

**Lentivirale Vektoren
für den stabilen Gentransfer
in primäre humane mononukleäre Blutzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von Michael D. Mühlebach
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main 2004

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

Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Disputation: 13. Mai 2004

Das ganze Leben

ist ein Experiment.

(Oliver Wendell Holmes jun.)

Inhaltsübersicht

Einleitung	1
Retroviren	1
Gentransfer in eukaryotische Zellen durch retrovirale Vektoren	9
Ziele der vorliegenden Arbeit	16
Materialien und Methoden	17
Chemikalien	17
Lösungen und Kulturmedien	18
Antibiotika	21
Bakterienstämme und Zellen	21
Plasmide und Oligonukleotide	22
Mikro- und Zellbiologische Methoden	26
Molekularbiologische Methoden	35
Analytische Methoden	42
Ergebnisse	48
Transduktion humaner peripherer mononukleärer Blutzellen durch lentivirale und gamma-retrovirale Vektoren	48
Transduktion von ruhenden humanen Zellen mit Hilfe eines neuen, von SIVsmmPBj abgeleiteten lentiviralen Vektors	59
Untersuchungen zur Aufklärung der besonderen Transduktionseigenschaften SIVsmmPBj-abgeleiteter Vektorsysteme	78
Ein erstes auf SIVsmmPBj1.9 basierendes 3-Plasmid-Vektorsystem	87
Diskussion	92
Gentransfer in humane periphere mononukleäre Blutzellen durch retrovirale Vektoren	92
Gentransfer in ruhende humane Zellen	96
Einfluss des Nef-Proteins und der LTR-Aktivität auf die Gentransfereffizienz	101
Entwicklung lentiviraler 3-Plasmid Vektorsysteme	104
Ausblick	105
Zusammenfassung	106
Literatur	108
Abkürzungsverzeichnis	121

Inhaltsverzeichnis	I-V
1 Einleitung	1
1.1 Retroviren	1
1.1.1 Gamma-Retroviren	4
1.1.2 Lentiviren	4
1.1.2.1 Das simiane Immundefizienzvirus SIVsmmPBj1.9	6
1.2 Gentransfer in eukaryotische Zellen durch retrovirale Vektoren	9
1.2.1 Retrovirale Gentransfer-Systeme	10
1.2.2 Retroviraler Gentransfer in eukaryotische Zellen	12
1.2.2.1 Gentransfer in mitotische Zellen	12
1.2.2.2 Gentransfer in nicht-mitotische Zellen	13
1.2.2.3 Gentransfer in unstimulierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	14
1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit	16
2 Materialien und Methoden	17
2.1 Chemikalien	17
2.2 Lösungen und Kulturmedien	18
2.2.1 Lösungen	18
2.2.2 Kulturmedien	20
2.3 Antibiotika	21
2.4 Bakterienstämme und Zellen	21
2.4.1 Bakterienstämme	21
2.4.2 Eukariotische Zellen	22
2.5 Plasmide und Oligonukleotide	22
2.5.1 Plasmide	22
2.5.2 Oligonukleotide	25
2.6 Mikro- und Zellbiologische Methoden	26
2.6.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien	26
2.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien	27
2.6.3 Transformation von Bakterien	27
2.6.4 Kultivierung und Lagerung von eukaryotischen Zelllinien	28
2.6.5 Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	29
2.6.5.1 Isolierung von Monozyten durch Magnetische Zell-Separierung (MACS)	29

2.6.6	Stimulierung von peripheren Blut-Lymphozyten (PBL)	30
2.6.7	Kultivierung von PBMC	30
2.6.7.1	Kultivierung unstimulierter PBL/PBMC	30
2.6.7.2	Kultivierung stimulierter PBL	31
2.6.7.3	Kultivierung von Monozyten	31
2.6.8	Transfektion von eukaryotischen Zellen	31
2.6.8.1	Transfektion mit Lipofektamin Plus	31
2.6.8.2	Transfektion mit dem Nukleofector	32
2.6.9	Präparation von retroviralen Vektoren	32
2.6.10	Konzentration und Aufreinigung von retroviralen Vektoren durch Ultrazentrifugation	33
2.6.11	Titration von retroviralen Vektoren	33
2.6.12	Transduktion von PBMC/PBL	33
2.6.12.1	Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten	34
2.6.12.2	Transduktion primärer Lymphozyten	34
2.6.12.3	Herstellung Antikörper-beschichteter Zellkulturplatten und Stimulation primärer Lymphozyten	35
2.7	Molekularbiologische Methoden	35
2.7.1	Restriktion von DNA	35
2.7.2	Polymerase Ketten-Reaktion (PCR)	35
2.7.2.1	Fusions-PCR	36
2.7.3	Gerichtete Punkt-Mutagenese	37
2.7.4	Auftrennung und Analyse von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese	37
2.7.5	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	38
2.7.5.1	QIAEX II-Agarose Gel Extraction Kit	38
2.7.5.2	Phenol-Aufreinigung	38
2.7.5.3	Ethanol-Fällung	39
2.7.6	Dephosphorylierung von DNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	39
2.7.7	Auffüllen überstehender Enden von DNA mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I ("Klenow-Fill-In")	39
2.7.8	Ligation	40
2.7.9	Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA ("Mini-Präp")	40
2.7.10	Isolierung großer Mengen von Plasmid-DNA ("Maxi-Präp")	40
2.7.11	Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen	41
2.8	Analytische Methoden	42
2.8.1	Southern Blot Hybridisierung	42
2.8.1.1	Vorbehandlung des Agarose-Gels	42

2.8.1.2	Blotten der DNA auf Nylon-Membran	43
2.8.1.3	Markieren der Probe mit α - ³² PdCTP	43
2.8.1.4	Hybridisierung und Autoradiographie des Blots	43
2.8.2	Luziferase-Assay	44
2.8.3	Proteinbestimmung	44
2.8.4	<i>In-situ</i> Immun-Peroxidase-Assay (IPA)	44
2.8.5	β -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal Färbung)	45
2.8.6	Fluoreszenz des "enhanced green fluorescent protein" (EGFP)	46
2.8.7	"Fluorescence Activated Cell Sorting"(FACS)	46
2.8.7.1	FACS-Analyse des zellulären DNA-Gehalts durch Propidium-Iodid (PI) Färbung	46
2.8.7.2	Nachweis von EGFP durch FACS	47
2.8.7.3	Nachweis von Oberflächen-Markerproteinen auf PBMC durch FACS	47

3 Ergebnisse **48**

3.1	Transduktion humaner peripherer mononukleärer Blutzellen durch lentivirale und gamma-retrovirale Vektoren	48
3.1.1	Bildung von HIV-1-abgeleiteten Vektoren mit unterschiedlichen Hüllproteinen	48
3.1.2	Zeitabhängigkeit der Vektorproduktion in transienten Verpackungszellen	49
3.1.3	Bildung von [MLV(VSV)] Pseudotyp-Vektoren	50
3.1.4	Transduktionseffizienz der Vektoren auf caninen D17 und humanen HT1080 Zellen	51
3.1.5	Transduktion von humanen T-Lymphozyten	52
3.1.5.1	Transduktion von stimulierten humanen T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Vektoren	53
3.1.5.2	Transduktion von stimulierten humanen T-Lymphozyten mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren	54
3.1.5.3	Transduktion von unstimulierten humanen T-Lymphozyten mit MLV- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren	56
3.1.6	Die Halbwertszeit HIV-1-abgeleiteter Vektoren	57
3.2	Transduktion von ruhenden humanen Zellen mit Hilfe eines neuen, von SIVsmmPBj abgeleiteten lentiviralen Vektors	59
3.2.1	Einfluß des Hüllproteins auf die Transduktion ruhender Ghost CXCR4 Zellen durch HIV-1-, SIVsmmPBj- und MLV-abgeleitete Vektoren	59
3.2.2	Arretierung von diploiden humanen Fibroblasten	61
3.2.3	Transduktion proliferierender, G1/S-arretierter und ruhender Fibroblasten mit HIV-1-, SIVsmmPBj- und MLV-abgeleiteten Vektoren	62

3.2.4	Konstruktion von Markergen-übertragenden SIVsmmPBj- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren	64
3.2.5	Funktionsfähigkeit der Markergen-übertragenden Vektoren	68
3.2.6	Transduktion proliferierender, G ₁ /S-arretierter und ruhender Fibroblasten mit <i>egfp</i> -übertragenden Vektoren	69
3.2.7	Ausschluß von Pseudotransduktion	70
3.2.8	Integration proviraler DNA in transduzierten Zielzellen	71
3.2.8.1	Nachweis der Integration durch Southern Blot Hybridisierung	72
3.2.9	Transduktion von primären humanen Monozyten	74
3.2.9.1	Nachweis der Integration in primären humanen Monozyten	77
3.3	Untersuchungen zur Aufklärung der besonderen Transduktionseigenschaften SIVsmmPBj-abgeleiteter Vektorsysteme	78
3.3.1	Einfluß des Nef-Proteins von SIVsmmPBj auf die Transduktionseffizienz	78
3.3.1.1	Herstellung einer <i>nef</i> ⁻ -Mutante von SIVsmmPBj	78
3.3.1.2	Funktionsfähigkeit von <i>nef</i> ⁻ -SIVsmmPBj-Vektorpartikeln	80
3.3.1.3	Transduktion proliferierender, G ₁ /S-arretierter und ruhender Zielzellen mit <i>nef</i> ⁻ -SIVsmmPBj-Vektoren	80
3.3.1.3.1	Transduktion von Ghost CXCR4 Zellen	81
3.3.1.3.2	Transduktion von humanen diploiden Fibroblasten Alpha-1	82
3.3.1.4	Transduktion von Monozyten mit <i>nef</i> ⁻ -SIVsmmPBj-Vektoren	82
3.3.2	Die LTR-Promotoraktivität verschiedener Lentiviren in humanen PBMC	83
3.3.2.1	Herstellung von Luziferase-Reporterkonstrukten	84
3.3.2.2	Promotoraktivität der lentiviralen LTRs nach Transfektion humaner PBMC	84
3.3.2.2.1	Promotoraktivität in stimulierten humanen T-Lymphozyten	85
3.3.2.2.2	Promotoraktivität in unstimulierten humanen PBMC	86
3.4	Ein erstes auf SIVsmmPBj1.9 basierendes 3-Plasmid-Vektor-System	87
3.4.1	Herstellung eines SIVsmmPBj1.9-abgeleiteten Verpackungskonstruktes	87
3.4.2	Herstellung eines <i>gag/pol</i> , <i>egfp</i> -übertragenden Transfervektors	88
3.4.3	Funktionsfähigkeit des Vektorsystems	90
4	Diskussion	92
4.1	Gentransfer in humane periphere mononukleäre Blutzellen durch retrovirale Vektoren	92
4.1.1	Herstellung und Titration der HIV-Pseudotypvektoren	93
4.1.2	Transduktion humaner T Lymphozyten	94

4.2 Gentransfer in ruhende humane Zellen	96
4.2.1 Transduktion ruhender GHOST-Zellen mit HIV-1-Env pseudotypisierten Vektoren	96
4.2.2 Konstruktion von SIVsmmPBj-abgeleiteten, Markergen-übertragender Vektorsysteme	96
4.2.3 Transduktion ruhender Alpha-1 Fibroblasten	98
4.2.4 Transduktion primärer humaner Monozyten	98
4.2.5 Nachweis der echten retroviralen Transduktion durch PBj-Vektoren	100
4.3 Einfluss des Nef-Proteins und der LTR-Aktivität auf die Gentransfereffizienz	101
4.3.1 Einfluss des Nef-Proteins von SIVsmmPBj auf die Effizienz des Gentransfers in ruhende Zellen	102
4.3.2 Charakterisierung der LTR-Aktivitäten von SIVsmmPBj, SIVagm und HIV-1	103
4.4 Entwicklung lentiviraler 3-Plasmid Vektorsysteme	104
4.5 Ausblick	105
<u>5 Zusammenfassung</u>	<u>106</u>
<u>6 Literatur</u>	<u>108</u>
<u>7 Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>121</u>

1 Einleitung

Ein möglicher Weg zur Therapie angeborener Erbkrankheiten oder auch erworbener Infektionskrankheiten besteht in der gezielten genetischen Veränderung betroffener Zellen durch Gentransfer. Um dadurch eine therapeutische Wirkung erreichen zu können, muss einerseits der Transfer in die entsprechenden Zielzellen hocheffizient durchgeführt werden können, andererseits sollte das transferierte Gen in den therapierten Zellen langfristig und mit gleichbleibender Stärke exprimiert werden. Viren leisten während ihrer Replikation einen ständigen Gentransfer: Den Transfer ihres Genoms in neue Wirtszellen. Ein gezielter Umbau von Viren verschiedener Virusgruppen führte dazu, dass uns heute eine ganze Reihe viraler „Vektoren“ zur Durchführung eines effizienten Gentransfers zur Verfügung steht. Aus der Familie der Retroviren abgeleitete Vektoren besitzen den Vorteil einer stabilen Integration der transferierten Erbinformation in das Genom der Zielzellen bei einer Transferkapazität von ca. 7 kb. Steht das transferierte Gen dann unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, so ist die Stabilität der Expression des transferierten Gens in therapierten Zellen und deren Tochterzellen gegeben. Allerdings sind bis heute noch nicht alle Zielzellen, die für eine Gentherapie interessant sind, einem effizienten Gentransfer durch vorhandene retro- oder lentivirale Vektoren zugänglich. Die vorliegende Dissertation befasst sich daher mit der Untersuchung und Weiterentwicklung des Gentransfers in eukaryotische Zellen durch retrovirale und lentivirale Vektoren. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Untersuchung des Gentransfers in unstimulierte primäre hämatopoetische Zellen humanen Ursprungs. Die Grundlagen dieser Untersuchung sollen im Folgenden erläutert werden.

1.1 *Retroviren*

Retroviren (Familie: *Retroviridae*) sind umhüllte RNA-Viren mit kugelförmiger Form und einem Durchmesser zwischen 80 und 100 nm. Diese Viruspartikel enthalten ein durch virale Proteine aufgebautes Kapsid mit kubischer Symmetrie, in dem das virale RNA-Genom in zwei Kopien verpackt ist. Charakteristisch und namensgebend für Retroviren ist ihre Fähigkeit, das RNA-Genom während der Replikation in DNA umzuschreiben. Dieser Vorgang wird als reverse Transkription bezeichnet und ist die Umkehrung des „normalen“ Informationsflusses der Biologie. Normalerweise wird in der DNA-Sequenz gespeicherte Erbinformation zuerst in RNA transkribiert, um von der RNA in Proteinsequenzen translatiert zu werden. Ein umgekehrter Fluss genetischer Information von RNA zu DNA ist dagegen außerhalb der Retroviren fast unbekannt.

Das virale Genom der Retroviren ist linear und nicht segmentiert. Die Genomgröße variiert zwischen 7 und 15 kb und das Genom enthält wenigstens 3 Gene: *gag*, *pol* und *env*. Diese 3 Gene sind Bestandteile eines jeden Retrovirus. Retroviren, die nur diese Grundbestandteile in ihrem Genom enthalten, werden zu den einfachen Retroviren gezählt. Andere Retroviren enthalten darüber hinaus noch verschiedene andere Gene (z.B. *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef* bei HIV-1 oder *tax*, *rex* bei HTLV-1), deren Genprodukte regulatorische Funktionen in der Expression des viralen Genoms haben (z.B. Tat oder Rev) oder die in die Regulationsmechanismen der infizierten Zellen eingreifen (z.B. Nef). Diese Retroviren werden zu den komplexen Retroviren zusammengefasst (Abb. 1.1).

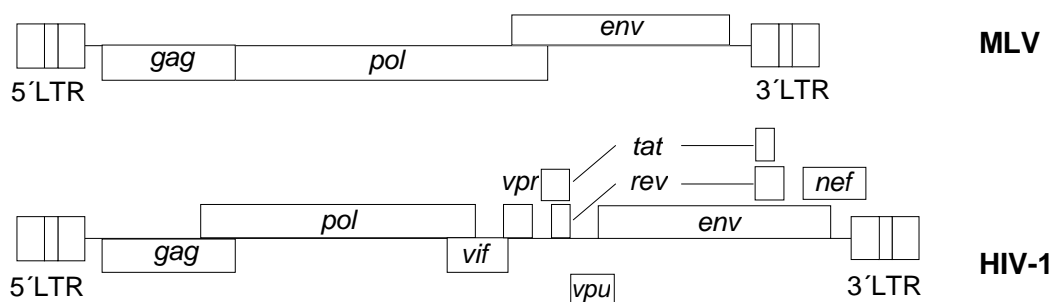


Abb. 1.1: Beispiele für die genetische Organisation einfacher (MLV) und komplexer (HIV) Retroviren (nach: Coffin JM *et al.*, 1996)

Abgesehen von dieser groben strukturellen Einteilung der Retroviren wird diese Familie taxonomisch in 7 verschiedene Genera aufgeteilt:

	Genus	Beispiel
1.	Alpha-Retroviren	Rous Sarcoma Virus (RSV)
2.	Beta-Retroviren	Maus Mamma Tumor Virus (MMTV), Mason-Pfizer Affen Virus (MPMV)
3.	Gamma-Retroviren	Maus-Leukämie-Virus (MLV)
4.	Delta-Retroviren	Humanes T-Zell-Leukämie-Virus-1 (HTLV-1)
5.	Epsilon-Retroviren	<i>Fisch-Retroviren</i>
6.	Lentiviren	Humanes Immundefizienzvirus (HIV) Simianes Immundefizienzvirus (SIV)
7.	Spumaviren	Humanes Foamy-Virus (HFV)

Die folgende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit Viren bzw. abgeleiteten viralen Vektoren aus den Genera der Gamma-Retroviren, im speziellen dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MoMLV od. MLV), und der Lentiviren, vertreten durch das humane Immundefizienzvirus Typ I (HIV-1) und verschiedene simiane Immundefizienzviren (SIV).

Alle Retroviren, wenn auch im Fall der Spumaviren mit Einschränkung, haben einen im Prinzip gleichen Replikationszyklus. Die Proteinstrukturen der Virionen (z.B. Kapsid) werden durch *gag*-Genprodukte (hauptsächlich Matrixprotein [MA], Kapsidprotein [CA] und Nukleokapsidprotein [NC]) aufgebaut. Freie Viruspartikel binden an ihre Zielzellen durch Interaktion des viralen Hüllproteins Env mit dem jeweiligen Rezeptor an der Zelloberfläche. Diese Interaktion führt schließlich zur Env-vermittelten Membranfusion von Virion und Zelle und zur Freisetzung des viralen Kapsids ins Zytoplasma. Darauf folgend lagern sich verschiedene virale und vermutlich auch zelluläre Proteine samt der viralen RNA zu einem reversen Transkriptionskomplex zusammen. In diesem Komplex kann nun die *pol*-kodierte Reverse Transkriptase (RT) das virale RNA-Genom in ein DNA-Provirus umschreiben. Nach Abschluss der reversen Transkription wird das DNA-Provirus mit Hilfe der ebenfalls *pol*-kodierten viralen Integrase in das Genom der Zielzelle integriert. Obwohl die retrovirale Integrase nicht spezifisch für bestimmte Sequenzen des Genoms der Zielzelle ist, werden zumindest von MLV- und HIV-1-Viren transkriptionell aktive genomische Bereiche für die Integration bevorzugt (Wu X, 2003). Ausgehend vom viralen Promotor in der 5'-LTR kommt es nun zur Transkription des integrierten Provirus und zur *de novo* Proteinsynthese der viralen Bestandteile durch die zelluläre Translationsmaschinerie.

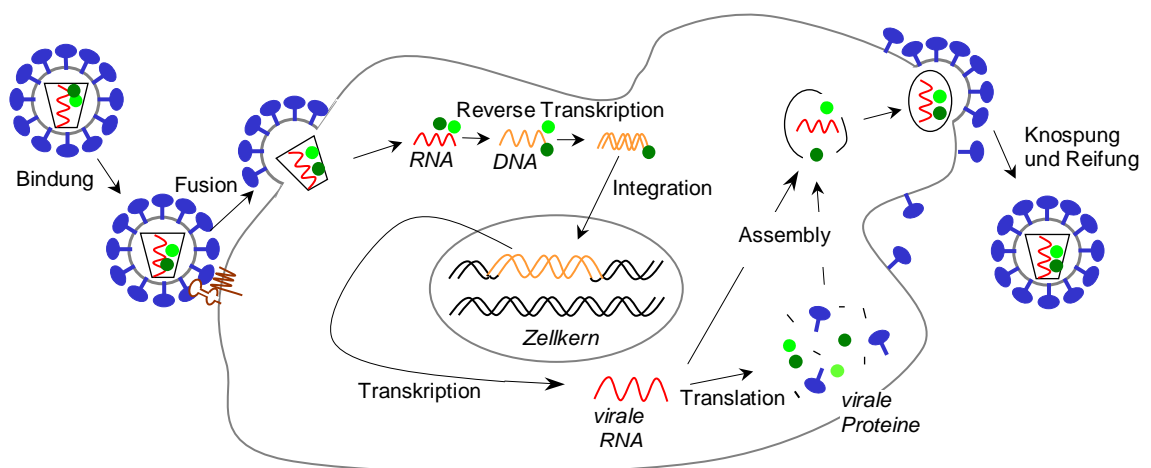


Abb. 1.2: Schema des retroviralen Replikationszyklus am Beispiel HIV.

Die verschiedenen viralen Proteine und die vom DNA-Provirus transkribierte neue genomische virale RNA bilden in einem als „assembly“ bezeichneten Prozess neue Viruspartikel, die über Knospung an der Zellmembran freigesetzt werden. Die viralen Proteine in diesen noch unreifen Partikeln werden nach der Knospung in einem Reifungsprozess über die virale Protease (PR) prozessiert, was bei einigen Viren an der

morphologischen Veränderung der viralen Kapsid-Struktur beobachtet werden kann. Schließlich liegen reife Virionen vor, die neue Zielzellen infizieren können (Abb. 1.2).

1.1.1 Gamma-Retroviren

Die Gamma-Retroviren gehören zu den einfachen Retroviren. Sie kodieren in ihrem normalen Genom somit nur *gag*, *pol* und *env*-Gene (s. Abb. 1.1 am Beispiel MLV). Alle Gamma-Retroviren besitzen ein kondensiertes Kapsid und kaum erkennbare Spikes auf der Oberfläche der Viruspartikel. Diese Viren sind sowohl exo- als auch endogen in verschiedenen Tiergruppen weit verbreitet und einige Viren dieser Gruppe sind pathogen. Neben der Onkogenität einiger Spezies können andere Viren dieser Gruppe Immunsuppressionen oder neurologische Krankheitsbilder auslösen. Eine wichtige Eigenschaft der Gamma-Retroviren soll hier erwähnt werden: Nur proliferative Zellen werden von diesen Viren infiziert. Das revers transkribierte Provirus ist für eine Integration unbedingt auf den Zerfall der Kernmembran während der Mitose der Zielzelle angewiesen, da der virale Präintegrationskomplex der Gamma-Retroviren nicht aktiv über die intakte Kernmembran transportiert wird (Fouchier RA, 1999). Trotzdem leiten sich bis heute sehr viele retrovirale Vektorsysteme von den Gamma-Retroviren, im speziellen dem MLV, ab.

1.1.2 Lentiviren

Lentiviren unterscheidet sich von den Gamma-Retroviren unter anderem im Aufbau des viralen Genoms. Sie besitzen über die essentiellen *gag*, *pol* und *env*-Gene hinaus noch akzessorische Gene, gehören also wie die Spumaviren und Delta-Retroviren zu den komplexen Retroviren (in Abb. 1.1 am Beispiel von HIV-1 dargestellt). Die erste mit Lentiviren assoziierte Erkrankung wurde schon um 1900 beschrieben; es handelt sich dabei um die infektiöse Anämie der Pferde (Vallé H, 1904). Ihren Namen, der sich vom lat. *lentus* = langsam ableitet, erhielt dieses Genus nach dem Konzept langsam verlaufender viraler Infektionen, das anhand der Visna-Krankheit, einer neurologischen Erkrankung bei Schafen aufgestellt wurde (Sigurdsson B, 1954). Das heute bekannteste Virus aus dem Genus der Lentiviren ist das Humane Immundefizienzvirus (HIV) mit dem Krankheitsbild der erworbenen Immundefizienz AIDS (engl. *acquired immunodeficiency syndrome*).

Eine weitere Besonderheit der Lentiviren ist ihre Fähigkeit, sich auch in nicht-teilenden Zellen vermehren zu können, was erstmalig für das VISNA-Virus gezeigt werden konnte (Thormar H, 1963). Auch für HIV-1 ließ sich diese Fähigkeit nachweisen (Gartner S, 1986), ebenso für die dem HIV-1 verwandten simianen Immundefizienzviren (SIV). Diese besondere Eigenschaft wird den Bestandteilen des lentiviralen Präintegrationskomplexes

(PIC) zugeschrieben, die einen aktiven Kerntransport durch die Kernmembran hindurch ermöglichen. Diese PICs bestehen bei HIV-1 neben dem revers transkribierten Virusgenom und der viralen Integrase (IN) aus einer relativ großen Zahl viraler Proteine. So wurden unter verschiedenen experimentellen Bedingungen immer RT, MA (p27^{gag}) und Vpr als Bestandteile der PIC identifiziert, bei einigen Veröffentlichungen zusätzlich NC (p7^{gag}), wenig CA (p24^{gag}) und die virale Protease (PR) (Fouchier RA, 1999). Bei diesen Proteinen wurden bei MA, Vpr und IN putative Kernlokalisierungssignale (engl *nuclear localisation signals*, NLS) mit Homologien zu bereits bekannten viralen NLS gefunden, von denen vermutet wird, dass sie den aktiven Kernimport der PICs vermitteln (von Schwendler U, 1994; Bukrinsky MI, 1993; Heinzinger NK, 1994; Gally P, 1997). Darüber hinaus wurde diskutiert, ob die Phosphorylierung eines Teils der viralen Matrix-Proteine einen Einfluß auf den Kernimport des PIC hat (Gally P, 1995). Neuere Daten zeigen für Vpr eine weitergehende Rolle auf. So konnte gezeigt werden, dass das virale Vpr-Protein in viralen Partikeln in relativ hoher Konzentration verpackt wird, in infizierten Zellen die Architektur und Integrität der Kernmembran beeinträchtigt und so den Kernimport ermöglicht (de Noronha CM, 2001).

Trotz dieser Importstrategien ist es weder *in vitro* noch *in vivo* möglich, die potentiellen Zielzellen von HIV im peripheren Blut (CD4⁺ T-Lymphozyten, Monozyten) ohne vorhergehende Stimulation/Priming produktiv zu infizieren. Dies wird mit dem Status dieser Zellen in Zusammenhang gebracht: Frisch isolierte PBMC befinden sich fast ausschließlich in der G₀-Phase des Zellzyklus. Für T-Lymphozyten konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen für eine *in vitro* Infektion wenigstens in der G_{1b}-Phase des Zellzyklus befinden müssen, da ansonsten die reverse Transkription und damit der gesamte Replikationszyklus nicht effizient ablaufen kann (Korin YD, 1998). Es wurde vermutet, dass dieser Block auf dem niedrigen Nukleotid-Angebot der G₀-Zellen beruht, aber auch eine externe Zusatzversorgung dieser Zellen mit Nukleotiden konnte die Infektiosität nicht wiederherstellen (Korin YD, 1999). Auch bei frisch isolierten Monozyten ist *in vitro* die HIV-Replikation blockiert. Zwar kann hier die reverse Transkription ablaufen, aber die gebildeten Proviren integrieren nicht (Neil S, 2001). Somit ist die Replikation der Immundefizienzviren auf unstimulierten PBMC blockiert, eine seltene Ausnahme stellt das simiane Immundefizienzvirus smmPBj1.9 (SIVsmmPBj1.9) dar.

