Vpx bzw. Nef und Immunsereen gegen SIV Vif und Vpr eingesetzt. Wie in Abb. 3.12 zu sehen ist, konnte jedes der akzessorischen Proteine in dem mit pPBjΔenv generierten Vektoren nachgewiesen werden. Für den vierfach-*Knockout* Vektor (PBj 4x ko) konnte jedoch keines der Proteine detektiert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die auf genetischer Ebene eingefügten Mutationen.



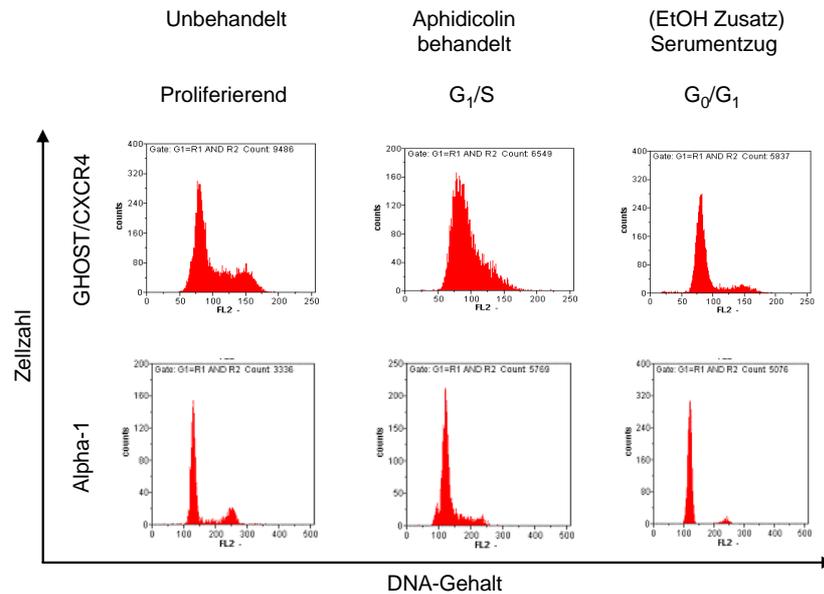
**Abb. 3.12 Ausgeschaltete Expression der akzessorischen Proteine der *Knockout* Mutante.** Normierte Proteinmengen aus vektorhaltigen Überständen wurden durch eine Western Blot-Analyse auf die Expression der akzessorischen Gene untersucht.

### 3.3.3 Arretierung von Zielzellen

Zur Evaluation der Transduktions-Eigenschaften verschiedener retro- bzw. lentiviraler Vektoren wurde in der Arbeitsgruppe „Medizinische Biotechnologie“ bereits ein Zellkulturmodell entwickelt (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005), bei dem Zelllinien in den verschiedenen Phasen des Zellzyklus arretiert werden können, um so den ruhenden Zustand diverser primärer Zellen zu „imitieren“. Die etablierte Methode ist nicht auf alle Zellen übertragbar. Sowohl Ghost Zellen als auch Alpha-1 Zellen erwiesen sich für diese Methode als geeignet. Ghost Zellen sind von humanen Osteosarkomzellen abgeleitet (HOS). Diese Zellen kodieren ein durch HIV/SIV Tat induzierbares *gfp*-Gen. Bei Alpha-1 Zellen handelt es sich um diploide humane Fibroblasten in der 16. - 20. Passage nach Isolierung. Diese Zellen sind im Gegensatz zu den Ghost Zellen nicht immortalisiert.

Zur Arretierung der Zellen in der  $G_1/S$ -Phase wurde der Polymeraseinhibitor Aphidicolin verwendet (Merril, 1998; Stitz *et al.*, 2000). Die betreffenden Zielzellen wurden dazu 24 h in Aphidicolin-haltigem Medium kultiviert. Zur Arretierung in der  $G_0$ -Phase wurden den konfluent gewachsenen Zellen durch Serumentzug die Wachstumsfaktoren entzogen (Merril, 1998; Mikami *et al.*, 1997). Je nach verwendetem Zelltyp variierte die Durchführung leicht (z.B.  $G_0$ -Arretierung mit und ohne Ethanol; siehe Materialien und Methoden 2.7.5).

Da der DNA-Gehalt von Zellen während des Zellzyklus variiert, konnte die Arretierung der Zellen durch eine Anfärbung der DNA und anschließende Messung des DNA-Gehalts in einem fluoreszenzaktiviertem Zellsortierer (FACS, fluorescent activated cellsorter, Becton Dickinson, FACScan<sup>TM</sup>) überprüft werden (Abb. 3.13, Tab. 3.1)



**Abb. 3.13 DNA-Gehalt unterschiedlich arretierter Zellen.** Gezeigt sind FACS Analysen von Ghost/CXCR4 (obere Reihe) und Alpha-1 (untere Reihe) Zellen, die unbehandelt (linke Spalte), Aphidicolin-behandelt (mittlere Spalte) oder durch Serumentzug (m/o EtOH, rechte Spalte) behandelt wurden.

**Tab. 3.1 Prozentualer Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen.**

		Unbehandelt [%]	Aphidicolin- behandelt [%]	(EtOH Zusatz) Serumentzug [%]
<b>G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub></b>	Ghost	60	<b>76</b>	<b>90</b>
	Alpha-1	74	<b>60</b>	<b>94</b>
<b>S</b>	Ghost	19	<b>22</b>	2
	Alpha-1	10	<b>34</b>	1
<b>G<sub>2</sub>/M</b>	Ghost	21	2	8
	Alpha-1	16	6	5

Die Auswertung bezieht sich auf die in Abb. 3.7 gezeigten FACS-Analysen.

Wie anhand der ausgewerteten Daten zu sehen ist, fand je nach Behandlung der Zellen eine Verschiebung der Zellzyklusphasen statt. Diese entsprach dem erwarteten Ergebnis. Bei nicht manipulierten und somit proliferierenden Zellen befindet sich der größte Teil der Zellen (60% Ghost, 74% Alpha-1) in der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase. Der Rest der Zellen ist verteilt auf S- und G<sub>2</sub>/M-Phase. Daß sich bei den Alpha-1 Zellen nur ein sehr geringer Anteil der Population in der S-Phase befindet, ist möglicherweise durch einen langsamer ablaufenden Replikationszyklus dieser Zellen zu erklären. Bei den mit Aphidicolin behandelten Zellen befinden sich kaum Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase. In der G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Population kommt es zu keiner

signifikanten Änderung. Allerdings häufen sich die Aphidicolin-behandelten Zellen in der S-Phase an. Auch dieses Ergebnis war so zu erwarten, da Aphidicolin keinen reinen G<sub>1</sub>-Phasen-Arrest bewirkt, sondern einen G<sub>1</sub>/S-Phasen-Arrest. Wurde den Zellen Serum entzogen fand eine Akkumulation in G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phase statt.

Ein Problem der verwendeten Zellzyklus-Nachweismethode ist die Tatsache, dass nicht zwischen G<sub>1</sub>- und G<sub>0</sub>-Phase unterschieden werden kann. Dennoch sind in den Histogrammen (Abb.3.13) deutliche Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die Aphidicolin-behandelten und die durch Serumentzug arretierten Zellen zu erkennen. Für die Zellen, denen Serum entzogen wurde, ist ein sehr schmaler Peak für die G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub>-Phasen-Population zu sehen, wohingegen bei den Aphidicolin-behandelten Zellen die Peaks für G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>- und S-Phase zu einem breiten Peak verschmelzen. Die später in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse der Transduktionsversuche mit HIV-1-Vektoren (siehe 3.3.4) geben zusätzliche Hinweise auf eine tatsächliche Arretierung der Zellen in G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase.

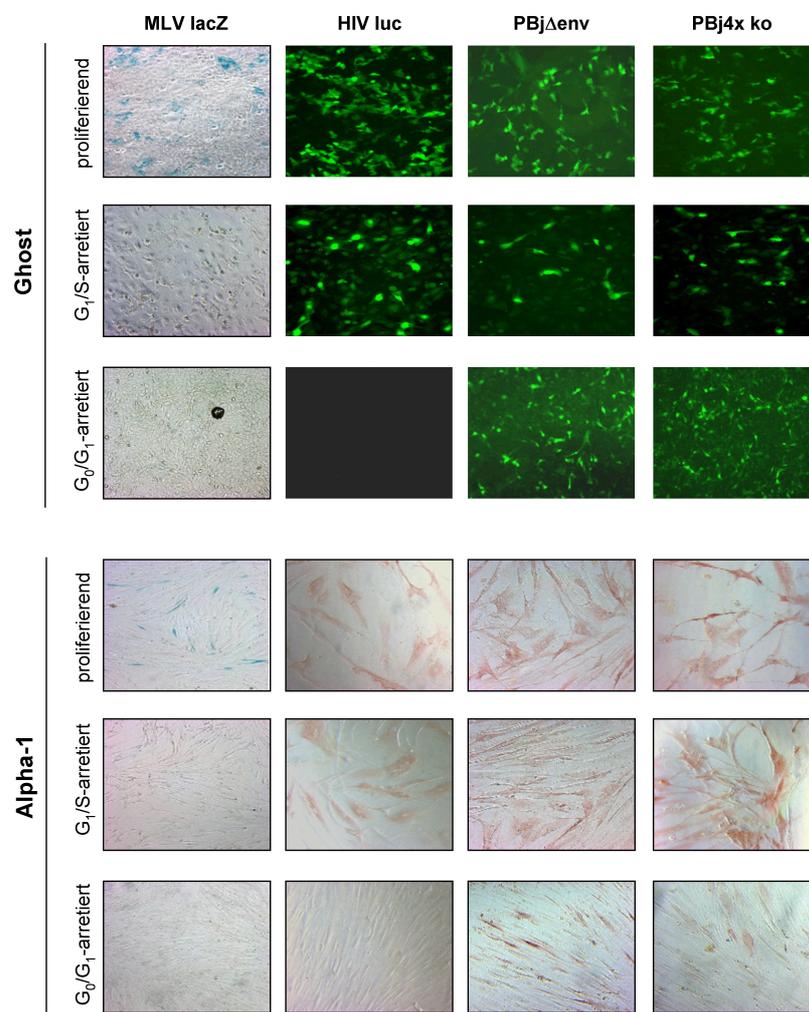
### 3.3.4 Transduktionseigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj 4xko im Vergleich zu anderen lenti- und gammaretroviralen Vektoren

Nachdem nun ein SIV<sub>smm</sub>PBj-Konstrukt vorlag, bei dem keines der akzessorischen Proteine exprimiert wird (PBj 4x ko), sollte dieser Vektor mit dem Wildtyp-abgeleiteten Vektor und zwei weiteren lenti- bzw. gammaretroviralen Vektoren verglichen werden. Bei dem lentiviralen Vektor handelte es sich um einen *Luziferase*-transferierenden HIV-1 Vektor, was hier jedoch nicht relevant ist, da der Gentransfer nicht anhand des Markergens, sondern durch Induktion von GFP (bei Ghost-Zellen) oder durch einen serologischen Nachweis der

Tab. 3.2 Plasmid-Mengenverhältnisse für die Transfektion zur Generierung der angegebenen Vektoren.

Vektor	Verpackungs-konstrukt	Transfervektor	Hüllprotein-konstrukt
MLV lacZ	pHIT60 2	pMD-SIdelS-βGal 2,5	pMD.G 1
HIV luc	pNL <sub>4-3</sub> .luc.R <sup>+</sup> E <sup>-</sup> 5		pMD.G 1
PBjΔenv	pPBjΔenv 10		pMD.G 1
PBj4x ko	pPBj 4xko 10		pMD.G 1

viralen Gene (bei Alpha-1 Zellen) nachgewiesen wurde (siehe 2.9.8). Der gammaretrovirale Vektor (MLV lacZ) transferiert ein *lacZ* Gen. Die vier verschiedenen Vektoren wurden durch transiente Transfektion in 293T Zellen generiert. Alle wurden mit dem Glykoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisiert. Die dabei eingesetzten Verhältnisse der jeweiligen Plasmide zueinander und die resultierenden Vektoren sind in Tab. 3.2 zusammengefasst. Diese Vektoren wurden zur Transduktion der Zielzellen Ghost und Alpha-1 eingesetzt, die sich in verschiedenen Phasen des Zellzyklus befanden. Um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten, wurden die Vektoren zur Titration in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt. Die Zellen wurden vier Tage nach Transduktion analysiert. Transduzierte Ghost Zellen exprimieren *gfp* und konnten direkt im

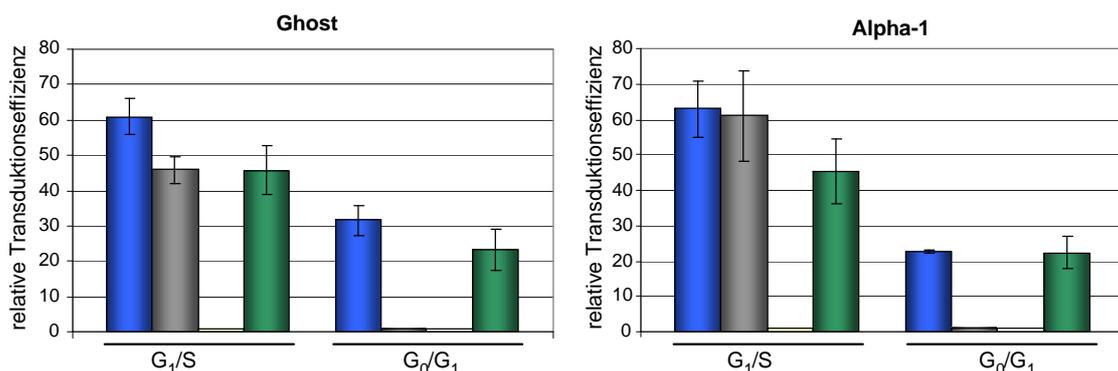


**Abb. 3.14 Transduzierte Ghost und Alpha-1 Zellen.** Die Zielzellen wurden in unterschiedlichen Zellzyklusphasen arretiert und mit den angegebenen Vektoren Transduziert. Vier Tage nach Transduktion wurden die Zellen analysiert. Der obere Teil der Abbildung zeigt Ghost Zellen, die nach erfolgreicher Transduktion *gfp* exprimieren. Im unteren Teil sind transduzierte Alpha-1 Zellen nach einer Immunfärbung gezeigt. Dabei wurde für den Nachweis der Transduktion mittels des HIV-1 Vektors ein HIV-1 Serum verwendet und für eine SIV<sub>smm</sub>PBj-vermittelte Transduktion ein kreuzreaktives HIV-2 Serum. Die Transduktion durch den MLV-abgeleiteten Vektor wurden auf beiden Zellen durch eine  $\beta$ -Galaktosidase-Färbung nachgewiesen.

Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Die Transduktion von Alpha-1 Zellen wurde mittels einer Immunfärbung der viralen Genprodukte nachgewiesen. Da der MLV-abgeleiteten Vektor ein  $\beta$ -Galaktosidase-Gen transferiert, wurde die Transduktion durch eine  $\beta$ -Gal-Färbung nachgewiesen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind in Abb. 3.14 dargestellt.

Wie auf den mikroskopischen Bildern gut zu erkennen ist, wurden mit den Referenz-Vektoren die erwarteten, bereits beschriebenen Ergebnisse erzielt (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Der MLV-abgeleitete Vektor kann ausschließlich proliferierende Zellen transduzieren, wohingegen der HIV-abgeleitete Vektor sowohl proliferierende als auch in  $G_1$ -Phase arretierte Zellen transduzieren kann; nicht jedoch die durch Serumentzug arretierten Zellen. Da HIV-1 Vektoren keine  $G_0$ -arretierten Zellen transduzieren können, ist dies ein weiteres Indiz dafür, dass sich die durch Serumentzug arretierten Zellen tatsächlich in der  $G_0$ -Phase befinden. Der PBJ $\Delta$ env Vektor konnte Zellen in allen Phasen des Zellzyklus transduzieren, auch die  $G_0$ -arretierten Zellen. Der hier getestete vierfach-*Knockout* Vektor (PBJ 4x ko) verhielt sich genau wie der PBJ $\Delta$ env Vektor und konnte trotz des Fehlens aller akzessorischer Proteine auch die  $G_0$ -arretierten Zellen transduzieren.

In Abb. 3.15 sind die Daten aus drei unabhängigen Experimenten graphisch zusammengefasst. Dazu wurden die Titer, die auf proliferierenden Zellen erzielt wurden, gleich hundert Prozent gesetzt und die Titer auf den arretierten Zellen in Relation dazu angegeben, was als relative Transduktionseffizienz bezeichnet wurde.



**Abb. 3.15 Transduktion von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen.** Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. ■ PBJ $\Delta$ env, ■ HIV luc, □ MLV lacZ, ■ PBJ 4x ko

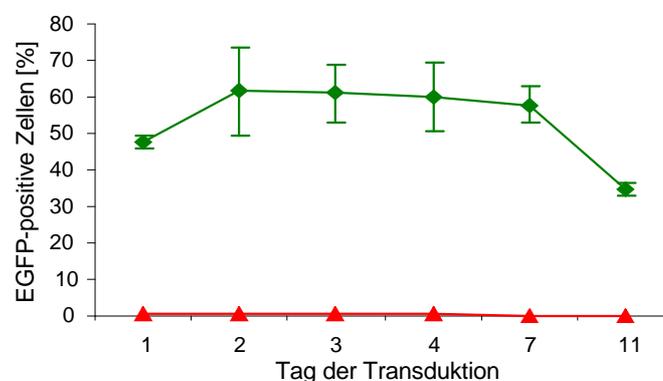
Wie auf den Diagrammen deutlich zu erkennen ist, waren die erzielten Ergebnisse unabhängig von der verwendeten Zelllinie. Die Transduktionseffizienz sank auf  $G_1$ -arretierten Zellen auf 50-60% ab. Das gilt sowohl für den verwendeten HIV-1-abgeleiteten Vektor als auch für beide PBJ-abgeleiteten Vektoren. Die  $G_0$ -arretierten Zellen wurden ausschließlich

von den PBJ-abgeleiteten Vektoren transduziert. Hier hatte sich die Transduktionseffizienz weiter verringert und lag bei etwa 20%. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen dem PBJ $\Delta$ env und dem PBJ 4x ko Vektor.

Diese Ergebnisse, die unabhängig voneinander auf zwei unterschiedlichen Zelltypen reproduziert werden konnten, zeigen, dass keines der akzessorischen Proteine für die Transduktion von arretierten Zellen benötigt wird.

### 3.4 Einfluss von Vpx auf die Transduktion von primären humanen Monozyten

Nun sollte getestet werden, ob die auf arretierten Zelllinien erzielten Ergebnisse auch auf primäre ruhende Zellen übertragbar sind. Daher sollte der SIV<sub>smm</sub>PBJ-abgeleitete 4x ko Vektor auf primären humanen Monozyten getestet werden. Monozyten befinden sich in einem ruhenden Zustand und können von dem PBJ-wt-abgeleiteten Vektor, nicht allerdings von einem HIV-1-abgeleiteten Vektor transduziert werden (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Diese Versuche wurden von J. Kaiser im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ am Paul-Ehrlich-Institut bearbeitet. Die Experimente wurden mit einem vierfach-*Knockout* Vektor durchgeführt (PBJ 4x ko EGFP), der ein *egfp*-Gen transferiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.16 dargestellt. Mit dem Wildtypvektor (PBJ EGFP) wurde bereits an Tag eins nach Isolierung eine Transduktionseffizienz von knapp 50% erreicht. Trugen allerdings alle vier akzessorischen Gene eine funktionale Mutation, ging die Fähigkeit zur Transduktion von Monozyten verloren. Somit scheinen unterschiedliche Mechanismen bei der Transduktion ruhender Zellen aktiv zu sein, die im Folgenden näher untersucht wurden.



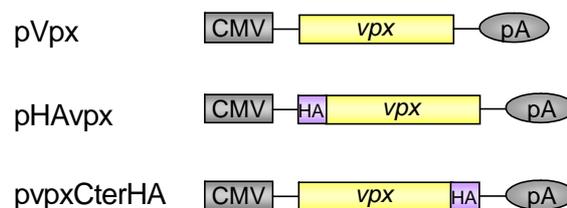
**Abb. 3.16 Transduktion von Monozyten durch einen SIV<sub>smm</sub>PBJ-abgeleiteten Vektoren mit (PBJ EGFP) und ohne (4x ko) akzessorische Proteine.** Transduktion an verschiedenen Tagen nach Isolierung mit einer moi von 10. — PBJ EGFP, — 4x ko. Das Diagramm wurde aus J. Kaisers Diplomarbeit (2004) entnommen.

Nun sollte ermittelt werden, welches der fehlenden akzessorischen Proteine für die Transduktion von Monozyten nötig ist.

1996 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass Vpx für die Replikation von SIV<sub>smm</sub>PBj in primären Makaken-Makrophagen essentiell ist (Fletcher *et al.*, 1996). Diese Beobachtung wurde später von der Gruppe um V.M. Hirsch bestätigt und darüber hinaus durch *in vivo* Studien ergänzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die auf Vpx zurückzuführende Möglichkeit der Infektion von Makrophagen *in vivo* eine zentrale Rolle bei der lokalen Virusreplikation und der Rekrutierung noch nicht infizierter Zellen spielt (Hirsch *et al.*, 1998).

### 3.4.1 Klonierung verschiedener Vpx-Expressionskonstrukte

Um zu testen, ob Vpx auch für die Transduktion von primären humanen Monozyten durch einen SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektor essentiell ist, sollte der PBj 4x ko EGFP Vektor, der selbst keines der akzessorischen Gene exprimiert, mit dem Vpx Protein supplementiert werden. Es wurden zunächst verschiedene Vpx-Expressionskonstrukte generiert (Abb. 3.17), um so das Protein durch Kotransfektion in den entsprechenden Verpackungszellen *in trans* zur Verfügung zu stellen.



**Abb. 3.17 Schematische Darstellung der Vpx Expressionsplasmide.** pVpx exprimiert das SIV<sub>smm</sub>PBj Wildtyp Vpx Protein. pHAvpx exprimiert ein N-terminal HA-markiertes Vpx und pvpxCterHA kodiert für ein C-terminal markiertes Vpx. CMV, Cytomegalovirus Promoter; pA, polyA Sequenz des bovinen Wachstumshormon-Gens; HA, Hämagglutinin-Markierung

Als Basis dieser Expressionsplasmide diente pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA), welches zwischen einem CMV-Promoter und einer poly A Sequenz eine Schnittstellen für multiple Restriktionsendonukleasen (MCS, *multiple cloning site*) besitzt. Aus dem Moleklarklon pPBj1.9 wurde über eine Polymerase Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) das *vpx* Gen amplifiziert. Über entsprechende Primer wurde N-terminal eine *EcoRI*-Schnittstelle und C-terminal eine *XhoI*-Schnittstelle angefügt. Für die Konstrukte pHAvpx und pvpxCterHA wurde ebenfalls über die Primer eine bestimmte Peptidsequenz

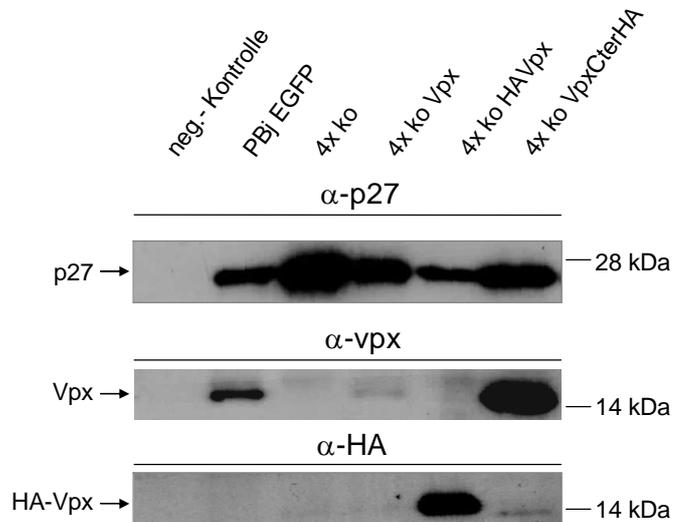
des Hämagglutinin-Proteins aus dem Influenza A Virus eingefügt, ein sogenannter *HA-tag*. Diese Proteinmarkierung sollte die spätere Detektion der Proteine erleichtern. Die jeweiligen Amplifikate wurden mit den entsprechenden Enzymen verdaut und in den ebenfalls restrigierten Plasmid-Vektor inseriert. Durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) wurden diese Konstrukte auf ihre Richtigkeit überprüft.

### 3.4.2 Verpackung von Vpx in SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren

Nun sollte überprüft werden, ob das exogene, *in trans* zur Verfügung gestellte Vpx in SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Vektorpartikel, die selbst keines der akzessorischen Gene kodieren, verpackt werden kann.

Dazu wurde das 4x ko Konstrukt zusammen mit jeweils einem der Vpx-Expressionsplasmide in 293T Verpackungszellen kotransfiziert. Sowohl die zu testenden Konstrukte als auch die Kontrollen wurden mit VSV-G pseudotypisiert. Die Vektorpartikel wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Als Positivkontrolle diente der PBj EGFP Vektor, der alle akzessorischen Gene kodiert. Als Negativkontrolle wurden die Überstände von nicht-transfizierten 293T Zellen benutzt. Diese wurde auch in den folgenden Versuchen benutzt, weshalb nicht jeweils gesondert darauf eingegangen wird. Als weitere Negativkontrolle wurde der 4x ko Vektor genutzt, bei dem alle akzessorischen Gene deletiert sind. Zur Detektierung von Vpx wurde ein mit SIV<sub>smm</sub>PBj kreuzreagierender anti-HIV-2-Vpx Antikörper oder ein gegen den bei zwei Vpx-Konstrukten vorhandenen HA-tag gerichteter Antikörper verwendet. Mit einem gegen die p27 Domäne des viralen Gag-Proteins gerichteten Antikörper sollte gezeigt werden, dass für jeden Ansatz etwa vergleichbare Mengen Protein eingesetzt wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.18 gezeigt. In allen Proben (mit Ausnahme der Negativkontrolle) konnte p27 detektiert werden, wenn auch nicht in vergleichbaren Mengen. Durch den gegen Vpx gerichteten Antikörper konnten das endogene Vpx des PBj EGFP, das nicht markierte Vpx und das C-terminal HA-markierte Vpx in Partikeln nachgewiesen werden (Spur 2, 4, 6). Das N-terminal HA-markierte Vpx wurde durch den anti-Vpx Antikörper nicht erkannt. Das lässt darauf schließen, dass die Bindungsstelle für den Antikörper durch die HA-Markierung nicht mehr zugänglich ist. Durch den anti-HA Antikörper konnte anschließend jedoch auch das N-terminal HA-markierte Vpx in Partikeln detektiert werden (Spur 5), wohingegen für das C-terminal HA-markierte Vpx bei der Verwendung des anti-HA Antikörper nur eine schwache Bande zu sehen war (Spur 6), wohingegen für dieses Vpx bei der Verwendung des anti-Vpx Antikörpers eine sehr intensive Bande zu erkennen war. Es kann also davon ausgegangen

werden, dass in diesem Fall die Antikörper-Bindungsstelle an der HA-Markierung durch die Fusion an Vpx eingeschränkt wird.