1.1.2.1 Das simiane Immundefizienzvirus SIVsmmPBj1.9

SIVsmmPBj1.9 ist ein akut pathogener molekularer Klon des in Schweinsaffen (*Macaca nemestrina*) passagierten SIV-Isolats SIVsmmPBj14 (Fultz PN, 1989). Während der

parentale Virenstamm SIVsmm9 isoliert aus der Schopfmangabe (*Cercocebus atys*, engl. *sootey mangabey monkey*) im natürlichen Wirt apathogen ist, verursacht er in Schweinsaffen eine chronische AIDS-ähnliche Erkrankung (Fultz PN, 1986). Das Isolat PBj14 jedoch verursacht innerhalb von 2 Wochen in Schweinsaffen, Cynomolgen (*Macaca fascicularis*) und einigen Rhesusaffen (*Macaca mulatta*) eine akute Erkrankung, die von blutigen Durchfällen begleitet wird und zum Tod der infizierten Versuchstiere führt. Auch Infektionen seronegativer Schopfmangaben mit dieser Variante des SIVsmm bleiben nicht mehr apathogen, sondern es zeigen sich ähnliche Erkrankungssymptome.

Von diesem Isolat wurden über PCR von verschiedenen Arbeitsgruppen mehrere Moleklarklone isoliert, von denen einige (z.B. PBj4.41, PBj6.6 und **PBj1.9**) in Schweinsaffen, nicht aber in Rhesusaffen, eine akute Pathogenität wie PBj14 zeigen (Dewhurst S, 1990; Novembre FJ, 1993). Zum Zeitpunkt des Todes der Versuchstiere, 8 Tage nach Inokulation, ließ sich das Virus in allen bei der Nekropsie gewonnenen Geweben (Periphere mononukleäre Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC), Milz, mesenteriale Lymphknoten, Cerebrospinal-Flüssigkeit und Cerebrum) nachweisen. Insbesondere im verdauungstrakt-assoziierten Gewebe ließen sich große Virusmengen und durch die Infektion verursachte Läsionen und Verschmelzung der Darmvilli finden, was eine enterotrope Orientierung der PBj-Moleklarklone nahelegt. Diese Symptome der infizierten und schließlich sterbenden Tiere spiegeln ein Schock-ähnliches Syndrom wider, von dem bekannt ist, dass einige akut-Phase inflammatorische Cytokine eine wichtige Rolle spielen. Tatsächlich wurden insbesondere erhöhte IL-6- und TNF- α -Blutserumlevel bei infizierten Schweinsaffen nachgewiesen, was für eine immun(über)aktivierende Eigenschaft der PBj-Viren spricht (Schwiebert R, 1994; Birx DL, 1993). Ebenso weisen die erhöhten Aktivierungsmarker (CD25, HLA-DR) auf den Blutlymphozyten infizierter Tiere in die gleiche Richtung (Schwiebert R, 1994).

In vitro zeichnen sich die akut pathogenen PBj-Klone durch die Replikationsfähigkeit in unstimulierten Primaten-PBMC aus; diese Replikation wird begleitet von einer Aktivierung der Lymphozyten und Induktion von Lymphozyten-Proliferation (Fultz PN, 1991; Schwiebert R, 1994). Diese Fähigkeit besitzen andere HIV- und SIV-Isolate nicht. Sie wird daher mit dem besonderen Krankheitsverlauf von PBj-Infektionen korreliert, zumal sich die Aktivierung der Immunzellen wie schon beschrieben *in vivo* nachweisen lässt. Zwar wurden auch Hybridviren zwischen SIVsmmPBj und SIVagm3mc konstruiert, die die Fähigkeit der Replikation in unstimulierten PBMC besitzen, aber *in vivo* keine akute

Pathogenese zeigten (Dittmar M, 1995). Jedoch wurde hier auch keine Aktivierung der Immunzellen untersucht.

Ferner wurde gezeigt, dass die Replikation des Virus in CD4⁺ T-Lymphozyten und deren Aktivierung die Anwesenheit von Makrophagen oder bestrahlten B-Zellen in der Kultur voraussetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wird also durch Makrophagen/Monozyten oder B-Zellen vermittelt und ließ sich teilweise durch Hemmung des co-stimulatorischen CD28-Signalweges inhibieren. Cyclosporin A blockierte die PBj-verursachte T-Zell-Proliferation vollständig, was für einen parallelen Einfluss des T-Zell-Rezeptorkomplexes in der PBj-vermittelten Aktivierung der T-Zellen spricht (Whetter L, 1998). In diesem Zusammenhang wurde weiterhin festgestellt, dass SIVsmmPBj1.9 in humanen Monozyten die Entstehung von Synzytien, d.h. die Ausbildung von multinukleären Riesenzellen (engl. „multinucleated giant cells“, MGCs), induziert (Baskar P, 1994), trotzdem aber gut in Makrophagen aus Makaken repliziert (Hirsch VM, 1998).

Um diese sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ungewöhnlichen Eigenschaften der PBj-Viren molekularen Bestandteilen dieser Klone zuordnen zu können, wurden sie mit nahe verwandten Lentiviren verglichen, die dieses unter den Immundefizienzviren der Primaten einzigartige Verhalten nicht zeigen. Die genomische Organisation der Molekularklone ist typisch für Lentiviren der HIV-2/SIVsmm-Gruppe und in Abb. 1.3 dargestellt:

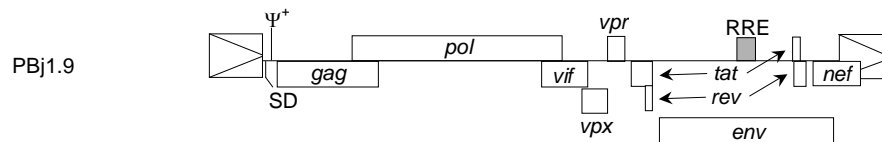


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Genoms von SIVsmmPBj1.9. Pfeile symbolisieren das Spleißen der Tat- und Rev-Exons. Ψ = Verpackungssignal, RRE = Rev responsives element, SD = Spleiß-Donor.

Allerdings zeigen sich im Vergleich der akut pathogenen SIV-Varianten mit den nicht-akut pathogenen Parentalviren bzw. Klonen sowohl auf Nukleinsäure- als auch Protein-Ebene einige Sequenzunterschiede, die für diese besondere akute Pathogenese verantwortlich gemacht werden. Insgesamt wurden im Vergleich mit dem Elternstamm SIVsmm9 57 Punktmutationen und zwei Insertionen gefunden (Cournaud V, 1992). Die akute Pathogenese ist aber multifaktoriell, da bei der Konstruktion chimärer Viren zwischen SIVsmmPBj und SIVsmmH4 (Molekularklon, nahe verwandt mit SIVsmm9) nur ausschließlich die Chimären eine akute Pathogenese zeigten, die von H4 nur die LTR-Region enthielten, ansonsten aber vollständig aus PBj-Genen bestanden (Novembre FJ,

1993). In den folgenden Abschnitten sollen die einzelnen Bestandteile von PBJ und deren Einfluss auf die Pathogenese erläutert werden.

Die PBJ-Viren zeigen eine für die parentalen SIVsmm-Viren ungewöhnliche Verdopplung der NFκB-Bindungsstelle in der Promotorregion der LTR, die ansonsten noch in HIV-1 Isolaten, allerdings auch in apathogenen SIVagm gefunden wird. Wie schon weiter oben beschrieben, zeigen chimäre Viren, die das PBJ-Genom unter der Kontrolle einer fremden LTR (SIVsmmH4) tragen, die gleiche Pathogenität, obwohl dort die Verdopplung der NFκB-Bindungsstelle fehlt (Novembre FJ, 1993).

In der gleichen Studie wurde darüber hinaus gezeigt, dass das PBJ-Env-Protein zwar notwendig, aber nicht ausreichend für die Pathogenese ist und mit anderen viralen Faktoren zusammenspielen muss. Unterstützt wird diese Position durch eine zweite Studie, die einen akut und einen nicht-akut pathogenen PBJ-Molekularklon miteinander verglich. Diese Klone divergieren in ihrer Sequenz nur um insgesamt 5 Aminosäuren (aa) und der Austausch einer Aminosäure an Position 119 (D119G) im SU-Fragment des Env-Proteins ist kritisch für den akuten Verlauf (Haddrick M, 2001). Allerdings verhielt sich schon der nicht akut-pathogene Molekularklon ungewöhnlich, da auch er die Eigenschaft zur Replikation in unstimulierten Makaken-PBMC besaß.

Weiterhin wurde für das *vpx*-Gen ein Einfluss auf die Pathogenese festgestellt. Während HIV-1 Viren nur ein *vpr*-Gen in ihrem Genom besitzen, tragen Viren der HIV-2/ SIVsmm-Gruppe zusätzlich ein *vpx*-Gen, das wahrscheinlich über Genduplikation aus dem ebenfalls noch vorhandenen *vpr*-Gen hervorgegangen ist und in Größe und Sequenz des kodierten Proteins große Homologien aufweist. Beide Proteine werden in Viruspartikel verpackt und in infizierte Zellen übertragen. Bei HIV-1 Viren arretiert das Vpr-Protein infizierte Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus (He J, 1995) und spielt wie schon erwähnt eine wichtige Rolle beim Kernimport des revers transkribierten viralen Genoms in nicht-mitotischen Zellen (de Noronha CM, 2001). Dadurch ist es für die Replikation in ausdifferenzierten Makrophagen unentbehrlich (Connor RI, 1995). Bei den HIV-2/SIVsmm Viren (im speziellen SIVsmmPBj1.9) sind diese Eigenschaften jedoch in Vpr und Vpx separiert: Während die Arretierung in G₂ weiterhin durch Vpr bedingt ist, ist die Determinante des Kernimports und damit die Fähigkeit zur Infektion von ausdifferenzierten Makrophagen auf das Vpx-Protein übergegangen (Fletcher TM, 1996). Tatsächlich zeigen PBJ-Molekularklone, deren *vpx*-Gen deletiert wurde, nicht mehr den akut pathogenen Krankheitsverlauf der PBJ-Infektion, obwohl die Viren eine produktive Infektion in den Versuchstieren etablieren konnten (Hirsch VM, 1998). Das spricht für eine große

Bedeutung der Monozyten/Makrophagen-Linie für die PBJ-Pathogenese *in vivo*, zumal gerade SIV_{smmPBJ}, wie schon erwähnt, gut in diesen Zellen repliziert.

Ein weiterer gut untersuchter Bestandteil von SIV_{smmPBJ} ist schließlich das *nef*-Gen. Für dieses Gen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass es für den akuten Krankheitsverlauf unentbehrlich ist. Nef-deletierte Moleklarklone waren weder in der Lage, den akuten Krankheitsverlauf *in vivo* auslösen zu können, noch *in vitro* in unstimulierten PBMCs zu replizieren (Novembre FJ, 1996). Schon die Mutation einer einzigen aa des Nef-Proteins an Position 17 (Tyr→Arg) und der dadurch bedingte Verlust von einer von 3 Konsensus-Motiven für SH2-Bindungsdomänen (YxxL) führte dazu, dass der mutierte PBJ-Klon nicht mehr in unstimulierten PBMCs replizieren konnte (Du Z, 1996). Dagegen konnte eine natürliche (Kirchhoff F, 1999) oder gezielte (Du Z, 1995; Du Z, 1996) Arg→Tyr Substitution im Nef-Protein an Position 17 in dem nur mäßig pathogenen SIV_{mac239} akut pathogene Viren generieren, die in unstimulierten PBMC replizierten und diese aktivierten. Interessanterweise konnte auch für diese Viren eine Abhängigkeit der Replikation und Aktivierung der T-Lymphozyten vom Vorhandensein von Monozyten/Makrophagen in der Kultur gezeigt werden (Du Z, 1995). Wird die gleiche Mutation in das apathogene SHIV_{PPC} (Stephens EB, 1998) eingeführt oder das gesamte *nef*-Gen von SIV_{smmPBJ1.9} auf das ebenfalls apathogene SIV_{agm3mc} übertragen (Wagener S, 1998), so entstehen ebenfalls Viren mit der Eigenschaft, in unstimulierten PBMC zu replizieren. Ein akuter Krankheitsverlauf wird durch diese neuen Viren jedoch nicht ausgelöst.

Ein genaues Zusammenspiel dieser verschiedenen viralen Determinanten und der Einfluss der einzelnen Faktoren auf die betroffenen Wirtszellen ist somit immer noch unklar und bedarf weiterer Aufklärung.

1.2 Gentransfer in eukaryotische Zellen durch retrovirale Vektoren

Wie in Kapitel 1.1 dargelegt besitzen Retroviren die Eigenschaft, ihr virales RNA-Genom revers zu transkribieren und das resultierende DNA-Provirus während des Replikationszyklus stabil in das Genom der infizierten eukaryotischen Wirtszelle zu integrieren. Das bedeutet, dass diese Virusgruppe in jedem Replikationszyklus das komplette virale Genom auf die neu infizierten Zellen stabil transferiert und dort exprimiert. Diese Eigenschaft des stabilen Transfers „fremder“ Gene auf die jeweiligen Zielzellen der Infektion lässt diese Viren als gut geeignet erscheinen, z.B. therapeutische Gene im Rahmen einer Genterapie auf defekte Zellen zu übertragen und dort stabil zu

exprimieren. Um diesen Transfer eines gewünschten Gens zu leisten, ohne dabei virale Gene mit zu transferieren oder eine mit dem entsprechenden Retrovirus evtl. assoziierte Erkrankung auszulösen, müssen die für den Gentransfer ausgesuchte Viren zu sicheren Vektorsystemen umgebaut werden, die im Folgenden beschrieben sind.

1.2.1 Retrovirale Gentransfer-Systeme

Zur Übertragung bestimmter Gene auf ausgesuchte Zielzellen durch retroviralen Gentransfer müssen funktionsfähige Viruspartikel vorhanden sein, welche die gewünschte Erbinformation in die Zellen transferieren und dort revers transkribieren können. Das entstandene DNA-Provirus muss schließlich in das Zellgenom integrieren und von dort exprimiert werden. Alle diese Eigenschaften sind auf verschiedenen Abschnitten des retroviralen Genoms lokalisiert und müssen für das angestrebte Vektorsystem genutzt werden.

Wie in Kapitel 1.1 dargelegt stellen die Gene *gag* und *pol* die primären Informationsträger für die strukturellen Bestandteile der Viruspartikel und der viralen Replikationsmaschinerie dar. Tatsächlich führt eine isolierte Expression von *gag* bei Lenti- oder auch C-Typ-Retroviren ohne weitere virale Bestandteile zur Knospung von virusähnlichen Partikeln („virus-like particles“, VLPs) in den Überstand der *gag/pol*-exprimierenden Zellen (Delchambre M, 1989). Diese Partikel sind nicht infektiös, da schon Bindung an und Fusion mit potentiellen Zielzellen aufgrund des Fehlens eines funktionalen Hüllproteins (*Env*) auf den VLPs nicht möglich ist. Darüber hinaus fehlt in den *gag/pol*-exprimierenden Zellen eine RNA, die das virale Verpackungssignal Ψ aufweist und deshalb bevorzugt verpackt wird. Zwar können andere zelluläre RNAs unspezifisch verpackt werden (Adkins B, 1981), diese werden jedoch nicht revers transkribiert oder integriert.

Wird nun in diesen Verpackungszellen zusätzlich ein virales *env*-Gen exprimiert, so wird dieses Hüllprotein in die Membran der knospenden VLPs inkorporiert und vermittelt die Bindung an suzeptible Zielzellen und Fusion des VLPs mit der Zelle. Die Inkorporation des Hüllproteins in die VLP-Membran ist nicht spezies-spezifisch. Retrovirale Vektorpartikel sind in dieser Hinsicht ebenso wie ihre Parentalviren sehr promiskuitiv und erlauben die Inkorporation von Hüllproteinen verschiedenster Viren. Dadurch erlangen sie das Zielzellspektrum des entsprechenden Virus. Diese Inkorporation fremder Hüllproteine wird als Pseudotypisierung bezeichnet (Zavada J, 1972). Einige der wichtigsten für die Pseudotypisierung von retroviralen Vektoren eingesetzten Hüllproteinen sind das ein sehr breites Zielzellspektrum vermittelnde und stabile Glykoprotein des Vesicular Stomatitis

Virus, VSV-G, sowie das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämie Virus, GaLV-Env. Letztere zeigte bei der Pseudotypisierung von MLV-Vektorpartikeln eine verbesserte Effizienz des Gentransfers in haematopoetische Zellen (Lam JS, 1996).

Um mit den so produzierten viralen Partikeln eine genetische Information übertragen zu können, muss in den Verpackungszellen noch eine RNA exprimiert werden, die sowohl das virale Verpackungssignal Ψ als auch virale LTRs enthält. Diese RNA wird von den knospenden VLPs als Vektorgenom spezifisch verpackt und kann revers transkribiert werden und integrieren. Enthält diese RNA zusätzlich das zu übertragende Gen in einer entsprechenden Expressionskassette, so führen die Vektorpartikel, die diese RNA inkorporieren, einen erfolgreichen Gentransfer auf die transduzierten Zielzellen durch. Allgemein wird der Gentransfer durch virale Vektoren als Transduktion bezeichnet.

Um zu verhindern, dass alle essentiellen Bestandteile des Vektorsystems durch Rekombination in den Verpackungszellen wieder in einem einzigen Vektorgenom zusammengeführt werden und es so zur Entstehung rekombinanter, replikativer Retroviren (*replication competent retroviruses*, RCRs) kommt, werden Gag/Pol-Expression, Env-Expression und Vektor-RNA auf drei Plasmiden separiert (Abb. 1.4), so dass wenigstens drei unabhängige Rekombinationsereignisse zur Entstehung von RCRs benötigt werden. Diese theoretische Sicherheit konnte experimentell bestätigt werden (Danos O, 1988).

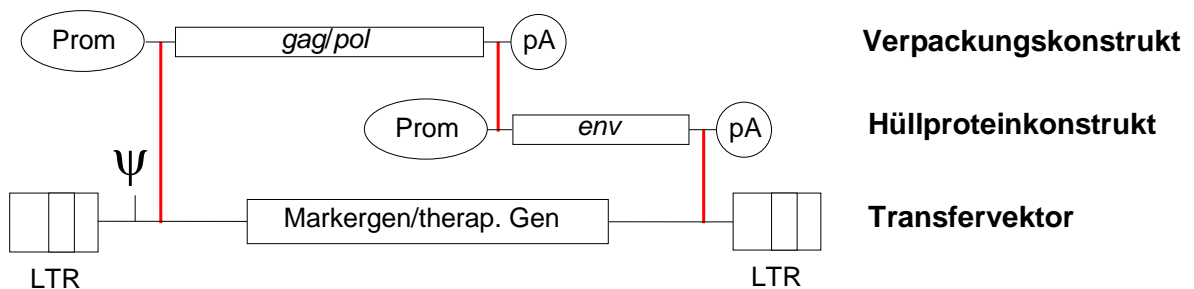


Abb. 1.4: Schematische Darstellung eines einfachen retroviralen Vektorsystems. In den Ovalen sind die Promotorregionen (Prom) und Polyadenylierungssignale (pA) dargestellt. Rote Linien symbolisieren notwendige Rekombinationsereignisse, die zur Generation von RCR führen können. Ψ = Verpackungssignal.

Das Gag/Pol-Expressionsplasmid wird dabei als Verpackungskonstrukt bezeichnet, das Env-Expressionsplasmid als Hüllproteinkonstrukt und das Plasmid, welches für das Vektorgenom kodiert, als Transfervektorkonstrukt (das Vektorgenom selbst ist dabei der Transfervektor). Nur wenn alle dieser 3 Konstrukte gleichzeitig in einer Zelle vorhanden sind und exprimiert bzw. transkribiert werden, sind alle Vektorbestandteile in dieser Zelle vorhanden und es werden transduzierende Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand

abgegeben. Die Herstellung dieser Verpackungszellen kann z.B. durch Lipofektion von Verpackungskonstrukt, Hüllproteinkonstrukt und Transfervektorkonstrukt geschehen; die 3 Plasmide werden vorübergehend exprimiert und geben in einem bestimmten Zeitraum Vektorpartikel in den Überstand ab. Hierbei spricht man von transienter Generierung von Vektoren. Werden allerdings alle Plasmide dauerhaft über Integration der Plasmide ins Zellgenom oder Antibiotika-Selektion der Zellen auf eine auf den Plasmiden kodierte Resistenz in die Zellen eingebracht, so erhält man stabile Verpackungszelllinien, welche die entsprechenden Vektoren dauerhaft produzieren und in den Kulturüberstand abgeben. Stabile Verpackungszellen haben den Vorteil einer dauerhaften Vektorproduktion; darüber hinaus sind durch Selektion entsprechender Zellklone höhere Vektortiter möglich als bei transienten Verpackungszellen. Dem steht der Aufwand der Etablierung der entsprechenden Linien gegenüber.

Bei Vektorsystemen, die sich von lentiviralen Vektoren ableiten, sind normalerweise wenigstens noch Tat und Rev aufgrund ihrer regulatorischen Eigenschaften für die Expression des Virus-/Vektorgenoms notwendig, um eine effiziente Generierung von Vektoren zu erlauben. Diese zusätzlichen Proteine werden entweder ebenfalls durch das Verpackungskonstrukt codiert oder auf einem 4. Plasmid zusätzlich in den Verpackungszellen exprimiert. Für lentivirale, von HIV-1 abgeleitete Vektorsysteme ist eine Etablierung von stabilen Verpackungszellen aufgrund der zytotoxischen Eigenschaften der HIV-Gag/Pol-Proteine bisher nur in einem induzierbaren oder attenuierten (Ikeda Y, 2003) System möglich und deswegen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden.

1.2.2 Retroviraler Gentransfer in eukaryotische Zellen

Die retroviralen Gentransfersysteme wurden entwickelt, um therapeutische Gene im Rahmen einer Gentherapie *ex vivo* oder *in vivo* in die zu therapierenden Körperzellen stabil einzuschleusen. Dieser Ansatz beruht auf dem stabilen Transfer des Vektorgenoms in diese Zellen; verschiedene Körperzellen sind jedoch sehr unterschiedlich. Von besonderem Interesse ist dabei der proliferative Status der zu verändernden Zellen.

1.2.2.1 Gentransfer in mitotische Zellen

Eukaryotische Zellen, die sich in einem proliferativen Zustand befinden, können prinzipiell von allen retroviralen Vektoren genetisch verändert werden. Um z.B. von MLV-abgeleiteten Vektoren erfolgreich transduziert zu werden, müssen sie allerdings wenigstens eine Mitose-Phase durchlaufen, da der Präintegrationskomplex MLV-abgeleiteter Vektoren nicht die intakte Kernmembran durchdringen kann. Darin spiegeln die Vektoren die

Infektionseigenschaften der Parentalviren wieder, die, wie schon beschrieben, nur in mitotischen Zellen replizieren können (Kap. 1.1.1). MLV-abgeleitete retrovirale Vektorsysteme wurden seit den frühen 1980er Jahren entwickelt (Anderson WF, 1984) und befinden sich mittlerweile auch in der klinischen Anwendung, so z.B. bei der erfolgreichen Gentherapie von Kindern, die an X-gekoppelter schwerer kombinierter Immundefizienz (engl. „severe combined immunodeficiency“; SCID) litten. Dort wurde mit MLV-abgeleiteten Vektoren das intakte Gen der bei den erkrankten Kindern fehlenden Untereinheit des IL-2-Rezeptors in hämatopoetische Stammzellen transferiert (Cavazzana-Calvo M, 2000). Auch wenn mittlerweile leider 2 der 9 erfolgreich behandelten Kinder an einer durch die Vektoren verursachten Leukämie erkrankt sind (Hacein-Bey-Abina S, 2003), stellt diese Studie einen beispiellosen Erfolg in der Behandlung dieser normalerweise mit hohen Sterblichkeitsraten assoziierten monogenetischen Erbkrankheit dar. Um mit den MLV-Vektoren überhaupt diesen Erfolg erreichen zu können, wurden in dieser Studie die behandelten hämatopoetischen Stammzellen vor Einsatz der Vektoren durch ein aufwendiges Protokoll stimuliert. Diese Notwendigkeit der Stimulation zeigt aber die Limitierung der MLV-abgeleiteten Vektorsysteme auf. Viele potentielle Zielzellen einer therapeutischen Anwendung (z.B. Neurone, Makrophagen, Dendritische Zellen) lassen sich nämlich entweder nicht oder nur sehr schwer in einen Proliferationszyklus bringen. Darüberhinaus kann sich die Zielzellpopulation durch den Einfluss des proliferativen Stimulus in ihrer Zusammensetzung ändern, was z.B. bei der Behandlung von T-Lymphozyten unerwünscht ist. Für diese nicht-mitotischen Zielzellen sind andere retrovirale Vektorsysteme erforderlich, die nicht diesen Beschränkungen unterliegen.

1.2.2.2 Gentransfer in nicht-mitotische Zellen

Wie schon erwähnt replizieren Lentiviren auch in nicht-proliferativen Zellen. Die primären Zielzellen einer HIV-Infektion sind z.B. ausdifferenzierte Makrophagen, die sich nicht teilen. Die Entwicklung lentiviraler, auf HIV-1 basierender Vektorsysteme, die auch tatsächlich die Fähigkeit zeigten, nicht-mitotische Zellen genetisch verändern zu können (Naldini L, 1996 *a,b*), markierte somit einen entscheidenden Fortschritt gegenüber den bis dahin verwendeten retroviralen Vektoren. Mit Hilfe lentiviraler Vektoren war es möglich, z.B. Neurone *in vivo* (Blömer U, 1997) oder terminal differenzierte Makrophagen zu transduzieren. Diese Fähigkeit ist zu einem gewissen Grad unabhängig von den akzessorischen Proteinen der Lentiviren (Zufferey R, 1997), die deshalb in lentiviralen Verpackungskonstrukten neuerer Generationen auch deletiert sind. Allerdings wurde ein struktureller Bestandteil des Virusgenoms identifiziert, der in den Vektoren die Effizienz

des Gentransfers in nicht-mitotische Zellen beträchtlich erhöht. Es handelt sich hierbei um die Kombination eines zentralen Polypurintraktes (cPPT) und eines zentralen Terminationssignals (engl. *central termination signal*, CTS), die innerhalb des Virus- bzw. Vektorgenoms zu einer diskontinuierlichen Synthese des antisense-Stranges während der reversen Transkription führt. Dieser Strangbruch soll zu einer besseren Flexibilität des Provirus im Präintegrationskomplex führen, was den Kernimport erleichtern könnte (Zennou V, 2000). Somit erschließen die lentiviralen, zumeist von HIV-1 abgeleiteten viralen Vektoren eine Vielzahl von primären, sich nicht teilenden Zellen für einen retroviralen Gentransfer.

1.2.2.2.1 Gentransfer in unstimulierte periphere mononukleäre Blutzellen

Bei den peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) handelt es sich um T- und B-Lymphozyten sowie Monozyten und NK-Zellen, allesamt Bestandteile des menschlichen Immunsystems. Diese Zellen stellen sehr interessante Zielzellpopulationen für gentherapeutische Ansätze dar. Erstens können Erbkrankheiten, die diese Zellen betreffen, die Funktionsfähigkeit des Immunsystems mit teilweise drastischen Folgen beeinträchtigen (Aruffo A, 1994), und ein erfolgreicher Transfer eines therapeutischen Gens kann, wie am Beispiel SCID gezeigt (s.1.2.2.1), diese Erbkrankheiten zumindest lindern. Zweitens stellen diese Immunzellen eine wirksame Waffe gegen Krankheiten wie z.B. virale Infektionen oder Krebs dar. Gelingt es, die entsprechenden Immunzellen genetisch so zu verändern, dass sie ihre Aufgabe effizienter erfüllen können, so können herkömmliche Therapien zumindest wirkungsvoll unterstützt werden. Es ist beispielsweise denkbar, dass zytotoxische T-Lymphozyten durch Gentransfer in die Lage versetzt werden, Tumorantigene auf den Krebszellen zu erkennen und diese zu vernichten (Clay TM, 1999). Außerdem könnten Monozyten bzw. abgeleitete dendritische Zellen (DCs) genetisch zur Präsentation von immunogenen Tumorantigenen programmiert werden und damit die gesamte Immunabwehr gegen die Krebszellen mobilisieren (Lapointe R, 2001). Drittens stellen bei einer HIV-Infektion Monozyten/Makrophagen und CD4⁺-T-Lymphozyten die primären Zielzellen für die HI-Viren dar. Gelingt es, effiziente Resistenzgene gegen die virale Replikation in diese Zellen oder ihre Vorläuferzellen einzuschleusen, so wäre zumindest ein Teil dieser Zellen gegen eine HIV-Infektion geschützt.

Eine genetische Veränderung dieser Zellen ist zwar erwünscht, frisch isolierte PBMC aus Blut oder ihre Vorläuferzellen, hämatopoetische Stammzellen, befinden sich jedoch überwiegend in der G₀-Phase des Zellzyklus und sind als ruhend anzusehen (Korin YD,

1998). Ein Gentransfer mit gamma-retroviralen Vektoren in diese ruhenden Zellen ist nicht möglich und auch bei herkömmlichen lentiviralen Vektoren ist es zumindest umstritten, ob ein erfolgreicher Gentransfer in frisch isolierte PBMC möglich ist (Chinnasamy D, 2000; Maurice M, 2001). Neuere Publikationen zeigen, dass humane T-Lymphozyten zumindest eine Vorstimulation mit Interleukinen wie z.B. Interleukin-7 (IL-7) erhalten müssen, um einen Gentransfer durch lentivirale Vektoren erhalten zu können (Ducrey-Rundquist O, 2002). Bei der Verwendung von gamma-retroviralen Vektoren wurden bisher verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet, die die gewünschten Zielzellen zur Proliferation anregen. Obwohl diese Vorstimulationsprotokolle in der Praxis die Möglichkeit des Gentransfers in diese Zielzellen eröffneten (Uckert W, 2000; Gladow M, 2000), müssen sie auch kritisch gesehen werden, da durch die verschiedenen Stimuli die Zusammensetzung der behandelten Zellpopulation maßgeblich verändert wird (Wong FS, 1993). So können z.B. alleine durch IL-7 Behandlung latente Proviren in PBMC von HIV-infizierten Patienten reaktiviert werden (Scripture-Adams DD, 2002). Um jedoch möglichst alle Immunzellen der zu behandelnden Population in ihrer ganzen Breite und Funktionsfähigkeit zur Verfügung zu haben, wäre es daher ideal auf eine vorherige Stimulation der PBMC ganz verzichten zu können.

In diesem Zusammenhang konnte in meiner vorangegangenen Diplom-Arbeit gezeigt werden, dass *env*-deletierte, mit VSV-G pseudotypisierte SIVsmmPBj1.9-Vektoren im Unterschied zu analog aufgebauten HIV-1-Vektoren in der Lage waren, G₀-arretierte GHOST-CXCR4-Zellen zu transduzieren. Dieses Modell erhärtete die Hypothese, dass die Replikationsfähigkeit von SIVsmmPBj1.9 in G₀-Zellen (unstimulierten PBMC) genutzt werden könnte, um einen Gentransfer in ruhende, G₀-arretierte Zellen zu ermöglichen.

1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines effizienten lentiviralen Gentransfersystems zur erfolgreichen genetischen Veränderung ruhender primärer Zellen, insbesondere humaner PBMC.

Zu diesem Zweck sollte zunächst getestet werden, ob und unter welchen Voraussetzungen sich verschiedene virale Hüllproteine verwenden lassen, um HIV-1-abgeleitete Vektoren effizient zu pseudotypisieren, und ob sich durch die unterschiedliche Pseudotypisierung die Effizienz des Gentransfers in stimulierte und/oder unstimulierte humane PBL/PBMC gegenüber herkömmlichen MLV-abgeleiteten Vektoren steigern läßt. Außerdem sollte untersucht werden, ob das Spektrum ruhender Zellen, die von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren transduziert werden können, auf primäre PBMC erweitert werden kann.

Um zu testen, ob mit SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren eine Übertragung eines nicht-viralen Gens möglich ist, sollten funktionsfähige nicht-replikative Vektoren auf Basis von SIVsmmPBj1.9 und zum Vergleich von HIV-1 konstruiert werden, die ein Markergen auf transduzierte Zellen übertragen und dort exprimieren. Diese neuen Vektoren sollten dann auf arretierten Zelllinien und primären Zellen verglichen werden.

Weiterhin wurde die Entwicklung eines vorläufiges 3-Plasmid-Vektorsystem basierend auf SIVsmmPBj1.9 und die Untersuchung der Funktionsfähigkeit der resultierenden Vektoren angestrebt.

Um schließlich der Frage nachzugehen, welche Bestandteile von SIVsmmPBj1.9 die Konstruktion von viralen Vektoren mit der Eigenschaft der Transduktion ruhender Zellen ermöglichen, sollte der Einfluß des Nef-Proteins und die Promotoraktivität der PBj-LTR charakterisiert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Substanz/Kit	Bezugsquelle
Agar Agar	Merck
Agarose	Biozym, Roth
3-Amino-9-ethyl-Carbazol	Sigma
5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal)	Merck
Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) (CIA)	Sigma
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP's)	Promega
DNAcon3 (DNA Färbekit)	DAKO A/S
DNA Polymerase I, Klenow Fragment	New England Biolabs
Ethidiumbromid	Serva
Expand High Fidelity PCR System	Roche Diagnostics
Fötale Kälberserum (FCS)	Seromed/Biochrom
Glycerin	Calbiochem, Merck
HCl, 37%	Merck
Human T cell Nucleofector Kit	Amaxa biosystems
Lipofectamin Plus	Invitrogen
Megaprime DNA Labelling System RPN 1606	Amersham Biosciences
Mercaptoethanol	Sigma
Monocyte Isolation Kit	Miltenyi Biotech
NaOH, fest	Merck
NaOH, 2N	Roth
NaCl p.A.	Merck
Oligonukleotide	Sigma-ARK
OptiMEM I	Invitrogen
Phenol (pH 8,0), mit TE-Puffer äquilibriert	Roth
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Plasmid Mini Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Proteinase K, Nukleotidase-frei	Amersham Biosciences
QIAQuick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Redivue [α - 32 P]dCTP	Amersham Biosciences
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Rinder Serum-Albumin (BSA)	Boehringer Ingelheim, Merck
RnaseA, DNase-frei	Amersham Biosciences
Saccharose, für Dichtegradientenzentrifugation	Merck
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Wasserstoffperoxid (30%)	Aldrich
Lösungsmittel (DMSO, DMF, Ethanol etc.)	Roth, Merck, Sigma, PEI

Puffer (TBS, PBS, Tris-Cl, SSC 20x etc.)	PEI
--	-----

2.2 Lösungen und Kulturmedien

2.2.1 Lösungen

Blocking Puffer

BSA 1% (w/v)
in PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

DNA-6-fach-Probenpuffer

EDTA 10 mM
Bromphenolblau 0,075% (v/v)
Xylencyanol 0,1% (v/v)
Glycerin 15% (v/v)
in 6x TAE-Puffer

FACS-Waschpuffer

NaN_3 0,1% (w/v)
FCS 1% (v/v)
in PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

FACS-Fixierlösung

Paraformaldehyd 1% (w/v)
in PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$)

FBI-Puffer

20x SSPE 18,75 ml
PEG 8000 25 g
SDS 7% (v/v)
ad 250 ml H_2O (bidest)

HybWash A

SSPE 1x
SDS 0,1% (v/v)

HybWash B

SSPE 0,1x
SDS 0,1% (v/v)

IPA-Farbstofflösung

3-Amino-9-ethyl-Carbazol (4 mg) in 1 ml Dimethylformamid

IPA-Färbelösung

IPA-Farbstofflsg.	500 µl
Na-Acetat-Puffer (pH 5,2), 3 M	132 µl
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂ , 30%)	20 µl
H ₂ O (bidest.)	19,5 ml

Lysis-Puffer

EDTA	100 mM
Tris-Cl	10 mM
SDS	0,5% (v/v)

MACS-Waschpuffer

BSA	2% (w/v)
Autologes Plasma (hitzeinaktiviert)	10% (v/v)
EDTA	2 mM
in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	

Southern-Denaturierungslösung

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Southern-Neutralisierungslösung

NaCl	3 M
Tris-Cl (pH 7,5)	0,5 M

20x SSC

NaCl	3 M
Na-Citrat	0,3 M
pH 7,0 mit NaOH einstellen	

20x SSPE

NaCl	3 M
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,2 M
EDTA	20 mM
pH 7,4 mit 10N NaOH einstellen	

STE-Puffer, pH 8,0

NaCl	100 mM
Tris-Cl	10 mM
EDTA	1 mM

TE, pH 7,5/pH 8,0

Tris/HCL	10 mM
EDTA	1 mM
pH mit HCl einstellen	

TAE, pH 7,5

Tris-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

TFB1

Kaliumacetat	30 mM
RbCl ₂	100 mM
CaCl ₂ ×2H ₂ O	10 mM
MnCl ₂ ×4H ₂ O	50 mM
Glycerin	15% (v/v)
pH 5,8 mit Essigsäure einstellen, sterilfiltrieren	

TFB2

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glycerin	15% (v/v)
pH 6,5 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren	

X-Gal-Färbelösung

K ₃ Fe(CN) ₆	5 mM
K ₄ Fe(CN) ₆ ×3H ₂ O	5 mM
MgCl ₂	1 mM
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galctopyranosid)	1 mg/ml

X-Gal-Fixierlösung

Formaldehyd	2% (v/v)
Glutaraldehyd	0,2% (v/v)
in PBS (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺)	

2.2.2 Kulturmedien**Luria-Bertani Medium (LB)**

Bacto-Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	1,0% (w/v)

SOC Medium

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

Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)

(Dulbecco et al. [1959], Smith et al. [1963])

RPMI 1640

(Moore et al. [1967])

Einfriermedium

FCS	20% (v/v)
DMSO	10% (v/v)
Gln	0,2 mM
NSP	angegebene Konz.

in DMEM bzw. RPMI 1640

2.3 Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration	Stammlösung	Bezugsquelle
Ampicillin	50 µg/ml	50 mg/ml in H ₂ O/EtOH 1:1	Boehringer Mannheim
Blasticidin (Bsr)	5 µg/ml	250 µg/ml	ICN
Genticin (G418)	500 µg/ml	40 mg/ml	Gibco BRL
Hygromycin	100 µg/ml	10 mg/ml	Invitrogen
Kanamycin	50 µg/ml	10 mg/ml in H ₂ O	Boehringer Mannheim
Neomycin	100 µg/ml	25 mg/ml	Merck
Penicillin	100 Einheiten/ml	2,5 × 10 ⁵ Einheiten/ml	Calbiochem
Puromycin	1 µg/ml	50 µg/ml	ICN
Streptomycin	50 µg/ml	25 mg/ml	Calbiochem
Zeocin	50 µg/ml	100 mg/ml	Invitrogen

2.4 Bakterienstämme und Zellen**2.4.1 Bakterienstämme**

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> Top 10 F'	F' {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)}, <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <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 ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> Top 10	F', <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <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 ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10B	F', <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> λ ⁻ , <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Gibco BRL
<i>E. coli</i> GM2163	F', <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> (Str ^R), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam13::Tn9</i> (Cam ^R), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i> , <i>rfbD1</i>	New England Biolabs
<i>E. coli</i> XL1- Blue	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F'proAB <i>lacIq</i> ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene

2.4.2 Eukaryotische Zellen

Zellen	Charakterisierung	Literatur/Bezug
D17	canine Osteosarkom-Zelllinie	Watanabe, S <i>et al.</i> [1983]
GHOST CXCR4	humane Osteosarkom-Zelllinie abgeleite von HOS-Zellen; stabil transformiert mit CD4 und CXCR4; Tat-abhängige GFP-Expression	Owen, SM <i>et al.</i> [1998]
HT1080	Humane Fibrosarcom-Zelllinie	ECACC No 85111505
PM1	Humane T-Lymphozyten-Zelllinie	Lusso, P <i>et al.</i> [1995]
293 T	abgeleitet von humanen embryonalen Nierenzellen (293) transformiert durch großes T-Antigen von SV 40.	DuBridge, RB <i>et al.</i> [1987]
Alpha-1	Diploide humane Fibroblasten	Neumann-Häfelin (Univ. Freiburg)

2.5 Plasmide und Oligonukleotide

2.5.1 Plasmide

Plasmid	Charakterisierung	Bezugsquelle / Literatur
<i>Klonierungsvektoren:</i>		
pCDNA 3.1 (+)	CMV-Prom; BGHpA; f1 ori; SV40 ori; ColE1; Amp ^r ; Neo ^r ;	Invitrogen
pPBS-kRSPA	RSV-Prom; SV40 polyA; f1 ori; ColE1 ori; Amp ^r	Flory E (PEI)/ Dorn P <i>et al.</i> [1990]
pZeo SV2(+)	SV40-Prom; BGHpA; ColE1 ori; f1 ori; Zeo ^r	Invitrogen
pRep 4	RSV-Prom; SV40 polyA; ColE1 ori; OriP; EBNA-1; Amp ^r ; Hyg ^r	Invitrogen
pIRES-EGFP	CMV-Prom; MCS; IVS; IRES (ECMV); <i>egfp</i> ; BGH pA; ColE1 ori; Amp ^r	Clontech
pGTe-IRES-EGFP	pGemTeasy mit IRES-EGFP-Kassette aus pAKvBi-EGFP (Jespersen T, <i>et al</i> [1999])	Fischer N [PEI]
pEGFP-N1	CMV-Prom; EGFP; SV40 pA; f1 ori; SV40 ori; Kan ^r /Neo ^r ; HSVtkpA; pUC ori	Clontech

<i>Hüllprotein-Expressionsvektoren:</i>		
pHit 456	amphotropes MLV- <i>env</i> (4070A); CMV-Prom; SV40-polyA; Amp ^r ; SV40 ori.	Kingsman AJ (Oxford) / Soneoka Y <i>et al.</i> [1995]
pMD.G	VSV-G; HCMV-IEP; human beta globin IVS 2 und polyA; Amp ^r ;	Blömer U (Kiel)/ Ory D, <i>et al.</i> [1996]

pL128	HIV-1(NL.4-3)- <i>env</i> trunziert im C-tail 7 aa nach TM-Region; β -Aktin-Prom; Amp ^r , Neo ^r ;	Bosch V (Heidelberg)/ Wilk T <i>et al.</i> [1992]
pRep MB2 wt	SIV _{agm} - <i>env</i> in pRep 4	Stitz J [PEI]/Stitz J <i>et al</i> [2001]
pRep MB2 Δ 10	SIV _{agm} - <i>env</i> trunziert 10 aa nach TM-Region in pRep 4	Stitz J [PEI]/Stitz J <i>et al</i> [2001]
pcPBj-01	SIV _{smm} PBj- <i>env</i> in pcDNA3.1 (+)	Mühlebach MD (Diplom-Arbeit)
pALF-GaLVwt	wtGaLV- <i>env</i> aus pMOV-GaLV in pALF anstelle von RD114	Stitz J [PEI]/Stitz J, <i>et al</i> [2000]
pALF-GaLVtrAC	trunziertes GaLV- <i>env</i> ohne R-Peptid kodierende Region (letzten beiden aa gegen Ala-Cys ausgetauscht) in pALF	Stitz, J. [PEI]/Mühlebach MD, <i>et al</i> [2003]
pALF-MLVA	amphoMLV- <i>env</i> aus pHit456 in pALF	Stitz J [PEI]/Stitz J, <i>et al</i> [2000]
pALF-10A1	10A1-MLV- <i>env</i> aus pcDNA-10A1 in pALF	Stitz J [PEI]/Stitz J, <i>et al</i> [2000]
pRDF	RD114 <i>env</i> in pALF; Amp ^r ; Phleo ^r	Cosset F-L <i>et al.</i> [1995]

Env-deletierte Proviren ohne Markergen:

pPBj Δ env	<i>env</i> -deletierter SIV _{smm} PBj-Molekularklon PBj1.9, Amp ^r	Schweizer M (PEI)
pPBj Δ E Δ ATGnef	pPBj Δ env mit Mutation des Start-Codons des <i>nef</i> -Gens	diese Arbeit
pNL4-3 Δ env	<i>env</i> -deletierter HIV-Molekularklon NL4-3, Amp ^r	diese Arbeit

Env-deletierte Proviren mit Markergen (egfp):

pPBj Δ E-EGFP	pPBj Δ env mit IRES- <i>egfp</i> -Kassette aus pIRES-EGFP im zerstörten <i>env</i> -ORF.	diese Arbeit
pPBj Δ E-EGFP2	pPBj Δ env mit IRES- <i>egfp</i> -Kassette aus pGTe-IRES-EGFP im zerstörten <i>env</i> -ORF	diese Arbeit
pPBj Δ E-EGFP3	pPBj Δ env mit IRES- <i>egfp</i> -Kassette aus pGTe-IRES-EGFP im zerstörten <i>env</i> -ORF mit größerer Deletion als pPBj Δ E-EGFP2	diese Arbeit
pPBj Δ E-EGFP4	pPBj Δ env mit CMV- <i>egfp</i> -pA-Kassette aus pEGFP-N1 vor RRE kloniert	diese Arbeit
pPBj Δ E-EGFP6	pPBj Δ env mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 vor RRE kloniert	diese Arbeit
pPBj Δ E-EGFP7	pPBj Δ env mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 hinter RRE kloniert	diese Arbeit
pPBj Δ E Δ N-EGFP	pPBj Δ E Δ ATGnef mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 hinter RRE kloniert	diese Arbeit
pNL4-3 Δ E-EGFP	pNL4-3 Δ env mit IRES- <i>egfp</i> -Kassette aus pGTe-	diese Arbeit

	IRES-EGFP im zerstörten <i>env</i> -ORF	
pNL4-3ΔE-EGFP2	pNL4-3Δenv mit CMV- <i>egfp</i> -pA-Kassette aus pEGFP-N1 vor RRE kloniert	diese Arbeit
pNL4-3ΔE-EGFP3	pNL4-3Δenv mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 vor RRE kloniert	diese Arbeit
pNL4-3ΔE-EGFP4	pNL4-3Δenv mit CMV- <i>egfp</i> -Kassette aus pEGFP-N1 hinter RRE kloniert	diese Arbeit

<i>Verpackungskonstrukte:</i>		
pHit 60	CMV-Prom; MLV- <i>gag/pol</i> ; <i>gpt</i> ; SV40 ori; Amp ^r	Kingsman AJ (Oxford)/Soneoka Y <i>et al.</i> [1995]
pCMVΔR8.2	CMV-i.e.Prom; HIV- <i>gag/pol/rev/tat/vpr/vpu/vif/nef</i> ; InspA; Amp ^r ; f1 ori; SV40 ori; <i>gpt</i> ; SV40 pA	Blömer U (Kiel)/Naldini L <i>et al.</i> [1996]
pPBj-pack1	CMV-Prom; Ψ ^r ; SIV _{PBj} - <i>gag/pol</i> /akzessorische Gene, <i>env</i> -deletiert, BgH-pA, Amp ^r	diese Arbeit

<i>Reporter-Transfervektoren:</i>		
pMgSLΔelS-EGFP	pSPsldSV (Becker S, <i>et al</i> [1998]) mit <i>egfp</i> anstelle von <i>gp91 phox</i>	Steidl S (PEI)/Steidl S <i>et al</i> [2002]
pMgSLΔelS-lacZ	pSPsldSV (Becker S, <i>et al</i> [1998]) mit <i>lacZ</i> anstelle von <i>gp91 phox</i>	Steidl S (PEI)/Steidl S <i>et al</i> [2002]
pLEGFP-SN	= pLXSNE; MoMLV-LTRs + Ψ, MCS, EGFP, SV40-Prom, Neo ^r , ori, Amp ^r	Uckert W (Berlin)/Clontech
pHR CMV GFP	HIV-1-LTR's + Ψ; CMV-Prom; <i>egfp</i> ; Amp ^r ; SV40 ori; puc19 ori;	Blömer U (Kiel)/Naldini L <i>et al.</i> [1996]
pHR CMV LacZ	HIV-1-LTR's + Ψ; CMV-Prom; <i>lacZ</i> ; Amp ^r ; SV40 ori; puc19 ori;	Blömer U (Kiel)/Naldini L <i>et al.</i> [1996]
pPBj-V2-EGFP	SIV _{smmPBj} -LTR's + Ψ, akzessorische Gene, CMV-Prom; <i>egfp</i> ; Amp ^r	diese Arbeit

<i>Vollängen-Konstrukte</i>		
pPBj1.9	Vollängenvirus SIV _{smmPBj} Molekularklon 1.9 in pBlueScript kloniert; Amp ^r	Fultz PN (Birmingham, USA)/Dewhurst S <i>et al</i> [1990]
pNL4-3	Vollängenvirus HIV-1 Molekularklon NL4-3 in pUC18-Plasmid-backbone kloniert; Amp ^r	Flory E [PEI]/Adachi A <i>et al</i> [1986]
PSIVMB2	Vollängenvirus SIV _{agm} Molekularklon 3 in pUC 18 kloniert; Amp ^r	Cichutek K [PEI]/Baier M <i>et al</i> [1989]

<i>Luciferase-Reporterkonstrukte</i>		
pGL3-Basic	synth.-pA, MCS, <i>luc3</i> , SV40-pA, Amp ^r , f1 ori	Promega

pGL3-Control	pGL3-Basic mit SV40-Prom in MCS und SV40-Enhancer hinter SV40-pA	Promega
pGL3bas-PBjLTR-Luc	pGL3basic mit U3, R und TAR-region von SIVsmmPBj1.9 in MCS	diese Arbeit
pGL3bas-NL4-3LTR-Luc	pGL3basic mit U3, R und TAR-region von HIV-1 NL4-3 in MCS	diese Arbeit
pGL3bas-Agm3LTR-Luc	pGL3basic mit U3, R und TAR-region von SIVagm3mc in MCS	diese Arbeit

2.5.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK bezogen:

Antisense-del(*nef*) 5'-CAC GCC TGC GCT ACT TCT AGG AGG TAA CGC CAC CCG
TAC TGT AGG-3'

Sense-del(*nef*) 5'-CCT ACA GTA CGG GTG GCG TTA CCT CCT AGA AGT
AGC GCA GGC GTG-3'

Ava-CMV-EGFP(+) 5'-GCT TGA CCC GAG TTA ATA GTA ATC AAT TAC GGG GTC
-3'

Ava-SA-CMV- 5'-CAG TCG CTC GGG ATT GGG AGG TGG GTC TGA AAC
GAT

EGFP(-) AAT GGT GAA TGC GGC CGC TTT ACT TGT ACA GC-3'

PBj-U3(+) 5'-CTC GGC AGA TCTB CTG GAA GGG ATT TAT TAC AG-3'

PBj-U3/R/TAR(-) 5'-GCT CGG AAG CTT GTC TTT AAG CAA GCA AGC GTG-3'

NL4-3-U3(+) 5'-CTC GGC AGA TCT CTG GAA GGG CTA ATT CAC TCC-3'

NL4-3-U3/R/TAR(-) 5'-GCT CGG AAG CTT GGC TTA AGC AGT GGG TTC CCT
AG-3'

Agm3-U3(+) 5'-CTC GGC AGA TCT CTG GAT GGG ATT TAT TAC AG-3'

Agm3-U3/R/TAR(-) 5'-GCT CGG AAG CTT CTT TCT BAAG CCA AGG AGT CC-3'

Pcmv(+) 5'-GGT CGA AGC TTA GTT ATT AAT AGT AAT CAA TTA C-3'

Pcmv-SD(-) 5'-GCT TGT TGC ACT TAC CTG CAA CCG GAG GCC TCG ATC
TGA CGG TTC ACT AAA CCA G-3'

SD- <i>gag</i> (+)	5'-CGG TTG CAG GTA AGT GCA ACA AGC CAT GGG CGC GAG AAA CTC CGT C-3'
<i>gag</i> -PBj(BsmI)(-)	5'-CTG CGT GAA TGC ACC AAA GGA CGC AGA C-3'
<i>nef</i> -PBj(<i>Pst</i> I)(+)	5'-CTC AAG GAC GCT GCA GAG AGC C-3'
<i>nef</i> -BGH-pA(+)	5'-GAC AAG AAG AAA ACA AGC TAA GAC AGC GCC TCG ACT GTG CCT TCT AGT TGC-3'
<i>nef</i> -BGH-pA(-)	5'-GCA ACT AGA AGG CAC AGT CGA GGC GCT GTC TTA GCT TGT TTT CTT CTT GTC-3'
BGH-pA- <i>Not</i> I(-)	5'-GAC GAG CTG CGG CCG CTC CCC AGC ATG CCT GCT ATT GTC-3'
PBj-Probe1(+)	5'-GAG AAA AGA GTA GGA GAG TGG GAG-3'
PBj-Probe1(-)	5'-GGA CCC AAT TCA ATC CCT GCT AC-3'

2.6 Mikro- und Zellbiologische Methoden

2.6.1 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Flüssigkultur:

Die Bakterien werden in LB-Medium unter Zusatz eines zur Selektion bestimmten Antibiotikums in den angegebenen Konzentrationen normalerweise bei 37°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 - 0,6 erreicht ist. Tragen die Bakterien Plasmide, die eine hohe interne Rekombinationswahrscheinlichkeit aufweisen, wie z.B. Virusplasmide mit zwei LTR-Regionen, so werden diese Bakterien bei 25°C kultiviert.

Nährböden:

Die Kultivierung auf Nährböden erfolgt durch Ausstreichen von 100 µl Bakterien-suspension auf LB-Agar-Platten (1,5% (w/v) Agar-Agar), die ebenfalls mit einem Antibiotikum versetzt sein können. Diese Platten werden bei 37°C oder 25°C kultiviert, bis sich deutliche Kolonien zeigen. Danach können diese Platten für einige Zeit bei 4°C gelagert werden.

Lagerung:

Zur Lagerung werden in einem 1,5 ml Plastiksraubgefäß 850 µl Bakteriensuspension mit 150 µl Glycerin versetzt (15% (v/v) Glycerinlösung), 2-4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich auf -80°C eingefroren. Zur erneuten Kultivierung wird etwas der gefrorenen Vorratslösung mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in Flüssigkulturmedium gegeben.

2.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Um Plasmide in Bakterien (alle Abkömmlinge von *Escherichia coli* K12) einbringen und dort vervielfältigen zu können, müssen die Bakterien speziell vorbehandelt werden. Nach dieser Behandlung sind die Bakterien „kompetent“ zur Aufnahme von DNA.

100 ml LB-Medium werden mit 2,5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert, bis eine OD₅₅₀ von 0,5 - 0,55, d.h. die logarithmische Wachstumsphase, erreicht war. Die Kultur wird 5 min auf Eis inkubiert, anschließend auf zwei Portionen (je 50 ml) aufgeteilt und pelletiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min). Die Zellen werden in 20 ml TFB1-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und wiederum pelletiert (6.000 rpm, 4°C, 10 min). Nach Resuspendierung in 2 ml TFB2-Puffer folgt eine weitere 15-minütige Inkubation auf Eis. Die Zellsuspension wird nun auf Eis aliquotiert (je 100 µl) und bei -80°C eingefroren.