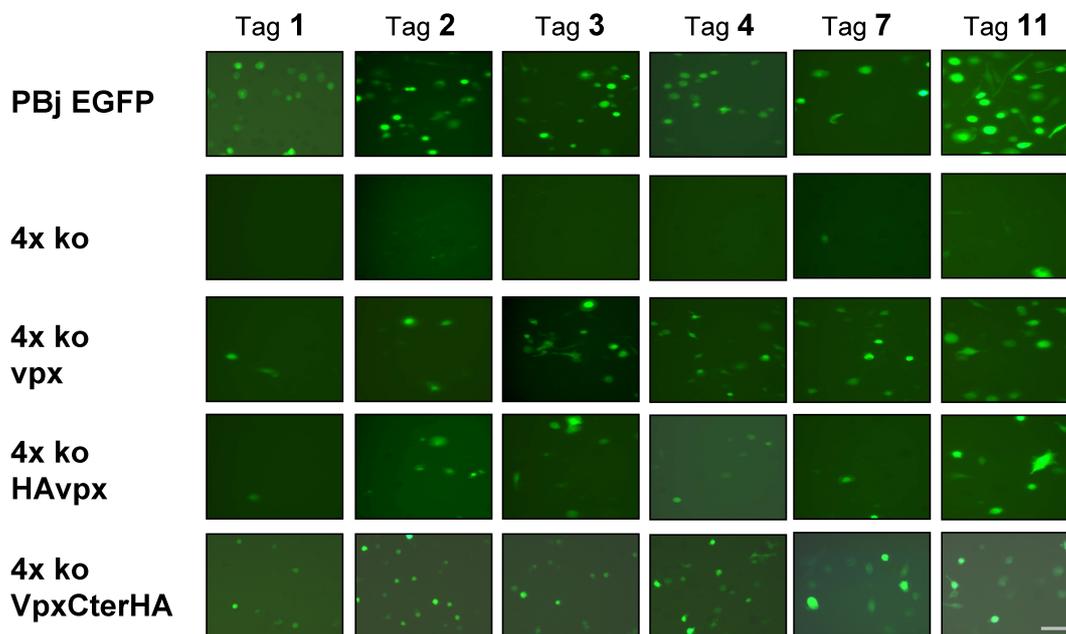


**Abb. 3.18 Verpackung von Vpx in den von  $SIV_{smm}$ PBj-abgeleiteten 4x ko Vektor.** Vektorhaltige Überstände wurden für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Oberste Reihe: Detektion von Gag p27. Mittlere Reihe: Detektion von Vpx. Untere Reihe: Detektion des HA-markierten Vpx.

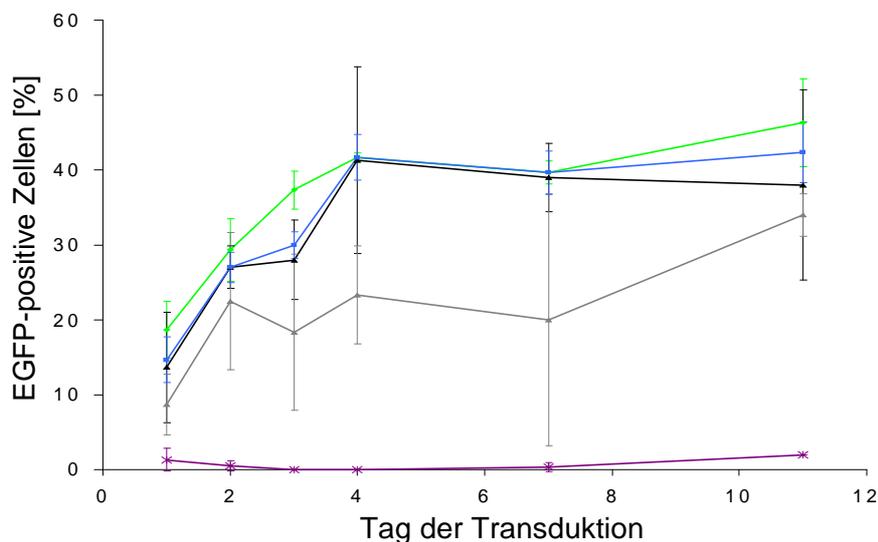
### 3.4.3 Transduktion von Monozyten mit Vpx-supplementierten $SIV_{smm}$ PBj 4x ko Vektoren

Um nun zu testen, ob das *in trans* zur Verfügung gestellte Vpx Protein einen Einfluss auf die Transduktion primärer humaner Monozyten hat, wurden PBj 4x ko Vektoren generiert, die eines der beschriebenen *in trans* zur Verfügung gestellten Vpx-Konstrukte verpacken. Alle Vektoren wurden mit VSV-G pseudotypisiert. Als Positivkontrolle diente der PBj EGFP Vektor, der alle akzessorischen Proteine kodiert und primäre humane Monozyten transduzieren kann. Als Negativkontrollen diente der 4x ko Vektor, der die Fähigkeit zur Transduktion von primären Monozyten verloren hat. In drei unabhängigen Experimenten wurden Monozyten aus dem Blut von drei freiwilligen, gesunden Spendern über einen Ficoll-Gradienten und anschließende Negativdepletion isoliert. Diese Zellen wurden an verschiedenen Tagen nach Isolierung mit den verschiedenen Vektoren mit einer *moi* von 5 transduziert und sieben Tage später im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. In Abb. 3.19 sind die Ergebnisse eines Experiments mit einem repräsentativen Donor gezeigt. Deutlich zu sehen ist, dass die Eigenschaft zur Transduktion primärer humaner Monozyten durch die Supplementierung des 4x ko Vektors mit dem Vpx Protein wieder hergestellt werden konnte. Bereits an Tag 1 nach Isolierung konnten die supplementierten Vektoren die Monozyten transduzieren. Die Daten aller Donoren sind in Abb. 3.20 graphisch zusammengefasst. Der 4x ko Vektor verhielt sich wie bereits bekannt; er war nicht dazu in der Lage, Monozyten

effizient zu transduzieren. Erst nach dem siebten Tag der Kultivierung, nachdem die Monozyten bereits zu Makrophagen differenziert waren, war eine Transduktionsrate von



**Abb. 3.19** Transduktion primärer humaner Monozyten mit Vpx-supplementierten PBj 4x ko Vektoren. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Monozyten bzw. vollständig differenzierten Makrophagen, die am angegebenen Tag nach Isolierung transduziert wurden. Die Analyse erfolgte sieben Tage nach Transduktion. Es ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt. 200x Vergrößerung, Maßstab 100µm



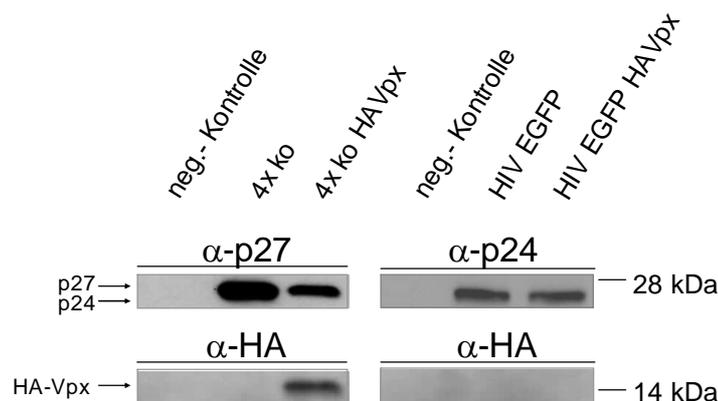
**Abb. 3.20** Transduktionseffizienz der verschiedenen Vpx-supplementierten PBj 4x ko Vektoren auf primären humanen Monozyten. Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil EGFP-exprimierender Monozyten bzw. Makrophagen. Die Zellen wurden an den angegebenen Tagen mit einer  $moi$  von 5 transduziert und sieben Tage später analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei Experimenten mit jeweils drei Donoren.

— PBj EGFP, — 4x ko Vpx, — 4x ko VpxCterHA, — 4x ko VpxHA, — 4x ko

weniger als 5% detektierbar. Alle *in trans* zur Verfügung gestellten Vpx Proteine konnten die Transduktionsfähigkeit der 4x ko Vektoren wiederherstellen. Dabei war der 4x ko Vektor supplementiert mit dem wt Vpx oder dem C-terminal HA-markierten Vpx genauso effizient wie der PBj EGFP Vektor. Der 4x ko Vektor, der mit dem N-terminal HA-markiertem Vpx supplementiert wurde, erzielte insgesamt eine geringere Transduktionseffizienz. Offensichtlich führte diese Markierung zu einer Einschränkung der Vpx Funktion.

### 3.4.4 Lässt sich die Fähigkeit zur Transduktion primärer Monozyten durch PBj Vpx auf HIV-1-abgeleitete Vektoren übertragen?

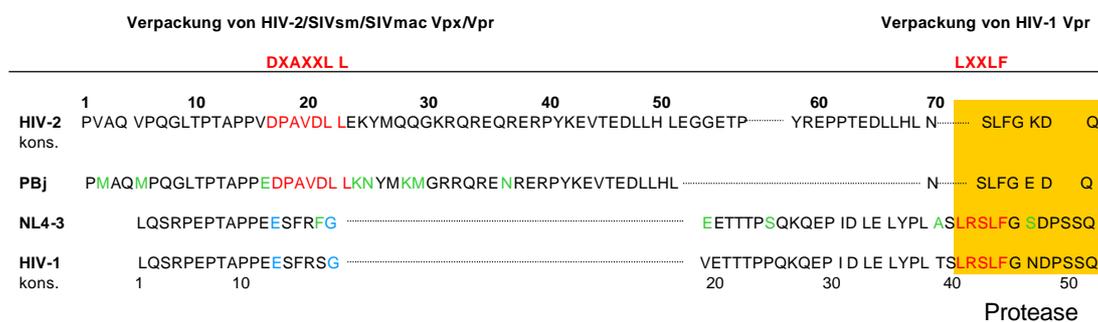
HIV-1 und die davon abgeleiteten Vektoren kodieren kein *vpx* Gen und sind nicht dazu in der Lage, Monozyten zu transduzieren. Nun sollte untersucht werden, ob SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx einen Einfluss auf die Transduktionsfähigkeit von Monozyten durch HIV-1-abgeleitete Vektoren hat. Dazu sollten HIV-1 Vektoren mit dem SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx Protein supplementiert werden. Zunächst wurde dies auf die gleiche Methode versucht, wie bei dem SIV<sub>smm</sub>PBj 4x ko Vektor. Es wurde ein Vpx-Expressionsplasmid mit dem HIV-1 Vektorkonstrukt kotransfiziert und die entstehenden Partikel im Western Blot auf die Verpackung von Vpx untersucht. Als Positivkontrolle wurde der mit dem N-terminal HA-markierten Vpx supplementierte 4x ko Vektor verwendet. Die Ergebnisse sind in Abb.3.21 gezeigt. Wie der Nachweis des Gag Proteins p27 (SIV) bzw. p24 (HIV) zeigt, wurden etwa gleiche Proteinmengen eingesetzt. Es stellte sich jedoch heraus, dass keine Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in HIV-1 Partikel stattfand. Daher wurden die im Folgenden beschriebenen Strategien gewählt, um SIV<sub>smm</sub>PBj in HIV-1 Partikel zu verpacken.



**Abb. 3.21 Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in HIV-1 Partikel.** Vektorhaltige Überstände wurden für eine Western Blot-Analyse eingesetzt. Obere Reihe: Detektion von Gag p27 (SIV) bzw. p24 (HIV-1) Untere Reihe: Detektion des HA-markierten SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx.

### 3.4.5 Inkorporation von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx durch Modifikation von HIV-1 Vektorpartikeln

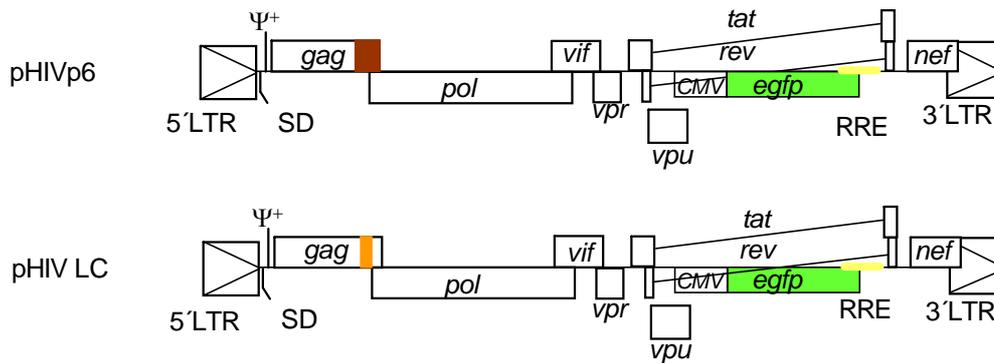
Es ist bekannt, dass SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx über eine Interaktion mit der p6 Domäne des Gag Proteins in SIV Partikel inkorporiert wird (Accola *et al.*, 1999; Selig *et al.*, 1999). Auch HIV-1 Vpr wird über eine solche Interaktion in HIV-1 Partikel inkorporiert (Jenkins *et al.*, 2001). Vergleicht man die p6 Domänen von HIV-1 und SIV<sub>smm</sub>PBj, so fällt auf, dass ein in der HIV-2/SIVsm/SIVmac Gruppe konservierter Bereich (AS 23-52) in der p6 Domäne von HIV-1 nicht vorhanden ist (Abb.3.22). Möglicherweise ist dieser Bereich für die Verpackung von Vpx in Partikel verantwortlich.



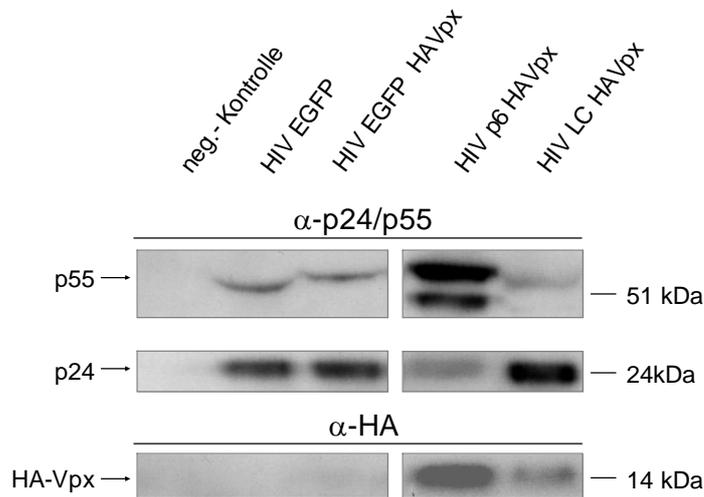
**Abb. 3.22 Vergleich der Aminosäuresequenz der p6 Domäne verschiedener Lentiviren.** Gelb unterlegt: Beginn des Protease-Leserahmens, rot: Verpackungs-Motiv für SIV Vpx bzw. HIV-1 Vpr, grün: Aminosäure-Austausch im Vergleich zur Konsensussequenz, blau: Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften wie die des Verpackungs-Motivs; kons, Konsensussequenz.

#### 3.4.5.1 Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in modifizierte HIV-1 Vektorpartikel

Die Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in HIV-1 Partikel sollte daher durch eine Modifikation der HIV-1 p6 Domäne erzielt werden. Es wurden zwei Konstrukte generiert. Bei pHIVp6 wurde die gesamte p6 Domäne gegen die von SIV<sub>smm</sub>PBj (AS 1-59) ausgetauscht, und bei dem zweiten Konstrukt pHIV LC wurden die Aminosäuren 23-52 der SIV<sub>smm</sub>PBj p6 Domäne an entsprechender Stelle in die HIV-1 p6 Domäne eingefügt. Beide Konstrukte sind schematisch in Abb. 3.23 dargestellt. Die Konstrukte pHIVp6 und pHIV LC wurden mit dem N-terminal HA-markierten Vpx-Expressionskonstrukt kotransfiziert und die entstandenen Partikel wurden im Western Blot auf die Verpackung von Vpx untersucht. Als Negativkontrolle wurde der HIV-1-abgeleitete Vektor (HIV EGFP) mit und ohne kotransfiziertes N-terminal markiertem Vpx benutzt.



**Abb. 3.23 Schematische Darstellung der HIV-1-abgeleiteten Vektoren mit modifizierter p6 Domäne.** Braun: gesamte SIV<sub>smm</sub>PBJ p6 Domäne (AS 1-59); orange: AS 23-52 der SIV<sub>smm</sub>PBJ p6 Domäne



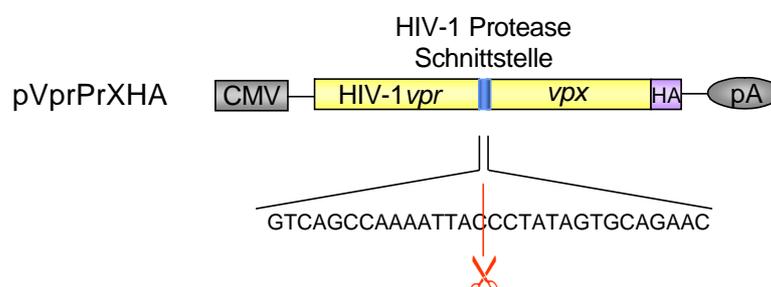
**Abb.3.24 Analyse der Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBJ Vpx in HIV-1 Partikel.** Vektorhaltige Überstände wurden über ein SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Obere Reihe: Detektion von Gag p55 Mittlere Reihe: Detektierung von Gag p27 (SIV) bzw. p24 (HIV-1) Untere Reihe: Detektion des HA-markierten Vpx.

Wie in der Abb. 3.24 deutlich zu erkennen ist, wurde Vpx in beide modifizierten HIV-Konstrukte verpackt. Die Negativkontrolle (Spur 3) ergab erneut, dass Vpx nicht in HIV-1 Partikel verpackt wird. Es ist allerdings auffällig, dass bei dem HIV p6 Konstrukt, bei dem die gesamte p6 Domäne ausgetauscht wurde, nur eine schwache p24 Bande zu sehen war, wohingegen die p55 Bande sehr stark war. p55 ist ein Vorläuferprotein, das während der Partikelreifung durch die virale Protease prozessiert wird; dabei entsteht p24. Da die p6 Domäne mit dem Leserahmen der viralen Protease überlappt, wurde durch den Austausch möglicherweise die Aktivität dieses Enzyms eingeschränkt. Dies würde die schwache p24 Bande erklären. Darüber hinaus stellte sich in den Transduktionsexperimenten heraus, dass

die entstandenen HIV p6 Partikel nicht infektiös waren, was ebenfalls für eine eingeschränkt ablaufende Partikelreifung spricht.

### 3.4.5.2 Verpackung eines HIV-1 Vpr/ SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx-Fusionsproteins in HIV-1 Vektorpartikel

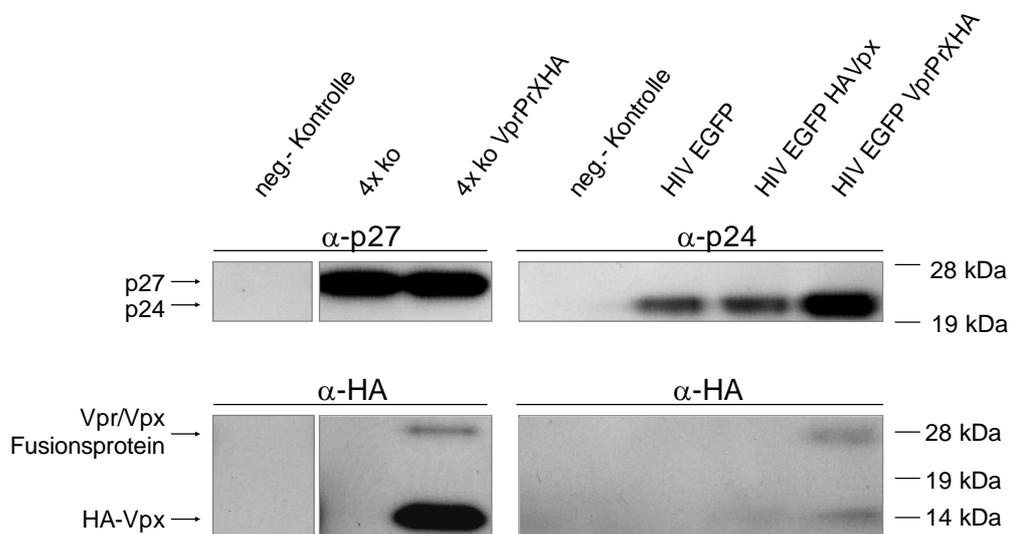
Neben dem Versuch, durch eine Modifikation der HIV-1 Vektorpartikel eine Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx zu ermöglichen, wurde eine Manipulation des Vpx-Proteins vorgenommen. Durch eine Fusion von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx an HIV-1 Vpr sollte die Inkorporation bewerkstelligt werden, denn das endogene Vpr wird auf natürlichem Weg in HIV-1 Partikel verpackt. Für die Verpackung von HIV-1 Vpr ist der N-terminale Teil (AS 1-73) dieses Proteins ausreichend (Mahalingam *et al.*, 1997). Daher wurde nur dieser Teil über eine Fusions-PCR an SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx fusioniert. Da es nicht ausgeschlossen werden konnte, dass solch eine Fusion zu einer Inhibition der Eigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx führt (z.B. durch sterische Blockierungen), sollte eine Separation der einzelnen Proteine ermöglicht werden. Daher wurde eine HIV-1-Proteaseschnittstelle zwischen Vpr und Vpx eingefügt. Diese Schnittstelle (GTCAGCCAAAATTAC~~×~~CCTATAGTGCAGAAC) ist hoch konserviert und dient auch als Substrat für die Protease von SIV<sub>smm</sub>PBj. Die Sequenz dieser Proteaseschnittstelle wurde durch spezifische Primer mittels einer PCR zwischen den N-terminalen Teil des HIV-1 Vpr und SIV<sub>smm</sub>Vpx eingebracht. Zur einfacheren Detektion wurde das Vpx Protein an seinem C-terminalen Ende mit einem HA-tag markiert. Das Fusionsprotein wurde in das Expressionsplasmid pcDNA3.1(+) (Invitrogen, Carlsbad, USA) inseriert. Das Expressionskonstrukt pVprPrXHA ist in Abb. 3.25 schematisch dargestellt.



**Abb. 3.25 Schematisch Darstellung des HIV-1 Vpr/SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx Fusionsprotein-Expressionskonstrukts.** Blau: Position der Proteaseschnittstelle; CMV, Cytomegalovirus Promoter; pA, polyA Sequenz des bovinen Wachstumshormon-Gens; HA, Hämagglutinin-Markierung

Um dieses Konstrukt auf seine Verpackung sowohl in SIV<sub>smm</sub>PBj als auch HIV-1 Partikel zu überprüfen, wurde es mit dem 4x ko bzw. dem HIV-1-abgeleiteten Vektorkonstrukt in 293T Zellen kotransfiziert und die entstandenen Partikel im Western Blot analysiert. Als

Negativkontrolle diente der 4x ko PBj Vektor allein sowie das HIV EGFP Konstrukt mit und ohne kotransfiziertem nicht-fusioniertem Vpx. Die Western Blot- Analyse ist in Abb. 3.26 gezeigt. Die Detektierung von p27 bzw. p24 zeigte, dass etwa gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden. Für das 4x ko und das HIV EGFP Konstrukt, die mit dem Fusionsprotein-Expressionskonstrukt kotransfiziert wurden (Spur 3 und 7) konnten durch den  $\alpha$ -HA-Antikörper zwei Banden detektiert werden. Die obere Bande stellt das nicht-gespaltene Fusionsprotein dar. Die untere Bande repräsentiert die gespaltene Form, von der mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper allerdings nur das HA-markierte Vpx detektiert werden kann. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fusionsprotein sowohl von SIV<sub>smm</sub>PBj als auch von HIV-1 Partikeln verpackt werden kann und die Spaltung durch die virale Protease in beiden Partikeln stattfindet.

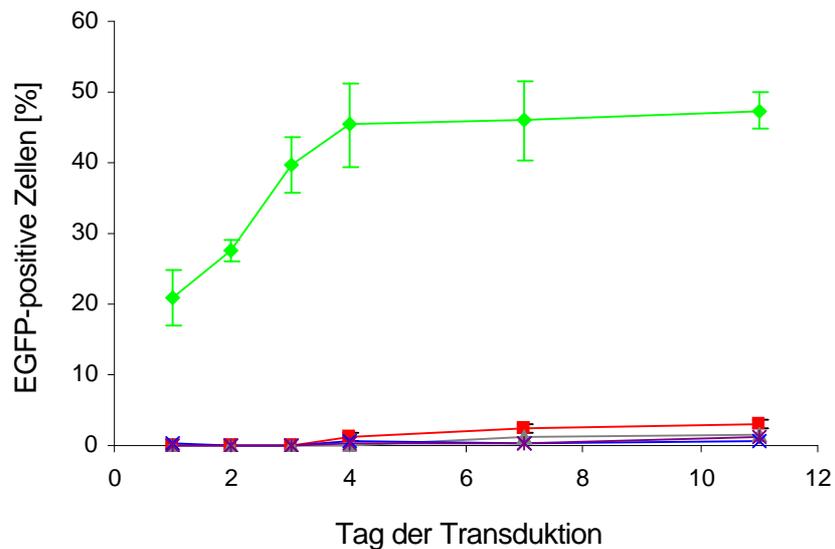


**Abb. 3.26 Verpackung des Fusionsproteins VprPrVpxHA in HIV-1 Partikel.** Vektorhaltige Überstände wurden über ein SDS-Gel getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Obere Reihe: Detektierung von Gag p27 (SIV) bzw. p24 (HIV-1) Untere Reihe: Detektion des HA-markierten Vpx.