2.6.3 Transformation von Bakterien

Ein 100 µl-Aliquot kompetenter Bakterien (i.d.R. *E. coli* Top 10 oder Top 10 F') wird langsam auf Eis aufgetaut. Es werden 50 ng bis 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und nach vorsichtigem Mischen mit der Pipettenspitze 1 h auf Eis inkubiert. Daraufhin folgt eine Inkubation im Wasserbad (42°C) für 60 sec, anschließend sofort Kühlung auf Eis. Der Ansatz wird in 1 ml SOC-Medium ohne Selektionsantibiotikum gegeben und 90 min bei 37°C bzw. 25°C geschüttelt. Danach werden je 100 µl dieser Suspension unverdünnt und 1:100-verdünnt auf eine LB-Agarplatte, die mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum in der oben angegebenen Konzentration (Kap. 2.3) versetzt ist, ausgestrichen. Diese Platte wird bei 37°C bzw. 25°C inkubiert, bis sich die Bakterienkolonien zeigen.

Besonders große Plasmide (>10 kb) können in *E. coli* DH10b, kleinere Plasmide (<5 kb) in *E. coli* DH5 α transformiert und amplifiziert werden. Sollten die Plasmide nicht durch die Bakterien methyliert werden, so wurden sie in *E. coli* GM2163 transformiert.

2.6.4 Kultivierung und Lagerung von eukaryotischen Zelllinien

Alle Zelllinien werden in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus) bei 37°C, 6% CO₂ und in gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert.

Adhärent wachsende Zelllinien werden in DMEM (Dubecco's modified Eagle Medium) mit 10% komplement-inaktiviertem (56°C 30 min) fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin und den Antibiotika Neomycin, Streptomycin und Penicillin [= „NSP“] in den oben angegebenen Konzentrationen kultiviert. Für die Kultivierung von GHOST-Zellen enthält dieses Medium zur Selektion zusätzlich Hygromycin, Genticin (G418) und Puromycin in den oben angegebenen Konzentrationen.

Alle adhärennten Zelllinien werden jede Woche 2 – 3x im Verhältnis 1:10 passagiert. Dazu wird der Medienüberstand in den Kulturflaschen verworfen und die Kulturen anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen werden daraufhin mit 5 ml einer 1 mM EDTA-Lösung (in PBS) gewaschen. 3 ml dieser Waschlösung werden verworfen, mit den verbleibenden 2 ml wird die Kultur bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle unter dem Mikroskop zeigt nach einigen Minuten die vollständige Ablösung der Zellen. Die abgelösten Zellen werden in 8 ml frischem Medium aufgenommen, von den so in der Kulturflasche vorhandenen 10 ml Zellsuspension werden 9 ml wieder verworfen oder zur Anzucht neuer Kulturen verwendet, der letzte Milliliter wird mit 19 ml frischem Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zur Lagerung der verschiedenen Zelllinien werden Zellen auf -80°C eingefroren. Dazu werden je eine Kultur in großen Kulturflaschen suspendiert und die Zellen aus dem Nährmedium abzentrifugiert (10 min 1200 rpm 4°C, Heraeus Minifuge). Das Pellet wird in 7,5 ml gekühltem (4°C) Einfriermedium aufgenommen, die resultierende Suspension wird auf 5 ebenfalls vorgekühlte (-20°C) 2 ml Cryoröhrchen (Nunc) verteilt und für 2 - 4 h bei -20°C eingefroren. Diese gefrorenen Kulturen werden anschließend bei -80°C gelagert, bevor sie in Flüssigstickstoff überführt werden.

Zum Wiederauftauen wird das Cryoröhrchen angetaut und das teilweise noch gefrorene Medium in 30 ml frische Kulturmedium bei 37°C gegeben. Nach 4 h erfolgt ein Medienwechsel.

2.6.5 Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Zur Gewinnung primärer, peripherer Blutlymphozyten (PBL) werden zunächst die mononukleären Zellen (PBMC) aus frischem Citrat-Blut gesunder Spender isoliert. 15 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque (Sigma, Taufkirchen) werden in einem 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) vorsichtig mit 15-30 ml Blut überschichtet und anschließend für 30 min zentrifugiert (1.000 rpm, 25°C, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Hierbei sedimentieren die roten Blutkörperchen und Granulozyten auf den Boden des Röhrchens. Über der Ficoll-Lösung sammeln sich die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (im ‚Lymphozytenring‘) und über diesen das Plasma. Letzteres wird abgenommen und Hitzeinaktiviert (30 min 56°C). Der Lymphozytenring wird abgezogen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die PBMC werden zweimal mit je 35 ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Daraufhin erfolgt die Lyse restlicher Erythrozyten durch 10-minütige Inkubation der Zellen in 10 ml PBS mit 0,86% NH₄Cl bei 37°C. In zwei Waschschrritten mit je 35 ml vorgewärmten PBS wird das NH₄CL entfernt. Die Zellen werden zur weiteren Kultivierung anschließend in einer Dichte von ca. 1x10⁶/ml in X-Vivo 10 Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien) aufgenommen. Zur Depletion der Monozyten und Makrophagen kann diese Zellsuspension 4 h – o/n in einer Zellkulturflasche im Brutschrank inkubiert werden. In dieser Zeit adherieren die Monozyten und Makrophagen an der Plastikoberfläche, und eine monozytenfreie PBMC-Population wird mit dem Medium abgenommen.

2.6.5.1 Isolierung von Monozyten durch Magnetische Zell-Separierung (MACS)

Um eine reine, völlig unstimulierte Monozyten-Population für nachfolgende Experimente zur Verfügung zu haben, wurde in dieser Arbeit die Magnetische Zell-Separierung (*Magnetic cell separation*, MACS) unter Verwendung des Monocyte Isolation Kits (Milteniy Biotech, Bergisch Gladbach) angewandt. Hierzu werden Ficoll-präparierte PBMC nach dem letzten PBS-Waschschritt 1x mit MACS-Puffer gewaschen und das Pellet

anschließend pro 10^7 Zellen in 60 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Es erfolgt die Zugabe von 20 μ l FcR-Blocking Reagent und 20 μ l Hapten Antibody Cocktail. Die Suspension wird gut gemischt und 10 min bei 6 – 9°C inkubiert. Die Zellen werden in 15 Vol MACS-Puffer 2x gewaschen. Das Pellet wird wiederum in 60 μ l MACS-Puffer aufgenommen und 20 μ l FcR-Blocking Reagent und 20 μ l Antibody Microbeads werden zugegeben. Die Suspension wird gut gemischt und 15 min bei 6 – 9°C inkubiert. Die Zellen werden in 15 Vol MACS-Puffer 1x gewaschen, das Pellet anschließend in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen. Eine LS/VS-MACS-Säule wird mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült. Die Zellsuspension wird auf die Säule aufgegeben und mit 4x 3 ml MACS-Puffer werden die unmarkierten Monozyten von der Säule eluiert und befinden sich im Durchfluß.

2.6.6 Stimulierung von peripheren Blut-Lymphocyten (PBL)

Nach der Isolation der PBMC werden die Zellen zur Stimulation der PBL für drei Tage auf Platten, die mit den monoklonalen Antikörper (mAb) UCHT1 (anti-huCD3) und CD28.2 (anti-huCD28) (Becton Dickinson, Heidelberg) beschichtet sind, kultiviert. Dazu wurden 24-Loch-Gewebekulturplatten (Becton Dickinson) mit einer Antikörper-Lösung in X-Vivo 10 [10 μ g/ml je mAb] zwei Stunden bei 37°C inkubiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Bevor die Zellen auf die beschichteten Platten gegeben werden, werden die Platten einmal mit Medium gewaschen. Die Zellen werden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 1 ml Medium pro 24-Lochbohrung ausgesät. Unter diesen Stimulationsbedingungen werden alle übrigen Bestandteile der PBMC-Suspension (B-Zellen, NK-Zellen etc) überwachsen, so dass nach der Stimulation eine 95-98% reine Lymphozytenpopulation vorliegt, was durch durchflußzytometrische Analyse auf den T-Zell-Marker CD3 (DAKO Diagnostika, Hamburg) bestätigt wird.

2.6.7 Kultivierung von PBMC

2.6.7.1 Kultivierung unstimulierter PBL/PBMC

Unstimulierte PBMC werden nach Monozytendepletion direkt in X-Vivo 10 mit 10% hitzeinaktiviertem, autologem Plasma aufgenommen. Diesem Medium können 50 U/ml rekombinantes humanes Interleukin 2 (rhIL-2, Chiron, Marburg) zugesetzt werden. Zur Vermeidung eines jeglichen Stimulus wird jedoch meistens auf sämtliche Zusätze zu dem

oben beschriebenen Medium verzichtet. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 7% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37°C.

2.6.7.2 Kultivierung stimulierter PBL

Stimulierte PBL werden während und nach Stimulation in X-Vivo 10, das mit 10% FCS, 10% autologem Plasma (Hitze-inaktiviert), 2 mM Glutamin (Biochrom KG, Berlin), Antibiotika (100 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin, Biochrom KG) und 200 Einheiten rhuIL-2 supplementiert war, kultiviert. Die Kultivierung erfolgt im Brutschrank bei 7% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatosphäre bei 37°C.

2.6.7.3 Kultivierung von Monozyten

Monozyten werden nach MACS-Separation in einer Dichte von 5×10^4 Zellen/well in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und in RPMI 1640 + 10% autologem Plasma + 0,5% FCS kultiviert. Die Monozyten adherieren an die Plastikoberfläche der Zellkulturgefäße und können über einen längeren Zeitraum (> 2 wo) in dem oben beschriebenen Medium gehalten werden. In dieser Zeit differenzieren die Monozyten unter den beschriebenen Bedingungen in Makrophagen aus (Neil S, 2001).

2.6.8 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Einschleusung von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurden Transfektionsmethoden mit Liposomen oder der Nucleofector (Amaxa biosystems, Köln) genutzt. Die Liposomen nehmen Plasmid-DNA auf und verschmelzen anschließend mit den Membranhüllen der zu transfizierenden Zellen. Die in den Liposomen enthaltene DNA wird über Endozytose in die Zellen aufgenommen. Bei der Nucleofection handelt es sich um eine Elektroporationsmethode optimiert für schwer zu transfizierende eukaryotische Zellen.

2.6.8.1 Transfektion mit Lipofectamin Plus

Das Transfektionsreagenz Lipofectamin Plus wurde von Invitrogen erworben. 24 h vor Transfektion werden die zu transfizierenden Zellen in einer definierten Dichte in 6-Lochplatten ausgesät (293T: 6×10^5 /6-well), so daß bei Transfektion die Zellen in 60-90% Konfluenz vorliegen. In ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß werden 1-2 µg DNA in 100 µl Serum-freien OptiMemI verdünnt; dieser Lösung werden 6 µl PLUS Reagens zugegeben,

gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 5 µl Lipofectamin in 100 µl OptiMemI gelöst, diese Lösung wird mit der DNA-Lösung gemischt und weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wird bei den zu transfizierenden Zellen das Kulturmedium durch 800 µl OptiMemI ersetzt. Danach wird die DNA-Lipofectamin-Lösung auf die Zellkulturen gegeben und 4 h bei 37°C im Kulturschrank inkubiert. Anschließend folgt ein Medienwechsel, bei dem die Kulturen wieder mit Kulturmedium bedeckt werden. Nach 24 - 48 h können Reportergene nachgewiesen bzw. Vektorüberstände geerntet werden. Die Transfektion in größeren Zellkulturgefäßen ist möglich. Die Transfektionsansätze werden hierzu lediglich dem Faktor der vergrößerten Kulturfläche angepasst.

2.6.8.2 Transfektion mit dem Nucleofector

Da sich PBMC nur sehr schwer durch Lipofektion transfizieren lassen, wurde in dieser Arbeit der Nucleofector (Amaxa biosystems, Köln) verwendet, um die transkriptionelle Aktivität der verschiedenen lentiviralen LTRs in den entsprechenden Luciferase-Reporterkonstrukten in primären Zellen zu studieren. Hierzu wurde der „Human T cell Nucleofector Kit“ (Amaxa biosystems) nach Angaben des Herstellers verwendet. Transfiziert werden PBMC direkt nach Ficoll-Aufreinigung bzw. nach Stimulation. Je Ansatz werden 5×10^6 Zellen abzentrifugiert (10 min 1200 rpm RT) und in 10 – 12 ml „Wash Buffer“ (RT) gewaschen; danach erneut abzentrifugiert. Die Zellen werden je Ansatz in 100 µl „Nucleofector solution“ aufgenommen (Zellen nicht länger als 20 min in „Nucleofector solution“ aufbewahren) und die vorbereitete DNA, die in die PBMC transfiziert werden soll (1 – 5 µg je Ansatz), wird zugemischt. Die DNA/Zell-Mischung wird in eine amaxa-Küvette überführt und in den Nucleofector gesteckt. Das Programm U 14 wird gewählt und gestartet. Nach Ablauf des Programms wird die Zellsuspension in ein vorbereitetes 12-Loch-Kulturgefäß, gefüllt mit 1 ml RPMI1640 + 10% FCS, überführt und für 6 h bis zur Analyse im Brutschrank inkubiert.

2.6.9 Präparation von retroviralen Vektoren

Um die von den Verpackungszellen oder transfizierten Zellen gebildeten Vektoren zu gewinnen, wird 42 – 72 h nach Transfektion der Überstand abgenommen und zur Abtrennung von Verpackungszellresten 5 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand

wird anschließend mit einem 450 nm Sterilfilter filtriert. Dieses Filtrat wird entweder direkt zur Transduktion von Zielzellen eingesetzt, in Aliquots bei -80°C eingefroren, oder aufkonzentriert.

2.6.10 Konzentration und Aufreinigung von retroviralen Vektoren durch Ultrazentrifugation

Retrovirale Partikel mit Hüllproteinen wie z.B. VSV-G, die gegen Scherkräfte relativ unempfindlich sind, lassen sich sehr einfach und effektiv durch Pelletierung der Partikel mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (UZ) aufkonzentrieren. Diese Konzentration kann mit einer Aufreinigung verbunden werden, in dem die Partikel durch eine 20%ige Saccharose-Lösung in STE-Puffer pelletiert werden. Diese Lösung hat eine Dichte von 1,08 g/ml, so dass die retroviralen Partikel (Dichte = 1,16 g/ml) noch pelletiert werden, alle anderen Bestandteile des Mediums mit einer geringeren Dichte jedoch nicht.

Zur Konzentration wird der frisch filtrierte, vektorhaltige Zellkulturüberstand entweder direkt in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen, 25x89 mm (Beckman-Coulter GmbH, Krefeld) oder auf die beschriebene 20%ige Saccharoselösung in einem solchen Röhrchen gegeben. Diese Röhrchen werden für 2 h bei 4°C und 25.000 rpm in einem SW28-Rotor (Beckman-Coulter GmbH) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in jeweils 100 – 250 μl Medium oder PBS auf einem Schüttler für 1 h bei 4°C wieder gelöst. Das so erhaltene Vektor-Konzentrat wird bei -80°C gelagert.

2.6.11 Titration von retroviralen Vektoren

Der Überstand der 24 h zuvor ausgesäten Zielzellen, die dann eine ca. 50% Konfluenz aufweisen, wird abgenommen und die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Jeweils 400 μl Vektorlösung werden unverdünnt und in den verschiedenen Verdünnungsstufen pro Loch in eine 12-Lochplatte zu den Zielzellen zugegeben. Nach 4 h Inkubation im Brutschrank erfolgt ein Medienwechsel mit frischem Kulturmedium. Die transduzierten Kulturen werden weiter bis zur Analyse ca. 48 h nach Transduktion bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.6.12 Transduktion von PBMC/PBL

Zur Transduktion von PBMC bzw. PBL wurde in dieser Arbeit ein durch Frau Dr. Isabel Schmitt etabliertes Transduktionsprotokoll angewendet (Doktorarbeit). Im Kern handelt es

sich um die wiederholte Zentrifugation von PBMC/PBL in vektorhaltiger Suspension auf RetroNectin-beschichteten Zellkulturplatten.

2.6.12.1 Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten

Retronektin ist ein rekombinantes Fragment aus humanem Fibronektin. Es enthält spezifische Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren, als auch für hämatopoetische Zellen (Hananberg H, 1996). Die Co-Lokalisierung von Vektoren und Zellen auf Retronektin-beschichteten Platten führt zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz (Fehse B, 1998).

Zur Transduktion primärer T-Zellen wurden unbeschichtete 24- oder 48-Lochplatten (BD Falcon, Heidelberg) mit Retronektin (TAKARA, OTSU, Japan, über BioWhittaker Europe, Taufkirchen) beschichtet. Dazu wurden 250 bzw. 150 µl Retronektinlösung (0,1 mg/ml) je Vertiefung der 24- bzw. 48-Lochplatte gegeben und für eine Stunde offen unter UV-Licht inkubiert. Nach einer weiteren halben Stunde unter UV-Licht mit geschlossenem Plattendeckel wurde die Retronektinlösung abgenommen und 250 µl einer 2%-igen BSA-Lösung zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in die Vertiefungen gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten zweimal mit HBSS (Hanks Buffered Saline Solution)-Puffer (*"Hanks 'Balanced Salts"*, Sigma, Taufkirchen) gewaschen und zur Lagerung bei 4°C mit 1 ml PBS überschichtet. Die Retronektin-beschichteten Platten können bei 4°C mehrere Monate gelagert werden.

2.6.12.2 Transduktion primärer Lymphozyten

Die Transduktion der stimulierten primären T-Zellen erfolgte nach einem von Dr. I. Schmitt, PEI, Langen optimierten Protokoll, auf Retronektin-beschichteten 48- oder 24-Lochplatten. 5×10^4 Zellen in 250 µl Medium wurden mit bis zu 1 ml Vektorüberstand transduziert. Die Transduktionsansätze wurden auf eine Konzentration von 4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen) und 200 U/ml IL-2 mit 10% FKS und 10% autologem Plasma eingestellt. Anschließend wurden die Platten für 90 min bei 32°C und 1.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert und weitere 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Halbmediumwechsel. Die Transduktion wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. Die durchflußzytometrische Analyse erfolgte drei Tage nach der letzten Transduktion.

2.6.12.3 Herstellung Antikörper-beschichteter Zellkulturplatten und Stimulation primärer Lymphozyten

Um primäre Lymphocyten zu stimulieren wurde in dieser Arbeit auf die Co-Stimulation mit anti-huCD3- und antihuCD28-monoklonalen Antikörpern (mABs) zurückgegriffen. Zu diesem Zweck müssen beide Antikörper an die gleiche Oberfläche gebunden vorliegen, um durch Kontakt zu den entsprechenden T-Zellrezeptoren den Stimulus auslösen zu können. Dazu werden beide Antikörper (α CD3: UCHT-1, α CD28: CD28.2; Pharmingen) in einer Konzentration von jeweils 10 μ g/ml in X-Vivo 10 gelöst und je 1 ml dieser Lösung pro Loch einer 24-Loch Gewebekulturplatten gegeben. Diese Platte wird 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und o/n bei 4°C gelagert. Bevor die Zellen auf diese Platten gegeben werden, wird die Antikörper-Lösung entfernt und die Platte 1x mit Zellkulturmedium gewaschen. Zur Stimulation werden die über einen Ficoll-Stufengradienten aufgereinigten PBMC in einer Dichte von 1×10^6 /ml in Zellkulturmedium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wird 1 ml in jedes Loch der mAb-beschichteten 24-Loch-Platte gegeben und für 72 h im Brutschrank inkubiert.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 Restriktion von DNA

Die Restriktionsspaltungen werden in den vom Hersteller gelieferten Puffern durchgeführt. Für analytische Restriktionen klonierter DNA wird 1 μ g DNA in einem Volumen von 20 μ l, für präparative Restriktionen ca. 10 μ g DNA in 100 μ l eingesetzt. Es werden 5 bis 10 Units Restriktionsendonuklease pro μ g DNA verwendet. Dabei sollte der Anteil der Restriktionsendonukleaselösungen am Gesamtansatzvolumen nicht 10% überschreiten. Bei einigen Enzymen wurde nach Angabe des Herstellers 0,1 mg/ml BSA zugegeben. Der hydrolytische Verdau erfolgte bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym empfohlenen Temperatur für 2 bis 24 h. Die meisten Enzyme können zum Stopp der Restriktion durch 20 min Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert werden.

2.7.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) verwendet. Es enthält neben der Taq DNA Polymerase die ebenfalls thermostabile Pwo DNA-Polymerase. Die Mischung beider Polymerasen vermindert nach Angaben des Herstellers durch die inherente

„proofreading“-Aktivität der Pwo-DNA-Polymerase die in den Produkten auftretende Fehlerrate um den Faktor 3 im Vergleich zu der Taq-Polymerase alleine. Ein Standard-PCR-Ansatz wird in zwei Mastermixen getrennt angesetzt. Diese beiden Mixe enthalten jeweils:

Mastermix 1:

750 ng Template DNA
300 nM 5'-Primer
300 nM 3'-Primer
5 µl dNTP-Mix (100 mM)
ad 50 µl H₂O (bidest)

Mastermix 2:

10 µl Expand HF Puffer (10×, 15mM MgCl₂)
0,75 µl Enzym-Mix (entspricht 2,6 U)
39,25 µl H₂O (bidest)

Diese beiden Mastermixe werden auf Eis in einem dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäß zusammengegeben und in einem PTC 200 Thermocycler inkubiert, das PCR-Programm gestartet und die programmierten PCR-Zyklen (i.d.R. 18 – 30 Zyklen) laufen ab. Vor Beginn des 1. Zyklus wird der gesamte Ansatz zuerst für 3 min auf 96°C gebracht, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Jeder Zyklus beginnt mit einem 15 sec Denaturierungsschritt bei 96°C, in dem die DNA-Duplexe des vorangegangenen Zyklus aufgeschmolzen werden. Anschließend folgen 30 sec Annealing der Primer an die zu amplifizierende Sequenz. Die Temperatur dieses Schritts richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primern (nach Angabe der Hersteller). Schließlich folgt der Amplifikationsschritt bei 68°C für 1 min pro kb zu amplifizierender Sequenz. Nach Ende des letzten Zyklus schließt sich eine Inkubation über 7 min bei 68°C an, um eine Vervollständigung der Polymerisation aller begonnenen Fragmente zu gewährleisten. Am Ende des Programms wird der gesamte Ansatz auf 4°C gekühlt.

2.7.2.1 Fusions-PCR

Um zwei DNA-Fragmente punktgenau aneinander fusionieren zu können, kann eine Fusions-PCR durchgeführt werden. Dabei handelt es sich im Grunde um 3 einzelne PCRs, die aufgrund der Konstruktion der Primer der beiden ersten PCR-Reaktionen in der dritten PCR die Endprodukte der vorangegangenen Reaktionen fusionieren. Hierzu werden bei den beiden ersten Reaktionen die DNA-Sequenzen, die fusioniert werden sollen, über PCR amplifiziert. Die Primer an der Stoßstelle beider Sequenzen werden in beiden Reaktionen so gewählt, dass sie sich wenigstens 20 bp überlappen. In der 3. PCR-Reaktion werden nun nur noch die beiden PCR-Produkte und die äußeren Primer der ersten Reaktionen eingesetzt. Dadurch, dass sich die Stoßstellen überlappen, können sich die beiden PCR-

Produkte gegenseitig primen, und das so fusionierte DNA-Fragment wird über die äußeren Primer exponentiell amplifiziert.

2.7.3 Gerichtete Punkt-Mutagenese

Um gezielte Punktmutationen in DNA-Sequenzen einzuführen, wurde in dieser Arbeit das QuickChange site-directed mutagenesis Kit (Stratagene, LaJolla, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die zu mutierende Sequenz muss in höchstens 7 kb großen, methylierten Plasmiden vorliegen. Die gewünschten Mutationen werden über höchstens 45 bp große Primer eingeführt, die die Mutation enthalten und up- und down-stream der Mutation(en) 10-15 bp komplementär zum Ausgangsplasmid sind. Die Primer liegen in einem Mutations-Ansatz sowohl in sense- als auch in anti-sense-Richtung vor. Über 10-18 PCR-Zyklen werden die einzelnen Plasmidstränge, ausgehend von den mutagenen Primern, vollständig komplementiert. Anschließend wird die nicht mutierte, methylierte Ausgangs-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI*, das nur methylierte Sequenzen erkennt, abgebaut. Die neu synthetisierten, mutierten DNA-Stränge werden in *E. coli* XL1-Blue transformiert, in den Bakterien religiert und amplifiziert. Alle Mutationen werden durch Sequenzierung überprüft.

2.7.4 Auftrennung und Analyse von DNA mit Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten werden TAE-Agarose-Gele benutzt. Für Fragmente im Größenbereich zwischen 0,5 und 9 kb werden 1%ige Agarose-Gele verwendet. Sind die Fragmente größer oder für Southern-Blots verringert sich der Agarose-Anteil auf 0,8%; bei Fragmenten kleiner als 0,7 kb werden 1,3%ige Agarose-Gele eingesetzt. Dazu wird die Agarose mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer aufgekocht und das Gel nach Zugabe von 50 µg/ml Ethidiumbromid gegossen. Die DNA-Proben werden mit 0,2 Vol DNA-Probenpuffer (6-fach) versetzt, auf das Gel aufgetragen und bei einer Spannung zwischen 10 und 200 V aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die aufgetrennten DNA-Banden bei UV-Belichtung betrachtet und durch Video-Ausdruck dokumentiert.

Als Größenstandards werden auf den Gelen die 1 kb- oder die 100bp-DNA-Ladder (NEB) verwendet, je nach Größe der zu analysierenden Fragmente.

2.7.5 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

2.7.5.1 QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit

Um DNA-Fragmente aus präparativen Gelen reisolieren zu können, wurde meistens das QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen) verwendet. Die entsprechende Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Plastikreaktionsgefäß überführt (maximal 300 mg). Dieser Agarose werden 3 Volumen QX1-Puffer zugegeben und bei 50°C so lange geschüttelt (600 rpm), bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Dieser Lösung werden 30 µl QIAEX II-Suspension (suspendiertes Silikat-Pulver) zugegeben und weitere 10 min unter Schütteln (1.200 rpm) bei 50°C inkubiert. Daraufhin wird der Ansatz 30 sec bei 14.000 rpm in einer Eppendorff-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird zur Entfernung restlicher Agarose nochmals in 500 µl QX1-Puffer durch starkes Mischen resuspendiert und wiederum 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit PE-Puffer gewaschen und luftgetrocknet. Zur Elution der an den Silikat-Kügelchen gebundenen DNA werden 20 µl TE-Puffer zugegeben, 5 min bei 50°C inkubiert und anschließend 30 sec bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthält die DNA und kann vom Pellet abgenommen werden.

2.7.5.2 Phenol-Aufreinigung

Zur Gewinnung besonders reiner DNA als Sonde für die Southern Blot Analysen wurde die über PCR oder Restriktion von Plasmiden hergestellte DNA mit Hilfe von Phenol aus den Agarose-Gelen isoliert. Hierzu wurde das die DNA enthaltende Stückchen Agarose in kleine Würfel (Kantenlänge ca. 1 mm) zerteilt und mit 1 Vol Phenol 15 sec. kräftig gevortext. Nach 30 min Inkubation auf -80°C wird der Ansatz in einer Biofuge fresco (Heraeus, Hanau) zentrifugiert (20 min 13.000 rpm 4°C). Die wässrige Phase wird abgenommen, mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation (10 min 13.000 rpm 4°C) wird die wässrige Phase abgenommen, mit 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt und gevortext. Der Ansatz wird wieder zentrifugiert (10 min 13.000 rpm 4°C) und die wässrige Phase abgenommen. Aus der wässrigen Phase wird die DNA über Ethanol-Fällung präzipitiert.

2.7.5.3 Ethanol-Fällung

Aus wässrigen Lösungen kann die in der Lösung enthaltene DNA mit Ethanol ausgefällt werden. Hierzu wird der wässrigen Lösung 0,1 Vol Natriumacetatlösung (3M) zugegeben und nach Mischen erfolgt die Zugabe von 2 Vol Ethanol p.A. (-20°C). Der Ansatz wird gut gemischt, 20 min bei -20°C inkubiert, und abzentrifugiert (Biofuge fresco, 20 min 13.000 rpm 4°C). Der Überstand wird verworfen und das DNA Pellet mit 1 Vol 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut abzentrifugiert (5 min 13000 rpm 4°C). Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt. Das Pellet wird anschließend bei RT luftgetrocknet, bis das gesamte Ethanol verdampft ist. Das getrocknete Pellet wird anschließend in H₂O_{dd} oder TE-Puffer aufgenommen und kann bei 4°C oder -20°C gelagert werden.

2.7.6 Dephosphorylierung von DNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP)

Die CIP hydrolysiert 5'-endständige Phosphatgruppen von DNA. Sie wird genutzt, um die Enden eines Klonierungsvektors mit kompatiblen Enden zu dephosphorylieren, da dann keine Selbst-Ligation dieses Vektors mehr auftreten kann.

89 µl der DNA-Lösung werden mit 10 µl NEB-Puffer 3 und 1 µl CIP (10 U) versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wird die DNA über ein präparatives Agarose-Gel oder über das QIAQuick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.7 Auffüllen überstehender DNA-Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I („Klenow-fill-in“)

Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, das die 3'-5'-Exonuklease-Funktion und die Polymerase-Einheit enthält, entfernt überstehende 3'-Enden eines DNA-Fragments und füllt überstehende 5'-Enden auf. Hier wird diese Funktion dazu genutzt, um nach einem Restriktionsverdau die überstehenden Enden („sticky ends“) des Fragments zu glatten Enden („blunt ends“) aufzufüllen und um das Fragment damit für eine „blunt-end“-Klonierung nutzbar zu machen.

Dazu wird folgender Ansatz genutzt:

10 µl EcoPol Puffer (NEB)
1 µl Klenow-Fragment (5 U)
3,3 µl dNTP's (1 mM)
10 µg DNA-Fragment
ad 100 µl H ₂ O bidest

Dieser Ansatz wird 15 min bei 25°C inkubiert und die DNA über ein präparatives Agarose-Gel oder über das QIAQuick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.7.8 Ligation

Für eine Ligation werden folgende Ansätze verwendet:

2 - 10 µg DNA (beide zu ligierenden Fragmente equimolar)
5 µl T4-DNA-Ligase
5 µl T4-DNA-Ligase-Puffer (10×)
ad 50 µl H₂O (bidest)

Diese Ansätze werden 1 h –o/n bei 16°C inkubiert. Anschließend wird die T4-DNA-Ligase durch 10-minütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert und die ligierte DNA direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt bzw. bei -20°C eingefroren.

2.7.9 Isolierung kleiner Mengen von Plasmid-DNA („Mini-Präp“)

Zur Isolation kleiner Mengen DNA aus 5 ml Übernachtskulturen wurde das Qiagen Mini-Präp-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. 4,5 ml einer Übernachtskultur werden bei 4500 rpm für 10 min bei 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und in Eppendorff-Reaktionsgefäße überführt, in denen 250 µl P2-Puffer vorgelegt sind. Nach gutem Mischen durch mehrmaliges Umdrehen folgt die Zugabe von 500 µl N3-Puffer und erneutes Mischen. Einer 10-minütigen Inkubation auf Eis folgt eine Zentrifugation (10 min 13.000 rpm 4°C). Der Überstand wird direkt auf Qiavac-8-strips (Silikat-Säulchen) in der Qiagen-Vakuum-Apparatur aufgegeben. Das Säulchen wird einmal mit 1 ml PB-Puffer und zweimal mit je 1 ml PE-Puffer gewaschen. Es folgen 5 min Vakuum, nach denen die Säulchen an ihrer Unterseite kurz abgetrocknet und auf die beschrifteten „collection tubes“ aufgesetzt werden. Daraufhin wird auf die Säulchen 100 µl EB-Puffer gegeben, 1 min inkubiert und danach mit Vakuum eluiert. Das Eluat enthält die gewünschte DNA.

2.7.10 Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA („Maxi-Präp“)

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus größeren Flüssigkulturen wurde das Maxi-Präp-Kit (Qiagen) genutzt.

100 - 500 ml Bakteriensuspension werden dazu in einer Beckmann-Zentrifuge für 15 min bei 4°C und 6.000 g (6.000 rpm) zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml P1-Puffer (mit RNaseA) gut resuspendiert und 10 ml P2-Puffer zugegeben. Nach gutem Mischen durch mehrmaliges Umdrehen wird diese Suspension 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 10 ml eiskalter P3-Puffer zugegeben, gut gemixt und 20 min auf Eis inkubiert. Diese Suspension wird dann 30 min bei 4°C und 20.000g (12.000 rpm in Beckmann Ja17-Rotor) zentrifugiert. Der Überstand wird durch Mull filtriert und auf eine Qiagen-Tip 500 Säule (Silikat) gegeben, die vorher mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert worden war. Nachdem der Überstand über die Säule gelaufen ist, wird diese zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene DNA mit 15 ml QF-Puffer in ein Corax-Zentrifugenröhrchen eluiert. Zur Fällung der DNA aus dem Eluat werden bei Raumtemperatur 10,5 ml 2-Propanol zugegeben, gut gemischt und sofort 30 min bei 4°C und mindestens 15.000 g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen und für 10 min bei 4°C und mindestens 15.000g zentrifugiert und anschließend luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wird in TE-Puffer gelöst. Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit wird die optische Dichte der DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.7.11 Isolierung von DNA aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von DNA aus eukaryotischen Zellen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Sambrook *J et al* [2001] verwendet. Die Zellen, aus denen die DNA isoliert werden soll, werden mit eiskaltem TBS gewaschen und anschließend entweder mit Hilfe eines Zell-scrapers oder durch Inkubation mit 1 mM EDTA in PBS abgelöst. Die Zellen werden abzentrifugiert (1200 rpm 10 min 4°C), nochmals mit eiskaltem TBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in eiskaltem TE-Puffer aufgenommen (1,5 ml / 5×10^7 Zellen) und gut resuspendiert. Durch Zugabe von 10 Vol Lysis-Puffer mit RNaseA [20 µg/ml] und 1 h Inkubation bei 37°C werden die Zellen lysiert und die zelluläre RNA verdaut. Es erfolgt die Zugabe von Proteinase K [100 µg/ml], die während 3 h Inkubation bei 50°C alle in der Lösung vorhandenen Proteine verdaut. Nach Abkühlen des Ansatzes auf RT wird 1 Vol Phenol (pH 7,5 – 8,0 äquilibriert mit TE-Puffer) zugegeben und die Phasen werden 1 h auf dem Überkopf-Schüttler gemischt. Nach 10 min auf Eis wird das 2-Phasen-Gemisch abzentrifugiert (15 min 4000 rpm 4°C) und die Phenol-Phase

verworfen. Dieser Phenol-Waschschritt wird 1x wiederholt. Anschließend wird 1 Vol Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und die Phasen werden 1 h auf dem Überkopf-Schüttler gemischt. Nach 10 min auf Eis wird das 2-Phasen-Gemisch abzentrifugiert (15 min 4000 rpm 4°C) und die organische Phase verworfen. Aus der wässrigen Phase wird die DNA über Ethanol-Fällung ausgefällt und gereinigt.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Southern Blot Hybridisierung

Durch Southern Blot Hybridisierung (Southern EM [1975]) können DNA-Sequenzen in DNA-Proben spezifisch nachgewiesen und ihre Größe analysiert werden.

2.8.1.1 Vorbehandlung des Agarose-Gels

Für den Nachweis von spezifischen Sequenzen durch Southern Blot Hybridisierung müssen die vorher auf einem Agarose-Gel aufgetrennten DNA-Fragmente auf eine Membran geblottet werden.

Hierzu bedarf es einer Vorbehandlung des Gels, das die verschiedenen DNA-Fragmente enthält, um einen gleichmäßigen Transfer aller DNA-Fragmente zu gewährleisten. In einem ersten Schritt wird durch 2x 15 min Inkubation des Gels in je 1 Vol 0,25 M HCl die DNA teilweise depuriniert. Im anschließenden Denaturierungsschritt werden den DNA-Fragmente in dem Gel durch 2x 15 min Inkubation mit Denaturierungslösung Doppelstrangbrüche zugefügt; die nun kürzeren Fragmente lassen sich effizient aus dem Gel blotten. Nun wird das Gel durch 2x 15 min Inkubation in Neutralisierungslösung neutralisiert und ist nach einigen Minuten wässern in 20x SSC bereit zum Blotten.

2.8.1.2 Blotten der DNA auf Nylon-Membran

3 Lagen Whatman 3 MM Filterpapier werden so über eine geeignete Brücke in einem mit 20x SSC gefüllten Trog platziert, dass sie dauerhaft Kontakt mit der Flüssigkeit haben. Auf diese Filterpapiere wird das vorbehandelte Gel (vgl. 2.8.1.1) blasenfrei „auf dem Bauch“ aufgelegt. Die in 20x SSC vorgewässerte Nylon-Membran (porablot NY amp, Macherey-Nagel, Düren) wird nun auf das Gel aufgelegt, gefolgt von weiteren 3 Lagen in 20x SSC durchfeuchteten Whatman 3 MM Filterpapier. Abschließend wird ein Stapel trockener Saugpapiere aufgelegt, beschwert durch geeignete Gewichte. Das Blotten der DNA auf die

Nylon-Membran erfolgt über Nacht durch die Kapillarwirkung der trockenen Saugpapiere. Am folgenden Tag wird die Membran kurz in 6x SSC gewässert und die geblottete DNA durch UV-Bestrahlung (Programm „AutoCrosslink“, StrataLinker, Stratagene, La Jolla, USA) auf der Membran fixiert.

2.8.1.3 Markieren der DNA-Probe mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP

Die Markierung der gesuchten, geblotteten DNA erfolgt durch Hybridisierung einer komplementären, radioaktiven DNA-Probe. Diese komplementäre Probe kann entweder aus PCR-Produkten oder aus Restriktionsverdau und Isolation der entsprechenden Fragmente gewonnen werden. Die radioaktive Markierung dieser Probe erfolgte mit Hilfe des Megaprime DNA labelling systems RPN 1606 (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Angaben des Herstellers. In Kürze: Mit Zufalls-Primern (Oligonukleotid-Hexamere) werden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-PolymeraseI DNA-Fragmente synthetisiert, in die radioaktives $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP eingebaut wird. Diese radioaktiven DNA-Fragmente hybridisieren sequenzspezifisch mit der zur Probe korrespondierenden Sequenz.

2.8.1.4 Hybridisierung und Entwicklung des Blots

Die fixierte Membran wird in einer Hybridisierungsröhre durch 30 min Inkubation mit 14 ml FBI-Puffer bei 65°C im Hybridisierungsofen prähybridisiert, um eine unspezifische Bindung der radioaktiven Probe an die Membran oder geblottete DNA zu verhindern. Die radioaktiv markierte Probe wird danach in 1 ml FBI-Puffer mit 1,5 mg ssDNA aus Lachs in die Hybridisierungsröhre zugegeben. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 65°C. Die Hybridisierungslösung wird anschließend vom Blot entfernt, dieser wird nun 2x 15 min mit HybWash A und anschließend 1x 30 min mit HybWash B gewaschen. Der Blot wird nochmals kurz in einer Schale mit HybWash B ab gespült und feucht in Folie eingeschlagen. Anschließend kann die radioaktive Markierung mit Hilfe eines Phospho-Imagers (Fuji BAS 1000, Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf) oder durch Inkubation des Blots mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham Biosciences) und Entwickeln des Films (Curix 60, Agfa, Gera) sichtbar gemacht werden.

2.8.2 Luziferase-Assay

Mit Hilfe des Luziferase-Assays wird in Zellen die Expression der firefly-Luziferase quantitativ nachgewiesen. Zu diesem Zweck werden die zu analysierenden Zellen pelletiert (1200 rpm 10 min) und 1x mit PBS gewaschen. Die resultierenden Pellets werden in je 100 µl PBL-Lysispuffer (Promega, Mannheim) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird anschließend abzentrifugiert (13000 rpm 10 min 4°C) und der Überstand kann in 20 µl Aliquots in 96-Lochplatten eingefroren gelagert werden. Die Luziferase-Aktivität der so gewonnenen Überstände wird im Luminometer (Microumat Plus LB96V, Berthold Technologies, Bad Wildbach), das auch die Substratzugabe durchführt, bestimmt. Je well werden 50 µl Luciferase Assay Reagent (Promega) zugegeben und nach 2 sec Inkubation über 10 sec die Chemolumineszenz gemessen. Die gemessenen Aktivitäten werden auf den Proteingehalt der Proben normalisiert.

2.8.3 Proteinbestimmung

Um die Luziferase-Aktivität normalisieren zu können und evtl. Ungleichheiten der Proben durch die Aufarbeitungsprozedur auszugleichen wurde der Proteingehalt der Luziferase-Überstände bestimmt. Zu diesem Zweck wird 5x Reagenz (Bio-Rad Protein Assay dye conc, Bio-Rad, München) 1:5 mit H₂O_{dd} verdünnt. Je 995 µl 1x Reagenz werden mit 5 µl Lysat gemischt und in eine Plastikkuvette überführt. Nach 15 min Inkubation bei RT wird die OD₅₅₀ im Photometer gemessen und über eine Standard-Eichkurve in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

2.8.4 *In-situ* Immun-Peroxidase-Assay (IPA)

Mit Hilfe dieses Testsystems können auf oder in Zellen exprimierte Antigene, z.B virale Proteine, auf *in-situ* fixierten Zellen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgt durch eine Immunfärbung.

36 - 48 h nach Transfektion bzw. Transduktion werden von den entsprechenden Zellkulturen das Kulturmedium abgenommen und die Kulturen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen werden daraufhin mit Methanol (-20°C) fixiert und mindestens 30 min bei -20°C inkubiert. Die fixierten Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min bei Raumtemperatur mit Blocking-Puffer inkubiert. Nach dem Entfernen des Blocking-Puffers wird der erste Antikörper, ein 1:400 in Blocking-Puffer verdünntes Serum, zugegeben und 1

h bei 37°C inkubiert. Nach dem Abziehen des Serums, welches durch einen 450 µm-Filter filtriert wird und wiederverwendet werden kann, werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wird der zweite, Peroxidase-gekoppelte Antikörper (α -human IgG, Sigma A-8775), der 1:500 in Blocking-Puffer verdünnt wurde, zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird die IPA-Färbelösung zugegeben und solange inkubiert, bis sich unter dem Mikroskop die Färbung deutlich erkennen lässt. Danach wird die Reaktion mit Leitungswasser abgestoppt. Die Auswertung dieser Färbungen geschieht unter dem Mikroskop. Zur Berechnung des Anteils der transfizierten oder transduzierten Zellen an der Gesamtpopulation werden in einem Gesichtsfeld bei geeigneter Vergrößerung jeweils die positiven und die negativen Zellen ausgezählt. Bei der Bestimmung von Titern werden die positiven Zellen innerhalb eines Gesichtsfeldes ausgezählt. Bei beiden Methoden werden je 5 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Berechnung der Titer geschieht über die in Abb. 2.1 dargestellte Formel aus den Mittelwerten der ausgezählten Felder:

$$\text{Titer [i. U./ml]} = \frac{\text{pos. Zellen / Gesichtsfeld} \times \text{Fläche(Kultur)}}{\text{Fläche(Gesichtsfeld)} \times \text{Verdünnung} \times \text{Volumen(Vektorsuspension)}}$$

Abb. 2.1: Formel zur Titerberechnung anhand der mikroskopischen Auswertung transduzierter und auf das übertragene Markergen gefärbter Kulturen

2.8.5 β -Galaktosidase-Nachweis (X-Gal-Färbung)

Durch die X-Gal-Färbung wird das Reportergen *lacZ* anhand der kodierten β -Galaktosidase nachgewiesen. Dieser Nachweis basiert auf der Spaltung des Substrates 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) durch dieses Enzym, die mit einer blauen Farbreaktion einhergeht. 36 - 48 h nach Transfektion bzw. Transduktion wird von den entsprechenden Zellkulturen das Kulturmedium abgenommen und die Kulturen einmal mit PBS gewaschen. Pro Lochbohrung werden die Zellen daraufhin mit 2 ml bei 6-Lochplatten, ansonsten 1 ml X-Gal-Fixierlösung für 5 - 10 min fixiert und anschließend noch dreimal mit PBS gewaschen. Nach Überschichtung mit 2 ml bzw. 1 ml X-Gal-Färbelösung werden die Kulturen für 6 - 12 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch Auszählen blau gefärbter Zellen analog zur IPA-Auswertung.

2.8.6 Fluoreszenz des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP)

Das Reportergen für EGFP kann entweder durch die entsprechenden Vektoren in die Zielzellen übertragen werden, oder es liegt wie z.B. bei den GHOST-Zellen schon in den Zielzellen vor und eine Expression dieses Gens wird erst durch die Übertragung eines anderen Gens bzw. Genproduktes induziert. Zur Auswertung müssen die Zellen nicht fixiert werden, sondern die lebende Zellkultur wird 36 - 48 h nach Transduktion unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt. Es werden je 5 Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung ausgezählt und die Titer nach der in Abb. 2.2 dargestellten Formel berechnet.

2.8.7 „Fluorescence Activated Cell Sorting“(FACS)

Fluoreszenzaktivierte Zell-Sortierung (FACS) erlaubt neben der Analyse auch die Sortierung einer relativ großen Zellpopulation von etwa 10^7 Zellen. Hier sollten allerdings nur verschiedene Zellpopulationen analysiert werden. Das zur Analyse verwendete FACS-Gerät (DAKO Galaxy, DAKO AS) vermischt in Suspension die einzelnen Zellen mit hoher Geschwindigkeit durch Anregung der Zellen mit Laserlicht (488 nm) und Detektion der abhängig vom Vorkommen eines Markers bzw. Reportergens auftretenden Fluoreszenz. Die Auswertung aller gemessenen Zellen erfolgt nach Gating der erwarteten Zellpopulation im Forward-Sideward-Streuungs-Diagramm und Filterung der Zellaggregate im Histogramm, wo die Zellzahl gegen die jeweilige Fluoreszenzintensität aufgetragen wird bzw. im Dot-Blot, wo 2 verschiedene Fluoreszenzen simultan ausgewertet werden können.

2.8.7.1 FACS-Analyse des zellulären DNA-Gehalts durch Propidiumiodid (PI)-Färbung

Der DNA-Gehalt der Zellen wurde durch Einlagerung des Farbstoffes Propidiumiodid (PI) bestimmt. Um die DNA im Zellkern anfärben zu können, müssen die Zelle und die Kernhülle allerdings für PI z.B. mit Saponin permeabilisiert werden. PI färbt dann die Zellen bzw. deren Kerne relativ zu ihrem DNA-Gehalt an, die im FACS gemessene Fluoreszenzintensität für PI korreliert so direkt zum DNA-Gehalt. In dieser Arbeit wurde das PI-Färbekit DNAcon3 (DAKO AS) verwendet.

Vor der Färbung werden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS + 1 mM EDTA abgelöst. Die suspendierten Zellen werden abzentrifugiert (10 min 300 g 4°C) und nochmals mit PBS gewaschen. Diese Zellen werden direkt gefärbt.

Zur Färbung mit Hilfe des Färbekits DNAcon3 werden 1 ml der in dem Kit enthaltenen PI-Lösung in ein mitgeliefertes Röhrchen gegeben, in dem sich das in ihm enthaltene Pulver nun löst. Nach 5 min werden ca. 1×10^6 der gewaschenen Zellen zugegeben und für wenige Sekunden gemischt. Danach wird der gesamte Ansatz für 1 - 8 h bei 4°C inkubiert, mehrmals zwischendurch gemischt und anschließend oder nach wenigen Tagen im FACS vermessen (nach Anleitung des Herstellers).

2.8.7.2 Nachweis von EGFP durch FACS

Zellen, auf die das Reportergen für EGFP übertragen wurde, können aufgrund der starken Fluoreszenz des exprimierten EGFP direkt nach Fixierung im FACS vermessen werden. Dazu werden die Zellen mit PBS gewaschen, bei adhären Zellen mit PBS + 1 mM EDTA abgelöst, abzentrifugiert (10 min 300 g 4°C) und mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Die abzentrifugierten Zellen werden in FACS-Fixierlösung aufgenommen und können direkt im FACS vermessen werden.

2.8.7.3 Nachweis von Oberflächen-Markerproteinen auf PBMC durch FACS

Um die verschiedenen Sub-Populationen der PBMC nachzuweisen und deren Status zu überprüfen, wird die Expression verschiedener als Marker verwendbarer Oberflächenproteine durch FACS-Analyse nachgewiesen. Hierzu werden die entsprechenden Zellen in Suspension überführt und 1x mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Das Zellpellet wird in 50 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen. Zu dieser Suspension werden pro 1×10^5 Zellen je 1 µl des Fluoreszenzfarbstoff-markierten FACS-Antikörpers (DAKO Diagnostics), gerichtet gegen das zu überprüfende Oberflächenprotein, zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Danach werden die gefärbten Zellen 2x mit je 1 ml FACS-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 µl FACS-Fixierlösung fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zu 1 Woche gelagert. Für jede Färbung wird die negative Zell-Fraktion durch Färbung der gleichen Zellen mit einem ebenfalls Fluoreszenz-Farbstoff markierten, unspezifischen Isotyp-Antikörper bestimmt, dessen Färbung den Grad unspezifischer Antikörper-Bindung definiert. Durch Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der entsprechenden Antikörper ist es möglich, auf einer Zelle mehrere Markerproteine simultan nachzuweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Transduktion humaner peripherer mononukleärer Blutzellen durch lentivirale und gamma-retrovirale Vektoren

Bei der Verwendung gamma-retroviraler Vektoren zur Transduktion von peripheren Blut-Lymphozyten (PBL) wurde in früheren Arbeiten eine Abhängigkeit der Transduktionseffizienz vom Hüllprotein, das zur Pseudotypisierung der Vektoren verwendet wurde, festgestellt (Uckert W, 2000). Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss des Hüllproteins auf die Effizienz der Transduktion von PBL durch HIV-1 abgeleitete Vektoren analysiert werden.

3.1.1 Bildung von HIV-1-abgeleiteten Vektoren mit unterschiedlichen Hüllproteinen

Zunächst wurden HIV-1-abgeleitete Pseudotyp-Vektoren mit den Hüllproteinen des amphotropen murinen Leukämievirus 4070A (MLV-A), des ebenfalls amphotropen MLV-Stamms 10A1, des felines endogenen Retrovirus RD114 und einer trunkierten Variante des Hüllproteins des Gibbonaffen Leukämievirus (GaLVtrAC) hergestellt und parallel die entsprechenden Vektortiter optimiert. Eine Etablierung stabiler Verpackungszellen ist für HIV-1-abgeleitete Vektoren nur schwer möglich, da die virale Protease von HIV-1 einen zytopathischen Effekt auf die Verpackungszellen hat. Daher wurden die HIV-1-abgeleiteten Vektoren transient hergestellt. Dazu wurden 1 µg HIV-1-Verpackungskonstrukt pCMVΔR8.2, 1,25 µg des *egfp*-übertragenden HIV-1-Transfervektors pHR⁺CMV-GFP und das jeweilige Env-Expressionskonstrukt in variablen Mengenverhältnissen in 293T Zellen, die in 6-Lochplatten kultiviert wurden, transfiziert. Nach 48 h wurde die Menge der transient gebildeten Vektorpartikel durch Titration der Überstände und mikroskopische Auswertung (Formel Abb. 2.1) auf der für alle Hüllproteine suszeptiblen humanen Zelllinie HT1080 bestimmt (Tab. 3.1).

Exp.1	MLV-A	10A1	RD114	GaLVtrAC	Exp. 2	MLV-A	10A1	RD114
0,5 µg	1,8x10 ⁴	3x10 ³	8,4x10 ³		2 µg	7,8x10 ³	2,8x10 ⁴	2,7x10 ⁴
1 µg	1,1x10 ⁵	6x10 ³	3,7x10 ⁴	2,7x10 ⁴	2,5 µg	4,4x10 ⁴	3,6x10 ⁴	2,9x10 ⁴
2 µg	1,4x10 ⁵	1,9x10 ⁴	7,6x10 ⁴	4,6x10 ⁴	3 µg	4,1x10 ⁴	4,4x10 ⁴	4,1x10 ⁴

Tab. 3.1: Optimierung der Bildung von HIV-1-abgeleiteten Pseudotyp-Vektoren mit Hüllproteinen der angegebenen Viren. Transduktionstiter der Pseudotypvektoren auf HT1080 Zellen in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Mengen der Env-Expressionsplasmide. (Auswertung erfolgte anhand EGFP-positiver Zielzellen)

Als Ergebnis dieser Untersuchung bleibt festzuhalten, dass sich die HIV-1-Vektoren mit allen verwendeten Hüllprotein-Varianten pseudotypisieren ließen. Alle HIV-1-abgeleiteten Pseudotyp-Vektoren wurden in nachfolgenden Experimenten dieser Arbeit durch Kotransfektion von Verpackungskonstrukt, Transfervektor und Env-Expressionskonstrukt in dem Mengenverhältnis 1:1,25:2 produziert. Dieses Verhältnis wurde gewählt, da hierbei alle Vektoren Titer im Optimalbereich aufwiesen.

3.1.2 Zeitabhängigkeit der Vektorproduktion in transienten Verpackungszellen

Während der oben beschriebenen Experimente konnte bei Transfektion des Plasmids pALF-GaLVtrAC in die 293T-Zellen eine überaus starke Syncytieninduktion bestätigt werden (Stitz J., unveröffentlicht). Dieser stark zytopathische Effekt, der sich schon 24 h nach Transfektion zeigte, erforderte eine Analyse des optimalen Erntezeitpunktes der Vektoren. Die Verpackungszellen waren 48 h nach Transfektion schon sehr stark geschädigt, ein negativer Einfluss auf die Titer relativ spät geernteter Vektorpräparationen ließ sich daher nicht ausschließen. Zu diesem Zweck wurden subkonfluente, in mittleren Kulturflaschen kultivierte 293T Zellen mit jeweils 7 µg pCMVΔR8.2, 8,75 µg pHR⁺CMV-LacZ und 14 µg eines der Verpackungskonstrukte pALF-GaLVtrAC, pALF-10A1, pALF-MLV-A oder pRDF mit Lipofektamin Plus transfiziert. Alle 6 h nach Transfektion wurden 10% des Überstandes entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die entnommenen Überstände wurden bei -80°C gesammelt, parallel aufgetaut und auf HT1080 Zellen titriert. Die so bestimmten Titer ergeben den in Abb. 3.1 dargestellten Zeitverlauf einer Vektoranreicherung im Überstand der Verpackungszellen.