### 3.4.5.3 Transduktion von Monozyten mit Vpx-supplementierten HIV-1-abgeleiteten Vektoren

Nun sollte getestet werden, ob die mit SIV<sub>smm</sub>PBj supplementierten HIV-1 Vektoren dazu in der Lage sind, humane Monozyten zu transduzieren. Es wurden sowohl HIV-1 Wildtypvektoren mit dem Vpr/Vpx-Fusionsprotein (HIV VprXHA) als auch an der p6 Domäne mutierte HIV-1 Vektoren mit SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx (HIV LC Vpx) generiert. Des weiteren sollte der mit dem Vpr/Vpx-Fusionsprotein supplementierte PBj 4x ko Vektor auf seine Fähigkeit zur Transduktion von Monozyten getestet werden. Als Positivkontrolle diente der mit Vpx supplementierte PBj 4x ko Vektor. Als Negativkontrollen diente der HIV-1 Wildtypvektor. Alle Vektoren wurden mit VSV-G pseudotypisiert. In drei unabhängigen Experimenten wurden

Monozyten aus dem Blut von drei freiwilligen, gesunden Spendern über einen Ficoll-Gradienten und anschließende Negativdepletion isoliert. Diese Zellen wurden an verschiedenen Tagen nach Isolierung mit den verschiedenen Vektoren mit einer  $moi$  von 10 transduziert und sieben Tage später mittels des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Wie aus Abb. 3.27 deutlich wird, war keiner der Vpx-supplementierten HIV-1 Vektoren dazu in der Lage, Monozyten zu transduzieren. Allerdings konnte auch der mit dem Vpr/Vpx-Fusionsprotein supplementierte PBJ 4x ko Vektor keine Monozyten transduzieren. Dies deutet darauf hin, dass das Vpx Protein trotz Abspaltung von dem fusionierten HIV-1 Vpr nicht funktionell ist.



**Abb. 3.27 Transduktionseffizienz der verschiedenen Vpx-supplementierten HIV-1 Vektoren auf primären humanen Monozyten.** Angegeben ist jeweils der prozentuale Anteil *egfp*-exprimierender Monozyten bzw. Makrophagen. Die Zellen wurden an den angegebenen Tagen mit einer  $moi$  von 10 transduziert und sieben Tage später analysiert. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei Experimenten. — PBJ EGFP, — HIV EGFP, — HIV VprXHA, — HIV LC Vpx, — 4x ko VprXHA

### 3.5 Konstruktion eines von SIV<sub>smm</sub>PBJ abgeleiteten Dreiplasmid-Vektor-Systems

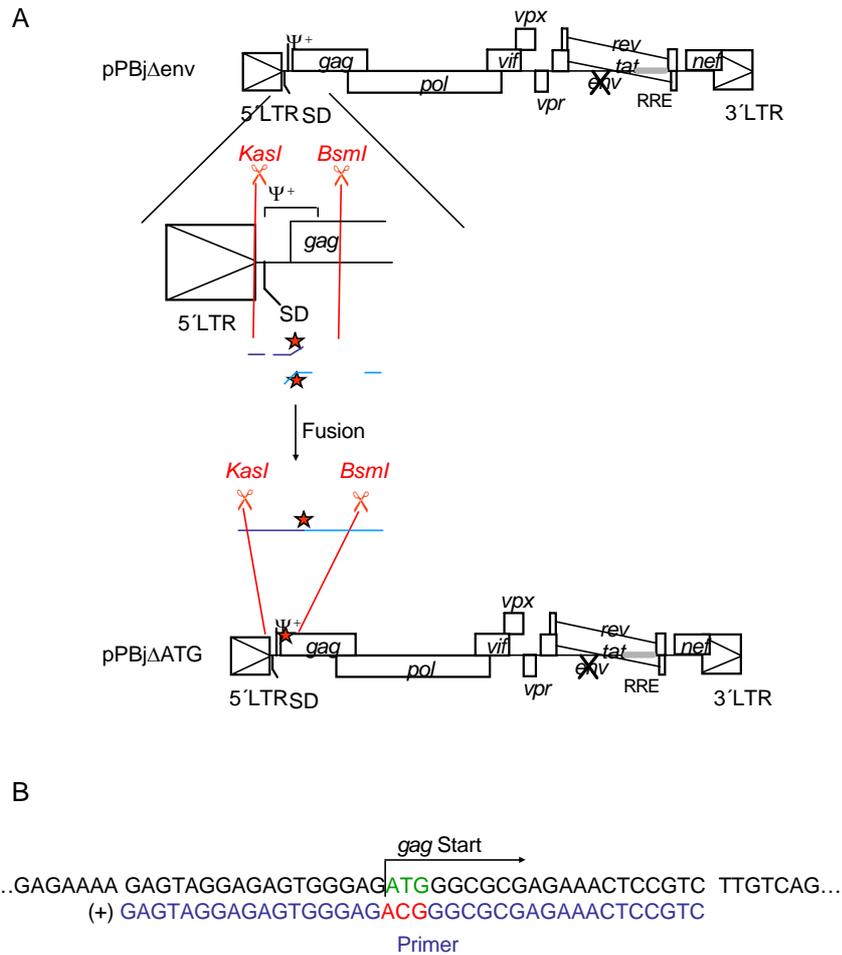
Für die Gentherapie mit viralen Vektoren ist es von großer Bedeutung, die verwendeten Systeme so sicher wie möglich zu machen. Der erste Schritt ist dabei, die Information zur Generierung eines Vektors auf drei Plasmide aufzuteilen und dabei so wenig wie möglich virale Genabschnitte beizubehalten. Bei den drei Plasmiden handelt es sich zum einen um ein Verpackungskonstrukt, das für die zur Partikelbildung notwendigen Proteine kodiert. Auf einem weiteren Plasmid befinden sich als einzige virale Bestandteile die für die reverse Transkription und Integration essentiellen Teile: die LTRs und das Verpackungssignal ( $\Psi$ ). Darüber hinaus kodiert diese Transfervektor für das zu transferierende Gen, das evtl. über

einen eigenen, heterologen Promotor reguliert wird. Auf dem dritten Plasmid wird das Hüllprotein zur Verfügung gestellt, bei dem es sich nicht um das homologe Env-Protein handeln muss. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren ausschließlich mit VSV-G pseudotypisiert wurden, musste kein neues Hüllproteinexpressionskonstrukt generiert werden.

### 3.5.1 Konstruktion des Transfervektors pPBj trans

Wie bereits beschrieben, sollte der Transfervektor nur noch die für die reverse Transkription und Integration essentiellen viralen Bestandteile beinhalten, denn die genetische Information des Transfervektors gelangt in die Zielzelle und wird dort in das Genom der Wirtszelle integriert. Im Folgenden wird die Entwicklung des SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Transfervektors pPBj trans beschrieben.

Als Ursprung für den von SIV<sub>smm</sub>PBj abgeleiteten Transfervektor diente das *env*-deletierte Konstrukt pPBj $\Delta$ env. Der erste Schritt war die Mutation des *gag* Start ATGs, welche durch eine Fusions-PCR eingefügt wurde. Da das Verpackungssignal mit dem 5'-Ende von *gag* überlappt, war eine vollständige Deletion dieses Gens nicht möglich. Für die PCR wurden die äußeren Primer so gewählt, dass sie jeweils über einer definierten Einzel-Restriktionsschnittstelle liegen. Die inneren Primer waren komplementär zu dem Bereich um das Start ATG, jedoch enthielten sie anstelle der ATG-Startsequenz die Sequenz ACG. Mit diesen Primern wurden zunächst zwei separate Fragmente aus pPBj $\Delta$ env amplifiziert und in einer dritten PCR fusioniert. Sowohl das entstandene Fragment als auch das Ausgangsplasmid wurden mit *KasI* und *BsmI* verdaut und anschließend das PCR-Fragment in das PBj $\Delta$ env Konstrukt ligiert. Das entstandene Konstrukt pPBj $\Delta$ ATG wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft. Die Klonierung ist schematisch in Abb. 3.28 dargestellt.



**Abb. 3.28 Schematische Darstellung der Klonierung zur Deletion des *gag* Start-ATG.** A) Amplifikation des Bereiches um das *gag* Start ATG mit modifizierten Primern zum Basenaustausch von ATG zu ACG. Fusion der beiden Fragmente und Insertion in das parentale Plasmid über die Restriktionsschnittstellen *KasI* und *BsmI*. B) Primersequenz und Bindungsstelle am *gag* Start-ATG.

Die nächsten Klonierungsschritte sind in Abb. 3.29 dargestellt. Es wurde ein Reporter-gen inseriert, um auf einfachem Weg die Funktionalität der einzelnen Transfervektor-Vorläuferkonstrukte testen zu können. Dazu wurde aus dem Konstrukt pEGFP-N1, welches ein durch einen CMV-Promotor reguliertes *egfp*-Gen enthält, die Promotor-Reporter-gen-Kassette durch die Restriktionsenzyme *AfeIII* und *NotI* herausgeschnitten. Nach Erzeugung von „glatten Enden“ durch die Klenow-Polymerase wurde das Fragment in das zuvor mit *SnaBI* linearisierte pPBjΔATG ligiert. Das resultierende Plasmid pPBjΔATG.EGFP wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.

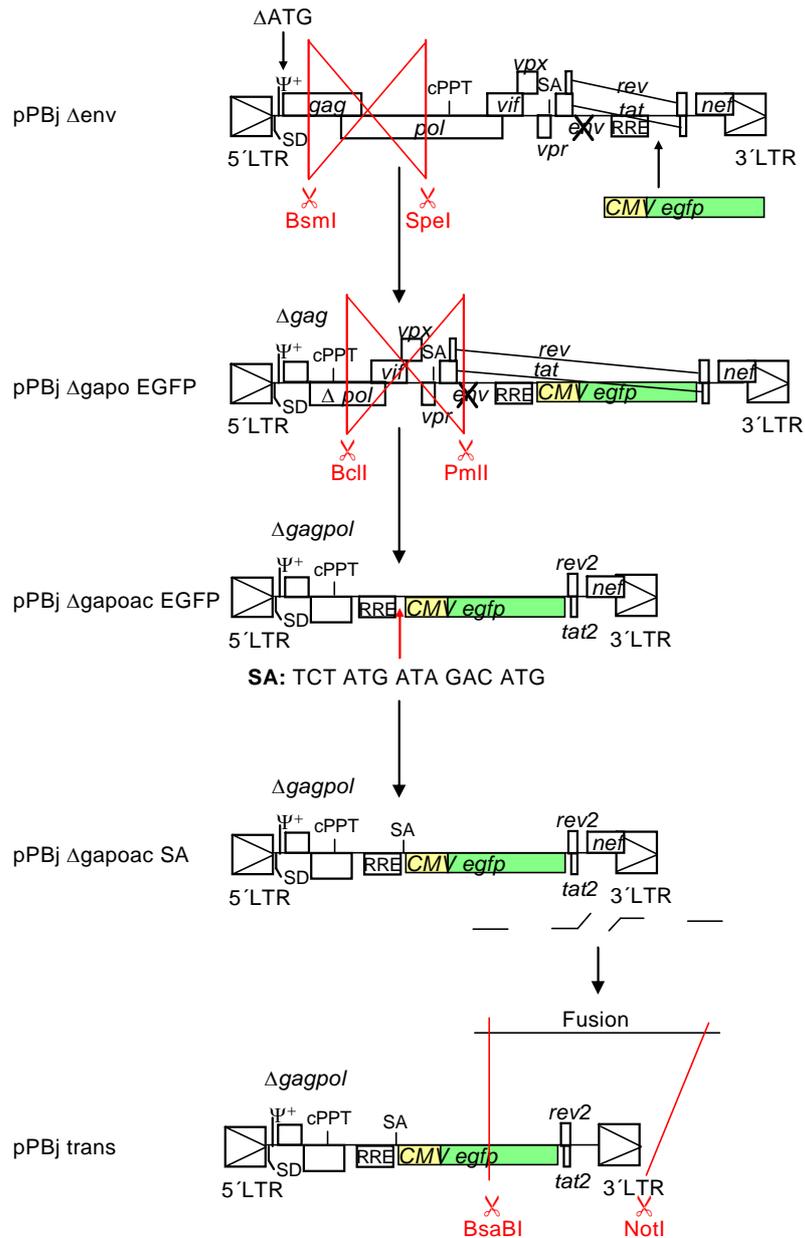
Durch die nächsten Klonierungsschritte sollten unnötige Bereiche des viralen Genoms deletiert werden. Dazu wurde zunächst über die Restriktionsschnittstellen *BsmI* und *SpeI* ein

2,8 kb großer Bereich aus dem *gag/pol*-Leserahmen deletiert. Durch Auffüllen der Enden durch die Klenow-Polymerase und anschließende Religation entstand das Plasmid pPBjΔgapoEGFP.

Der folgende Schritt führte zur Deletion des 3'-Endes der *pol*-Region und der akzessorischen Gene *vif*, *vpx* und *vpr*. Exon 1 der Gene *tat* und *rev* wurde ebenfalls aus dem viralen Genom entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass der zentrale Polypurintrakt (cPPT) erhalten blieb. Wie bereits beschrieben (Follenzi *et al.*, 2000), ist dieser wichtig für die Transduktion nicht-prolierender Zellen. Eine Restriktion mit den Enzymen *Bcl* und *Pml* mit anschließender Auffüllung der Enden durch die Klenow-Polymerase und Religation des Plasmids führte zur Deletion dieses 1,8 kb großen Fragments. Das resultierende Konstrukt pPBjΔgapoacEGFP wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.

Bei dem zuletzt beschriebenen Klonierungsschritt wurde ein wichtiger Spleißakzeptor deletiert, der jedoch für die Funktionalität des Transfervektors von großer Bedeutung ist (Naldini *et al.*, 1996). Daher wurde nun nachträglich ein Spleißakzeptor eingefügt. Die entsprechende Sequenz (Reinhart *et al.*, 1996) wurde als Oligonukleotid synthetisiert. Zunächst wurden der Plus- und der Minus-Strang in einem Ansatz für 1 min auf 95°C erhitzt, um sicherzustellen, dass alle Oligonukleotide als Einzelstrang vorliegen. Zum Hybridisieren beider Stränge wurde der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Dieses Fragment wurde in das mit *MscI* linearisierte Plasmid pPBjΔgapoacEGFP ligiert, wodurch das Konstrukt pPBjΔgapoacSA entstand. Durch die Insertion des Oligonukleotids wurde eine neue Schnittstelle generiert, die es ermöglichte, über einen analytischen Verdau die Insertion zu überprüfen. Mehrere der so identifizierten Konstrukte wurden zusätzlich durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) überprüft.

Als letztes verbleibendes akzessorisches Gen wurde auch *nef* deletiert. Es konnte nicht die gesamte Sequenz deletiert werden, da sich der 3'-Bereich des Gens mit der LTR überschneidet und diese erhalten bleiben sollte. Über eine PCR wurde zunächst der Bereich 5' vom *nef* Start-Kodon amplifiziert. Der (+)-Strang Primer ist komplementär zu einer *BsaBI*-Schnittstelle. In einer zweiten PCR wurde der Bereich von *nef*, der mit der 3'-LTR überlappt,



**Abb. 3.29 Schematische Darstellung der Klonierung des Transfervektors pPBj trans.** Insertion der CMV-egfp-Kassette in den ehemaligen *env*-Leserahmen und Deletion eines 2,8 kb großen Fragments aus *gag/pol* (pPBj $\Delta gapo EGFP$ ). Deletion der akzessorischen Gene *vif*, *vpr* und *vpx* und Exon 1 von *tat* und *rev* (pPBj  $\Delta gapoac EGFP$ ). Insertion eines Spleißakzeptors zwischen RRE und Reporter gen (pPBj  $\Delta gapoac SA$ ). Deletion des *nef*-Gens durch eine Fusions-PCR (pPBj trans).  $\Psi$ , Verpackungssignal; cPPT, zentraler Polypurintrakt; RRE, Rev-responsives Element; SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; ✂ Restriktionsschnittstellen.

amplifiziert. Der (-)-Primer wurde hier so gewählt, dass dieser über einer *NotI*-Schnittstelle des Matrizen-Plasmids liegt. Die entstandenen Fragmente wurden in einer dritten PCR durch die beiden äußeren Primer fusioniert. Dieses Fusionsprodukt wurde nun durch *BsaBI* und *NotI* restringiert und in das ebenfalls geschnittene Ausgangsplasmid (pPBj  $\Delta gapoac SA$ ) inseriert, wodurch das *nef*-deletierte Konstrukt pPBj trans entstand. Auch dieses Konstrukt

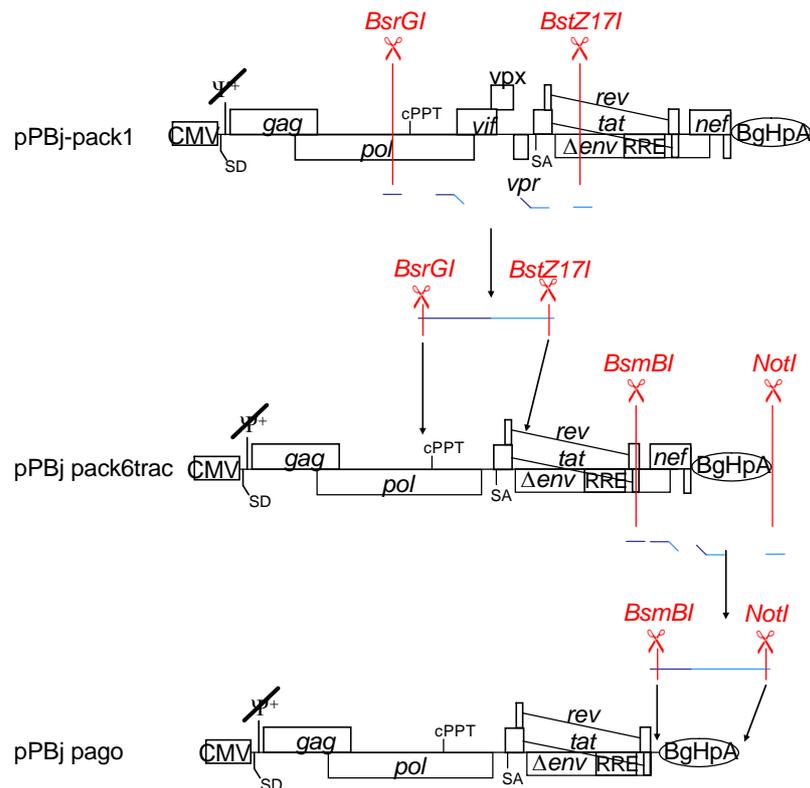
wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) auf seine Richtigkeit überprüft.

### 3.5.2 Konstruktion des Verpackungskonstrukts

Für die Konstruktion eines SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten Verpackungskonstrukts wurde als Ausgangskonstrukt das Plasmid pPBj-pack1 verwendet. Dieses Konstrukt enthält anstelle der 5'-LTR einen CMV Promotor, und am 3'-Ende wurde die LTR durch eine poly A Sequenz des bovinen Wachstumshormon-Gens ersetzt. Der CMV Promotor wurde so kloniert, dass die Sequenz zwischen der ursprünglichen 5'-LTR und dem Spleißdonor deletiert wurde, wobei auch gleichzeitig die putative Verpackungssequenz trunziert wurde. Dadurch sollte eine Verpackung des Konstrukts ausgeschlossen werden. Im folgenden Schritt sollten die akzessorischen Gene *vif*, *vpx*, *vpr* und *nef* deletiert werden. Die regulatorischen Gene *tat* und *rev* sollten zunächst erhalten werden.

#### 3.5.2.1 Konstruktion von pPBj pago

Zunächst wurde die Deletion der akzessorischen Gene *vif*, *vpx* und *vpr* deletiert. Dazu wurde eine Fusions-PCR durchgeführt, wobei 5' und 3' dieser Gene liegende Bereiche amplifiziert und anschließend fusioniert wurden. Sowohl das Plasmid pPBj-pack1 als auch das bei der Fusions-PCR entstandene Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *BsrGI* und *BstZ17I* geschnitten und anschließend ligiert. Das dadurch entstandene Plasmid pPBj-pack6 trac wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) verifiziert. Um das *nef* Gen zu deletieren, wurde ebenfalls eine Fusions-PCR durchgeführt. Dazu wurden die *nef*-flankierenden Bereiche amplifiziert und in einer weiteren PCR fusioniert. Über die Schnittstellen *BsmBI* und *NotI* wurde das Fragment in das Plasmid pPBj-pack6 trac eingebracht, wodurch das Konstrukt pPBj pago entstand. Auch dieses wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG, Ebersberg) überprüft. In Abb. 3.30 ist die Klonierung schematisch dargestellt.

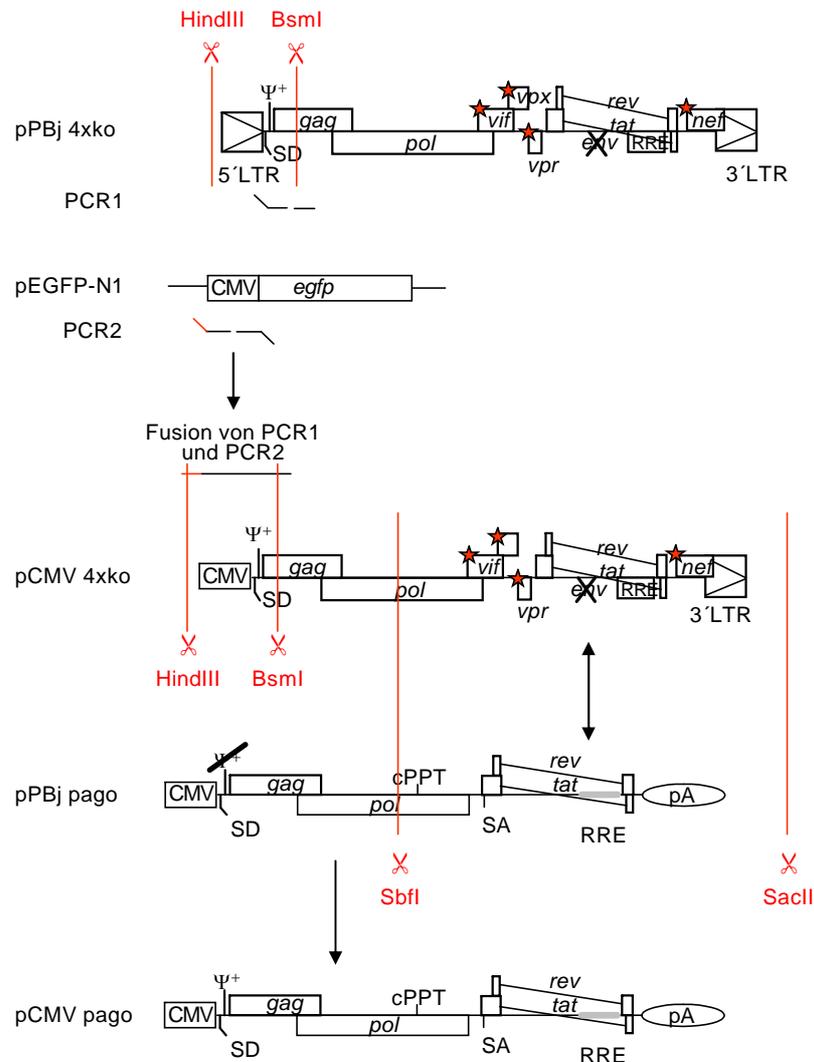


**Abb. 3.30 Schematische Darstellung der Klonierung des Verpackungskonstrukts pPBj pago.** Deletion der akzessorischen gene *vif*, *vpx* und *vpr* (pPBj pack6trac). Deletion des akzessorischen Gens *nef* (pPBj pago).  $\Psi$ , Verpackungssignal; cPPT, zentraler Polypurintrakt; RRE, Rev-responsives Element; SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; ✂ Restriktionsschnittstellen.

### 3.5.2.2 Konstruktion von pPBj pack

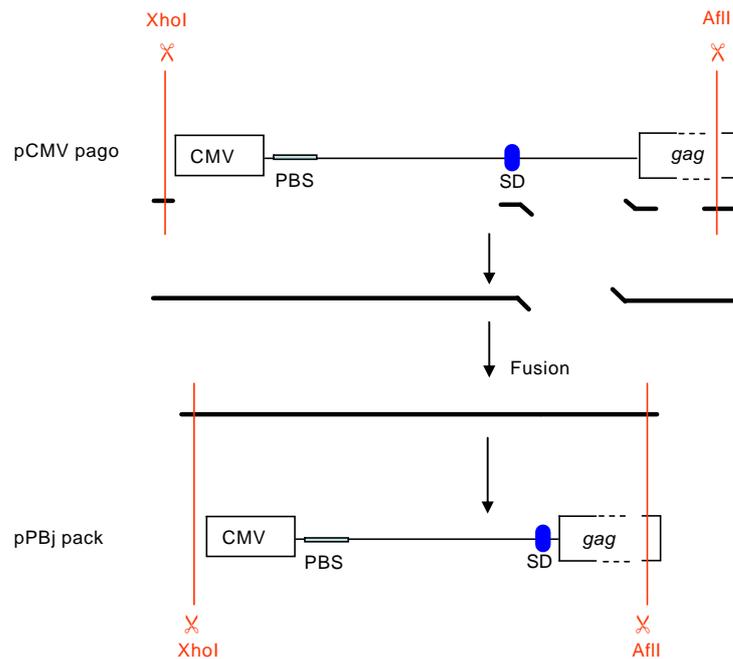
Da das beschriebene Verpackungskonstrukt pPBj pago nur zur Bildung von geringen Titern führte (siehe 3.5.3), sollte es im Folgenden optimiert werden. In der Literatur fanden sich hinweise darauf, dass die Sequenz zwischen 5'-LTR und Spleißdonor für die Expression von Gag notwendig ist (Patel *et al.*, 2003; Kaye, *et al.*, 1999; McCann *et al.*, 1997). Dieser Bereich war bereits in pPBj-pack1, welches als Ausgangskonstrukt für pPBj pago diente, deletiert. Zur Deletion des Verpackungssignals sollte nun stattdessen der Bereich zwischen dem Spleißdonor und dem *gag*-Gen deletiert werden. Zunächst wurde ein PBj-Konstrukt generiert, bei dem die 5'-LTR durch einen CMV-Promotor ersetzt wurde, aber die komplette Sequenz zwischen LTR und *gag* erhalten blieb. Als Ausgangskonstrukt hierfür diente pPBj 4x ko Die Sequenz des CMV-Promotors wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1(+) amplifiziert. Über entsprechende Primer wurde am 5'-Ende des Fragments eine *HindIII*-Restriktionsstelle eingebracht. Aus dem Konstrukt pPBj 4x ko wurde der Bereich zwischen LTR und *BsmI*-Schnittstelle amplifiziert. Diese beiden PCR-Fragmente wurden fusioniert,

mit *HindIII* und *BsmI* restringiert und in das ebenfalls mit diesen Enzymen geschnittenen pPBj 4x ko inseriert. In das entstandene Konstrukt pCMV 4x ko wurde die 3'-Hälfte des pPBj pago über die Restriktionsschnittstellen *SbfI* und *SacII* eingefügt. Das entstandene Konstrukt pCMV pago wurde durch eine Sequenzanalyse (MWG, Ebersberg) auf die Richtigkeit der Sequenz überprüft. Die Klonierung ist schematisch in Abb. 3.31 dargestellt.