Wie Abb. 3.1 zeigt, bestätigte sich die Hypothese, dass der stark zytopathische Effekt des trunkierten, hochgradig fusogenen GaLV-Hüllproteins einen Einfluss auf den Erntezeitpunkt des entsprechenden Vektors hat. Tatsächlich erreichten die Verpackungszellen für [HIV(GaLVtrAC)]-Vektoren 6 h früher als alle anderen, nämlich 42 h nach Transfektion, ihre maximale Vektorkonzentration im Überstand. Danach gingen die Vektortiter wieder deutlich zurück, wahrscheinlich aufgrund der Schädigung der Verpackungszellen. Aus diesem Grund wurden die [HIV(GaLVtrAC)]-Vektoren während der folgenden Experimente 42 h nach Transfektion von den Verpackungszellen geerntet. Für alle anderen HIV-1-abgeleiteten Pseudotypvektoren wurde der Erntezeitpunkt bei 48 h nach Transfektion beibehalten.

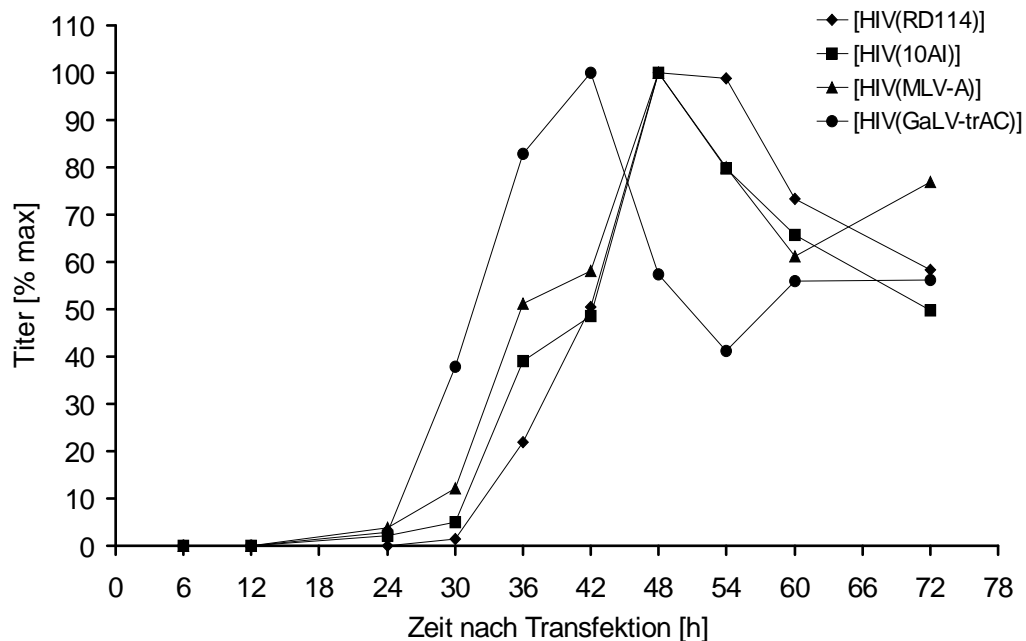


Abb. 3.1: Kinetik der Vektorproduktion transienter Verpackungszellen für HIV-abgeleitete Vektoren. Vektorpartikel im Überstand von HIV-abgeleitete, *lacZ*-übertragende Vektoren nach Transfektion von 293T Zellen. Dargestellt ist der Zeitverlauf der relativen Menge transduzierender Partikel/ml im Überstand transfizierter 293T Zellen, titriert auf HT1080-Zellen. Titerbestimmung erfolgte durch X-Gal-Färbung in verschiedenen Verdünnungen. Vektortypen wie angegeben. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung.

3.1.3 Bildung von [MLV(VSV)] Pseudotyp-Vektoren

Anders als für HIV-abgeleitete Vektoren können für MLV-Vektoren stabile Verpackungszelllinien etabliert werden, die dauerhaft die entsprechenden Vektoren in den Zellkulturüberstand abgeben. Die Linien für die Vektoren [MLV_{EGFP}(MLV-A)], [MLV_{EGFP}(10A1)], [MLV_{EGFP}(RD114)] und [MLV_{EGFP}(GaLV)] wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Uckert etabliert (Uckert W, 2000) und die resultierenden Vektoren auf D17 Zellen austitriert uns zur Verfügung gestellt. Ähnlich zu HIV-1-abgeleiteten Pseudotyp-Vektoren ist für [MLV(VSV)] Vektoren die Etablierung stabiler Verpackungszellen auf Grund der zytopathischen Effekte des Hüllproteins nicht ohne weiteres möglich. Deshalb war es auch hier nötig, ein optimiertes Transfektionsprotokoll für 293T Zellen zu etablieren. Dazu wurden 1 µg des MLV-Verpackungskonstruktes pHit 60 sowie der *egfp*-übertragende MLV-Transfervektor pLEGFPSN und das VSV-G-Expressionskonstruktes pMD.G in variablen Mengen in 293T-Zellen transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde der Titer der transient gebildeten [MLV_{EGFP}(VSV)]-Vektoren durch Titration der Überstände auf suszeptiblen caninen D17 Zellen bestimmt, so dass die VSV-

G-pseudotypisierten MLV-Vektoren auf den gleichen Zellen wie die anderen MLV-Vektoren titriert wurden (Tab. 3.2).

pLEGFPSN	pMD.G [ng]	Titer [TU/ml]	pLEGFPSN	pMD.G [ng]	Titer [TU/ml]
500 ng	1000	$3,0 \times 10^3$	1 μ g	1000	$4,4 \times 10^3$
1 μ g	1000	$4,4 \times 10^3$	1 μ g	500	$1,3 \times 10^4$
2 μ g	1000	$6,6 \times 10^3$	1 μ g	250	$1,8 \times 10^4$
3 μ g	1000	$2,3 \times 10^4$			

Tab. 3.2: Optimierung der Bildung von MLV-abgeleiteten Pseudotyp-Vektoren mit VSV-G. Transduktionstiter der Pseudotypvektoren aus der Kotransfektion von pHit60 (1 μ g), pMD.G und pLEGFPSN (in den angegebenen Mengen). (Auswertung erfolgte durch Auszählen EGFP-positiver Zielzellen).

Aufgrund dieser Daten wurden [MLV_{EGFP(VSV)}]-Vektoren durch Kotransfektion der Plasmide pHit 60, pLEGFPSN und pMD.G im Verhältnis von 1:1,5:0,2 in 293T Zellen produziert.

3.1.4 Transduktionseffizienz der Vektoren auf caninen D17 und humanen HT1080 Zellen

Wie in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.3 beschrieben wurden die HIV-Vektoren auf den HT1080 Zellen ausstitriert, die MLV-abgeleiteten Vektoren jedoch auf den D17 Zellen. Um einen direkten Vergleich aller Vektoren zu ermöglichen, mussten die Titer aller Vektoren auf beiden Zelllinien verglichen werden. Dazu wurden alle verwendeten MLV- und HIV-Vektoren parallel sowohl auf D17 als auch HT1080 Zellen ausstitriert und die resultierenden Titer verglichen (Abb. 3.2):

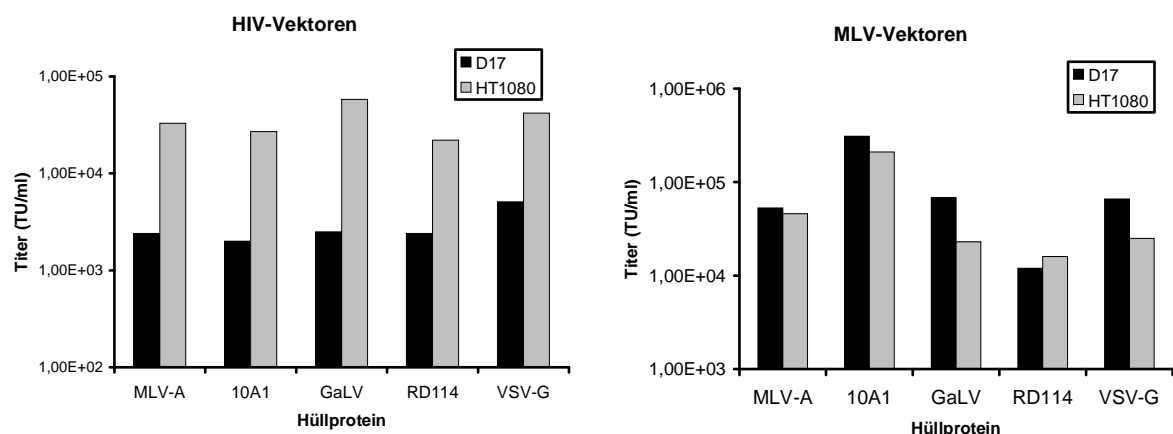


Abb. 3.2: Titration von HIV- und MLV-abgeleiteten Vektoren auf HT1080 und D17 Zellen. Bestimmung der Titer *egfp*-transferierender Pseudotyp-Vektoren 48 h nach paralleler Transduktion der Zielzellen in verschiedenen Verdünnungen der Vektorstocks anhand der EGFP-Fluoreszenz und FACS-Analyse. Repräsentatives Experiment.

Für die MLV-Vektoren lagen die Transduktionseffizienzen auf beiden Zelllinien in der gleichen Größenordnung. Die maximale Abweichung der Titer bei den [MLV_{EGFP}(GaLV)]-Vektoren beträgt lediglich den Faktor 3. Das bedeutet, dass vermutlich keiner der von den verschiedenen Vektoren verwendeten Rezeptoren auf beiden Zelllinien so unterschiedlich exprimiert wird, dass dies einen entscheidenden Einfluss auf die Transduktionseffizienz hätte. Im Gegensatz dazu zeigten alle getesteten HIV-Vektoren auf den HT1080-Zellen um ca. eine Größenordnung höhere Titer als auf den D17-Zellen. Diese Titerunterschiede waren relativ unabhängig von den zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllproteinen (zwischen Faktor 8,2 (für [HIV_{EGFP}(VSV)]) und 23,2 (für [HIV_{EGFP}(GaLVtrAC)])). Das spricht wie bei den MLV-Vektoren gegen eine Beeinflussung des Titers durch unterschiedliche Rezeptorexpression. Die geringere Transduktionseffizienz der HIV-Vektoren auf der caninen Zelllinie kann sich durch eine Anpassung des humanpathogenen HI-Virus und der abgeleiteten Vektoren an die Zellen des natürlichen Wirtes „Mensch“ erklären lassen. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass es für die MLV-Vektoren nicht entscheidend war, ob sie auf D17 oder HT1080-Zellen austitriert wurden. Die HIV-Vektoren wurden im Folgenden jedoch immer auf den gut suzeptiblen HT1080 Zellen austitriert, um eine Unterschätzung der verschiedenen Vektortiter zu vermeiden.

3.1.5 Transduktion von humanen T-Lymphozyten

Nun wurden die Transduktionseffizienzen der vorgestellten Vektoren parallel unter identischen experimentellen Bedingungen auf isolierten humane T-Lymphozyten verglichen. Zunächst sollte untersucht werden, ob das in der eigenen Arbeitsgruppe von Frau Dr. I. Schmitt etablierte Protokoll (vgl. Kap. 2.6.12) zur Transduktion stimulierter primärer T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Vektoren zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie von anderen Gruppen publizierte Experimente (vgl. Uckert W, 2000). Parallel sollten auch für die HIV-abgeleiteten Vektoren unter den gleichen Bedingungen untersucht werden, ob eines der verwendeten Hüllproteine den anderen in Bezug auf die Transduktionseffizienz überlegen ist. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob die Verwendung der HIV-Vektoren prinzipiell eine Verbesserung gegenüber den MLV-Vektoren darstellt. Dies wurde vermutet, da die HIV-Vektoren im Unterschied zu den MLV-Vektoren keine Zellproliferation für eine Transduktion der Zielzelle benötigen. Dies führte schließlich zum dritten Teil der Experimente mit T-Lymphozyten: Der Transduktion unstimulierter T-Lymphozyten. Wie in der Einleitung dargelegt existieren in der Literatur unterschiedliche Positionen zur Transduzierbarkeit unstimulierter T-Lymphozyten. Daher

wurde hier in dieser Arbeit auch untersucht, ob die Hüllproteine einen Einfluss auf die Transduzierbarkeit der unstimulierten T-Zellen haben.

3.1.5.1 Transduktion von stimulierten humanen T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Vektoren

PBMCs von mindestens 3 gesunden, freiwilligen anonymen Spendern wurden über einen Ficoll-Stufengradienten aus Citrat-Blut präpariert und mit Hilfe von immobilisierten anti-huCD3/anti-huCD28-mAbs stimuliert. Die so stimulierten T-Lymphozyten wurden insgesamt 3x an 3 aufeinander folgenden Tagen auf RetroNectin-beschichteten Platten mit den verschiedenen MLV-abgeleiteten Pseudotypvektoren mit einer $moi = 1$ transduziert. 3 Tage nach der letzten Transduktion wurden die Zellen auf die T-Zellmarker CD3, CD4 und CD8 gefärbt und anhand der EGFP-Fluoreszenz der Anteil transduzierter Zellen innerhalb der verschiedenen Subpopulationen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die FACS-Ergebnisse für einen repräsentativen Donor sind in Abb. 3.3 dargestellt. Die Mittelwerte aus 3 Donoren eines repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.4 abgebildet. Alle Experimente zeigten die gleichen Verhältnisse der Transduktionsraten verschiedener Vektoren, allerdings mit unterschiedlichen absoluten Werten.

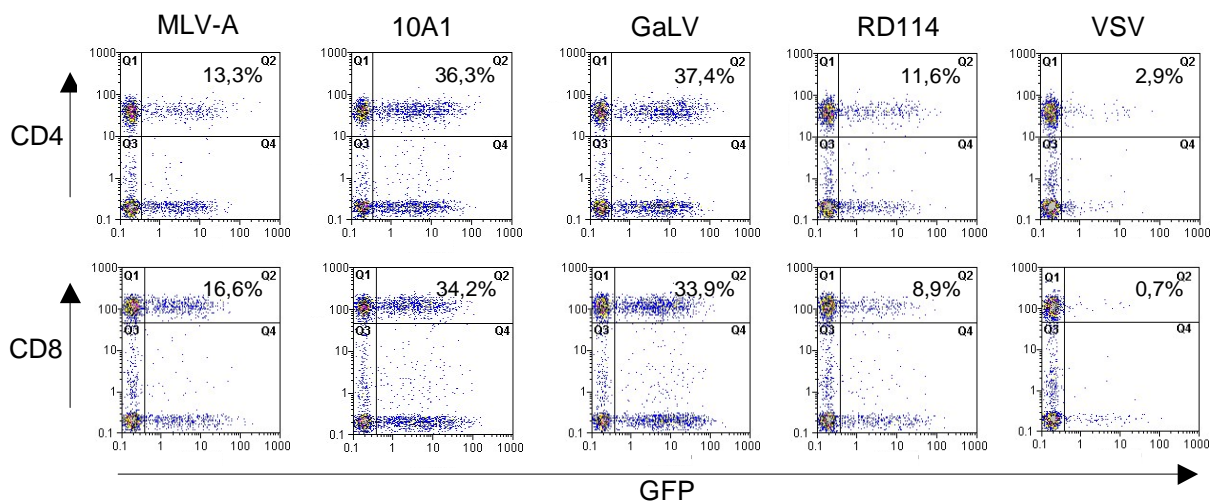


Abb. 3.3: Transduktion stimulierter primärer T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Pseudotypvektoren. Dot-Plots der FACS-Analyse 72 h nach der letzten Transduktion von anti-CD3/anti-CD28-stimulierten T-Zellen mit *egfp*-transferierenden MLV-Vektoren, pseudotypisiert mit den Hüllproteinen der angegebenen Viren. Analyse der Zellen auf EGFP-Expression und Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD3 (nicht gezeigt) und CD4 oder CD8. In der oberen rechten Ecke der Dot-Plots ist der prozentuale Anteil transduzierter Zellen in der jeweils betrachteten T-Zell-Subpopulation angegeben. Daten eines repräsentativen von 3 getesteten Donoren.

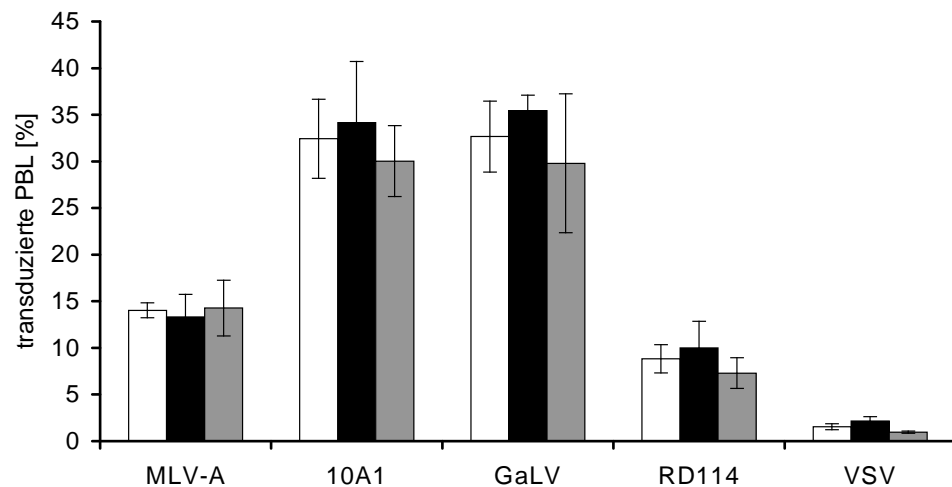


Abb. 3.4: Transduktion stimulierter primärer T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Pseudotypvektoren. Auswertung der FACS-Analyse transduzierter primärer T-Lymphozyten. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil EGFP-exprimierender CD3⁺ (□) CD4⁺ (■) oder CD8⁺ (▒) T-Lymphozyten innerhalb der gesamten CD3⁺ T-Lymphozytenpopulation bzw. der korrespondierenden CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zell-Subpopulation. Mittelwerte von 3 Donoren (aus einem repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmung) und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Deutlich bestand bei MLV-Pseudotypvektoren ein Einfluss der verwendeten Hüllproteine auf die Transduktionseffizienz für T-Lymphozyten. GaLV- und 10A1-pseudotypisierte Vektoren zeigten die besten Transduktionseffizienzen (32,7 bzw. 32,4% GFP⁺/CD3⁺-Zellen), während RD114- und MLV-A-pseudotypisierte Vektoren eine reduzierte Effizienz aufwiesen (14,0 bzw. 8,8% GFP⁺/CD3⁺). Das routinemäßig zur Pseudotypisierung von lentiviralen Vektoren verwendete Hüllprotein VSV-G schnitt bei der Pseudotypisierung von MLV-Vektoren mit 1,5% transduzierten T-Zellen überraschenderweise deutlich schwach ab. Diese Reihenfolge und auch die absoluten Transduktionseffizienzen unterschieden sich in diesen Experimenten für kein Hüllprotein signifikant auf den verschiedenen T-Zell Subpopulationen (CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen). Diese Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Daten (Uckert W, 2000), allerdings schnitten die [MLV_{EGFP}(GaLV)]-Vektoren in diesen Versuchen besser ab als publiziert.

3.1.5.2 Transduktion von stimulierten humanen T-Lymphozyten mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren

Nun wurden die HIV-1-abgeleiteten Vektoren untersucht. Die wie in Abschnitt 3.1.5.1 vorbehandelten Zellen wurden 3x an 3 aufeinander folgenden Tagen ebenfalls mit einer $moi = 1$ mit den verschiedenen HIV-1-abgeleiteten Pseudotypvektoren transduziert. Die

resultierenden FACS-Ergebnisse für einen repräsentativen Donor sind in Abb. 3.5 dargestellt. Die Mittelwerte aus 3 Donoren eines repräsentativen von 3 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.6 abgebildet. Wie bei den MLV-Vektoren zeigten alle Experimente die gleichen Verhältnisse der Transduktionsraten verschiedener Vektoren, allerdings mit unterschiedlichen absoluten Werten.

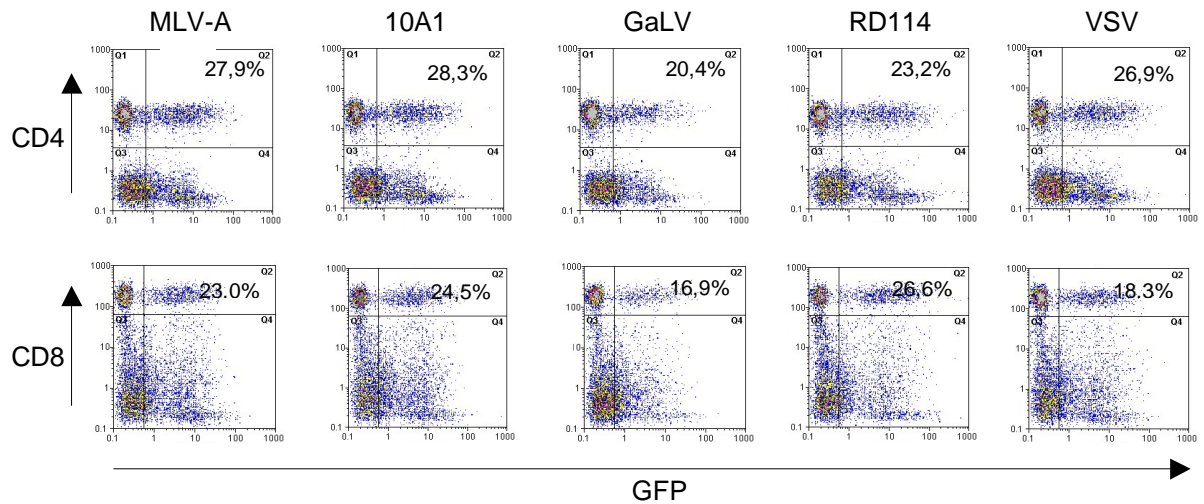


Abb. 3.5: Transduktion stimulierter primärer T-Lymphozyten mit HIV-abgeleiteten Pseudotypvektoren. Dot-Plots der FACS-Analyse 72 h nach der letzten Transduktion von anti-CD3/anti-CD28-stimulierten T-Zellen mit *egfp*-transferierenden HIV-Vektoren, pseudotypisiert mit den Hüllproteinen der angegebenen Viren. Analyse der Zellen s. Abb. 3.3.

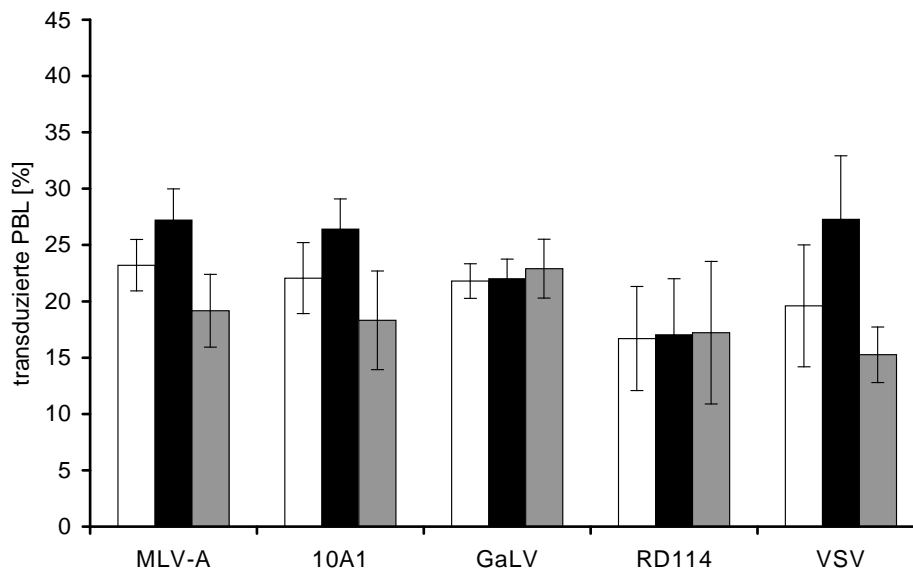


Abb. 3.6: Transduktion stimulierter primärer T-Lymphozyten mit MLV-abgeleiteten Pseudotypvektoren. Auswertung der FACS-Analyse transduzierter primärer T-Lymphozyten. Darstellung s. Abb. 3.4.

Somit zeigte sich, dass bei den HIV-Pseudotypvektoren im Unterschied zu den MLV-Vektoren keine deutlichen Abhängigkeiten der Transduktionseffizienz vom verwendeten Hüllprotein bestanden. Die Transduktionsraten lagen sehr eng in einem Bereich von ca. 20% transduzierter T-Zellen (zwischen 16,7% für RD114- und 23,2% für MLV-A-

pseudotypisierte Vektoren). Auch das als Standard verwendete Hüllprotein VSV-G zeigt unter den gleichen experimentellen Bedingungen mit 19,8% transduzierter T-Zellen keine Effizienz-Vor- oder -Nachteile gegenüber den anderen untersuchten Hüllproteinen. Wie bei den MLV-Pseudotypvektoren ließen sich auch bei den HIV-abgeleiteten Vektoren keine signifikanten Unterschiede der Transduzierbarkeit verschiedener T-Zell-Subpopulationen (CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen) feststellen.

3.1.5.3 Transduktion von unstimulierten humanen T-Lymphozyten mit MLV- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren

Wie in der Einleitung dargelegt existieren in der Literatur unterschiedliche Positionen zur Transduzierbarkeit frisch isolierter, unstimulierter T-Lymphozyten. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob mit unterschiedlichen Hüllproteinen eine Transduktion dieser Zellen möglich wird. Mit den MLV-Vektoren wurde getestet, ob transduzierte Zellen durch die Transduktionsprozedur zu Zellteilung angeregt werden (nur dann wären sie durch MLV-abgeleitete Vektoren transduzierbar). Für diese Experimente wurden PBMC von wenigstens 3 gesunden, freiwilligen Spendern über einen Ficoll-Stufengradienten aus Citrat-Blut präpariert. Diese PBMC wurden jetzt ohne vorhergehende Stimulation mit den verschiedenen MLV- und HIV-1-Vektoren mit einer $moi = 1$ transduziert und in der Gegenwart sehr niedriger IL-2-Konzentrationen [50 U/ml] 3 Tage nach der Transduktion bis zur FACS-Analyse kultiviert. Die transduzierten T-Lymphozyten sowie die entsprechende Negativ-Kontrolle wurden auf die T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 und CD69 gefärbt und der zelluläre DNA-Gehalt dieser Zellen durch Propidiumiodid-Färbung untersucht. Die FACS-Analyse zeigte ruhende Zellen ohne proliferative Aktivität (s. Abb. 3.7), und eine Stimulation der Zellen durch die Präparation oder Transduktionsprozedur konnte durch Abwesenheit der Aktivierungsmarker ausgeschlossen werden. Die Transduktionseffizienzen der verschiedenen Vektoren auf diesen unstimulierten T-Zellen sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.

	Glykoprotein				
	MLV-A	10A1	GaLV	RD114	VSV-G
MLV-Vektor	0,23	0,55	0,24	0,05	0,09
HIV-Vektor	0,23	0,12	0,19	0,18	0,10

Tab. 3.3: Transduktion unstimulierter T-Lymphozyten mit MLV- und HIV-1-abgeleiteten Pseudotypvektoren. Diese Daten zeigen die Prozentzahl transduzierter CD3⁺ T-Lymphozyten und repräsentieren die Mittelwerte von 3 Donoren in unabhängigen Experimenten.