**Abb. 3.31 Schematische Darstellung der Klonierung von pCMV pago.** Austausch der 5'-LTR gegen einen CMV-Promotor im Konstrukt pPBj 4x ko (pCMV 4x ko). Einfügen der 3'-Hälfte von pPBj pago (pCMV pago).  $\Psi$ , Verpackungssignal; cPPT, zentraler Polypurintrakt; RRE, Rev-responsives Element; SD, Spleißdonor; SA, Spleißakzeptor; ✂ Restriktionsschnittstellen.

Anschließend wurden über eine Fusions-PCR die Nucleotide 854 bis 912 deletiert, was dem Bereich zwischen Spleißdonor und dem *gag*-Gen entspricht. Das PCR-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *AfeI* in pCMV pago eingefügt, wodurch pPBj pack entstand. Der letzte Teil dieser Klonierung ist schematisch in Abb. 3.32 dargestellt.



**Abb. 3.32 Deletion des Bereichs zwischen Spleißdonor und gag zur Generierung von pPBj pack.** Amplifikation der Bereiche, die den zu deletierenden Bereich flankieren. Fusion der beiden Fragmente und Insertion in das Ausgangskonstrukt. PBS, Primer Bindestelle; SD, Spleißdonor; ✂ Restriktionsschnittstellen.

### 3.5.3 Titration der PBj-Vektoren

Zur Generierung von Vektorpartikeln wurden die einzelnen Vektorkomponenten-kodierenden Plasmide (Transfervektor, Verpackungskonstrukt und Hüllproteinkonstrukt) in 293T Verpackungszellen kotransfiziert. Die Effizienz der Vektorproduktion hängt dabei sowohl von dem Mengenverhältnis der einzelnen Plasmide zueinander als auch von der Gesamtmenge der DNA ab. Die Gesamtmenge an DNA ist für die jeweilige Transfektionsmethode limitiert. Um die Titer zu optimieren, wurden unterschiedliche Plasmidverhältnisse eingesetzt. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Überstände der transfizierten Zellen abgenommen und zum Titrieren auf HT1080 Zellen übertragen. Nach weiteren 48 h wurden die Zielzellen auf die Expression des Markergens (*egfp*) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Je nach eingesetzten Plasmidmengen variierten die Titer bis zu fast einer Zehnerpotenz. Für das Verpackungskonstrukt pPBj pago war der niedrigste Titer  $1,0 \times 10^3$  und der höchste erzielte Titer  $2,2 \times 10^4$ . Für das optimierte Konstrukt pPBj pack ist der geringste Titer  $3,9 \times 10^4$  und der höchste Titer  $4,6 \times 10^5$ . Auffällig ist, dass mit dem Verpackungskonstrukt pPBj pack bei allen eingesetzten Plasmidverhältnissen um etwa das Zehnfache höhere Titer erzielt wurden als mit pPBj pago. Des Weiteren ist es auffällig, dass mit der zehnfachen Menge Hüllprotein bei allen Ansätzen die höheren Titer erzielt werden.

Tab. 3.3 Titration der Verpackungskonstrukte.

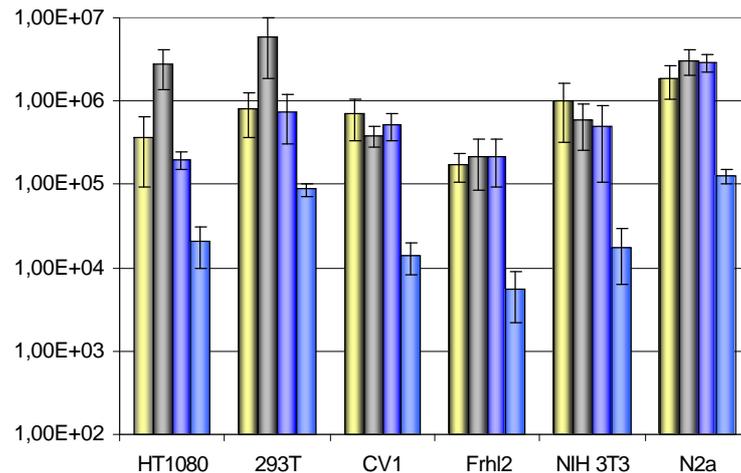
Menge pPBJ pago [µg]	Menge pPBJ trans [µg]	Verhältnis	Menge pMD.G (VSV-G) [µg]	Titer [i.E./ml]
1,5	1,5	1:1	0,05	1,4 x 10 <sup>4</sup>
1,0	2,0	1:2		0,3 x 10 <sup>4</sup>
2,0	1,0	2:1		1,1 x 10 <sup>4</sup>
0,75	2,25	1:3		0,1 x 10 <sup>4</sup>
2,25	0,75	3:1		1,1 x 10 <sup>4</sup>
2,4	0,6	4:1		1,0 x 10 <sup>4</sup>
1,5	1,5	1:1	0,5	1,8 x 10 <sup>4</sup>
1,0	2,0	1:2		0,4 x 10 <sup>3</sup>
2,0	1,0	2:1		2,6 x 10 <sup>4</sup>
0,75	2,25	1:3		0,1 x 10 <sup>3</sup>
2,25	0,75	3:1		<b>2,2 x 10<sup>4</sup></b>
2,4	0,6	4:1		2,0 x 10 <sup>4</sup>
Menge pPBJ pack [µg]	Menge pPBJ trans [µg]	Verhältnis	Menge pMD.G (VSV-G) [µg]	Titer [i.E./ml]
1,5	1,5	1:1	0,05	7,2 x 10 <sup>4</sup>
1,0	2,0	1:2		12,0 x 10 <sup>4</sup>
2,0	1,0	2:1		5,6 x 10 <sup>4</sup>
0,75	2,25	1:3		18,0 x 10 <sup>4</sup>
2,25	0,75	3:1		4,7 x 10 <sup>4</sup>
2,4	0,6	4:1		3,9 x 10 <sup>4</sup>
1,5	1,5	1:1	0,5	<b>46,0 x 10<sup>4</sup></b>
1,0	2,0	1:2		35,0 x 10 <sup>4</sup>
2,0	1,0	2:1		23,0 x 10 <sup>4</sup>
0,75	2,25	1:3		24,0 x 10 <sup>4</sup>
2,25	0,75	3:1		9,1 x 10 <sup>4</sup>
2,4	0,6	4:1		9,9 x 10 <sup>4</sup>

Dargestellt sind die jeweiligen Plasmidmengen in µg, das Verhältnis von Verpackungskonstrukt zu Transfervektor und die daraus resultierenden Titer (i.E./ml). Die höchsten erzielten Titer sind fett gedruckt.

### 3.5.4 Titer von SIV<sub>smm</sub>PBJ Vektoren auf verschiedenen Zelllinien im Vergleich zu anderen Vektoren

Um zu untersuchen, ob sich die auf HT1080 Zellen erzielten Titer auch auf anderen Zelltypen und Zellen verschiedener Spezies reproduzieren lassen, wurden die Titer auf

humanen (HT1080, 293T), simianen (CV1, Frhl2) und murinen (NIH 3T3, N2a) Zelllinien bestimmt. Dazu wurden durch Kotransfektion des PBj Transfervektors (pPBj trans), eine VSV-G-kodierenden Plasmids (pMD.G) und eines der beiden PBj Verpackungskonstrukte (pPBj pago, pPBj pack) Vektoren generiert. Diese wurden mit etablierten HIV-1 und MLV Vektoren verglichen. Alle eingesetzten Vektoren übertragen das *egfp*-Gen, wodurch eine einfache Analyse ermöglicht wurde. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen sind in Abb. 3.33 zusammengefasst.



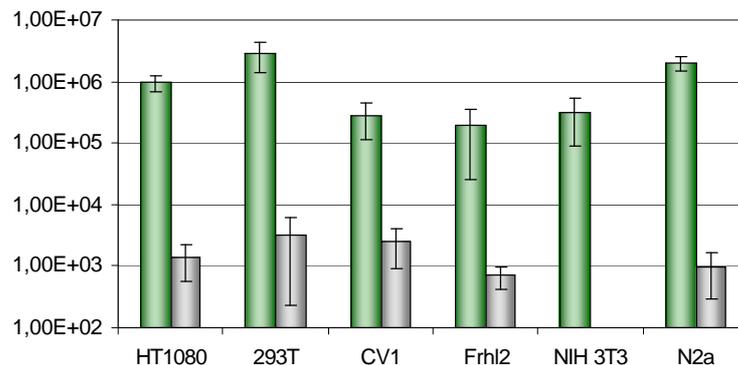
**Abb 3.33 Titer verschiedener Vektoren auf unterschiedlichen Zelllinien.** Die Zellen wurden parallel mit den verschiedenen Vektoren transduziert und 48 h später im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

■ MLV, ■ HIV-1, ■ PBj pack, ■ PBj pago

### 3.5.5 Kreuzverpackung von HIV-1 und SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren

Da sowohl SIV<sub>smm</sub>PBj als auch HIV-1 zu den Lentiviren zählen, ist es prinzipiell möglich, dass ein SIV Transfektor in ein HIV-1 Partikel verpackt wird und umgekehrt. Bisher wurde hauptsächlich die Verpackung von SIV- bzw. HIV-2 Transfektoren in HIV-1 Partikel beschrieben (Rizvi *et al.*, 1993; Kaye *et al.*, 1998; Poeschla *et al.*, 1996; Stitz *et al.*, 2001; Strappe *et al.*, 2005). Der umgekehrte Fall, bei dem ein HIV-1 Transfektor in ein SIV-Partikel verpackt wird, konnte bisher nur einmal gezeigt werden (White *et al.*, 1999). Es sollte nun getestet werden, ob sich der SIV<sub>smm</sub>PBj Transfektor in HIV-1 Partikel verpacken lässt und ob der umgekehrte Fall möglich ist. Dazu wurden die jeweiligen Verpackungs- (für SIV<sub>smm</sub>PBj: pPBj pack, pPBj pago; für HIV-1: pCMVΔR8.2) und Transferkonstrukte (für SIV<sub>smm</sub>PBj: pPBj trans; für HIV-1: pHR-CMV-GFP) in 293T Zellen kotransfiziert und nach 48 h die vektorhaltigen Überstände abgenommen. Diese wurden zur Transduktion verschiedener Zielzellen eingesetzt (human: HT1080, 293T; simian: CV1, Frhl2; murin: NIH 3T3, N2a). Nach zwei Tagen wurden die Zellen auf die Expression des transferierten *egfp*-

Gens untersucht. Die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.34 gezeigt. Wie es den bereits publizierten Daten für SIV/HIV-1-Kreuzverpackung entspricht konnte auch hier nur eine effiziente Generierung von HIV-1 Partikeln mit SIV<sub>smm</sub>PBj Transfervektor gezeigt werden. Die so erzielten Titer liegen etwas unter denen, die mit reinen HIV-1 Vektoren erzielt wurden (siehe Abb. 3.33) und variieren auf den verschiedenen Zelllinien ebenso wie diese, d.h. die größten Titer wurden auf humanen Zellen erzielt und die niedrigsten auf simianen Zellen. Der Umgekehrte Fall, bei dem ein HIV-1 Transfervektor in PBj Partikel verpackt werden sollte, führte zu einer sehr ineffizienten Transduktion der Zielzellen (max.  $3,2 \times 10^3$  i.E./ml).

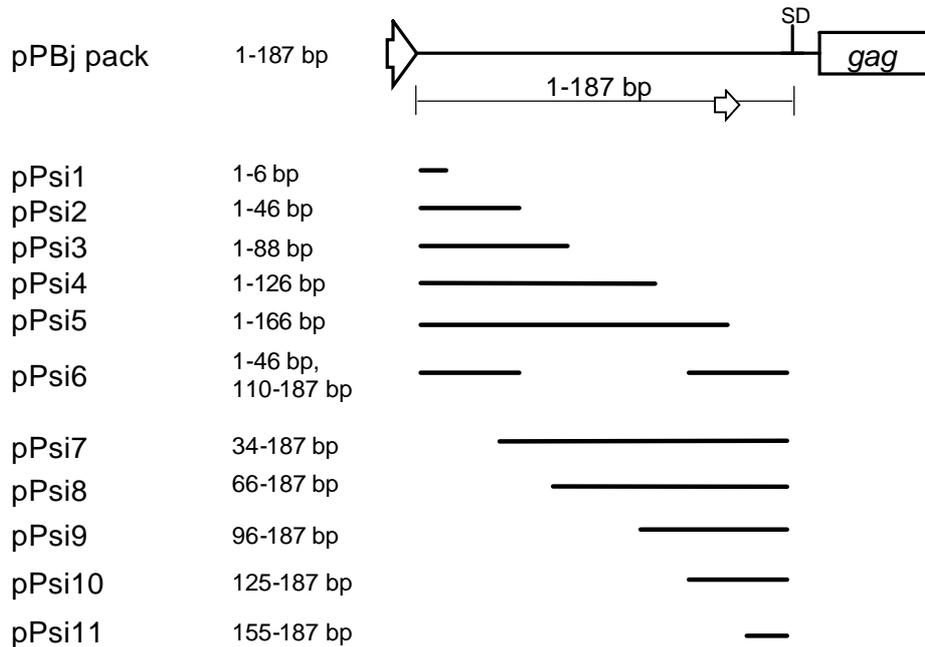


**Abb. 3.34 Titer auf unterschiedlichen Zielzellen, die durch kreuzverpackte HIV-1/PBj bzw. PBj/HIV-1 Vektoren erzielt wurden.** ■ HIV-1 Partikel/PBj Transfervektor, ■ PBj Partikel/ HIV-1 Transfervektor

### 3.5.6 Klonierung der Verpackungskonstrukte pPBj Psi1 - 11

Wie eben beschrieben führte das Verpackungskonstrukt pPBj pack zu weitaus höheren Titern als pPBj pago. Patel (2003) zeigte, dass der Bereich zwischen der Primer-Bindungsstelle und dem Spleißdonor für eine effiziente intrazelluläre Gag/Pol-Protein Akkumulation benötigt wird. Dieser Bereich ist in dem Konstrukt pPBj pago deletiert und könnte somit die geringen Titer erklären. Um nun diesen Bereich genauer zu charakterisieren, wurden weitere Konstrukte generiert, die auf pPBj pack basieren. Der Bereich zwischen CMV-Promotor und Spleißdonor, der in diesem Konstrukt enthalten ist, wurde sukzessive sowohl von dem 3'- als auch von dem 5'-Ende verkürzt. Diese Fragmente wurden durch Fusions-PCR erzeugt und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *Eco47III* in pPBj pack eingefügt. Dadurch entstanden elf Konstrukte (pPsi1 – pPsi11), die durch eine Sequenzanalyse (MWG Biotech, Ebersberg) auf ihre Richtigkeit überprüft wurden. Bei pPsi6 handelt es sich nicht um eine Verkürzung der Sequenz von einem der Enden, sondern um eine Deletion eines 64 bp großen Bereichs in dem mittleren

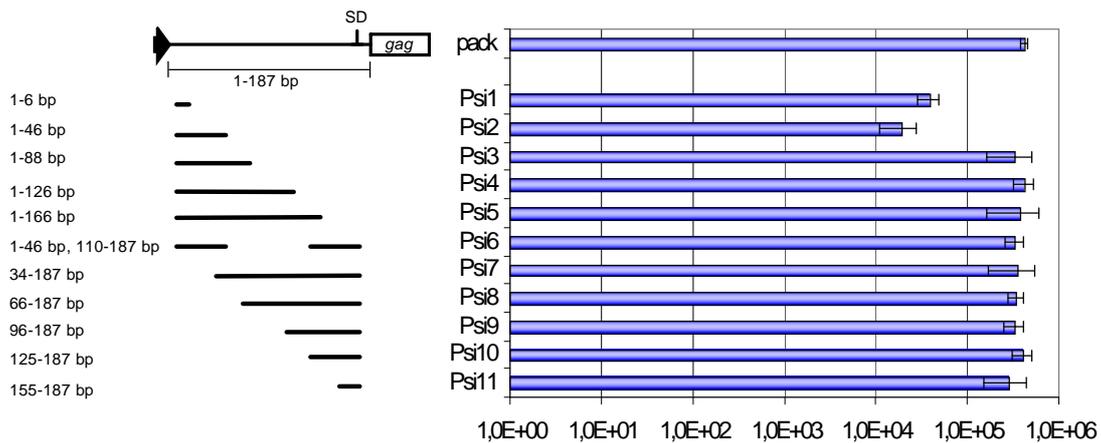
Bereich zwischen Promotor und Spleißdonor. Eine schematische Darstellung des modifizierten Bereichs der einzelnen Konstrukte ist in Abb. 3.35 gezeigt.



**Abb. 3.35 Schematische Darstellung der modifizierten 5'-Enden der Konstrukte Psi1-11.** Im oberen Teil der Abbildung ist der Bereich zwischen Promotor und gag des pPBj pack-Konstrukts gezeigt. In den darunter folgenden Abbildungen sind die Bereiche gezeigt die in den jeweiligen Psi-Konstrukten erhalten blieben. Links davon ist die Anzahl der erhaltenen Basenpaare angegeben. SD, Spleißdonor; CMV-Promotor

### 3.5.7 Titration der verschiedenen Vektorkonstrukte

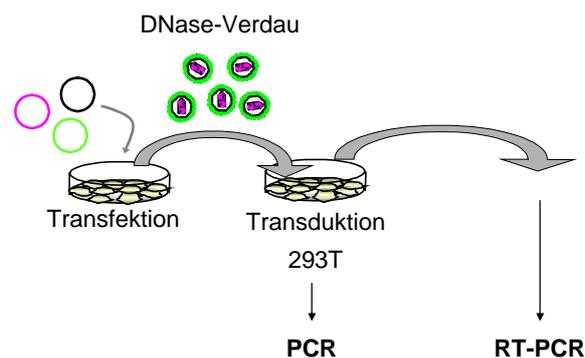
Um die Titer der einzelnen Konstrukte zu bestimmen, wurden die verschiedenen Verpackungskonstrukte zusammen mit dem Transfektor und einem VSV-G-kodierenden Plasmid in 293T Zellen kotransfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die vektorhaltigen Überstände geerntet und zur Transduktion von HT1080 Zellen eingesetzt. Nach weiteren zwei Tagen wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop auf die Expression von *egfp* untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.36 dargestellt. Wie anhand der Abbildung deutlich wird, scheint es keine Korrelation zwischen der Größe der eingefügten Deletion und den erzielten Titern zu geben. Mit Ausnahme der Konstrukte Psi1 und Psi2 können mit allen anderen Titer erzielt werden, die denen durch das Konstrukt PBj pack entsprechen (etwa  $5 \times 10^5$  i.E./ml). Durch Psi1 und Psi2 werde Titer erzielt, die um das zehnfache darunter liegen.



**Abb. 3.36** Titer der durch die verschiedenen PBJ Verpackungskonstrukte generierten Vektoren auf HT1080 Zellen. Die Zellen wurden durch die verschiedenen Vektoren transduziert und 48 h später im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

### 3.5.8 Übertragung von Transfervektor und Verpackungskonstrukt in Zielzellen

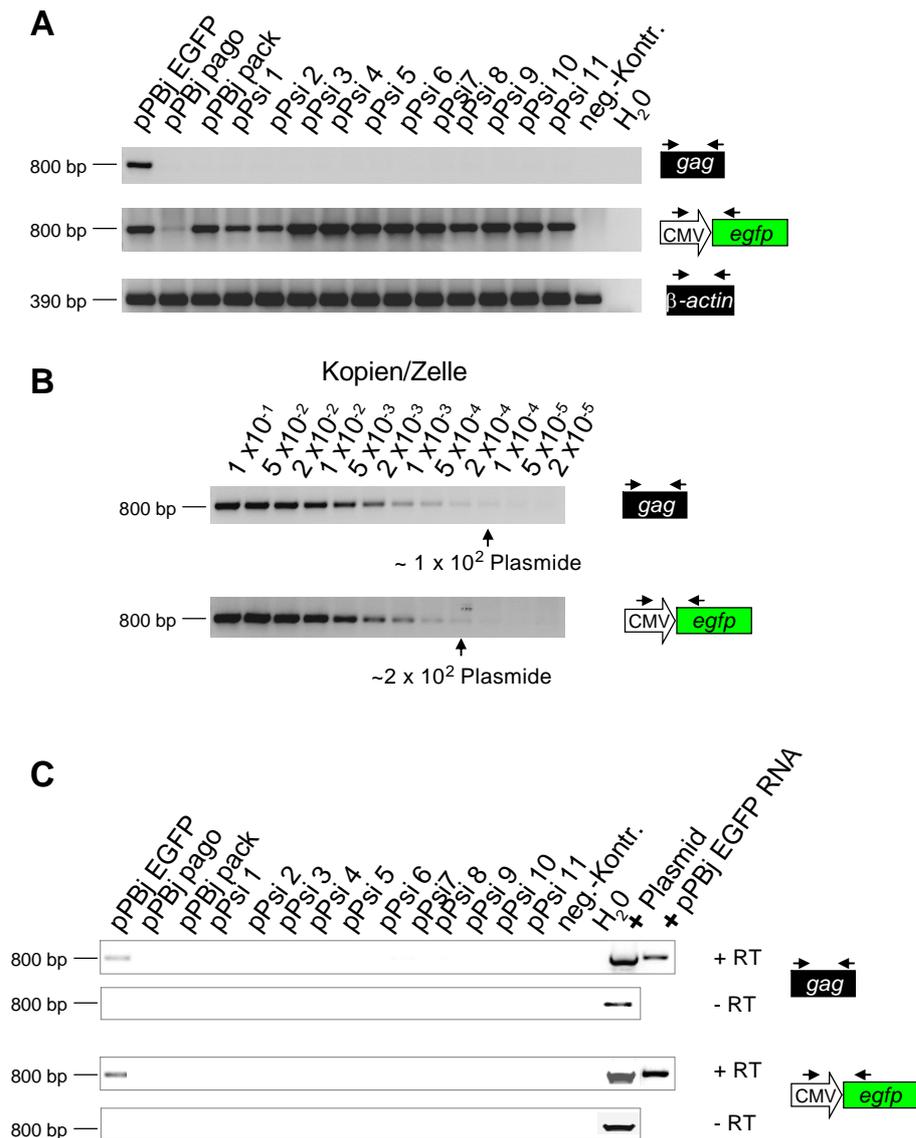
Der Sinn eines Dreiplasmid-Vektorsystems besteht darin, nur essentielle genetische Informationen in die Zielzellen zu übertragen, d.h. nur die auf dem Transfervektor kodierten Bereiche werden transferiert. Die auf dem Verpackungskonstrukt kodierten Gene werden nur in der Produzentenzelle exprimiert und gelangen nicht in die Zielzelle. Um zu überprüfen, ob dies auch für die generierten Vektoren gilt, wurde der in Abb. 3.37 dargestellte Versuch durchgeführt.



**Abb. 3.37** Schematische Darstellung des Versuchs zum Nachweis der Übertragung verschiedener Vektorkomponenten.

Zunächst wurden 293T Zellen mit den einzelnen Vektorsystem-Komponenten transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Überstände geerntet und mit DNase behandelt. Dieser Schritt ist unbedingt erforderlich, damit keine Plasmid-DNA auf die Zielzellen übertragen werden kann. Dies kann bei der anschließenden PCR zu falsch-positive Ergebnisse führen. Die Überstände wurden dann zur Transduktion von 293T Zellen eingesetzt. Weitere zwei Tage

später wurde aus den Überständen der transduzierten Zellen RNA, und aus den Zellen DNA isoliert. Für die folgende PCR bzw. RT-PCR wurden *egfp*- oder *gag*-spezifische Primer eingesetzt, um Transfervektor- oder Verpackungskonstrukt-spezifische Sequenzen nachzuweisen. Als Positivkontrollen wurde Plasmid-DNA eingesetzt sowie RNA, die aus den Überständen von transfizierten 293T Zellen präpariert wurde. Um die Qualität der isolierten DNA zu überprüfen, wurde eine PCR mit  $\beta$ -Aktin-spezifischen Primern durchgeführt. Durch serielle Verdünnung von Plasmid-DNA in zellulärer DNA wurde die



**Abb. 3.38 Nachweis spezifischer Transfer- und Verpackungskonstruktsequenzen.** A) Amplifikation zellulärer DNA von transduzierten 293T Zellen. Der amplifizierte Bereich ist rechts schematisch dargestellt. B) Bestimmung der Sensitivität durch seriell in genomischer DNA verdünnten Plasmiden. Die Kopienzahl pro Zelle sowie die Gesamtzahl der in  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzten Plasmide ist angegeben. C) RT-PCR aus dem Überstand transduzierter 293T Zellen. Der amplifizierte Bereich ist rechts schematisch dargestellt. RT, Reverse Transkriptase; +Plasmid, pPBj EGFP-Plasmid DNA; +pPBj EGFP RNA, RNA aus Überständen PBj EGFP transfizierter 293T Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis.