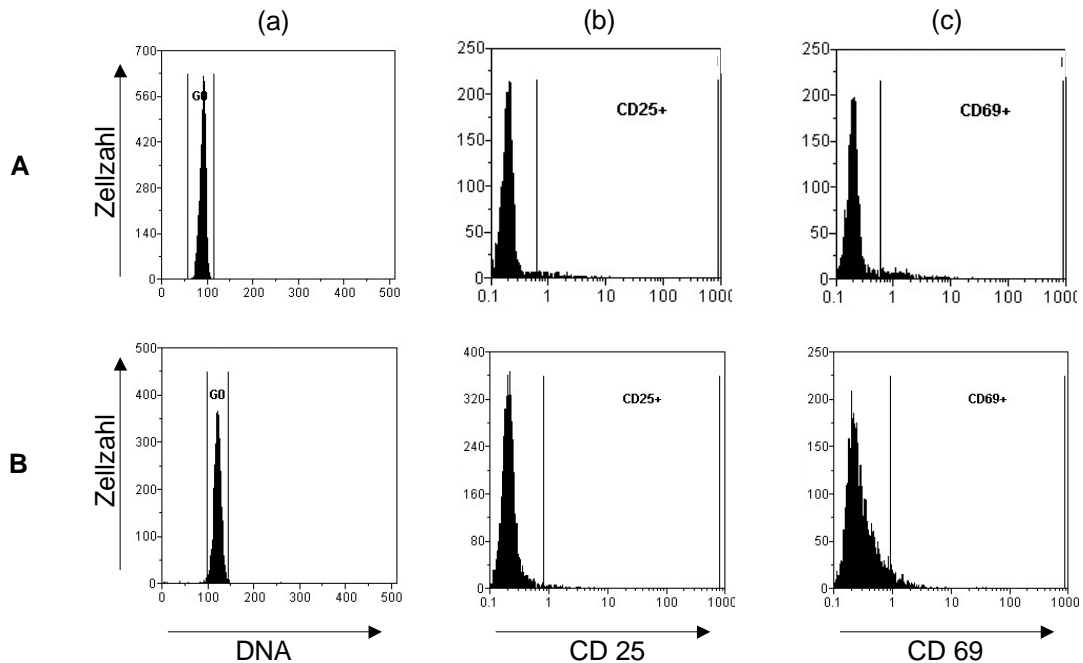


Abb. 3.7: Histogramme der FACS-Analyse frisch isolierter (A) oder transduzierter (B) unstimulierter T-Lymphozyten. Ausgewertet wurden CD3+ Zellen nach Propidiumiodid-Färbung (a) bzw. nach Färbung auf die Aktivierungsmarker CD25 (b) und CD69 (c).

Für keinen der verwendeten Vektoren zeigte sich eine signifikante EGFP-Expression. Weder die verschiedenen HIV-1-, noch die MLV-abgeleiteten Vektoren waren somit in der Lage, unter den gegebenen experimentellen Bedingungen die frisch isolierten, unstimulierten T-Lymphozyten zu transduzieren. Dies war unabhängig vom zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllprotein.

3.1.6 Die Halbwertszeit HIV-1-abgeleiteter Vektoren

In der Literatur ist beschrieben, dass die unterschiedliche Effizienz der verschiedenen MLV-Pseudotypvektoren auf den primären T-Lymphozyten auf der unterschiedlichen Halbwertszeit dieser Vektoren beruhen kann. Daher sollte nun untersucht werden, ob der ähnlichen Effizienz der verschiedenen HIV-Vektoren auf primären T-Lymphozyten auch ähnliche Vektorhalbwertszeiten zu Grunde liegen. Hierfür wurden die entsprechenden Vektoren transient hergestellt und für 0 h, 6 h, 12 h und 24 h bei 37°C inkubiert und bei -80°C gelagert. Diese Gefrierstocks wurden zum gleichen Zeitpunkt aufgetaut und parallel auf HT1080 Zellen titriert. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.8 dargestellt. Der zum Zeitpunkt 0 h erhaltene Titer wurde gleich 100% gesetzt und die Titer der übrigen Zeitpunkte als relative Vektortiter angegeben.

Alle HIV-Pseudotypvektoren wiesen Halbwertszeiten von = 12 h auf (Tab. 3.4). Dies stellt einen deutlichen Unterschied zu den MLV-Vektoren dar, deren Halbwertszeiten teilweise mit nur ca. 6 h ([MLV_{EGFP}(MLV-A)]) beschrieben sind (Uckert W, 2000). Die

Halbwertszeit der HIV-Vektoren war im Mittel deutlich höher als die der MLV-Vektoren, voneinander wichen die Halbwertszeiten der HIV-Vektoren jedoch teilweise deutlich ab.

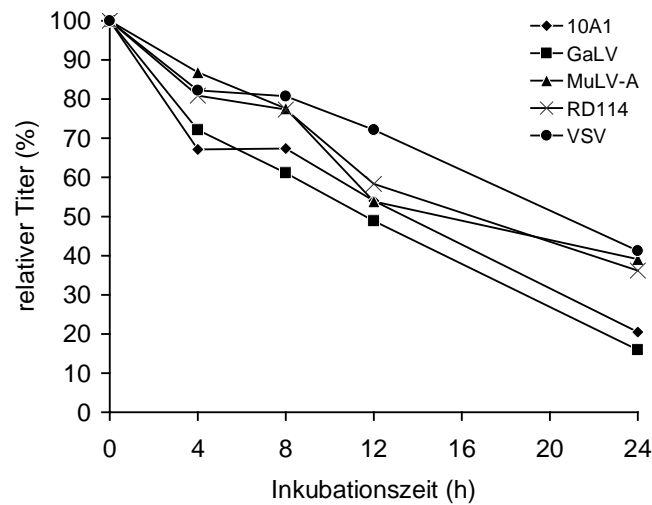


Abb. 3.8: Stabilität der pseudotypisierten HIV-Vektoren. Dargestellt sind die relativen transduzierenden Titer von HIV-Vektoren pseudo-typisiert mit den Hüllproteinen der angegebenen Viren nach unterschiedlich langer Inkubationszeit bei 37°C. Titerbestimmung erfolgte durch Endpunkt-Titration in HT1080-Zellen. Die Titer zum Zeitpunkt $t_0 = 0$ (keine Inkubation) wurde gleich 100% gesetzt. Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten.

	MLV-A	10A1	GaLV	RD114	VSV-G
HIV-Vektor	17	14	12	17	22
MLV-Vektor	6	14	13	24	n.t.

Tab. 3.4: Halbwertszeiten verschiedener MLV- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren, pseudotypisiert mit den angegebenen Hüllproteinen. Angegeben ist die Halbwertszeit der verschiedenen Vektoren bei 37°C. Für HIV-Vektoren wurde Abb. 3.8 ausgewertet, die Daten für MLV-Vektoren wurden Uckert W *et al.* [2000] entnommen.

So reduzierte sich der Titer von MLV-A, 10A1 oder RD114-pseudotypisierten HIV-Vektoren innerhalb von 24 h auf ca. 40%, während die mit GaLVtrAC-pseudotypisierten Vektoren nach 24 h nur noch 25% der ursprünglichen Infektiosität zeigten (Abb. 3.8).

Die Transduktion der T-Lymphozyten mit verschiedenen MLV- und HIV-Vektoren zeigte, dass bei den HIV-Vektoren im Unterschied zu den MLV-Vektoren für primäre humane T-Lymphozyten keine ausgeprägte Abhängigkeit der Transduktionseffizienz vom zur Pseudotypisierung der Vektorpartikel verwendeten Hüllprotein besteht, wahrscheinlich aufgrund der höheren Stabilität aller HIV-Vektoren. Allerdings konnte kein genereller Vorteil des lentiviralen Vektorsystems gezeigt werden, da unstimulierte, ruhende T-Lymphozyten bzw. PBMCs weder von den MLV- noch von den HIV-Vektoren transduziert werden konnten. Darüber hinaus war auf den stimulierten T-Lymphozyten die Effizienz der z.B. GaLV-pseudotypisierten MLV-Vektoren deutlich besser als die der getesteten HIV-Vektoren.

3.2 Transduktion von ruhenden humanen Zellen mit Hilfe eines neuen, von SIVsmmPBj abgeleiteten viralen Vektors

Wie die Ergebnisse aus Kapitel 3.1 zeigen, war es nicht möglich, unstimulierte, ruhende primäre T-Lymphozyten oder PBMC mit Hilfe eines HIV-1-abgeleiteten Standard-Vektors zu transduzieren. Dies ist in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten (Maurice M, 2001; Ducrey-Rundquist O, 2002). Andererseits war aus eigenen Vorarbeiten bekannt, dass SIVsmmPBj-abgeleitete Vektoren in der Lage sind, in einem Zellkultursystem durch Serumentzug arretierte Zellen zu transduzieren. Diese arretierten Zellen konnten von HIV-1-abgeleiteten Vektoren nicht mehr transduziert werden. Daher sollte im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob sich diese größere Effizienz der PBj-abgeleiteten Vektoren auch auf primären humanen Zellen zeigt.

3.2.1 Einfluss des Hüllproteins auf die Transduktion ruhender GHOST CXCR4-Zellen durch HIV-1-, SIVsmmPBj- und MLV-abgeleitete Vektoren

Bei der Verwendung von retroviralen Vektoren werden diese sehr häufig mit VSV-G pseudotypisiert, da dieses Hüllprotein gegen Scherkräfte sehr unempfindlich ist. Daher erlaubt es die Konzentrierung der Vektorpartikel durch Ultra-Zentrifugation, und hohe Vektortiter werden ermöglicht (Burns JL, 1993). Aus diesen Gründen waren auch in meiner Diplom-Arbeit die verschiedenen in Abb. 3.9 dargestellten, *env*-deletierten Vektorkonstrukte mit VSV-G pseudotypisiert worden. Diese waren parallel mit MLV-Vektoren auf GHOST-Zellen getestet worden, die entweder proliferierten, durch Zugabe des DNA-Polymerase-Inhibitors Aphidicolin [10 μ M] in der G₁/S-Phase des Zellzyklus arretiert waren oder durch Serumentzug in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert waren. Der arretierte Zustand der Zielzellen zum Zeitpunkt der Transduktion konnte durch Propidium-Iodid-Färbung und FACS-Analyse der jeweiligen Zielzellen gezeigt werden. In diesen Experimenten wurde die Effizienz der PBj-Vektoren auf G₀-arretierten Zellen erstmals beschrieben.

Die mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren nutzen jedoch nicht Membranfusion zum Zelleintritt, sondern sie werden endosomal in die Zielzellen aufgenommen (Aiken C, 1997). Um einen Einfluss dieser für Retroviren ungewöhnlichen Zelleintrittsstrategie auf die Fähigkeit von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren zur Transduktion von ruhenden Zellen zu prüfen, sollte zunächst getestet werden, welche Transduktionseigenschaften die

verschiedenen HIV-1-, SIVsmmPBj- und MLV-abgeleiteten Vektoren aufweisen, wenn sie mit dem Hüllprotein von HIV-1 (HIV-Env) anstelle von VSV-G pseudotypisiert werden.

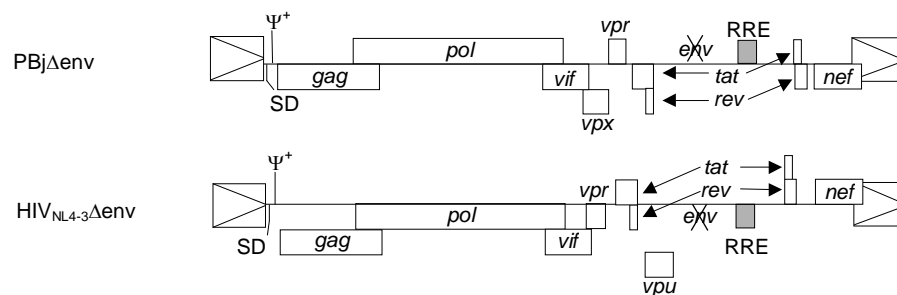


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der *env*-deletierten Vektor-Konstrukte. Kursiv sind die verschiedenen Gene bezeichnet. Translatierte ORFs sind durch intakte Kästchen dargestellt. RRE = Rev-responsives Element, pA = Polyadenylierungssignal, SD = Spleiß-Donor, Ψ^+ = Verpackungssignal

Daher wurden die lentiviralen Vektoren über Kotransfektion der *env*-deletierten Vektorkonstrukte pNL4-3 Δ *env* bzw. pPBj Δ *env* mit dem HIV-Env-Expressionskonstrukt pL128 in 293T Zellen generiert. Beide Vektortypen konnten durch IPA-Nachweis der durch die Vektorkonstrukte transferierten viralen Proteine bzw. durch die Tat-abhängige EGFP-Expression der GHOST-Indikatorzellen nachgewiesen werden (nicht gezeigt). [MLV_{LacZ}(HIV)]-Pseudotyp-Vektoren wurden von 293T Zellen abgeerntet, die mit dem Verpackungskonstrukt pHit60, dem *lacZ*-übertragenden Transfervektorkonstrukt pMgSLdelS-LacZ und pL128 co-transfiziert worden waren. Alle Vektoren wurden parallel auf proliferierenden, G₁/S-arretierten und ruhenden GHOST CXCR4-Zellen ausitiert. Die Effizienz eines Vektors in den in verschiedenen Phasen des Zellzyklus arretierten Zielzellen wird ausgedrückt durch die Berechnung des prozentualen Anteils des Titers in den entsprechenden Zellen bezogen auf den Titer des gleichen Vektors auf proliferierenden Zielzellen. In Abb. 3.10 sind die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst. Die mit HIV-Env pseudotypisierten Vektoren zeigten die gleichen Eigenschaften wie die mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren: Die MLV-abgeleiteten Vektoren transduzieren erwartungsgemäß nur proliferierende Zielzellen, während die HIV-1-abgeleiteten Vektoren zusätzlich G₁/S-arretierte GHOST-Zellen, kaum jedoch die G₀-arretierten Zielzellen transduzieren konnten. Ausschließlich die [SIV_{PBj}(HIV-1)] Vektoren waren in der Lage, alle drei Zielzellpopulationen mit einer deutlichen Effizienz zu transduzieren. Offensichtlich besteht daher bei der Transduktion ruhender Zellen durch SIVsmmPBj-abgeleitete Vektoren keine Abhängigkeit von dem zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllprotein bzw. der zum Zelleintritt verwendeten Strategie. Daher konnte in den folgenden Teilen der Arbeit VSV-G-pseudotypisierte Vektoren verwendet werden.

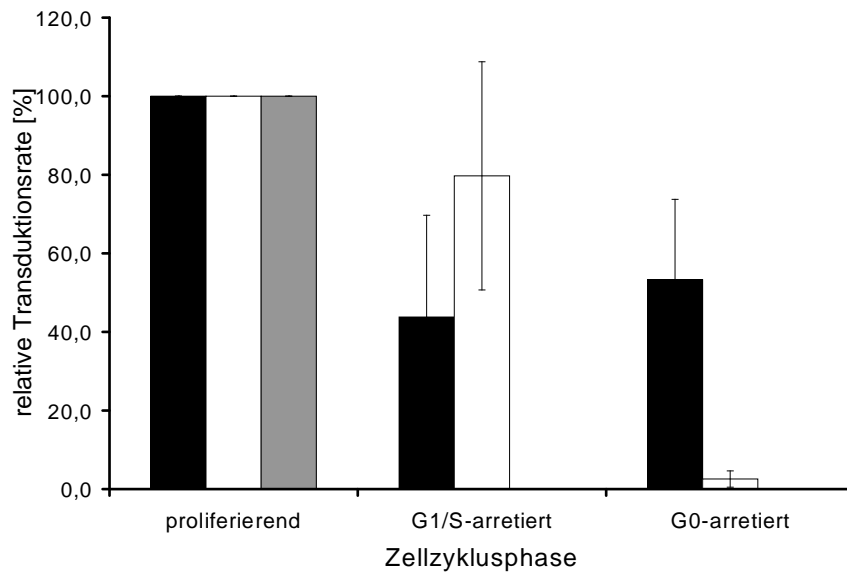


Abb. 3.10: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren pseudotypisiert mit HIV-1-Env zur Transduktion arretierter GHOST CXCR4 Zellen. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstiter auf den proliferierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). (■ = [SIV_{PBJ}(HIV)], □ = [HIV-1(HIV)], ▒ = [MLV_{lacZ}(HIV)])

3.2.2 Arretierung von diploiden humanen Fibroblasten

Bei den bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten GHOST CXCR4 Zellen handelt es sich um Abkömmlinge der HOS-Zelllinie, humane Osteosarkomzellen. Um die Analyse der Transduktionseffizienz von SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren auf nicht-transformierten Zellen durchführen zu können, wurden uns von Prof. Neumann-Haefelin (Univ. Freiburg) die diploiden Fibroblasten Alpha-1 (primäre humane Vorhautfibroblasten in Passage 13 nach Isolation) zur Verfügung gestellt. Zur Arretierung in der G₁/S-Phase wurden die Zellen 24 h in der Gegenwart von 10 µg/ml Aphidicolin kultiviert. Die Arretierung in einem ruhenden Zustand, der als G₀-Arretierung bezeichnet werden kann, zeigten die Fibroblasten nach 18 Tage Kultivierung von konfluenten Kulturen unter Serumentzug (0,4% FCS). Die erfolgreiche Arretierung wurde über PI-Färbung des zellulären DNA-Gehalts und anschließende FACS-Analyse gezeigt (Abb. 3.11).

Man erkennt, dass sich in proliferierenden Alpha-1 Kulturen 74% der Zellen in der G₁ oder G₀-Phase befinden, während sich 10% in der S-Phase befinden und sich die restlichen 16% der analysierten Zellen sich in der G₂ oder M-Phase sammeln. Bei den Aphidicolin-behandelten Alpha-1 sind demgegenüber keine Zellen mehr nachzuweisen, die sich in der G₂ oder M-Phase befinden. Die G₀-arretierten Zellen befanden sich schließlich zu 96% in der G₁ oder G₀-Phase und 4% in G₂ oder M, während keine Zellen in S-Phase mehr nachzuweisen sind. Die Arretierungsprotokolle funktionieren also wie beabsichtigt.

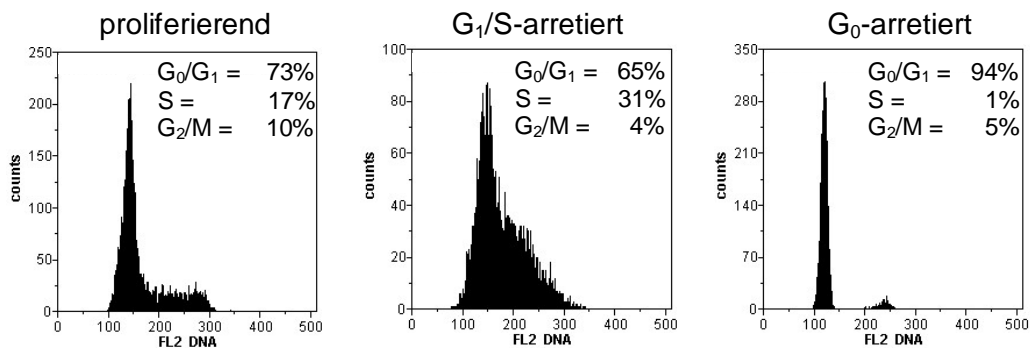


Abb. 3.11: Analyse des DNA-Gehaltes arretierter Fibroblasten. In den Histogrammen sind die FACS-Analysen proliferierender und arretierter Fibroblasten (Alpha-1) nach Propidium-Iodid-Färbung dargestellt. Angegeben ist der prozentuale Anteil der analysierten Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase.

3.2.3 Transduktion proliferierender, G₁/S-arretierter und ruhender Fibroblasten mit SIVsmmPBj-, HIV-1- und MLV-abgeleiteten Vektoren

Nachdem nun primäre Fibroblasten in den verschiedenen Zellzyklusphasen zur Verfügung standen, konnten die HIV-1-, SIVsmmPBj- und MLV-abgeleiteten Vektoren auf diesen Zellen miteinander verglichen werden. Dazu wurden die lentiviralen, mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren über Kotransfektion der *env*-deletierten Vektorkonstrukte pPBjΔenv bzw. pNL4-3Δenv mit dem VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G im Verhältnis 20:1 bzw. 5:1 in 293T Zellen generiert. [MLV_{LacZ}(VSV-G)]-Pseudotyp-Vektoren wurden von 293T Zellen abgeerntet, die mit dem Verpackungskonstrukt pHit60, dem Transfervektorkonstrukt pMgSLdelS-LacZ und pMD.G Verhältnis 1:1:0,2 co-transfiziert worden waren. Die Vektoren wurden parallel auf proliferierenden, G₁/S-arretierten und ruhenden Alpha-1 austitriert. Die Effizienz eines Vektors auf den in verschiedenen Phasen des Zellzyklus arretierten Zielzellen wird ausgedrückt durch die Berechnung des prozentualen Anteils des Titers in den entsprechenden Zellen bezogen auf den Titer des gleichen Vektors auf proliferierenden Zielzellen. Die entsprechenden Vektortiter wurden über den direkten Nachweis der Expression viraler Proteine durch Immunfärbung (IPA), bei den MLV-abgeleiteten Vektoren über X-Gal-Färbung der transduzierten Alpha-1 bestimmt. In Abb. 3.12 sind die Ergebnisse eines repräsentativen Experimentes dargestellt, in Abb. 3.13 sind die Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

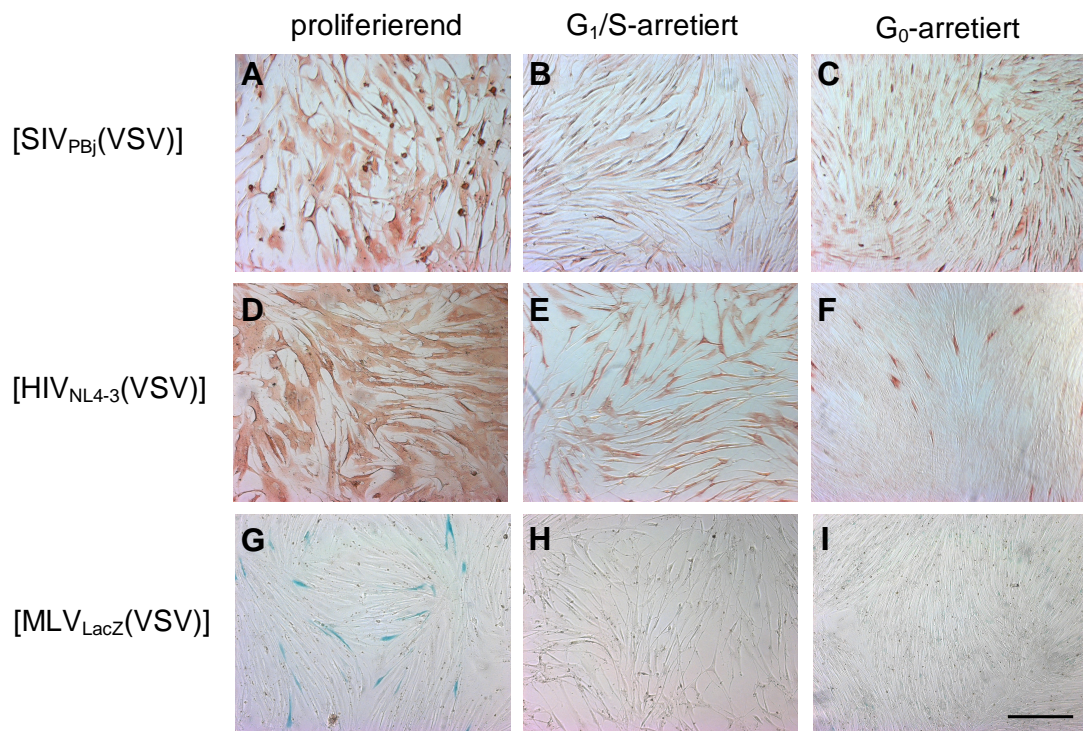


Abb. 3.12: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Alpha-1 diploider Fibroblasten (200x Vergrößerung; Maßstab, 200 μ m; **A-F:** IPA / **G-I:** X-Gal-Färbung)

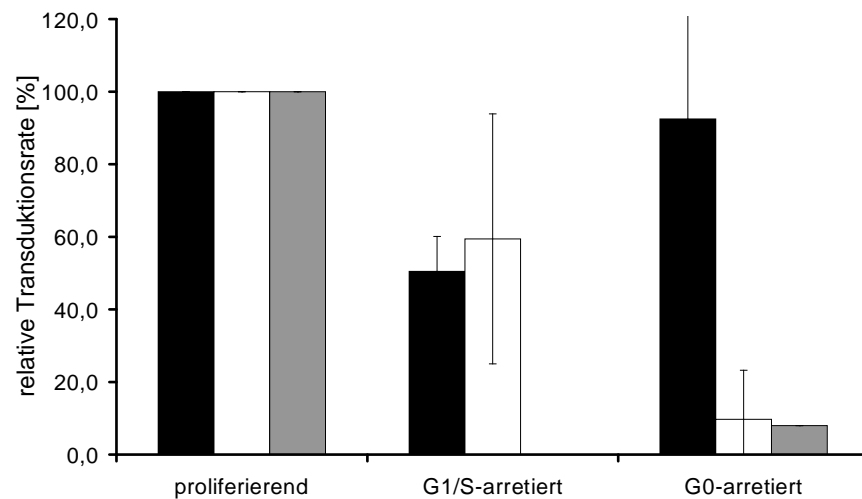


Abb. 3.13: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Alpha-1 diploider Fibroblasten. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitern auf den proliferierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimente und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). (■ = [SIV_{PBj}](VSV), □ = [HIV-1(VSV)], ▒ = [MLV_{LacZ}](VSV))

Die Vektoren zeigten das gleiche Verhalten wie auf den GHOST CXCR4 Zellen: Die MLV-abgeleiteten Vektoren transduzierten erwartungsgemäß nur die proliferierenden Zielzellen, während HIV-1-abgeleitete Vektoren zusätzlich noch die G₁/S-arretierten GHOST-Zellen, kaum jedoch die ruhenden Zielzellen transduzieren konnten. Ausschließlich die [SIV_{PBj}](VSV) Vektoren waren in der Lage, alle drei Zielzellpopulationen mit deutlicher Effizienz zu transduzieren.

3.2.4 Konstruktion von Markergen-übertragenden SIVsmmPBj- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren

Der Zweck von viralen Vektoren ist die Übertragung von therapeutischen Genen in die zu behandelnden Zielzellen. Die bisher getesteten SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren übertrugen allerdings nur virale Gene in die transduzierten Zellen. Um die Übertragung eines nicht-viralen Gens und eine einfachere Detektion der transduzierten Zellen zu ermöglichen, sollten nun SIVsmmPBj- und die korrespondierenden HIV-1-abgeleiteten Vektoren konstruiert werden, die das *egfp*-Gen auf die Zielzellen funktionell übertragen. Eine Expression dieser Gens lässt sich anhand der Fluoreszenz des kodierten EGFP-Proteins im Fluoreszenzmikroskop oder durch FACS-Analyse nachweisen.