Sensitivität der PCR bestimmt: Die gag-PCR war so sensitiv, dass eine Kopie des Verpackungskonstrukts in 10.000 Zellen nachgewiesen werden konnte. Die PCR zum Nachweis der *egfp*-Sequenz war etwas weniger sensitiv. Hier konnte eine Kopie in 5.000 Zellen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.38 dargestellt. Die *egfp*-DNA konnte in allen transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit der mikroskopischen Auswertung der Transduktion. Am wenigsten effizient war die Transduktion durch den mit pPBj pago generierten Vektor, was ebenfalls mit dem PCR-Ergebnis übereinstimmt. Die *gag*-Sequenz wurde nur in mittels pPBj EGFP transduzierten Zellen nachgewiesen. Dies entsprach dem erwarteten Ergebnis, da pPBj EGFP alle viralen Gene außer *env* kodiert und somit die gesamte genetische Information in Zielzellen überträgt und dort nachgewiesen werden kann. Diese Ergebnisse konnten durch die RT-PCR bestätigt werden. Die aus den Überständen von transduzierten Zellen isolierte RNA wurde in einer RT-PCR eingesetzt, um zu prüfen, ob in den Zielzellen erneut Partikel gebildet wurden. Der Nachweis von sowohl gag- als auch egfp- spezifischen Sequenzen gelang auch hier ausschließlich für PBj EGFP; wie erwartet führt das Zweiplasmidsystem auch in den Zielzellen zur Generierung neuer Partikel. Insgesamt ist aber zu sagen, dass alle Verpackungskonstrukte zur Übertragung des Transfervektors in Zielzellen führten, dabei aber selbst nicht übertragen wurden.

### 3.5.9 Nachweis von replikationskompetenten Retroviren (RCR, replication competent retrovirus)

Um auszuschließen, dass sich durch Rekombinationen der einzelnen Vektorkomponenten replikationskompetente Viren gebildet hatten, wurde der in Abb. 3.39 dargestellte Versuch durchgeführt.

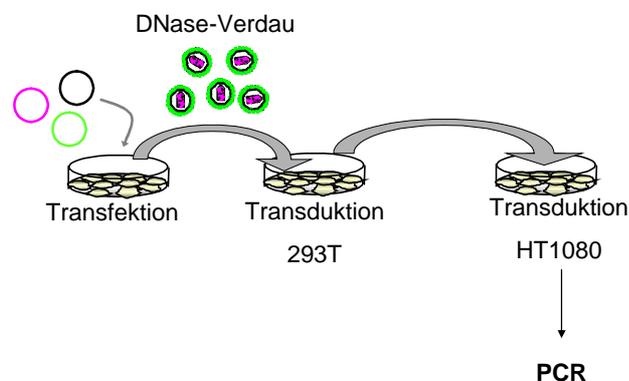
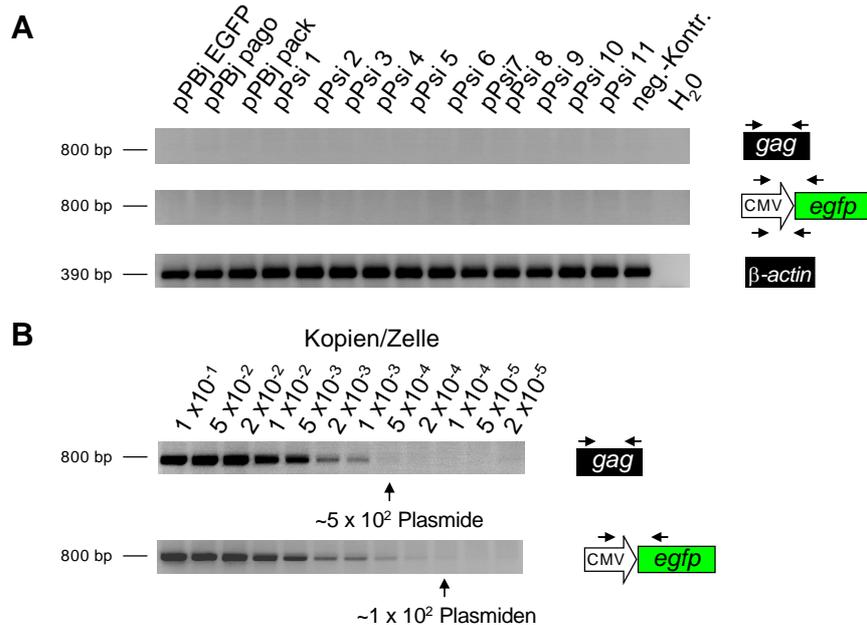


Abb. 3.39 Schematische Darstellung des Versuchs zum Nachweis von replikationskompetenten Retroviren.

Vektoren wurden durch Kotransfektion der einzelnen Vektorkomponenten in 293T Zellen generiert. Die vektorhaltigen und DNase-verdauten Überstände wurden zur Transduktion von 293T Zellen eingesetzt. Von diesen wurde nach drei Tagen Überstand abgenommen und auf HT1080 Zellen übertragen. Aus diesen Zellen wurde nach zwei Tagen DNA isoliert und durch spezifische Primer in einer PCR auf die Anwesenheit viraler Sequenzen bzw. auf das Vorhandensein des Transfergens *egfp* untersucht.



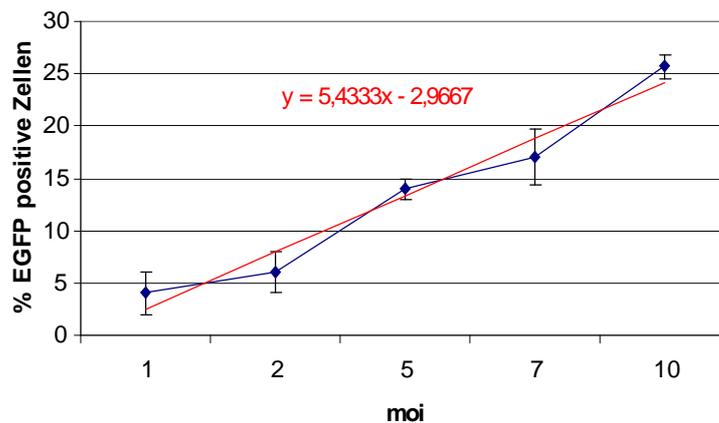
**Abb. 3.40 Nachweis von replikationskompetenten Retroviren.** A) Amplifikation zellulärer DNA von HT1080 Zellen, auf die Überstände von transduzierten 293T Zellen übertragen wurden. Der amplifizierte Bereich ist rechts schematisch dargestellt. B) Bestimmung der Sensitivität der PCR in seriell in genomischer DNA verdünnten Plasmiden. Die ermittelte Kopienzahl pro Zelle sowie die Gesamtzahl der in  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzten Plasmide ist angegeben.

Wie in Abb.3.40 zu sehen ist, konnten keine virusspezifischen Sequenzen nachgewiesen werden. Die Sensitivität der PCR ergab ähnliche Werte wie im vorherigen Versuch (Abb. 3.38). Aufgrund dieser Daten kann man darauf schließen, dass sich während der Herstellung und dem Einsatz der verschiedenen Dreiplasmid-PBj Vektoren in keinem Fall replikationskompetente Partikel gebildet haben.

### 3.5.10 Transduktion von Monozyten mit einem neuen SIV<sub>smm</sub>PBj Vektor

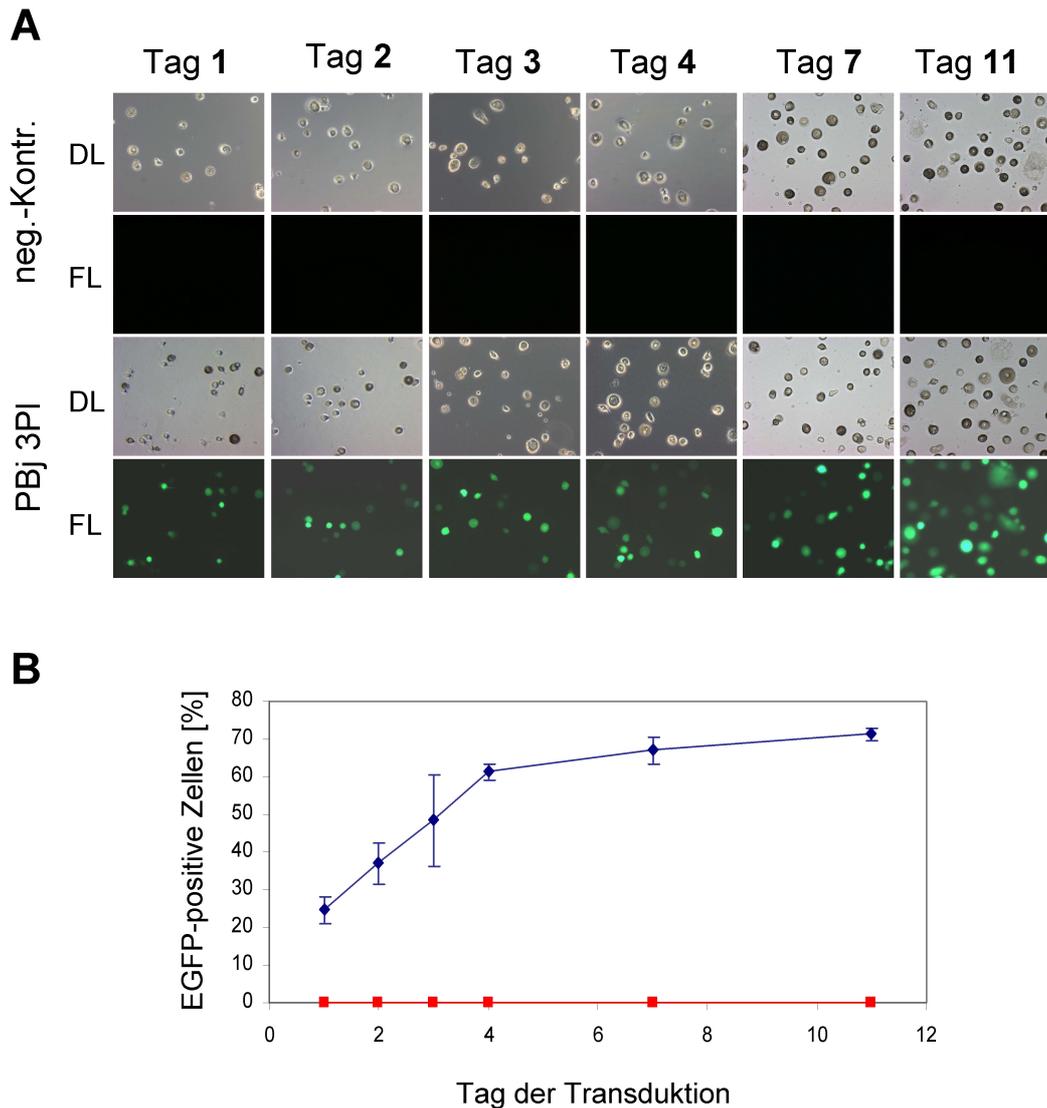
Das neu entwickelte SIV<sub>smm</sub>PBj Dreiplasmid-Vektorsystem sollte nun auf seine Fähigkeit getestet werden, primäre humane Monozyten zu transduzieren. Zur Generierung der

Vektoren wurde als Verpackungskonstrukt pPBj pack ausgewählt, da mit diesem die höchsten Titer erzielt wurden. Als Transfervektor diente pPBj trans. Die Vektoren wurden mit VSV-G pseudotypisiert und mit SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx supplementiert, da bereits gezeigt werden konnte, dass dieses Protein für die Transduktion von Monozyten durch SIV<sub>smm</sub>PBj essentiell ist. Die Vektoren wurden durch Ultrazentrifugation konzentriert und bei -80°C gelagert. Die Titration auf HT1080 Zellen ergab einen Titer von  $2 \times 10^7$  i.E./ml. Nun wurde untersucht wie effizient der PBj Vektor ein Transgen in Abhängigkeit verschiedener moi in Monozyten transferieren kann. Dazu wurden mit der bereits beschriebenen Methode (siehe 2.7.6 und 2.7.7) aus dem Blut von drei freiwilligen, gesunden Spendern über einen Ficoll-Gradienten und anschließende Negativdepletion Monozyten isoliert. Diese wurden an Tag eins nach Isolierung mit verschiedenen moi transduziert und sieben Tage später analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.41 dargestellt. Auch der durch das Dreiplasmid-System generierte SIV<sub>smm</sub>PBj Vektor, der keine viralen Gene mehr überträgt, ist zur Transduktion von Monozyten in der Lage. Deutlich zu erkennen ist ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der bei diesen Experimenten eingesetzten moi und der dadurch erzielten Transduktionseffizienz. Mit einer moi von 10 wurden im Durchschnitt 25% der Zellen



**Abb. 3.41 Vergleich verschiedener moi zur Transduktion von Monozyten mit dem neuen SIV<sub>smm</sub>PBj Dreiplasmid-Vektorsystem.** Monozyten wurden an Tag eins nach Isolierung mit verschiedenen moi transduziert und sieben Tage später analysiert. Die rote Linie stellt die Regressionsgerade dar; die dazugehörige Formel ist angegeben.

transduziert. Dies entspricht den Ergebnissen, die mit dem SIV<sub>smm</sub>PBj Zweiplasmid-Vektorsystem erreicht wurden. Um herauszufinden, an welchem Tag nach Isolierung die Monozyten am effizientesten transduziert werden können, wurden die Monozyten an verschiedenen Tagen nach Isolierung mit dem PBj-Vektor mit einer moi von 5 transduziert und sieben Tage später analysiert. Auch bei diesem Versuch wird ein ähnliches Ergebnis wie mit dem Zweiplasmid-Vektorsystem erzielt. Die Transduktionseffizienz steigt von knapp 20% an Tag eins nach Isolierung auf knapp 70% ab Tag sieben nach Isolierung (siehe Abb. 3.42B).



**Abb. 3.42 Transduktion von Monozyten an verschiedenen Tagen nach Isolierung.** Die Monozyten wurden am angegebenen Tag nach Isolierung mit einer *moi* von 10 transduziert (PBj 3PI) oder nicht transduziert (neg.-Kontr.) und sieben Tage später analysiert. A) Mikroskopische Aufnahmen von transduzierten Monozyten bzw. vollständig differenzierten Makrophagen. Oben: Durchlicht, unten: Fluoreszenz. Es ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen gezeigt. 200x Vergrößerung, Maßstab 100  $\mu\text{m}$ . B) Prozentualer Anteil *egfp*-exprimierender Monozyten bzw. Makrophagen. Dargestellt sind die Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei Donoren. — PBj 3PI, — neg.-Kontr.

## 4. Diskussion

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung der Transduktionseigenschaften SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektoren und deren Optimierung. Es sollte untersucht werden, ob es neben Monozyten weitere primäre Zellen gibt, bei deren Transduktion der auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierende Vektor Vorteile gegenüber anderen lentiviralen Vektoren bietet. Des Weiteren wurde der Einfluss der akzessorischen Proteine auf die Transduktion ruhender Zellen mittels eines SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteten *Knockout*-Vektors analysiert. Dieser wurde sowohl auf arretierten Zelllinien als auch auf primären humanen Monozyten getestet. Abschließend wurde unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse ein neues auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierendes Dreiplasmid-Vektorsystem generiert.

### 4.1 Transduktion von humanen CD4<sup>+</sup> Zellen mittels SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektoren

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass ein SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor sowohl in der G<sub>0</sub>-Phase arretierte Zelllinien und Fibroblasten als auch primäre humane Monozyten transduzieren kann. In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden, ob auch unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels dieser Vektoren transduziert werden können. Dazu wurden die Zellen über eine Negativdepletion mittels MACS isoliert und mit SIV<sub>smm</sub>PBj bzw. HIV-1 Vektoren transduziert. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Transduktionseffizienz (7% bzw. 9%), jedoch fiel diese unerwartet hoch aus. Bisherige Studien mit HIV-1 Vektoren zeigten bei einer moi von 10 deutlich weniger als 5% transduzierte Zellen (Unutmaz *et al.*, 1999; Cavalieri *et al.*, 2003). Die publizierten Daten sind allerdings schwer zu vergleichen, da die einzelnen Transduktionsprotokolle stark voneinander abweichen. Eine mögliche Erklärung für die unerwartet hohe Transduktionseffizienz auf unstimulierten T-Zellen ist die relativ hohe Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69, der auch auf 16% der unstimulierten Zellen nachgewiesen werden konnte. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass die Zellen durch die Isolierung einen Stimulus erfahren haben. Im Gegensatz zu den unstimulierten Zellen wurden stimulierte Zellen von SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren effizienter transduziert als von HIV-1-abgeleiteten Vektoren. Die durch den hier verwendeten HIV-1 Vektor erzielten Transduktionsergebnisse sind allerdings etwas niedriger als die für andere HIV-1 Vektoren publizierten Daten. Hingegen entsprechen die mittels des SIV<sub>smm</sub>PBj Vektors erreichten Gentransfereffizienzen den für lentivirale Vektoren veröffentlichten Werten (Costello *et al.*, 2000; Mühlebach *et al.*, 2003). Allerdings können auch diese Daten hier nicht ohne weiteres verglichen werden, da sich die Transduktionsprotokolle stark unterscheiden.

Insgesamt zeigten die Versuche zur Transduktion humaner CD4+ Zellen, dass der SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektor auf unstimulierten Zellen keinen Vorteil gegenüber HIV-1 Vektoren bietet. Die ursprüngliche Annahme, dass alle Zelltypen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus durch SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren transduziert werden können, wurde in diesem Experiment widerlegt. Neben der Zellzyklusphase, in der sich die Zielzellen befinden, kann es noch weitere Faktoren geben, die eine Transduktion durch einen lentiviralen Vektor inhibieren. Solche Wirtszellfaktoren werden im Allgemeinen als Restriktionsfaktoren bezeichnet. So wurde die HIV-replikationshemmende Wirkung von APOBEC3G beschrieben. Dieses Enzym wird in Viruspartikel verpackt und führt in der Zielzelle bei der reversen Transkription zu einer Deaminierung des synthetisierten DNA-Minusstrangs. Diese Modifikation führt zu Fehlern bei der Plusstrang-Synthese (Klarmann *et al.*, 2003). Es konnte gezeigt werden, dass in ruhenden Zellen eine niedermolekulare Form des zellulären APOBEC3G vorkommt, wohingegen in aktivierten bzw. differenzierten Zellen die hochmolekulare Form nachgewiesen wurde. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass diese APOBEC-Varianten mit der Infizierbarkeit der jeweiligen Zellen korrelieren. So können nur Zellen infiziert werden, die den hochmolekularen und somit inaktiven APOBEC3G Komplex enthalten (Chiu *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde die HIV-1 hemmende Potenz von Murr1 in humanen T-Zellen beschrieben (Ganesh *et al.*, 2003). Der Einfluss solcher Restriktionsfaktoren auf die Transduktionseffizienz der SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht, könnte aber durch zukünftige Arbeiten zu einem detaillierten Bild der Transduktionsmechanismen von SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektoren beitragen.

#### **4.2 Charakterisierung und Transduktion von Monozyten**

Wie bereits gezeigt werden konnte sind SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren dazu in der Lage Monozyten zu transduzieren (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Diese Zellen sind Vorläuferzellen von Makrophagen und Dendritischen Zellen, welche ein interessantes Ziel für eine mögliche Gentherapie darstellen. Diese primären Zellen wurden zunächst genauer charakterisiert. Durch Isolierung der Monozyten aus PBMC mittels MACS wurde eine zu etwa 90% reine Zellpopulation erhalten. Da diese Zellen die einzigen innerhalb einer PBMC-Population sind die adhären, konnte die Reinheit der Monozyten durch Entfernung der Suspensionszellen gesteigert werden. Monozyten differenzierten unter den gewählten Bedingungen zu Makrophagen, welches in vorangegangenen Arbeiten durch die Messung der Oberflächenmarker CD14 und CD86 bestätigt werden konnte (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Auch die morphologische Analyse der Zellen stimmte mit den in der Literatur

beschriebenen zellulären Veränderungen überein (Cohn und Benson, 1965; van Furth *et al.*, 1970). Darüber hinaus wurde der Zellzyklus der Monozyten bzw. Makrophagen analysiert. In der Literatur finden sich wenig Studien der Zellzyklus-Kinetiken von reifen Monozyten. Beschrieben wurden solche Kinetiken nur für Promonozyten. Diese sind proliferationsaktiv solange sie sich im Knochenmark befinden. Gelangen sie ins Blut, ist ihre mitotische Aktivität nicht mehr nachweisbar (Meuret *et al.*, 1974). Diese Ergebnisse beruhen auf Versuchen mit Maus-Monozyten bzw. auf *in vivo* Studien im Menschen, bei denen durch die Gabe von  $^3\text{H}$ -TDR Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität der Zellen gezogen werden konnte. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal eine genaue Analyse des Zellzyklus von Monozyten des peripheren Blutes durchgeführt, bei der die einzelnen Zellzyklusphasen aufgrund der Bestimmung des relativen DNA- und RNA-Gehalts der Zellen zugeordnet werden konnten (Toba *et al.*, 1995). Die Auswertung ergab, dass sich nahezu alle Monozyten (99%) bis zum dritten Tag nach Isolierung in der  $G_0$ -Phase befinden. Ab dem vierten Tag wird der Anteil der Zellen in der  $G_0$ -Phase kleiner (88%), bis sich schließlich am Tag elf nur noch 6% aller Zellen in der  $G_0$ -Phase befinden. Diese Abnahme der Zellen in  $G_0$ -Phase korreliert mit der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und mit der über die Zeit steigenden Transduktionseffizienz durch HIV-1-abgeleitete Vektoren. Diese können die Zellen frühestens am Tag 4 nach Isolierung der Monozyten transduzieren; ein Zeitpunkt, an dem die Entwicklung von Makrophagen bereits begonnen hat. Der  $\text{SIV}_{\text{smm}}$ PBj-abgeleitete Vektor, der alle akzessorischen Proteine enthält, ist im Gegensatz dazu bereits am ersten Tag nach Isolierung zu einer effizienten Transduktion der Monozyten in  $G_0$ -Phase in der Lage (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005).

Neben der Zellzyklus-Kinetik der Monozyten wurde auch das Differenzierungspotential von transduzierten Monozyten untersucht. Unabhängig von einer vorangegangenen Transduktion differenzierten die Monozyten unter den gewählten Kulturbedingungen zu Makrophagen. Nun sollte ermittelt werden, ob Monozyten auch nach Transduktion mittels eines  $\text{SIV}_{\text{smm}}$ PBj-abgeleiteten Vektors das Potential zur Differenzierung zu Dendritischen Zellen behalten. Um dies zu untersuchen, wurden die Monozyten nach dem etablierten Protokoll isoliert und anschließend transduziert. Nach der Transduktion wurden dem Medium die Zytokine GM-CSF, IL-4, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zugegeben, die eine Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen bewirken. Die vollständige Differenzierung wurde nach fünf Tagen durch die Detektion des spezifischen Oberflächenrezeptors CD1a überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass Monozyten, trotz Transduktion mittels des  $\text{SIV}_{\text{smm}}$ PBj-abgeleiteten Vektors, zu Dendritischen Zellen differenzieren können.

Für das Vpr Protein von HIV-1 wurde beschrieben, dass es die Reifung und Aktivierung von Makrophagen und Dendritischen Zellen inhibiert (Muthumani *et al.*, 2004). SIV<sub>smm</sub>PBj und der davon abgeleitete hier verwendete Vektor PBjΔenv exprimiert neben *vpr* auch *vpx* – ein Gen, dass nicht von HIV-1 exprimiert wird. Es wird angenommen, dass die Eigenschaften von HIV-1 Vpr (Arretierung der Zellen in G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus und Beteiligung am Kernimport der viralen DNA) in SIV-Stämmen auf die Proteine Vpr und Vpx aufgeteilt sind (Fletcher *et al.*, 1996). Die akzessorischen Proteine von SIV<sub>smm</sub>PBj haben keinen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen, denn trotz erfolgter Transduktion mittels des Vektors PBjΔenv, der alle akzessorischen Gene exprimiert, können Monozyten zu Dendritischen Zellen reifen.

#### **4.3 Transduktion arretierter Zelllinien mittels eines SIV<sub>smm</sub>PBj Vektor mit funktionaler Deletion aller akzessorischen Gene**

Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren auch Zellen, die in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretiert sind, transduzieren können, sollte nun untersucht werden, welcher bzw. welche viralen Faktoren für diese Eigenschaft verantwortlich sind. Hierzu wurde ein *Knockout*-Konstrukt generiert, bei dem die Expression aller vier akzessorischer Gene (*vif*, *vpx*, *vpr* und *nef*) durch eine Mutation der jeweiligen Start ATGs und der Insertion von mindestens jeweils einem zusätzlichen Stop-Kodon inhibiert wurde. Durch Western Blot-Analysen von Vektor-Partikeln konnte gezeigt werden, dass keines der akzessorischen Proteine in Partikel inkorporiert wurde. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Synthese der einzelnen Proteine tatsächlich inhibiert wurde.

Für die vergleichenden Transduktionsversuche wurden Ghost und Alpha-1 Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen arretiert. Die Methode zur Arretierung der beiden verwendeten Zelltypen wurde in vorangegangenen Arbeiten optimiert (Mühlebach und Wolfrum, 2005). Eine Arretierung der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase wurde durch Aphidicolin erzielt und eine Arretierung in der G<sub>0</sub>-Phase durch Serumentzug. Zur Überprüfung der Arretierung wurde der DNA-Gehalt der Zellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert. Aufgrund des DNA-Gehalts lassen sich Rückschlüsse auf die jeweiligen Zellzyklusphasen ziehen. Allerdings kann bei dieser Methode nicht zwischen der G<sub>1</sub>- und der G<sub>0</sub>-Phase unterschieden werden. Die Histogramme, die sich für die Aphidicolin- bzw. mit Serumentzug behandelten Zellen ergaben, weisen jedoch deutliche Unterschiede auf. So ist der Peak für die G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase der durch Serumentzug behandelten Zellen sehr schmal, wohingegen es für die Aphidicolin-behandelten Zellen zu einer Verschmelzung des S-Phasen Peaks mit dem

G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phasen Peak kommt. Ein weiteres Indiz für eine erfolgreiche Arretierung in der G<sub>0</sub>- oder zumindest in der G<sub>1a</sub>-Phase ist die Tatsache, dass ein HIV-1-abgeleiteter Vektor die so behandelten Zellen nicht oder nur äußerst ineffizient transduzieren konnte. Für eine eindeutige Zellzyklusbestimmung müsste eine DNA/RNA-Doppelfärbung durchgeführt werden. Da der RNA-Gehalt in G<sub>0</sub>-Zellen gegenüber Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase geringer ist, kann man durch diese Methode auch zwischen G<sub>1</sub>- und G<sub>0</sub>-Phase unterscheiden. Die hier für Monozyten angewandte Methode zur RNA/DNA-Färbung eignete sich aber nicht für adhärenente Zellen, da bei der FACS-Analyse keine eindeutige Zuordnung der einzelnen Zellzyklusphasen möglich war. Die in der Literatur beschriebenen Anwendungen dieser Methode beziehen sich ausschließlich auf die Bestimmung des Zellzyklus von Suspensionszellen (Toba *et al.*, 1995). Eine Methode zur genauen Unterscheidung der Zellzyklusphasen bei adhärenenten Zellen wurde bisher nicht beschrieben.

Die Transduktionsexperimente zum Vergleich verschiedener Vektoren auf arretierten Zellen zeigten das erwartete Ergebnis: MLV-abgeleitete Vektoren konnten ausschließlich die proliferierenden Zellen transduzieren, HIV-1-abgeleitete Vektoren konnten sowohl proliferierende als auch G<sub>1</sub>-arretierte Zellen transduzieren. Ausschließlich die PBj-abgeleiteten Vektoren erzielten eine Transduktion von G<sub>0</sub>-arretierten Zellen. Der *Knockout*-Vektor, der keines der akzessorischen Proteine enthält, zeigte gegenüber dem Wildtyp-abgeleiteten PBj $\Delta$ env keine signifikanten Unterschiede in der Transduktionseffizienz. Der Vorteil, den PBj Vektoren gegenüber HIV-1 Vektoren bei der Transduktion von arretierten Zelllinien bieten, ist offensichtlich unabhängig von den viralen akzessorischen Proteinen.

#### 4.4 Einfluss von Vpx auf die Transduktion von Monozyten

Wie oben beschrieben, kann der SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektor PBj $\Delta$ env, der alle akzessorischen Proteine kodiert, in der G<sub>0</sub>-Phase arretierte Zelllinien und primäre humane Monozyten transduzieren (Mühlebach und Wolfrum *et al.*, 2005). Für die Transduktion der arretierten Zelllinien wurde keines der akzessorischen Proteine benötigt (Wolfrum, 2002). Allerdings ging die Fähigkeit zur Transduktion primärer Monozyten verloren, wenn keines der akzessorischen Proteine im Vektor enthalten war (Kaiser, 2004). Da es in der Literatur Hinweise auf eine essentielle Rolle des simianen Vpx Proteins bei der Replikation von SIV in Makaken-Makrophagen gibt (Fletcher *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 1998), wurde die Notwendigkeit dieses Proteins für die Transduktion von Monozyten durch SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren untersucht. Verschiedene Vpx Expressionskonstrukte wurden zusammen mit dem *Knockout*-Vektorkonstrukt und dem Hüllprotein-kodierenden Konstrukt in

Verpackungszellen kotransfiziert. Die Verpackung der *in trans* zur Verfügung gestellten Vpx Proteine in Partikel wurde mittels einer Western Blot-Analyse nachgewiesen. Die mit dem Vpx Protein supplementierten *Knockout*-Vektoren waren nun wieder dazu in der Lage, Monozyten zu transduzieren. Durch Supplementation mit dem wt-Vpx-Konstrukt (Vpx) und dem C-terminal HA-markiertem Vpx (VpxCterHA) konnte die gleiche Transduktionseffizienz erzielt werden wie mit dem Vektor PBj EGFP, der alle akzessorischen Gene exprimiert. Nur das Vpx-Konstrukt, das mit einer N-terminalen HA-Markierung versehen ist (HAVpx), führte zu einer geringeren Transduktionseffizienz. Dies deutet darauf hin, dass am N-Terminus von Vpx ein Bereich liegt, der die Transduktion von Monozyten beeinflusst. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die offensichtlich eingeschränkte Funktion von Vpx ist eine Beeinflussung der Proteinfaltung durch die N-terminale Markierung. Allerdings konnte unabhängig von der Markierung des Vpx die Fähigkeit des 4x ko Vektors zur Transduktion von primären Monozyten wiederhergestellt werden. Somit ist Vpx nicht nur bei der Replikation des SIV<sub>smm</sub>PBj Viruses in Makrophagen (Hirsch *et al.*, 1998) sondern auch bei der Transduktion von Monozyten mit SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren notwendig. Die Mechanismen, die zu dem beobachteten Phänotyp führen, sind unbekannt. Bisher konnte gezeigt werden, dass Vpx am Kernimport des viralen Präintegrationskomplexes (PIC, preintegration complex) beteiligt ist (Fletcher *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1994). Darüber hinaus wurde eine Phosphorylierung von Vpx durch ERK-2/MAPK beschrieben, die zu einer Inhibition des Kernimports und einer verminderten Replikationsfähigkeit in Makaken-Makrophagen führt (Rajendra Kumar *et al.*, 2005). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Kernimport eine maßgebliche Rolle bei der Restriktion Vpx-defizienter Vektoren bzw. Viren spielt. Um dies genauer zu untersuchen, müsste zunächst geklärt werden, ob die reverse Transkription abläuft und ob virale DNA im Zellkern nachweisbar ist. Da nur die Transduktion von Monozyten bzw. Makrophagen Vpx-abhängig ist, kann vermutet werden, dass in diesen Zellen ein Restriktionsfaktor exprimiert wird, der einer Infektion durch Lentiviren bzw. einer Transduktion durch davon abgeleiteten Vektoren entgegenwirkt. Hinsichtlich der eben beschriebenen Funktionen von Vpx ist es denkbar, dass ein solcher Faktor den Kerneintritt verhindert, aber durch die Anwesenheit von Vpx inhibiert werden kann.

#### **4.5 Eine Übertragung der Vpx-Funktion auf HIV-1 Vektoren ist nicht möglich**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Vpx für die Transduktion primärer Monozyten mittels eines auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierenden Vektors essentiell ist, sollte nun analysiert werden, ob das simiane Vpx auch eine Transduktion von Monozyten durch einen HIV-1-abgeleiteten Vektor

ermöglichen kann. Da Vpx auf natürlichem Weg nicht in HIV-1 Partikel inkorporiert wird, wurden zwei Strategien gewählt, um dies zu bewerkstelligen.

Zuerst wurde SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx modifiziert, um eine Inkorporation in HIV-1 Partikel zu erreichen. Dazu wurde HIV-1 Vpr, welches auf natürlichem Weg in HIV-1 verpackt wird, mit SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx fusioniert. Um die Separierung beider Proteine zu ermöglichen befand sich zwischen beiden eine Protease-Schnittstelle. Wie mittels einer Western Blot-Analyse gezeigt werden konnte, fand eine erfolgreiche Inkorporation und die Spaltung des Fusionsproteins sowohl in SIV<sub>smm</sub>PBj als auch HIV-1 statt. Die Supplementierung mit diesem Vpr/Vpx-Fusionsprotein führte jedoch weder bei HIV-1 noch bei PBj-*Knockout* Partikeln zu einer Transduktion von Monozyten. Da auch der supplementierte PBj-*Knockout* Vektor nicht dazu in der Lage war, Monozyten zu transduzieren, muss davon ausgegangen werden, dass das Fusionsprotein nicht funktional war. Obwohl Vpx von dem fusionierten HIV-1 Vpr vermutlich durch die virale Protease abgespalten wird, scheint die Funktion inhibiert zu sein. Dies ist durch eine mögliche Fehlfaltung zu erklären, die das fusionierte Vpx eventuell aufweist und auch nach der Prozessierung durch die virale Protease erhalten bleibt.

Ein zweiter Versuch, Vpx in HIV-1 Partikel zu inkorporieren, war die Modifikation der Vektoren selbst. Die Inkorporation von Vpx in SIV Partikel erfolgt über die p6 Domäne des Gag Proteins (Accola *et al.*, 1999; Selig *et al.*, 1999). Daher wurde ein HIV-1-Konstrukt generiert, bei dem die gesamte p6 Domäne gegen die des SIV<sub>smm</sub>PBj ausgetauscht wurde (pHIVp6). Dies führte zwar zur Verpackung von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in HIV-1, allerdings waren die entstehenden Partikel nicht infektiös. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass durch den Austausch der p6 Domäne die Funktion der Protease beeinträchtigt wurde, da der p6 Leserahmen mit dem der Protease überlappt. Dies wurde mittels einer Western Blot-Analyse bestätigt, in der gezeigt wurde, dass p55 nur ineffizient prozessiert wurde.

Da der Vektor HIV p6 nicht funktional war, wurde ein drittes Konstrukt generiert, bei dem nur ein Teil der p6 Domäne verändert wurde. Ein innerhalb der HIV-2/SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub> Gruppe konservierter Bereich (AS23-52) ist in der p6 Domäne von HIV-1 nicht vorhanden und damit auch auffallend kürzer. Da möglicherweise dieser in HIV-1 fehlende Bereich für die Inkorporation von Vpx in Partikel verantwortlich ist, wurde diese Region bei dem dritten Konstrukt pHIV LC in die p6 Domäne von HIV-1 nach AS 18 eingefügt (siehe Abb. 3.21). Mittels einer Western Blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass das so generierte Konstrukt in der Lage ist, Vpx zu inkorporieren. Der in die p6 Domäne von HIV-1 inserierte Bereich entspricht nicht einem bereits publizierten Motif (D-X-A-X-X-L-L), das innerhalb der HIV-2/SIV<sub>sm</sub>/SIV<sub>mac</sub> Gruppe für die Inkorporation von Vpr und Vpx in Verbindung gebracht wurde

(Accola *et al.*, 1999). Zur Untersuchung des Vpx-Verpackungsmotivs wurden in der Gruppe um M.A. Accola (1999) einzelne Aminosäuren in dem vermuteten Bereich ausgetauscht, die einen Verlust der Inkorporationsfähigkeit von Vpx zur Folge hatten. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass das auf diese Art charakterisierte Motiv alleine zu einer Interaktion mit Vpx führt. Durch das Austauschen einer Aminosäure können Wechselwirkungen innerhalb des gesamten Proteins verändert werden, was bei einem Funktionsverlust nicht zwangsläufig auf eine direkte Beteiligung der beschriebenen Domäne hindeutet. Erstaunlicherweise liegt das für die Verpackung von HIV-1 Vpr beschriebene Motiv (L-X-X-L-F) am C-terminalen Ende der p6 Domäne und weist kaum Ähnlichkeiten mit dem für SIV-Vpr und SIV-Vpx Verpackung beschriebenen Motiv auf, obwohl die Proteine untereinander starke Homologie zeigen (Kondo und Göttlinger, 1996).

Die HIV LC Vektoren, die nun Vpx inkorporieren und zur Transduktion proliferierender Zelllinien in der Lage sind, konnten allerdings keine Monozyten transduzieren. Neben Vpx scheinen somit noch andere Faktoren für die Transduktion von Monozyten verantwortlich zu sein. Dies könnten z.B. virale Proteine sein, die mit Vpx interagieren müssen, um eine erfolgreiche Transduktion zu bewerkstelligen. In diesem Fall könnten andere HIV-1 Proteine nicht mit SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx funktional interagieren, obwohl die Inkorporation von SIV<sub>smm</sub>PBj Vpx in HIV1 Partikel erreicht wurde.

Die auf arretierten Zelllinien erzielten Ergebnisse zeigen, dass SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren prinzipiell Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus transduzieren können, was unabhängig von der Anwesenheit der akzessorischen Proteine ist und gegenüber anderen lentiviralen Vektoren eine Ausnahme darstellt. Die Transduktionsversuche auf primären ruhenden Zellen wie T-Zellen und Monozyten zeigten allerdings, dass es in verschiedenen primären Zellen weitere zelluläre Faktoren geben muss, die neben der Zellzyklusphase eine Transduktion durch lentivirale Vektoren beeinflussen, denn im Fall der T-Zellen war keine Transduktion möglich und auf Monozyten nur in Anwesenheit von Vpx. Mögliche derartige Faktoren sind für T-Zellen bereits beschrieben, z.B. der replikationshemmende Faktor Murr1 (Ganesh *et al.*, 2003). Die durch ihn bedingte Restriktion wurde bisher nur im Zusammenhang mit HIV-1 beschrieben. Ob dieser Faktor auch gegenüber SIV restriktiv wirkt ist nicht bekannt. Der genaue Mechanismus, der zu einer Replikationsinhibierung führt, ist noch nicht eingehend charakterisiert worden. Es wurde jedoch gezeigt, dass ein Teil der Wirkung über eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB vermittelt wird. Ein weiterer Restriktionsfaktor in humanen T-Zellen ist APOBEC3G (Sheehy *et al.*, 2002). Dieses Protein inhibiert die Replikation bestimmter simianer und humaner Immundefizienzviren. Allerdings kann die Wirkung von APOBEC3G durch das virale Vif Protein inhibiert werden. Es ist

denkbar, dass auch Monozyten einen Restriktionsfaktor exprimieren, der durch das virale Vpx Protein inhibiert werden kann. Allerdings ist Vpx allein nicht dazu in der Lage eine Transduktion von Monozyten durch jeden lentiviralen Vektor zu ermöglichen, denn diese Zellen sind trotz Vpx unzugänglich für eine Transduktion durch HIV-1 Vektoren. Dies kann neben den beschriebenen Ursachen auch daran liegen, dass HIV-1 Vektoren keine Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus transduzieren können, eine Eigenschaft, die nur für PBj Vektoren bekannt ist.

#### 4.6 Etablierung eines SIV<sub>smm</sub>PBj Dreiplasmid-Vektorsystems

In der vorliegenden Arbeit wurde ein auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierendes Dreiplasmid-Vektorsystem generiert. Die Genomstruktur des Transfervektors entspricht bereits publizierten lentiviralen Transfervektoren (Naldini *et al.*, 1996; Pandya *et al.*, 2001; Stitz *et al.*, 2001). Es enthält die viralen LTRs, sowie das durch einen CMV-Promotor regulierte *egfp*-Gen. Um eine größere Sicherheit beim Gentransfer zu gewährleisten, müssten noch weitere Modifikationen vorgenommen werden. So sollte zum Beispiel der U3-Bereich der 5' LTR deletiert werden, um einen so genannten SIN (self inactivating vector) Vektor zu generieren (Yu *et al.*, 1986; Schnell *et al.*, 2000). Diese Modifikation soll insertionsbedingte Aktivierungen von Zielzell-Onkogenen durch den viralen Promotor vermeiden. Des Weiteren kann eine Unabhängigkeit des Transfervektors vom viralen Tat-Protein erzielt werden, indem der U3-Bereich der 5' LTR durch einen heterologen Promotor ersetzt wird (Miyoshi *et al.*, 1998).

Die beiden Verpackungskonstrukte pPBj pago und pPBj pack kodieren für die Proteine *gag*, *pol*, *tat* und *rev*. Sie unterscheiden sich nur in dem Bereich zwischen Promotor und *gag*-Start-ATG. In diesem Bereich wird das Verpackungssignal ( $\Psi$ ) vermutet, welches in den Verpackungskonstrukten deletiert sein sollte. Das Verpackungssignal der murinen Retroviren liegt zwischen Spleißdonor und dem Start-ATG von *gag*. Die *cis*-aktiven  $\Psi$ -Sequenzen, die bei Lentiviren zur Verpackung führen, scheinen hingegen unter den verschiedenen Viren dieser Familie große Unterschiede aufzuweisen. So umfasst die HIV-1 Verpackungssequenz einen Bereich, der 5' des Spleißdonors beginnt und bis in das *gag*-Gen hinein reicht (Harrison *et al.*, 1992; Berkowitz *et al.*, 1995). Aus diesem Grund muss dieser Bereich in einem optimalen Transfervektor erhalten bleiben. Sekundärstrukturanalysen der als Verpackungssequenz vermuteten Region sind komplex und enthalten viele RNA Schleifen (stem loops, SL1-SL4), die zur Verpackung, Dimerisierung und Bindung an das Nukleokapsid beitragen. Dabei ist zu beachten, dass diese Struktur innerhalb der Lentiviren nicht konserviert ist. So konnten für HIV-1 vier RNA-Schleifen nachgewiesen werden,



(Patel *et al.*, 2003). Um diesen Bereich genauer zu charakterisieren wurde das putative Verpackungssignal durch eine Deletion des Bereichs zwischen Spleißdonor und Gag Start-ATG eliminiert. Anschließend wurde die Region zwischen Promotor und Spleißdonor sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende beginnend sukzessive deletiert. So konnte gezeigt werden, dass es keine direkte Korrelation zwischen der Länge der Deletion und den resultierenden Titern gibt. Jedoch waren alle hier untersuchten Deletionen ausreichend, die Verpackung und den Transfer der viralen Strukturgene in transduzierte Zielzellen zu unterbinden.

Mit dem Verpackungskonstrukt pPBj pago, bei dem der von Patel beschriebene Bereich zwischen Promotor und Spleißdonor komplett deletiert wurde, konnten nur sehr geringe Titer erzielt werden. Dies könnte mit der in diesem Zusammenhang beschriebenen Hemmung der Gag Akkumulation zusammenhängen. In dem Konstrukt pPBj pack wurde dieser Bereich erhalten und stattdessen der Bereich zwischen Spleißdonor und dem *gag* Start-ATG deletiert, um dadurch eine Elimination des Verpackungssignals zu erreichen. Dies erlaubte die Generierung von Titern, die etwa zehnmal höher waren als die durch das Konstrukt pPBj pago erzielten. Allerdings sind die durch dieses Dreiplasmid-Vektorsystem erreichten Titer ( $5 \times 10^5$  i.E./ml) noch zehnmal niedriger als die durch das Zweiplasmidsystem erreichten. Auch die publizierten Titer, die mit lentiviralen Dreiplasmidsystemen erreicht werden, liegen um das zwei- bis hundertfache höher (Nègre *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2000; Mochizuki *et al.*, 1998).

Auch wenn durch die Verwendung von pPBj pack höhere Titer als durch pPBj pago generiert werden konnten, sind diese für lentivirale Vektoren immer noch relativ gering. Eine Ursache hierfür könnte die Deletion von Bereichen sein, die einen Einfluss auf die Partikelbildung oder die Stabilisierung der RNA haben und bisher nicht charakterisiert wurden. Um höhere Titer zu erhalten, könnten an den Konstrukten weitere Modifikationen vorgenommen werden. So kann zum Beispiel ein *posttranskriptionelles Regulationselement des Murmeltier-Hepatitis-Virus* (WPRE, woodchuck posttranscriptional regulatory element) inseriert werden. Dieses ist in die posttranskriptionelle Kontrolle des mRNA-Transports involviert und bewirkt eine Stabilisierung der RNA, wodurch die Translationseffizienz gesteigert wird (Zufferey *et al.*, 1999; Hlavaty *et al.*, 2005). Allerdings gilt es zu beachten, dass eine Erhöhung der Translation nur dann effektiv ist, wenn das betreffende Gen normalerweise ähnliche Kontrollelemente benötigt (Schambach *et al.*, 2000). Des Weiteren könnte das Konstrukt in ein anderes Plasmid-Rückgrad überführt werden. Enthält das Plasmid-Rückgrad z.B. ein *SV40 Ori*, wirkt sich dieses nach Transfektion in 293T Zellen positiv auf die Expression der auf dem Plasmid kodierten Gene aus und kann somit zu einer erhöhten Partikelbildung führen. Als weitere Modifikation ist eine Kodon-Optimierung der einzelnen

Vektorkomponenten denkbar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass auch dies zur Erhöhung der Titer beiträgt (Ikeda *et al.*, 2003; Kotsopoulou *et al.*, 2000).

Da es in einem homogenen lentiviralen Vektorsystem nicht möglich ist, *cis*-aktive Sequenzen des Transfervektors komplett von *trans*-aktiven Bereichen des Verpackungskonstruktes zu trennen, besteht ein erhöhtes Risiko einer homologen Rekombination zwischen Transfervektor und Verpackungskonstrukt, was zur Entstehung replikationskompetenter Viren (RCR, replication competent retrovirus) führen kann. Solche rekombinanten Viren konnten in ersten Versuchen nicht nachgewiesen werden. Dazu wurden Überstände von transduzierten Zellen auf Zielzellen übertragen und diese Zellen auf die Anwesenheit von viralen Sequenzen analysiert. Um das Vorhandensein von RCRs mit noch größerer Sicherheit auszuschließen, sollten jedoch sensitivere Methoden verwendet werden. Es könnte z.B. die Reverse Transkriptase-Aktivität im Überstand transduzierter Zellen über einen längeren Zeitraum verfolgt werden.

Eine Möglichkeit, die Bildung solcher replikationskompetenter Retroviren von vornherein auszuschließen, ist die Generierung von heterogenen Vektoren durch die Kreuzverpackung von SIV- und HIV-Vektorkomponenten. Solch eine Kreuzverpackung kann auch mit dem hier etablierten SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren erfolgen. Allerdings ist dies nur unidirektional möglich, d.h. der SIV<sub>smm</sub>PBj Transfervektor kann in HIV-1 Partikel verpackt werden, was zu Titern führt ( $1 \times 10^6$  i.E./ml), die denen mit reinen HIV-1 Vektoren erzielten ( $3 \times 10^6$  i.E./ml) entsprechen. Eine Verpackung eines HIV-1 Transfervektors in SIV<sub>smm</sub>PBj Partikel ist jedoch nicht bzw. nur sehr ineffizient möglich. Diese unidirektionale Kreuzverpackung wurde bereits für andere HIV-1 und SIV- bzw HIV-2-Konstrukte beschrieben (Rizvi *et al.*, 1993; Kaye *et al.*, 1998; Poeschla *et al.*, 1996; Stitz *et al.*, 2001; Strappe *et al.*, 2005). Der umgekehrte Fall, bei dem ein HIV-1 Transfervektor in ein SIV-Partikel verpackt wird und zu einer effizienten Transduktion führt, wurde bisher nur einmal beschrieben (White *et al.*, 1999).

#### **4.7 Effiziente Transduktion von Monozyten mit dem neu etablierten SIV<sub>smm</sub>PBj Dreiplasmid-Vektorsystem**

Die durch das Dreiplasmidsystem generierten Vektoren konnten durch Ultrazentrifugation um das Zehnfache konzentriert werden und erreichten so Titer bis zu  $5 \times 10^6$  i.E./ml. Die so konzentrierten Vektoren wurden zur Transduktion von Monozyten eingesetzt. Da vorangegangene Experimente zeigten, dass Vpx für eine Transduktion von Monozyten essentiell ist, wurden die aus dem Dreiplasmidsystem generierten Vektoren (durch

Kotransfektion des Vpx-Expressionskonstrukts eigentlich ein Vierplasmid-System) auch mit Vpx supplementiert. Es wurde gezeigt, dass der Vpx-supplementierte Dreiplasmidsystem-Vektor zur Transduktion von Monozyten in der Lage ist. Wurden die Monozyten an verschiedenen Tagen nach Isolierung mit den Vpx-supplementierten Dreiplasmidsystem-Vektoren mit einer moi von 5 transduziert, entsprachen die resultierenden Daten denen, die durch die SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren des Zweiplasmidsystems erzielt wurden. Somit wurde gezeigt, dass durch die Aufteilung der einzelnen viralen Komponenten von zwei auf drei Plasmide der Titer der generierten Vektoren geringer wurde, die Transduktionseigenschaften des SIV<sub>smm</sub>PBj Vektors aber nicht verändert wurden. Im Bereich einer moi von 1 bis 10 ergab sich ein lineares Verhältnis der Transduktionseffizienz zur eingesetzten moi. Dies entspricht den für lentivirale Vektoren publizierten Daten für die Transduktion primärer Zellen (Ma *et al.*, 2003). Eine Sättigung wird erst ab einer moi von 100 erwartet.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist es gelungen ein auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierendes Dreiplasmid-Vektorsystem zu etablieren. Die damit generierten Vektoren haben die Fähigkeit zur Transduktion primärer humaner Monozyten beibehalten. Bei einer Optimierung der einzelnen Konstrukte, z.B. durch die beschriebenen möglichen Modifikationen, muss stets überprüft werden, ob sich dadurch eine Änderung der Transduktionseigenschaften ergeben hat.

Der hier entwickelte, auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierende, Vektor bietet die Möglichkeit einen Gentransfer in Zellen zu ermöglichen, die sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden. Für eine mögliche Gentherapie bietet dies große Vorteile gegenüber herkömmlichen lentiviralen Vektoren. So können nun primären humanen Monozyten, die Vorläuferzellen der wichtigen antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen und Makrophagen, genetisch modifiziert werden, um immunogene Epitope zu exprimieren. Zum Beispiel könnten die Gene für bekannte Tumorantigene eingebracht werden, um die körpereigene Immunreaktion gegen Tumore zu aktivieren. In zukünftigen Experimenten muss getestet werden, ob der SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektor auch bei der Transduktion von Stammzellen Vorteile aufweist, denn auch diese Zellen befinden sich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus und sind einem Gentransfer durch gammaretrovirale oder lentivirale Vektoren bisher nicht oder nur schwer zugänglich.

## 5. Zusammenfassung

In der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ des Paul-Ehrlich-Instituts konnte gezeigt werden, dass ein SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleiteter Vektor Vorteile gegenüber HIV-1-abgeleiteten Vektoren aufweist, da auch in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus arretierte Zelllinien und Fibroblasten sowie primäre humane Monozyten transduziert werden können.

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit wurden die besonderen Transduktionsfähigkeiten dieses SIV<sub>smm</sub>PBj Vektors eingehend untersucht. Zunächst wurden die transduzierbaren Monozyten morphologisch und biochemisch genauer charakterisiert; insbesondere wurde gezeigt, dass sich diese Zellen tatsächlich in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden und auch nach der Transduktion die Fähigkeit aufweisen, sowohl in Makrophagen als auch in Dendritischen Zellen auszudifferenzieren. Bei dem Versuch andere primäre humane Blutzellen zu transduzieren wurde gezeigt, dass SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren für die Transduktion unstimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht geeignet sind.

Zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen die zur Transduktion arretierter Zellen und Monozyten durch SIV<sub>smm</sub>PBj-abgeleitete Vektoren führen, wurde der Einfluss der akzessorischen viralen Proteine untersucht. Dazu wurde ein PBj-*Knockout*-Vektor, bei dem die Expression aller akzessorischen Gene (*vif*, *vpx*, *vpr* und *nef*) inhibiert war, generiert und zur Transduktion von arretierten Zellen und Monozyten eingesetzt. Keines der akzessorischen Proteine war für die Transduktion der in G<sub>0</sub> arretierten Zellen notwendig. Für die Transduktion von Monozyten erwies sich das virale Protein Vpx jedoch als essentiell, da der *Knockout*-Vektor zur Transduktion von Monozyten nur nach Supplementierung mit diesem Protein in der Lage war. Die Supplementierung von HIV-1 Vektoren mit Vpx des SIV<sub>smm</sub>PBj ermöglichte keine Transduktion von Monozyten, was darauf hindeutet, dass weitere Proteine von SIV<sub>smm</sub>PBj oder aber auch die Fähigkeit der prinzipiellen Transduktion von Zellen der G<sub>0</sub>-Phase eine Rolle spielen.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde ein auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierendes Dreiplasmid-Vektorsystem entwickelt. Für das Verpackungskonstrukt wurde das Verpackungssignal charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Bereich zwischen dem Promotor und dem Spleißdonor gelegene Bereich für eine effiziente Partikelbildung nötig ist und die Deletion der Region zwischen Spleißdonor und *gag*-Start-ATG zur Inaktivierung des Verpackungssignals ausreicht. Die aus dem Dreiplasmid-System generierten Vektoren erreichten Titer von bis zu  $5 \times 10^5$  i.E./ml und waren nach Supplementierung mit Vpx dazu in der Lage, primäre humane Monozyten zu transduzieren.

Der hier entwickelte, auf SIV<sub>smm</sub>PBj basierende Vektor eröffnet neue Möglichkeiten in der Gentherapie. So sind nun auch Monozyten als wichtige Zielzellen der Tumorthherapie einem Gentransfer durch lentivirale Vektoren zugänglich.

## 6. Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

#### A

---

Accola M.A., Bukovsky A.A., Jones M.S., Gottlinger H.G.: "A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agm)." (*J. Virol.* **1999**; 73(12): 9992-9)

Antas P.R., Oliveira E.B., Milagres A.S., Franken K.C., Ottenhoff T.H., Klaster P., Sarno E.N, Sampaio E.P.: "Kinetics of T cell-activation molecules in response to Mycobacterium tuberculosis antigens." (*Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**; 97(8): 1097-9)

Arya S.K., Zamani M., Kundra P.: „Human immunodeficiency virus type 2 lentivirus vectors for gene transfer: expression and potential for helper virus-free packaging." (*Hum. Gene Ther.* **1998**; 9(9): 1371-80)

#### B

---

Berkowitz R.D., Hammarskjold M.L., Helga-Maria C.: „5' regions of HIV-1 are not sufficient for encapsidation: implications for the HIV-1 packaging signal." (*Virology* **1995**; 212(2): 718-23)

Bukrinsky M.I., Sharova N., Dempsey M.P., Stanwick T.L., Bukrinskaya A.C., Haggerty S., Stevenson M.: „Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex." (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**; 89(14): 6580-84)

#### C

---

Caruso M., Panis Y., Gagandeep S., Houssin D., Salzman J.L., Klatzmann D.: „Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene." (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1993**; 90(15): 7024-8)

Cavaliere S., Cazzaniga S., Geuna M., Magnani Z., Bordignon C., Naldini L., Bonini C.: „Human T lymphocytes transduced by lentiviral vectors in the absence of TCR activation maintain an intact immune competence.“ (***Blood* 2003**; 102(2): 497-505)

Chen R., Le Rouzic E., Kearney J.A., Mansky L.M., Benichou S.: „Vpr-mediated incorporation of UNG2 into HIV-1 particles is required to modulate the virus mutation rate and for replication in macrophages.“ (***J. Biol. Chem.* 2004**; 279(27):28419-25)

Chen R., Wang H., Mansky L.M.: „Roles of uracil-DNA glycosylase and dUTPase in virus replication.“ (***J. Gen. Virol.* 2002**; 83(10): 2339-45)

Cheng-Mayer C., Iannello P., Shaw K., Luciw P.A., Levy J.A.: „Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host.“ (***Science* 1989**; 246(4937): 1629-32)

Chiu Y.L., Soros V.B., Kreisberg J.F., Stopak K., Yonemoto W., Greene W.C.: „Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells.“ (***Nature* 2005**; 435(7038): 108-14)

Clever J.L., Parslow T.G.: „Mutant human immunodeficiency virus type 1 genome with defects in RNA dimerization or encapsidation.“ (***J. Virol.* 1997**; 71(5): 3407-14)

Coeytaux E., Coulaud D., Le Cam E., Danos O., Kichler A.: „The cationic amphipathic alpha-helix of HIV-1 viral protein R (Vpr) binds to nucleic acids, permeabilizes membranes, and efficiently transfects cells.“ (***J. Biol. Chem.* 2003**; 278(20): 18110-16)

Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E.: „Retroviruses“ (1997, Cold Spring Harbor Laboratory Press)

Cohn Z.A., Benson B.: „The differentiation of mononuclear phagocytes. Morphology, Cytochemistry and Biochemistry.“ (***J. Exp. Med.* 1965**; 1(121): 153-70)

Connor R.I., Chen B.K., Choe S., Landau N.R.: „Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes.“ (***Virology* 1995**; 206(2): 935-44)

Costello E., Munoz M., Buetti E., Meylan P.R.A., Diggelmann H., Thali M.: „Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors.” (***Gene Ther.* 2000**; 7(7): 596-604)

Cournaud V., Laure F., Fultz P.N., Montagnier L., Brechot C., Sonigo P.: „Genetic differences accounting for evolution and pathogenicity of simian immunodeficiency virus from sooty mangabey monkey after cross-species transmission to a pig-tailed macaque.” (***J. Virol.* 1992**; 66(1): 414-9)

## D

---

Daniel M.D., Li Y., Naidu Y.M., Durda P.J., Schmidt D.K., Troup C.D., Silva D.P., MacKey J.J., Kestler H.W. 3rd, Sehgal P.K., *et al.*: „Simian immunodeficiency virus from african green monkeys.” (***J. Virol.* 1988**; 62(11): 4123-8)

De Noronha C.M., Sherman M.P., Lin H.W., Cavrois M.V., Moir R.D., Goldman R.D., Greene W.C.: „Dynamic disruptions in nuclear envelope architecture and integrity induced by HIV-1 Vpr.” (***Science* 2001**; 294(5544): 1105-8)

Dewhurst S., Embretson J.E., Anderson D.C., Mullins J.I., Fultz P.N.: „Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVsmmPBj14.” (***Nature* 1990**; 345(6276): 636-9)

Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Krasovsky J., Munz C., Bhardwaj N.: „Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.” (***J. Exp. Med.* 2001** 15;193(2): 233-8)

Di Marzio P., Choe S., Ebright M., Knoblauch R., Landau N.R.: „Mutational analysis of cell cycle arrest, nuclear localization and virion packaging of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.” (***J. Virol.* 1995**; 69(12): 7907-16)

Dranoff G., Jaffee E., Lazenby A., Golumbek P., Levitsky H., Brose K., Jackson V., Hamada H., Pardoll D., Mulligan R.C.: „Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.” (***Proc. Natl. Acad. Sci.* 1993**; 90(8): 3539-43)

Du Z., Lang S.M., Sasseville V.G., Lackner A.A., Ilyinskii P.O., Daniel M.D., Jung J.U., Desrosiers R.C.: „Identification of a nef allele that causes lymphocyte activation and acute disease in macaque monkeys.“ (**Cell** 1995; 82(4): 655-74)

Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L.: „A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.“ (**J. Virol.** 1998; 72(11): 8463-71)

Dyall J., Latouche J.B., Schnell S., Sadelain M.: „Lentivirus-transduced human monocyte-derived dendritic cells efficiently stimulate antigen-specific cytotoxic T lymphocytes.“ (**Blood** 2001; 97(1): 114-21)

## F

---

Fisher A.G., Ensoli B., Ivanoff L., Chamberlain M., Petteway S., Ratner L., Gallo R.C., Wong-Staal F.: „The sor gene of HIV-1 is required for efficient virus transmission in vitro.“ (**Science** 1987; 237(4817): 888-93)

Fletcher T.M. 3rd, Brichacek B., Sharova N., Newman M.A., Stivahtis G., Sharp P.M., Emerman M., Hahn B.H., Stevenson M.: „Nuclear import and cell cycle arrest functions of the HIV-1 Vpr protein are encoded by two separate genes in HIV-2/SIVsm.“ (**EMBO J.** 1996; 15(22): 6155-65)

Follenzi A., Ailles L.E., Bakovic S., Geuna M., Naldini L.: „Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences.“ (**Nat. Genet.** 2000; 25(2): 217-22)

Fouchier R.A., Malim M.H.: „Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes.“ (**Adv. Virus. Res.** 1999; 52: 275-99)

Fultz P.N., McClure H.M., Anderson D.C., Switzer W.M.: „Identification and biologic characterization of an acutely lethal variant of simian immunodeficiency virus from Sooty Mangabeys (SIV/SMM).“ (**AIDS Res. Hum. Retroviruses** 1989; 5(4): 397-409)

Fultz P.N.: „Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes.“ (**J. Virol.** 1991; 65(9): 4902-9)

## G

---

Gabuzda D.H., Lawrence K., Langhoff E., Terwilliger E., Dorfman T., Hasetine W.A., Sodorski J.: „Role of vif in replication of human immunodeficiency virus type 1 in CD4+ T lymphocytes.“ (*J. Virol.* **1992**; 66(11): 6489-95)

Ganesh L., Burstein E., Guha-Niyogi A., Louder M.K., Mascola J.R., Klomp L.W.J., Wijmenga C., Duckett C.S., Nabel G.J.: „The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4<sup>+</sup> lymphocytes.“ (*Nature* **2003**; 426(6968): 853-7)

Garcia J.V., Miller A.D.: „Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef.“ (*Nature* **1991**; 350(6318): 508-11)

Garzino-Demo A., Gallo R.C., Arya S.K.: „Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2): packaging signal and associated negative regulatory element.“ (*Hum. Gene Ther.* **1995**; 6(2): 177-84)

Gasmi M., Glynn J., Jin M.J., Jolly D.J., Yee J.K., Chen S.T.: „Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vector.“ (*J. Virol.* **1999**; 73(3): 1828-34)

Ghose T., Guclu A., Tai J., Norvell S.T., MacDonald A.S.: „Active immunoprophylaxis and immunotherapy in two mouse lymphoma models.“ (*J. Natl. Cancer. Inst.* **1976**; 57(2): 303-15)

Gu Y., Sundquist W.I.: „Good to CU.“ (*Nature* **2003**; 424(6944): 21-2)

## H

---

Hacein-Bey-Abina S., Le Deist F., Carlier F., Bouneaud C., Hue C., De Villartay J.P., Thrasher A.J., Wulffraat N., Sorensen R., Dupuis-Girod S., Fischer A., Davies E.G., Kuis W., Leiva L., Cavazzana-Calvo M.: „Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy.“ (*N. Engl. J. Med.* **2002**; 346(16): 1185-93)

Harris R.S., Bishop K.N., Sheehy A.M., Craig H.M., Petersen-Mahrt S.K., Watt I.N., Neuberger M.S., Malim M.H.: "DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection." (**Cell** **2003**; 113(6): 803-9)

Harrison G.P., Lever A.M.: „The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure.“ (**J. Virol.** **1992**; 66(7): 4144-53)

He J., Choe S., Walker R., Di Marzio P., Morgan D.O., Landau N.R.: „Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity.“ (**J. Virol.** **1995**; 69(11): 6705-11)

Hirsch V.M., Dapolito G.A., Goldstein S., McClure H., Emau P., Fultz P.N., Isahakia M., Lenroot R., Myers G., Johnson P.R.: „A distinct African lentivirus from Sykes' monkeys.“ (**J. Virol.** **1993**; 67(3): 1517-28)

Hirsch V.M., Olmsted R.A., Murphey-Corb M., Purcell R.H., Johnson P.R.: „An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2.“ (**Nature** **1989**; 339(6223): 389-92)

Hirsch V.M., Sharkey M.E., Brown C.R., Brichacek B., Goldstein S., Wakefield J., Byrum R., Elkins W.R., Hahn B.H., Lifson J.D., Stevenson M.: „Vpx is required for dissemination and pathogenesis of SIV(SM) PBj: evidence of macrophage-dependent viral amplification.“ (**Nat. Med.** **1998**; 4(12): 1401-8)

Hlavaty J., Schittmayer M., Stracke A., Jandl G., Knapp E., Felber B.K., Salmons B., Gunzburg W.H., Renner M.: „Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors.“ (**Virology** **2005**; 341(1): 1-11)

Huang A.Y.C., Golumbek P., Ahmadzadeh M., Jaffee E., Pardoll D., Levitsky H.: „Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC Class I-restricted tumor antigen.“ (**Science** **1994**; 264(5161): 961-65)

Huet T., Cheynier R., Meyerhans A., Roelants G., Wain-Hobson S.: „Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1.“ (**Nature** **1990**; 345(6273): 356-9)

**I**

---

Ikeda Y., Takeuchi Y., Martin F., Cosset F.L., Mitrophanous K., Collins M.: „Continuous high-titer HIV-1 vector production.“ (*Nat. Biotechnol.* **2003**; 21(5): 569-72)

**J**

---

Jainchill J.L., Aaronson S.A., Todaro G.J.: „Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.“ (*J. Virol.* **1969**; 4(5): 549-53)

Jenkins Y., Pornillos O., Rich R.L., Myszka D.G., Sundquist W.I., Malim M.H.: „Biochemical analyses of the interactions between human immunodeficiency virus type 1 Vpr and p6(Gag).“ (*J. Virol.* **2001**; 75(21): 10537-42)

Jensen F.C., Girardi A.J., Gilden R.V., Koprowski H.: „Infection of human and simian tissue cultures with rous sarcoma virus.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1964**; 52: 53-9)

Johnson P.R., Fomsgaard A., Allan J., Gravell M., London W.T., Olmsted R.A., Hirsch V.M.: „Simian immunodeficiency viruses from African green monkeys display unusual genetic diversity.“ (*J. Virol.* **1990**; 64(3): 1086-92)

Jones K.A., Peterlin B.M.: „Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter.“ (*Annu. Rev. Biochem.* **1994**; 63: 717-43)

Jowett J.B., Planelles V., Poon B., Shah N.P., Chen M.L., Chen I.S.: „The human immunodeficiency virus type 1 gene arrests infected T cells in the G2 + M phase of the cell cycle.“ (*J. Virol.* **1995**; 69(10): 6304-13)

**K**

---

Kaiser J.: „Die Bedeutung der akzessorischen Gene bei der Transduktion primärer humaner Monozyten mit SIVsmmPBj-abgeleiteten lentiviralen Vektoren.“ (**2004**, Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut; Abteilung Medizinische Biotechnologie)

Katz R.A., Greger J.G., Boimel P., Skalka A.M.: „Human immunodeficiency virus type 1 DNA nuclear import and integration are mitosis independent in cycling cells.“ (*J. Virol.* **2003**; 77(24): 13412-7)

Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L.: „Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.“ (*Nat. Med.* **2001**; 7(1): 33-40)

Kaye J.F., Lever A.M.: „Human immunodeficiency virus types 1 and 2 differ in the predominant mechanism used for selection of genomic RNA for encapsidation.“ (*J. Virol.* **1999**; 73(4): 3023-31)

Kaye J.F., Lever A.M.: „Nonreciprocal packaging of human immunodeficiency virus type 1 and type 2 RNA: a possible role for the p2 domain of Gag in RNA encapsidation.“ (*J. Virol.* **1998**; 72(7): 5877-85)

Kestler H.W.<sup>3<sup>rd</sup></sup>, Ringler D.J., Mori K., Panicali D.L., Sehgal P.K., Daniel M.D., Desrosiers R.C.: „Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS.“ (*Cell* **1991**; 65(4): 651-62)

Kichler A., Pages J.C., Leborgne C., Druillennec S., Lenoir C., Coulaud D., Delain E., Le Cam E., Roques B.P., Danos O.: „Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R.“ (*J. Virol.* **2000**; 74(12): 5425-31)

Kim V.N., Mitrophanous K., Kingsman S.M., Kingsman A.J.: „Minimal requirement for a lentivirus vector based on human immunodeficiency virus type 1.“ (*J. Virol.* **1998**; 72(1): 811-6)

Klarmann G.J., Chen X., North T.W., Preston B.D.: „Incorporation of uracil into minus strand DNA affects the specificity of plus strand synthesis initiation during lentiviral reverse transcription.“ (*J. Biol. Chem.* **2003**; 278(10): 7902-9)

Kondo E., Göttlinger H.G.: „A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6<sup>gag</sup> required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.“ (*J. Virol.* **1996**; 70(1): 159-64)

Korin Y.D., Zack J.A.: „Progression to the G<sub>1</sub>b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in t cells.” (*J. Virol.* **1998**; 72(4): 3161-8)

Kotsopoulou E., Kim V.N., Kingsman A.J., Kingsman S.M., Mitrophanous K.A.: „A rev-independent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-based vector that exploits a codon-optimized HIV-1 *gag-pol* gene.“ (*J. Virol.* **2000**; 74(10): 4839-52)

## L

---

Levy D.N., Refaeli Y., Weiner D.B.: „The vpr regulatory gene of HIV.“ (*Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **1995**; 193: 209-36)

Lewis M.G., Zack P.M., Elkins W.R., Jahrling P.B.: „Infection of Rhesus and Cynomolgus macaques with a rapidly fatal SIV (SIVSMM/PBj) isolate from Sooty Mangabeys.“ (*AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**; 8(9): 1631-9)

Lewis P.F. and Emerman M.: „Passage through mitosis is required for oncoviruses but not for the human immunodeficiency virus.“ (*J. Virol.* **1994** 68(1): 510-6)

Lo Bianco C., Schneider B.L., Bauer M., Sajadi A., Brice A., Iwatsubo T., Aebischer P.: „Lentiviral vector delivery of parkin prevents dopaminergic degeneration in a alpha-synuclein rat model of Parkinson's disease.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**; 101(50): 17510-5)

## M

---

Ma Y., Ramezani A., Lewis R., Hawley R.G., Thomson J.A.: „High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors.“ (*Stem Cells* **2003**; 21(1): 111-7)

Mahalingam S., Ayyayoo V., Patel M., Kieber-Emmons T., Weiner D.B.: „Nuclear import, virion incorporation, and cell cycle arrest/differentiation are mediated by distinct functional domains of human immunodeficiency virus type 1 Vpr.“ (*J. Virol.* **1997**; 71(9):6339-47)

Mahalingam S., VanTine B., Santiago M.L., Gao F., Shaw G.M., Hahn B.H.: „Functional analysis of the simian immunodeficiency virus Vpx protein: identification of packaging determinants and a novel nuclear targeting domain.“ (*J. Virol.* **2001**; 75(1): 362-74)

Mangeat B., Turelli P., Caron G., Friedli M., Perrin L., Trono D.: „Broad antiretroviral defence by human APOBEC3G through lethal editing of nascent reverse transcripts.“ (*Nature* **2003**; 424(6944): 99-103)

Mangeot P.M., Nègre D., Dubois B., Winter A.J., Leissner P., Mehtali M., Kaiserlian D., Cosset F.L., Darlix J.L.: „Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells.“ (*J. Virol.* **2000**; 74(18): 8307-15)

Mansky L.M., Preveral S., Selig L., Benarous R., Benichou S.: „The interaction of Vpr with uracil DNA glycosylase modulates the human immunodeficiency virus type 1 in vivo mutation rates.“ (*J. Virol.* **2000**; 74(15): 7039-47)

Mansky L.M., Temin H.M.: „Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase.“ (*J. Virol.* **1995**; 69(8): 5087-94)

Mansky L.M.: „The mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 is influenced by the vpr gene.“ (*Virology* **1996**; 222(2): 391-400)

McCann E.M., Lever A.M.: „Location of cis-acting signals important for RNA encapsidation in the leader sequence of human immunodeficiency virus type 2.“ (*J. Virol.* **1997**; 71(5): 4133-7)

Meuret G., Bammert J., Hoffmann G.: „Kinetics of human monocytopoiesis.“ (*Blood* **1974**; 44(6): 801-16)

Miller D.G., Adam M.A., Miller A.D.: „Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that actively replicate at the time of infection.“ (*Mol. Cell. Biol.* **1990** 10(8): 4239-42)

Miller G.A., Pontes J.E., Huben R.P., Goldrosen M.H.: „Humoral immune response of patients receiving specific active immunotherapy for renal cell carcinoma.“ (*Cancer Res.* **1985**; 45(9): 4478-82)

Miller M.D., Warmerdam M.T., Gaston I., Green W.C., Feinberg M.B.: „The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages.“ (*J. Exp. Med.* **1994**; 179(1): 101-13)

Miyoshi H., Blomer U., Takahashi M., Gage F.H., Verma I.M.: „Development of a self-inactivating lentivirus vector.“ (*J. Virol.* **1998**; 72(10): 1850-7)

Mochizuki H., Schwartz J.P., Tanaka K., Brady R.O., Reiser J.: „High-titer human immunodeficiency virus type 1-based vector system for gene delivery into nondividing cells.“ (*J. Virol.* **1998**; 72(11): 8873-83)

Modrow S., Falke D.: „Molekulare Virologie“ (1997, Spektrum Verlag)

Mühlebach M.D., Schmitt I., Steidl S., Stitz J., Schweizer M., Blankenstein T., Cichutek K., Uckert W.: „Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes.“ (*J. Mol. Med.* **2003**; 81(12): 801-10)

Mühlebach M.D., Wolfrum N., Schüle S., Tschulena U., Sanzenbacher R., Flory E., Cichutek K., Schweizer M.: „Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj.“ (*Mol. Ther.* **2005**; Epub ahead of print)

Muthumani K., Hwang D.S., Choo A.Y., Mayilvahanan S., Dayes N.S., Thieu K.P., Weiner D.B.: „HIV-1 Vpr inhibits the maturation and activation of macrophages and dendritic cells in vitro.“ (*Intern. Immunol.* **2004**; 17(2): 103-16)

Miyoshi H., Blömer U., Takahashi M., Gage F.H., Verma I.M.: „Development of a Self-inactivating lentivirus vector.“ (*J. Virol.* **1998**; 71(10): 8150-7)

## N

---

Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D.: „In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.“ (*Science* **1996**; 272(5259): 263-7)

Nègre D., Mangeot P.E., Duisit G., Blanchard S., Vidalain P.O., Leissner P., Winter A.J., Roubardin-Combe C., Mehtali M., Moullier P., Darlix J.L., Cosset F.L.: „Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells.“ (*Gene Ther.* **2000**; 7(19): 1613-23)

## O

---

Oettgen H.F., Old L.J. in „*Biologic Therapy of Cancer*“, eds. DeVita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A. (Lippincott, Philadelphia; 87-119)

Olmsted J.B., Carlson K., Klebe R., Ruddle F., Rosenbaum J.: „Isolation of microtubule protein from cultured mouse neuroblastoma cells.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1970**; 65(1): 129-36)

Ory D.S., Neugeboren B.A., Mulligan R.C.: „A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**; 93(21): 11400-6)

## P

---

Pandori M., Craig H., Moutouh L., Corbeil J., Guatelli J.: „Virological importance of the protease-cleavage site in human immunodeficiency virus type 1 Nef is dependent of both intravirion processing and CD4 down-regulation.“ (*Virology* **1998**; 251(2): 302-16)

Pandori M.W., Fitch N.J.S., Craig H.M., Richman D.D., Spina C.A., Guatelli J.C.: „Producer-cell modification of human immunodeficiency virus type 1: Nef is a virion protein.“ (*J. Virol.* **1996**; 70(7): 4283-90)

Pandya S., Boris-Lawrie K., Leung N.J., Akkina R., Planelles V.: „Development of an rev-independent, minimal simian immunodeficiency virus-derived vector system.“ (*Hum. Gene Ther.* **2001**; 12(7): 847-57)

Parolin C., Dorfman T., Palu G., Gottlinger H., Sodroski J.: „Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes.“ (*J. Virol.* **1994**; 68(6): 3888-95)

Patel J., Wang S.W., Izmailova E., Aldovini A.: „The simian immunodeficiency virus 5' untranslated leader sequence plays a role in intracellular viral protein accumulation and in RNA packaging.“ (*J. Virol.* **2003**; 77(11): 6284-92)

Peeters M., Honore C., Huet T., Bedjabaga L., Ossari S., Bussi P., Cooper R.W., Delaporte E.: „Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon.“ (*AIDS* **1989**; 3(10): 625-30)

Petricciani J.C., Hopps H.E., Lorenz D.E.: „Subhuman primate diploid cells: possible substrates for production of virus vaccines.“ (*Science* **1971**; 174(13): 1025-7) (US Patent 4,040,905 **1977**)

Poeschla E., Corbeau P., Wong-Staal F.: „Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**; 93(21): 11395-9)

Porgador A., Gilboa E.: „Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes.“ (*J. Exp. Med.* **1995**; 182(1): 255-60)

## R

---

Rajendra Kumar P., Singhal P.K., Subba Rao M.R., Mahalingam S.: „Phosphorylation by MAPK regulates simian immunodeficiency virus Vpx protein nuclear import and virus infectivity.“ (*J. Biol. Chem.* **2005**; 280(9): 8553-63)

Ratner L., Haseltine W., Patarca R., Livak K.J., Starcich B., Josephs S.F., Doran E.R., Rafalski J.A., Whitehorn E.A., Baumeister K.: „Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III.“ (*Nature* **1985**; 313(6000): 277-84)

Re F., Braaten D., Franke E.K., Luban J.: „Human Immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B.“ (*J. Virol.* **1995**; 69(11): 6859-64)

Reinhart T.A., Rogan M.J., Haase A.T.: „RNA splice site utilization by simian immunodeficiency viruses derived from sooty mangabey monkeys.“ (*Virology* **1996**; 224(1): 338-44)

Rizvi T.A., Panganiban A.T.: „Simian immunodeficiency virus RNA is efficiently encapsidated by human immunodeficiency virus type 1 particles.“ (**J. Virol.** 1993; 67(5): 2681-8)

Robbins P.D., Ghivizzani S.C.: „Viral vectors for gene therapy.“ (**Pharmacol. Ther.** 1998; 80(1): 35-47)

Roe T.Y., Reynolds T.C., Yu G., Brown P.O.: „Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis.“ (**EMBO J.** 1993 12(5): 2099-108)

Ryncarz R.E., Anasette C.: „Expression of CD86 on human marrow CD34+ cells identifies immunocompetent committed precursors of macrophages and dendritic cells.“ (**Blood** 1998; 91(10): 3892-900)

## S

---

Schambach A., Wodrich H., Hildinger M., Bohne J., Krausslich H.G., Baum C.: „Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors.“ (**Mol. Ther.** 2000; 2(5): 435-45)

Schnell T., Foley P., Wirth M., Münch J., Überla K.: „Development of a self-inactivating, minimal lentivirus vector based on simian immunodeficiency virus.“ (**Hum. Gene Ther.** 2000; 11(3): 439-47)

Schrager J.A., Marsh J.W.: „HIV-1 Nef increases T cell activation in a stimulus-dependent manner.“ (**Proc. Natl. Acad. Sci.** 1999; 96(14): 8167-72)

Schwartz O., Marechal V., Le Gall S., Lemonnier F., Heard J.M.: „Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein.“ (**Nat. Med.** 1996; 2(3): 338-42)

Schwiebert R., Fultz P.N.: „Immune activation and viral burden in acute disease induced by simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14: correlation between in vitro and in vivo events.“ (**J. Virol.** 1994; 68(9): 5538-47)

Selig L., Pages J.C., Tanchou V., Preveral S., Berlioz-Torrent C., Liu L.X., Erdtmann, L., Darlix J., Benarous R., Benichou S.: „Interaction with the p6 domain of the gag precursor mediates incorporation into virions of Vpr and Vpx proteins from primate lentiviruses.“ (**J. Virol.** **1999**; 73(1): 592-600)

Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H.: „Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein.“ (**Nature** **2002**; 418(6898): 646-50)  
Sherman M.P., Schubert U., Williams S.A., de Noronha C.M., Kreisberg J.F., Henklein P., Greene W.C.: „HIV-1 Vpr displays natural protein-transducing properties: implications for viral pathogenesis.“ (**Virology** **2002**; 302(1): 95-105)

Simmons A., Aluvihare V., McMichael A.: „Nef triggers a transcriptional program in T cells imitating single-signal T cell activation and inducing HIV virulence mediators.“ (**Immunity** **2001**; 14(6): 763-77)

Simms P.E., Ellis T.M.: „Utility of flow cytometric detection of CD69 expression as a rapid method for determining poly- and oligoclonal lymphocyte activation.“ (**Clin. Diagn. Lab. Immunol.** **1996**; 3(3): 301-4)

Soneoka Y., Cannon P.M., Ramsdale E.E., Griffiths J.C., Romano G., Kingsman S.M., Kingsman A.J.: „A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors.“ (**Nucl. Acids Res.** **1995**; 23(4): 628-33)

Specht J.M., Wang G., Do M.T., Lam J.S., Royal R.E., Reeves M.E., Rosenberg S.A., Hwu P.J.: „Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases.“ (**J. Exp. Med.** **1997**; 186(8): 1213-21)

Spina C.A., Kwoh T.J., Chowder M.Y., Guatelli J.C., Richman D.D.: „The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes.“ (**J. Exp. Med.** **1994**; 179(1): 115-23)

Steidl S., Stitz J., Schmitt S., König R., Flory E., Schweizer M., Cichutek K.: „Coreceptor Switch of [MLV(SIVagm)] pseudotype vectors by V3-loop exchange.“ (**Virology** **2002**; 300(2): 205-16)

Stitz J., Mühlebach M.D., Blömer U., Scherr M., Selbert M., Wehner P., Steidl S., Schmitt I., König R., Schweizer M., Cichutek K.: „A novel lentivirus vector derived from apathogenic simian immunodeficiency virus.“ (***Virology* 2001**; 291(2): 191-7)

Strappe P.M., Hampton D.W., Brown D., Gonzales B.C., Caldwell M., Fawcett J.W., Lever A.M.: „Identification of unique reciprocal and non reciprocal cross packaging relationships between HIV-1, HIV-2 and SIV reveals an efficient SIV/HIV-2 lentiviral vector system with highly favourable features for in vivo testing and clinical usage. (***Retrovirology* 2005**; 2(1): 55 Epub ahead of print)

Strebel K., Daugherty D., Clouse K., Cohen D., Folks T., Martin M.A.: „The HIV 'A' (sor) gene product is essential for virus infectivity.“ (***Nature* 1987**; 328(6132): 728-30)

Swigut T., Shohdy N., Skowronski J.: „Mechanism for down-regulation of CD28 by Nef.“ (***EMBO J.* 2001**; 20(7):1593-604)

## T

---

Testi R., D'Ambrosio D., DeMaria R., Santoni A.: „The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells.“ (***Immunol. Today* 1994**; 15(10): 479-83)

Toba K., Winton E. F., Koike T., Shibata A.: „Simultaneous three-color analysis of the surface phenotype and DNA-RNA quantitation using 7-amino-actinomycin D and pyronin Y.“ (***J. Immunol. Methods* 1995**; 182(2): 193-207)

Tsujimoto H., Hasegawa A., Maki N., Fukasawa M., Miura T., Speidel S., Cooper R.W., Moriyama E.N., Gojobori T., Hayami M.: „Sequence of a novel simian immunodeficiency virus from a wild-caught African mandrill.“ (***Nature* 1989**; 341(6242): 539-41)

## U

---

Unutmaz D., KewalRamani V.N., Marmon S., Littman D.R.: „Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes.“ (***J. Exp. Med.* 1999**; 189(11): 1735-46)

**V**

---

van Furth R., Hirsch J.G., Fedorko M.E.: „Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes, and macrophages.“ (*J. Exp. Med.* **1970**; 32(4): 794-812)

**W**

---

Wain-Hobson S., Sonigo P., Danos O., Cole S., Alizon M.: „Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV.“ (*Cell* **1985**; 40(1): 9-17)

Wang G., Bunnell B.A., Painter R.G., Quiniones B.C., Tom S., Lanson Jr. N.A., Spees J.L., Bertucci D., Peister A., Weiss D.J., Valentine V.G., Prockop D.J., Kolls J.K.: „Adult stem cells from bone marrow stroma differentiate into airway epithelial cells: Potential therapy for cystic fibrosis.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**; 102(1): 186-91)

Weiss D.J.: „Delivery of gene transfer vectors to lung: obstacles and the role of adjunct techniques for airway administration.“ (*Mol. Ther.* **2002**; 6(2): 148-52)

Welker R., Kottler H., Kalbitzer H.R., Kräusslich H.G.: „ Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein is incorporated into virus particles and specifically cleaved by the viral protease.“ (*Virology* **1996**; 219(1): 228-36)

White S.M., Renda M., Nam N.Y., Klimatcheva E., Zhu Y., Fisk J., Halterman M., Rimel B.J., Federoff H., Pandya S., Rosenblatt J.D., Planelles V.: „Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements.“ (*J. Virol.* **1999**; 73(4): 2832-40)

Wolfrum N.: „Eigenschaften von SIVsmmPBj abgeleiteten lentiviralen Vektoren.“ (**2002**, Diplomarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Abteilung für Medizinische Biotechnologie)

Wu X., Conway J.A., Kim J., Kappes J.C.: „Localization of the Vpx packaging signal within the C terminus of the human immunodeficiency virus type 2 Gag precursor protein.“ (*J. Virol.* **1994**; 68(10): 6161-9)

**Y**

---

Yang Y., Wilson J.M.: „Clearance of adenovirus-infected hepatocytes by MHC class I-restricted CD4+ CTLs in vivo.“ (*J. Immunol.* **1995**; 155(5): 2567-70)

Yu S.F., von Ruden T., Kantoff P.W., Garber C., Seiberg M., Ruther U., Anderson W.F., Wagner E.F., Gilboa E.: „Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells.“ (*Proc. Natl. Acad. Sci.* **1986**; 83(10): 3194-8)

Yuan X., Matsuda Z., Matsuda M., Essex M., Lee T.H.: „Human immunodeficiency virus vpr gene encodes a virion-associated protein.“ (*AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1990**; 6(11): 1265-71)

**Z**

---

Zhang H., Yang B., Pomerantz R.J., Zhang C., Arunachalan S.C., Gao L.: „The cytidine deaminase CEM15 induces hypermutation in newly synthesized HIV-1 DNA.“ (*Nature* **2003**; 424(6944): 94-8)

Zufferey R., Donello J.E., Trono D., Hope T.J.: „Woodchuck Hepatitis Virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors.“ (*J. Virol.* **1999**; 73(4): 2886-92)

Zufferey R., Nagy D., Mandel R.J., Naldini L., Trono D.: „Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.“ (*Nat. Biotechnol.* **1997**; 15(9): 871-5)

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Lfd. Nr.	Abb. Nr.	Titel	Seite
1	1.1	Reifung mononukleärer Phagozyten	4
2	1.2	Lentiviren	6
3	1.3	Dreiplasmid-Vektorsystem zur Generierung von lentiviralen Vektoren	12
4	2.1	Schematische Darstellung des PCR-Blocks	26
5	2.2	Schematische Darstellung einer Fusions-PCR	27
6	3.1	Expression der Aktivierungsmarker auf CD4 <sup>+</sup> Zellen mit und ohne Stimulation	58
7	3.2	Transduktion unstimulierter und stimulierter CD4 <sup>+</sup> T-Zellen mit HIV-1- und SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteten Vektoren	58
8	3.3	Oberflächenexpression der Monozyten-Marker CD14 und CD86	59
9	3.4	Morphologie von kultivierten Monozyten und Makrophagen	60
10	3.5	Schematische Darstellung einer FACS-Messung zur Analyse des DNA/RNA-Gehalts von Zellen	61
11	3.6	Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen	62
12	3.7	Zellzyklusanalyse von Monozyten bzw. Makrophagen nach Transduktion	63
13	3.8	Differenzierung von transduzierten Monozyten zu Dendritischen Zellen	64
14	3.9	Mutationen zur funktionalen Deletion der akzessorischen Gene	66
15	3.10	Schematische Darstellung der Klonierung von pPBj vif <sup>-</sup> /x <sup>-</sup> /r <sup>-</sup>	67
16	3.11	Schematische Darstellung der Klonierung von pPBj 4x ko	68
17	3.12	Ausgeschaltete Expression der akzessorischen Proteine der <i>Knockout</i> Mutante	68
18	3.13	DNA-Gehalt unterschiedlich arretierter Zellen	70
19	3.14	Transduzierte Ghost und Alpha-1 Zellen	72
20	3.15	Transduktion von Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen	73
21	3.16	Transduktion von Monozyten durch eine SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteten Vektor mit (PBj EGFP) und ohne (4x ko) akzessorische Proteine	74
22	3.17	Schematische Darstellung der Vpx Expressionsplasmide	75
23	3.18	Verpackung von Vpx in den von SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteten 4x ko Vektor	77
24	3.19	Transduktion primärer humaner Monozyten mit Vpx-supplementierten PBj 4x ko Vektoren	78
25	3.20	Transduktionseffizienz der verschiedenen Vpx-supplementierten PBj 4x ko Vektoren auf primären humanen Monozyten	78
26	3.21	Verpackung von SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx in HIV-1 Partikel	79
27	3.22	Vergleich der Aminosäuresequenz der p6 Domäne verschiedener Lentiviren	80

28	3.23	Schematische Darstellung der HIV-1-abgeleiteten Vektoren mit modifizierter p6 Domäne	81
29	3.24	Analyse der Verpackung von SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx in HIV-1 Partikel	81
30	3.25	Schematisch Darstellung des HIV-1 Vpr/SIV <sub>smm</sub> PBj Vpx Fusionsprotein-Expresionskonstrukts	82
31	3.26	Verpackung des Fusionsproteins VprPrVpxHA in HIV-1 Partikel	83
32	3.27	Transduktionseffizienz der verschiedenen Vpx-suplementierten HIV-1 Vektoren auf primären humanen Monozyten	84
33	3.28	Schematische Darstellung der Klonierung zur Deletion des <i>gag</i> Start-ATG	86
34	3.29	Schematische Darstellung der Klonierung des Transfervektors pPBj trans	88
35	3.30	Schematische Darstellung der Klonierung des Verpackungskonstrukts pPBj pago	90
36	3.31	Schematische Darstellung der Klonierung von pCMV pago	91
37	3.32	Deletion des Bereichs zwischen Spleißdonor und <i>gag</i> zur Generierung von pPBj pack	92
38	3.33	Titer verschiedener Vektoren auf unterschiedlichen Zelllinien	94
39	3.34	Titer auf unterschiedlichen Zelllinien, die durch kreuzverpackte HIV-1/PBj bzw. PBj/HIV-1 Vektoren erzielt wurden	95
40	3.35	Schematische Darstellung der modifizierten 5'-Enden der Konstrukte Psi1-11	96
41	3.36	Titer der durch die Verschiedenen PBj Verpackungskonstrukte generierten Vektoren auf HT1080 Zellen	97
42	3.37	Schematische Darstellung des Versuchs zum Nachweis der Übertragung verschiedener Vektorkomponenten	97
43	3.38	Nachweis spezifischer Transfer- und Verpackungskonstruktsequenzen	98
44	3.39	Schematische Darstellung des Versuchs zum Nachweis von replikationskompetenten Retroviren	99
45	3.40	Nachweis von replikationskompetenten Retroviren	100
46	3.41	Vergleich verschiedener moi zur Transduktion von Monozyten mit dem neuen SIV <sub>smm</sub> PBj Dreiplasmid-Vektorsystem	101
47	3.42	Transduktion von Monozyten an verschiedenen Tagen nach Isolierung	102
48	4.1	Sekundärstrukturanalysen von HIV-1 und HIV-2	112
49	4.2	Sequenzvergleich der putativen Verpackungssequenz von HIV-2 und SIV <sub>smm</sub> PBj	112

**6.3 Tabellenverzeichnis**

<b>Lfd. Nr.</b>	<b>Tab. Nr.</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	1.1	Vektoren in klinischen Gentherapiestudien weltweit	2
2	1.2	Anwendungsgebiete für Gentransfervektoren	3
3	3.1	Prozentualer Anteil der Zellen in den jeweiligen Zellzyklusphasen	70
4	3.2	Plasmid-Mengenverhältnisse für die Transfektion zur Generierung der angegebenen Vektoren	71
5	3.3	Titration der Verpackungskonstrukte	93

## 6.4 Abkürzungsverzeichnis

### 6.4.1 Einheiten

#### Gewicht

g	Gramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ng	Nanogramm
pg	Pikogramm

#### Konzentrationen

v/v	volume per volume
w/v	weight per volume
mM	Millimolar
pmol	Pikomol

#### Temperatur

°C	Grad Celsius
----	--------------

#### Volumen

ml	Mililiter
µl	Mikroliter
l	Liter

#### Zeit

h	Stunde
min	Minute
sek	Sekunde

#### Sonstige

V	Volt
g	Erdbeschleunigung
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
bp	Basenpaare

### 6.4.2 Weitere verwendete Abkürzungen

7-AAD	7-Actinoaminomycin
Abb.	Abbildung
agm	african green monkey, Grüne Meerkatze
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bgh	Bovines Wachstumshormon
BSA	Bovines Serumalbumin
c	Konzentration
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Calf Intestinal Posphatase, Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	zentraler Polypurintrakt
cpz	chimpanzee, Schimpanse
C-terminal	Carboxy-terminal
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt

DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (-acid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
E	Extinktion
<i>E.coli</i>	<i>Echericha coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
egfp/EGFP	enhanced green fluorescence protein
env	envelope, virales Hüllprotein
ERK	extracellular signal-regulated protein kinase
et al.	und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	5'-Fluoroisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
gag	group specific antigen, virales Strukturgen
HBV	Hepatitis B Virus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	horse radish peroxidase
i.E.	infektiöse Einheiten
IL	Interleukin
IPA	Immun-Peroxidase-Assay
lacZ	$\beta$ -Galaktosidase Gen
LB	Luria-Bertani
LTR	long terminal repeat
luc	Luziferase Gen
mac	macaque, Makake
MACS	magnetic activated cell sorting
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MDM	monocyte derived macrophages, von Monozyten abgeleitete Makrophagen
MHC	major histocompatibility complex
MLV	Murines Leukämie Virus
Mnd	mandrill, Drills
m/o	mit/ohne
moi	multiplicity of infection
MOPS	3-(N-Morpholio)-propansulfonsäure
MPMV	Mason Pfizer Affen Monkey Virus
mRNA	messenger RNA
nef	negative factor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B, Transkriptionsfaktor
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierung
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PBS	Primer Bindungsstelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin

PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidiumiodid
PIC	Präintegrationskomplex
pol	polymerase Gen, kodiert für virale Enzyme
PPT	Poypurintrakt
Psi $\Psi$	Verpackungssignal
PTD	Protein Transduktions Domäne
RCR	replikationkompetente Reteroviren
RNA	Ribonukleinsäure (-acid)
RRE	Rev responsives Element
RSV	Rous Sarkom Virus
RT	Reverse Transkriptase
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Spleißdonor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN	selbst inaktivierend
SIV	Simianes Immundefizienz Virus
smm	sooty mangabey monkey, Halsband Mangabe
syk	sykes, Diademmeerkatze
Tab.	Tabelle
TLB	Triton-Lysis-Puffer
U	Unit
UNG2	Uracil DNA Glykosylase 2
upm	umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
Vif	viral infectivity factor
Vpr	viral protein rapid
Vpx	viral protein X
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WPRE	woodchuck posttranscriptional regulatory element
wt	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 6.5 Anglizismenverzeichnis

assay	Untersuchung
buffy coat	Blutkonserve
insert	zu inserierendes DNA Fragment
kit	„Baukasten“
moi	multiplicity of infection, Anzahl Partikel pro Zelle
primer	Oligonukleotid für die PCR
tag	Markierung
template	Matrize, Vorlage

## 7. Danksagung

Herrn Professor Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Universität Frankfurt, die er freundlicherweise, trotz großer Inanspruchnahme übernommen hat.

Herrn Professor Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des Themas, und die regelmäßigen wissenschaftlichen Besprechungen, bei denen man lernte den Blick für das Wesentliche zu schärfen.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Johannes Löwer für die Bereitstellung des erstklassigen Arbeitsplatzes in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ am Paul-Ehrlich-Institut bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Matthias Schweizer bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit, vor allem für die gewissenhafte Durchsicht dieses Manuskripts und für seine Förderung der eigenständigen Planung und Durchführung von Experimenten.

Herrn Dr. Egbert Flory danke ich für seine „Nobelpreis-verdächtigen“ Ideen, mit denen er stets für große Motivation sorgte.

Allen Mitgliedern der Abteilung Medizinische Biotechnologie danke ich für das großartige Arbeitsklima. Allen voran Dr. Silke Schüle, für ihre geleistete emotionale Unterstützung, Dr. Christoph Merten, der stets für gute Unterhaltung sorgte, Dr. Ralf Sanzenbacher, der mir bei der Anwendung einiger Methoden hilfreiche Tips gab, Tanja Kearns für die „Maxis“, Dr. Irene Hartl, Dr. Daphne Nikle und Melanie Krämer, die sowohl wissenschaftlich als auch privat eine große Bereicherung waren und Matthias Hamdorf für die Unterstützung bei allen Computer-Angelegenheiten. Natürlich auch allen anderen: Gundi Braun, PD Dr. Christian Buchholz, Dr. Sabine Fengler, Andreas Jungmann, Julia Kaiser, Björn Philipp Kloke (der hoffentlich die „PBJ Vektor-Story“ zu einem erfolgreich Ende bringen wird), Dr. Heide Muckenfuß, Dr. Michael D. Mühlebach, Mario Perkovic, Thomas Preuß, Sylvia Raupp, Dr. Richard Schneider, Martin Selbert, Dr. Ulrich Tschulena und Renate Wenig.

Danken möchte ich auch meinen Freunden Tina Heitmann, Julia Kiolbassa, Sylvia Adam, Nina Kramer, Saskia Randt, Rainer Gehrke und Christian Cordes, die stets für den Ausgleich zur täglichen Forschung gesorgt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jörn Stitz, der mir in allen Lebenslagen zur Seite stand und mir durch die vielen Diskussionen wissenschaftlicher Fragestellungen eine große Hilfe bei dieser Arbeit war.

Und natürlich ein riesiges Dankeschön an meine Eltern Rosy und Michael Wolfrum, meinen Bruder Philipp, meinen Cousin Andreas Zäh und den Rest der Familie. Sie haben mich stets unterstützt und mir das nötige Selbstvertrauen und den Mut gegeben, um diese Aufgabe zu bewältigen.

## Curriculum vitae

Vorname	Nina
Name	Wolfrum
Geburtstag	20. Juli 1978
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Ausbildung

Schule	1984 – 1997	
	Abschluss	Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,5
Studium	1997 – 2002	Biochemie an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt am Main
		<u>Studienschwerpunkte:</u> Biochemie, Biophysikalische Chemie, Zellbiologie
Diplom	08/01 – 09/01	Diplomhauptprüfung
Diplomarbeit	10/01 – 05/02	<u>Thema:</u> „Eigenschaften von SIV <sub>smm</sub> PBj-abgeleiteten lentiviralen Vektoren“ durchgeführt am Paul-Ehrlich-Institut in Langen, in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek in der Arbeitsgruppe von Matthias Schweizer
	Abschluss	Diplom, Gesamtnote: „sehr gut“
Promotion	seit 06/02	<u>Thema:</u> „Untersuchung der besonderen Transduktionseigenschaften von SIV <sub>smm</sub> PBj Vektoren und Etablierung eines davon abgeleiteten Dreiplasmid-Vektorsystems“ durchgeführt am Paul-Ehrlich-Institut in Langen, in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek in der Arbeitsgruppe von Matthias Schweizer.

## Bibliographie

### Publikationen

M.D. Mühlebach\*, **N. Wolfrum\***, S. Schüle, U. Tschulena, R. Sanzenbacher, E. Flory, K. Cichutek and M. Schweizer. „Stable transduction of primary human monocytes by simian lentiviral vector PBj“. *Molecular Therapy*, im Druck

\*zu gleichen Teilen beigetragen

J. Stitz\*, **N. Wolfrum\***, C.J. Buchholz, K. Cichutek. „ The spleen necrosis virus envelope proteins form infectious HIV-1 pseudotype vector particles but fail to incorporate upon substitution of the cytoplasmic domain with that of gibbon ape leukemia virus“. *Journal of General Virology*, im Druck

\* zu gleichen Teilen beigetragen

**N. Wolfrum**, M.D. Mühlebach, J. Kaiser, S. Schüle, M. Schweizer and K. Cichutek. “Influence of the viral accessory proteins of SIV<sub>smm</sub>PBj vectors on the transduction of quiescent cells”

### In Vorbereitung

**N. Wolfrum**, S. Schüle, J. Stitz, M.D. Mühlebach, M. Schweizer and K. Cichutek. “Development of a new vector derived from SIV<sub>smm</sub>PBj1.9 for efficient transduction of primary human monocytes”

### In Vorbereitung

### Mündliche Präsentationen

**N. Wolfrum**, M. Mühlebach, M. Schweizer and K. Cichutek. “The viral vif, vpx, vpr and nef genes are dispensable for G<sub>0</sub>-arrested cell transduction achievable by SIV<sub>smm</sub>PBj-derived vectors”. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 2003

**N. Wolfrum**, M. Mühlebach, M. Schweizer and K. Cichutek. „Development of SIV<sub>smm</sub>PBj-derived vectors: Role of the viral vif, vpx, vpr and nef genes for transduction of G<sub>0</sub>-arrested cells“. Workshop of the Study Group in the Society for Virology on Viral Vectors, Schloss Zeilitzheim, 2003

## Poster

**N. Wolfrum**, M. Mühlebach, M. Schweizer and K. Cichutek. „The viral vif, vpx, vpr and nef genes are dispensable for G<sub>0</sub>-arrested cell transduction achievable by SIV<sub>smm</sub>PBj-derived vectors”.

Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Edinburgh, UK, 2003

**N. Wolfrum**, M. Mühlebach, J. Kaiser, M. Schweizer and K. Cichutek. „Transduction of primary human monocytes with an SIV<sub>smm</sub>PBj-derived lentiviral vector”. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 2004

**N. Wolfrum**, M. Mühlebach, J. Kaiser, S. Schüle, M. Schweizer and K. Cichutek. „Transduction of quiescent human cells with an SIV<sub>smm</sub>PBj-derived vector and the influence of the accessory genes vif, vpr, vpx and nef”.

Annual Congress of the European Society of Gene Therapy, Tampere, FIN, 2004

**N. Wolfrum**, J. Kaiser, S. Schüle, M.D. Mühlebach, M. Schweizer, K. Cichutek. „Primary monocytes resistance against lentiviral infection is overcome by viral accessory protein Vpx”  
The British Society for Cell Biology Autumn Meeting, Edinburgh, UK, 2005

## Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass die Vorgelegte Dissertation „Untersuchung der besonderen Transduktionseigenschaften von SIV<sub>smm</sub>PBj Vektoren und Etablierung eines davon abgeleiteten Dreiplasmid-Vektorsystems ” selbständig angefertigt wurde und ich mich keiner anderen Hilfsmittel als den angegebenen bedient habe, insbesondere, dass Entlehnungen aus anderen Schriften, soweit sie nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Quelle bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Langen, den 12.Oktober 2005

.....

Nina Wolfrum