Zwei verschiedene Strategien wurden eingesetzt, um *egfp*-übertragende Vektoren zu konstruieren. Zum einen wurden IRES-*egfp*-Kassetten in den zerstörten *env*-ORF der viralen Vektoren kloniert. Das Markergen sollte also von gespleißten *env*-mRNA exprimiert werden, wobei die Proteintranslation an der IRES startet. Dadurch steht die Markergen-Expression unter der Kontrolle des viralen LTR-Promotors, unter dessen Regulation die *env*-mRNA transkribiert wird. In einem zweiten Ansatz wurde das *egfp*-Gen

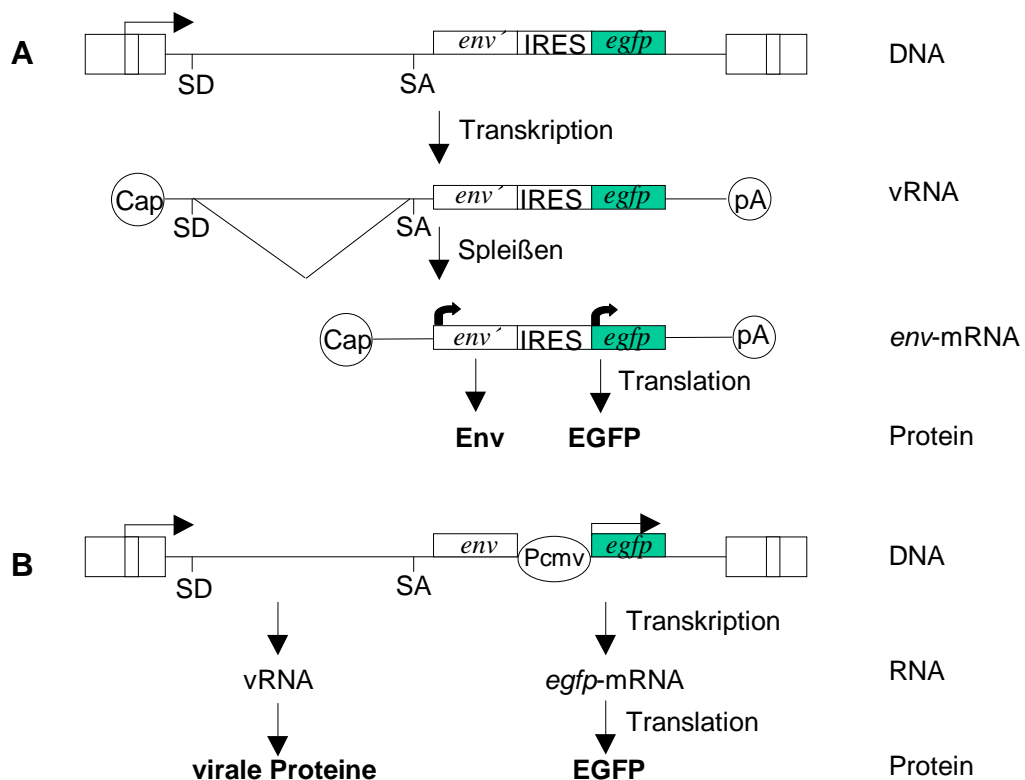


Abb. 3.14: Schematische Darstellung der Expression des Markergens in den *egfp*-transferierenden Konstrukten. Die LTR-Struktur ist durch das 3-geteilte Kästchen repräsentiert. ▭▶ = Transkriptionsstart, SD = Spleiß-Donor, SA = Spleiß-Akzeptor, vRNA = virale RNA. (A) IRES-Element tragende Konstrukte. IRES = internal ribosomal entry site, Cap = Capping-Struktur, pA = Polyadenylierung, ◀◻ = Translationsstart. (B) Konstrukte mit internem Promotor

unter der Kontrolle eines zweiten, von der LTR unabhängigen Promotors in das Vektor-Genom (ebenfalls in den zerstörten *env*-ORF) kloniert, um die Expression aller anderen viralen Proteine möglichst wenig zu beeinträchtigen (Abb. 3.14).

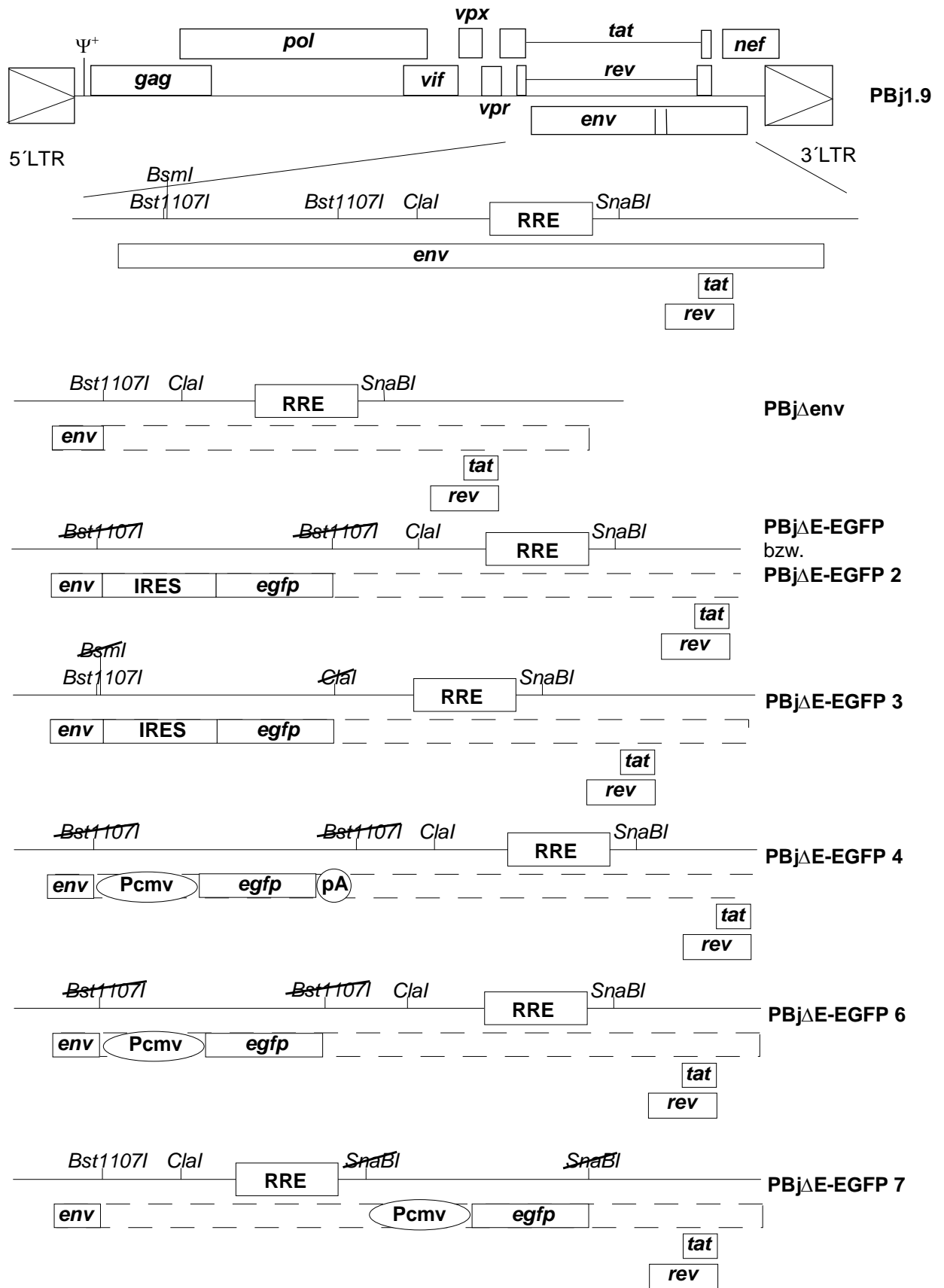
Für die Klonierung der IRES-*egfp*-Kassette wurden pIRES-EGFP und pGTe-IRES-EGFP als Ausgangsplasmide getestet, von denen bekannt war, dass sich die IRES-Regionen beider Plasmide deutlich in der Expressionstärke des IRES-getriebenen Gens unterscheiden. Die IRES-*egfp*-Fragmente wurden mit *Ppu10I/BclI* bzw. *BpI* geschnitten und nach Klenow-Behandlung über eine blunt-end-Klonierung in das mit *BstZ17I* geöffnete pPBjΔenv-Plasmid ligiert. Es ergaben sich so die Plasmid-Konstrukte pPBjΔE-EGFP bzw. pPBjΔE-EGFP2. Da die IRES-*egfp*-Fragmente mit ca. 1,4 kb etwas größer waren als das über *BstZ17I* aus dem Vollängenvirus deletierte *env*-Fragment (1,024 kb) war es nicht auszuschließen, dass die resultierenden längeren Vektorgenome weniger effizient in die Virionen verpackt werden. Daher sollte in einem dritten Konstrukt, pPBjΔE-EGFP3, ein 1386 bp großes Fragment über *BsmI/ClaI* aus dem *env*-ORF von pPBj1.9 deletiert und durch das IRES-EGFP-Fragment aus pGTe-IRES-EGFP ersetzt werden

Für die Klonierung der Promotor-*egfp*-Konstrukte wurde das Plasmid pEGFP-N1 ausgewählt. Dieses Plasmid besitzt ein über den starken, konstitutiv aktiven CMV-Promotor (P_{CMV}) getriebenes *egfp*-Gen, gefolgt von einem SV40-poly-Adenylierungssignal (pA). Die gesamte P_{CMV} -*egfp*-pA-Expressionskassette wurde über *AseI/AflIII* aus pEGFP-N1 ausgeschnitten und nach Klenow-Behandlung über eine blunt-end-Klonierung in das mit *BstZ17I* geöffnete pPBjΔenv-Plasmid ligiert. Die EGFP-Expressionskassette befand sich somit im SU-Bereich des *env*-Gens upstream des Rev-responsiven Elementes (RRE). Dieses Konstrukt wurde pPBjΔE-EGFP4 genannt. Als zweite Variante wurde nur das P_{CMV} -*egfp*-Fragment über *AseI/NotI* aus pEGFP-N1 ausgeschnitten und nach Klenow-Behandlung über eine blunt-end-Klonierung in das mit *BstZ17I* geöffnete pPBjΔenv-Plasmid ligiert. Die EGFP-Expressionskassette befand sich damit an der gleiche Stelle upstream des RRE, die entstehende EGFP-mRNA wird allerdings nicht von einem eigenen pA-Signal, sondern vom viralen pA-Signal am 3'-Ende der R-Region der 3'-LTR beendet und trägt somit auch das RRE. Dieses Konstrukt trägt den Namen pPBjΔE-EGFP6. Schließlich wurde pPBjΔE-EGFP7 kloniert: Wie bei pPBjΔE-EGFP6 wurde nur das P_{CMV} -*egfp*-Fragment über *AseI/NotI* aus pEGFP-N1 ausgeschnitten, allerdings 3' des RRE über blunt-end Klonierung nach Klenow-Behandlung beider Plasmidfragmente in das mit *SnaBI*

geöffnete Plasmid pPBj Δ env ligiert. Die entstehende EGFP-mRNA dieses Konstruktes trägt somit nicht das RRE.

Um die SIVsmmPBj-abgeleiteten Konstrukte direkt mit gleichermaßen konstruierten HIV-Vektoren vergleichen zu können, wurden auf Basis des infektiösen HIV-1 Moleklarklons NL4-3 die im Folgenden aufgeführten HIV-Vektoren kloniert. Um ein direkt mit pPBj Δ env vergleichbares HIV-1-Konstrukt zu erhalten, wurde pNL4-3 Δ env durch Deletion eines Abschnitts des *env*-ORFs von pNL4-3 mittels *Acc65I/BsaBI*-Verdau, Klenow-fill-in und Religation kloniert. Korrespondierend zu pPBj Δ E-EGFP2 wurde pNL4-3 Δ E-EGFP durch Klonierung des mit *BlpI* ausgeschnittenen IRES-*egfp*-Abschnitts aus pGTe-IRES-EGFP in das mit *Acc65I/BsaBI* verdaute und durch Klenow-fill-in blunt-end gestaltete pNL4-3 Δ env-Plasmid (vor Religation) konstruiert. Für pNL4-3 Δ E-EGFP2 bzw. pNL4-3 Δ E-EGFP3 (korrespondierend zu pPBj Δ E-EGFP4 bzw. pPBj Δ E-EGFP6) wurden in derselben Position die gesamte P_{CMV} -*egfp*-pA-Expressionskassette (über *AseI/AflIII* aus pEGFP-N1 ausgeschnitten) bzw. nur das P_{CMV} -*egfp*-Fragment (über *AseI/NotI* aus pEGFP-N1 ausgeschnitten) nach Klenow-Behandlung über eine blunt-end-Klonierung eingesetzt. Für das Konstrukt pNL4-3 Δ E-EGFP4 (korrespondierend zu pPBj Δ E-EGFP7) wurde das P_{CMV} -*egfp*-Fragment über PCR aus pEGFP-N1 amplifiziert und mit *AvaI*-Schnittstellen an den Enden versehen. Als Primer wurden die Oligonukleotide Ava-CMV-EGFP(+) und Ava-SA-CMV-EGFP(-) verwendet. Das resultierende PCR-Fragment wurde nach partiellem *AvaI*-Verdau in das pNL4-3 Δ env-Plasmid, geöffnet über *AvaI*, kloniert. Die Strukturen aller SIVsmmPBj-abgeleiteten Konstrukte sind in Abb 3.15 dargestellt. Die Identität der Plasmide wurde über analytische Restriktionsverdau bestätigt.

Abb. 3.15: (nächste Seite) Schematische Darstellung des Genoms von SIVsmmPBj1.9 (PBj) sowie eines Ausschnitts der *env*-Region in den verschiedenen Konstrukten. Auf eine Darstellung der gleichermaßen konstruierten HIV-Konstrukte wurde verzichtet. Fett und kursiv sind die verschiedenen Gene bezeichnet, normal kursiv die Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme (durchgestrichen: durch Klonierung zerstört). Translatierte ORFs sind durch intakte Kästchen dargestellt, der zerstörte Bereich des *env*-ORFs durch ein gestricheltes Kästchen. Pcmv = CMV-Promotor, RRE = Rev-responsives Element, pA = Polyadenylierungssignal.



3.2.5 Funktionsfähigkeit der Markergen-übertragenden Vektoren

Um die Funktionsfähigkeit der neuen Vektorkonstrukte zu testen, wurden diese Vektorplasmide mit dem VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G in variablen Mengen in 293T-Zellen kotransfiziert. Die Überstände dieser Zellen wurden nach 48 h abgeerntet und auf HT1080 Zellen austitriert. Die verschiedenen Konstrukte wurden auf die Expression des Markergens in den transfizierten 293T-Verpackungszellen (VPZ) und den transduzierten HT1080 Zielzellen (ZZ) untersucht, wobei ein Signal in den HT1080-Zellen gleichzeitig die Fähigkeit der Vektorkonstrukte zur Bildung transduzierender Vektorpartikel bewies. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 3.5 zusammengefasst.

	PPBjΔE-EGFP	pPBjΔE-EGFP 2	pPBjΔE-EGFP 3	pPBjΔE-EGFP 4	pPBjΔE-EGFP 6
VPZ	+	+ / ++	+	+++	+++
ZZ	-	+ / -	-	-	+ / -
Titer	$<10^2$	1×10^3	$<10^2$	$<10^2$	4×10^6

	PPBjΔE-EGFP 7	pNL4-3ΔE- EGFP	pNL4-3ΔE- EGFP 2	pNL4-3ΔE- EGFP 3	pNL4-3ΔE- EGFP 4
VPZ	+++	+ / ++	+++	+++	+++
ZZ	+++	+ / -	-	+	+++
Titer	4×10^6	4×10^6	$<10^2$	4×10^6	2×10^6

Tab. 3.5: Quantifizierung der Expressionsstärke von EGFP anhand der im Mikroskop beobachteten GFP-fluoreszierender Zellen transfizierter Verpackungszellen (VZ) oder transduzierter Zielzellen (ZZ). Titerangabe auf HT1080 Zellen. (-: keine Fluoreszenz / +: schwach fluoreszierende Zellen / +++: sehr stark fluoreszierende Zellen)

Zwar zeigten alle Konstrukte nach Transfektion der Plasmide in 293T-Zellen eine Expression des Markergens, jedoch variierte die Expressionsstärke erheblich. Insbesondere zeigte sich, dass alle IRES-Konstrukte nur eine schwache Expression von EGFP in den 293T Zellen induzierten, während die Transfektion aller CMV-EGFP-Konstrukte ein starkes EGFP-Signal ergab. Auf den transduzierten HT1080 gestalteten sich die Ergebnisse vielschichtiger: Für die Konstrukte pPBjΔE-EGFP, pPBjΔE-EGFP3, pPBjΔE-EGFP4 und das zu pPBjΔE-EGFP4 korrespondierende HIV-Konstrukt pNL4-3ΔE-EGFP2 konnten keine Vektorpartikel nachgewiesen werden, die das Markergen auf die HT1080 übertragen. Bei den Konstrukten pPBjΔE-EGFP2 und pPBjΔE-EGFP6 sowie den jeweils korrespondierenden HIV-Konstrukten pNL4-3ΔE-EGFP und pNL4-3ΔE-EGFP3 konnten zwar Markergen-positive Zielzellen nach Transduktion detektiert werden, die Fluoreszenz dieser Zellen war jedoch sehr gering. Die Bildung von hochtitrigen Vektorpräparationen sowie eine gute Expression von EGFP in den transduzierten Zielzellen konnte nur durch

Verwendung der Konstrukte pPBj Δ E-EGFP7 und pNL4-3 Δ E-EGFP4 erreicht werden, die beide *egfp* unter der Kontrolle eines internen CMV-Promotors downstream des RRE exprimieren. Daher wurden für die folgenden Versuche mit EGFP-übertragenden Vektoren diese Konstrukte verwendet.

3.2.6 Transduktion proliferierender, G₁/S-arretierter und ruhender Fibroblasten mit *egfp*-übertragenden Vektoren

Jetzt sollte getestet werden, ob die neu klonierten, *egfp*-übertragenden SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren immer noch die Eigenschaft besitzen, ruhende Fibroblasten zu transduzieren, die von den korrespondierenden HIV-1-abgeleiteten Vektoren nicht mehr effizient transduziert werden können. Dazu wurden die entsprechenden lentiviralen Vektoren über Kotransfektion der Vektorkonstrukte pPBj Δ E-EGFP7 bzw. pNL4-3 Δ E-EGFP4 mit dem VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G im Verhältnis 5:1 bzw. 2,5:1 in 293T Zellen generiert. Zum Vergleich wurden auch MLV-abgeleitete Vektoren hergestellt: [MLV_{EGFP}(VSV)]-Pseudotypvektoren wurden von 293T Zellen abgeerntet, die mit dem Verpackungskonstrukt pHit60, dem *egfp*-übertragenden Transfervektorkonstrukt pMgSL Δ elS-EGFP und pMD.G im Verhältnis 1:1:0,2 kotransfiziert wurden. Diese Vektoren wurden parallel auf proliferierenden, G₁/S-arretierten und ruhenden Alpha-1 austitriert und die relative Transduktionseffizienzen wie in 3.2.3 dargelegt anhand der Anzahl der EGFP-exprimierenden Zellen bestimmt. In Abb. 3.16 sind die Bilder eines repräsentativen Experimentes dargestellt, in Abb. 3.17 wurden die Daten von 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Diese Daten zeigen, dass in unserem Testsystem auch der Transfer des Markergens *egfp* in ruhende Fibroblasten nur mit Hilfe der SIV_{smm}PBj-abgeleiteten Vektoren möglich war. Demgegenüber konnten die getesteten MLV- oder HIV-1-abgeleiteten Vergleichsvektoren wie erwartet nur in den proliferierenden bzw. zusätzlich in den G₁/S-arretierten Fibroblasten eine effiziente Expression von EGFP hervorrufen. Damit zeigt sich eine Unabhängigkeit der Effizienz der PBj-abgeleiteten Vektoren sowohl von der Art des nachgewiesenen Genprodukts als auch vom Promotor, durch den das nachgewiesene Genprodukt exprimiert wird.

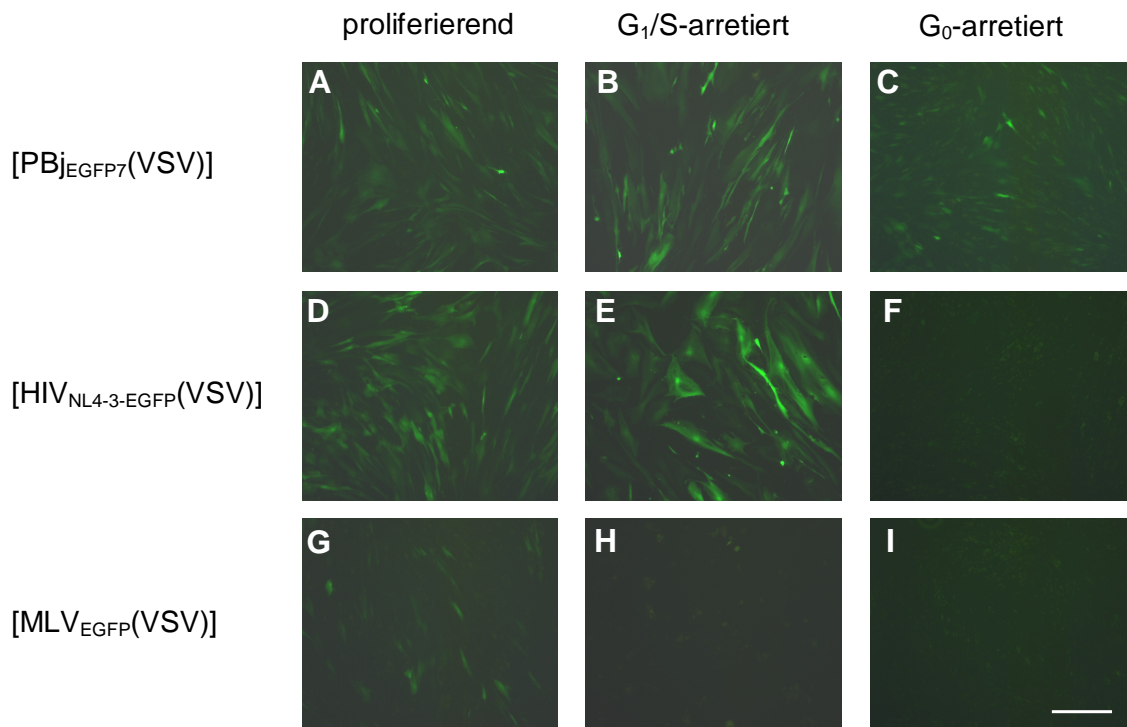


Abb. 3.16: Vergleich der Effizienz verschiedener *egfp*-transferierender Vektoren zur Transduktion arretierter Alpha-1 Fibroblasten. GFP-Fluoreszenz der transduzierten Zellen (200x Vergrößerung; Maßstab, 200 µm; UV-Fluoreszenz)

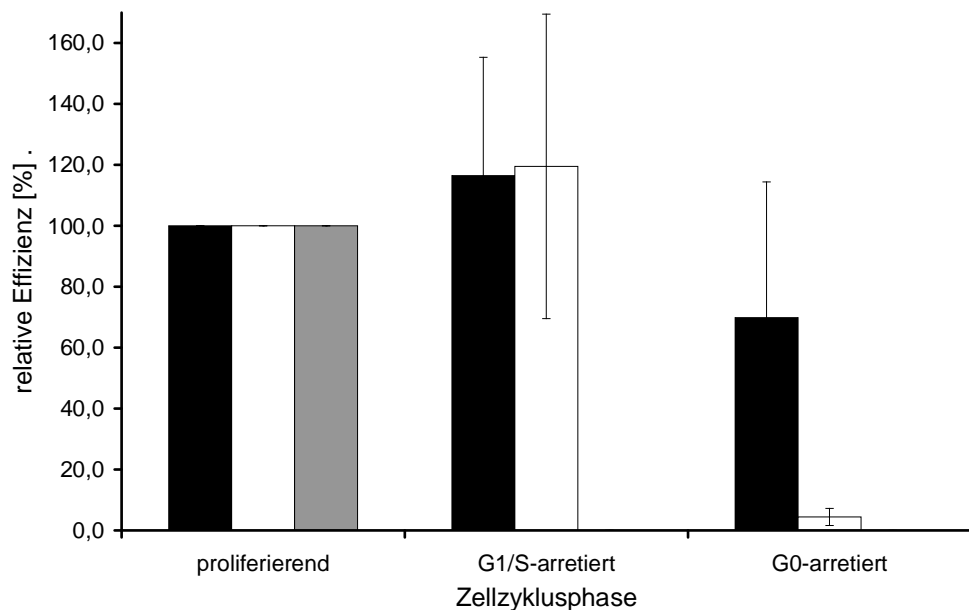


Abb. 3.17: Vergleich der Effizienz verschiedener *egfp*-transferierender Vektoren zur Transduktion arretierter Alpha-1 diploider Fibroblasten. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitern auf den proliferierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimente und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken) (■ = [SIV]_{PBj}-EGFP7(VSV)), □ = [HIV-1]_{NL4-3}-EGFP(VSV)], ▒ = [MLV]_{EGFP}(VSV))

3.2.7 Ausschluss von Pseudotransduktion

Ein Problem beim Nachweis eines Gentransfers durch virale Vektoren ist die sogenannte Pseudotransduktion. Hierbei handelt es sich um eine Übertragung des auch in den

Verpackungszellen exprimierten Markerproteins auf die Zielzellen. Deshalb sollte überprüft werden, ob die anhand des Protein-Nachweises von „Marker-Gen-Produkten“ beobachteten Transduktionsereignisse tatsächlich durch eine *de novo* Proteinexpression in den transduzierten Zellen zu Stande kommen. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Transduktionen auf arretierten und proliferierenden Zielzellen parallel ohne oder mit Zusatz von 10 μ M Azidothymidin (AZT), einem Inhibitor der retroviralen reversen Transkriptase, durchgeführt, und die Titer bestimmt. Während AZT auf eine Pseudotransduktion keinen Effekt hat, werden retrovirale Transduktionen durch Inhibition der reversen Transkription stark reduziert. Die mit AZT erreichten Inhibitionsraten für die verschiedenen Vektoren und Zielzellen sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

	Ghost CXCR4		Alpha-1	
	PBj	HIV	PBj	HIV
proliferierend	97,6	90	82	97
G ₁ /S-arretiert	97	84,5	78	88
G ₀ -arretiert	97,7	n.t.	95	n.t.

Tab. 3.6: Inhibition der Transduktion PBj- und HIV-abgeleiteter Vektoren auf arretierten GHOST CD4-CXCR4 oder Alpha-1 Fibroblasten durch AZT. Angegeben sind die Inhibitionsraten auf den verschiedenen Zellen in Prozent.

Anhand der starken Inhibition sowohl der SIVsmmPBj- als auch der HIV-1-abgeleiteten Vektoren durch AZT auf beiden Zellen ließ sich zeigen, dass die nachgewiesenen Markerproteine in den Zielzellen auf eine *de novo* Expression des übertragenen Vektorgenoms zurückzuführen sind. Somit lässt sich ausschließen, dass die in den vorangegangenen Experimenten gewonnenen Daten auf Pseudotransduktion beruhen

3.2.8 Integration proviraler DNA in transduzierten Zielzellen

Abschnitt 3.2.7 hat gezeigt, dass die Genome der verwendeten retroviralen Vektoren revers transkribiert werden müssen, um eine Expression der entsprechenden Markerproteine zu erreichen. Es ist jedoch außerdem vorstellbar, dass die Proteinexpression nicht von integrierter Vektor-DNA herrührt, sondern dass auch nicht integrierte virale Vektor-DNA in den Zielzellen zur Expression der Proteine ausreichen könnte. Die Integration der retroviralen DNA in den Zielzellen ist jedoch einer der entscheidenden Vorteile bei der Verwendung eines retroviralen Vektorsystems. Daher sollte in diesem Abschnitt gezeigt werden, dass auch in den ruhenden Zielzellen eine Integration des Transfervektors der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren erfolgt.

3.2.8.1 Nachweis der Integration durch Southern Hybridisierung

Die in infizierten bzw. transduzierten Zielzellen vorhandene retrovirale DNA kann nach der reversen Transkription mehrere Formen annehmen (s. Abb. 3.18). Direkt nach reverser Transkription liegt die virale DNA linear, nicht integriert in den Zielzellen vor. Diese lineare DNA wird normalerweise als Bestandteil eines Prä-Integrationskomplexes in den Nukleus der infizierten Zellen transportiert. Dort kann die virale DNA mit Hilfe der viralen Integrase an einer mehr oder weniger zufälligen Stelle ins Zellgenom integrieren (vgl. Wu X, 2003; Schroder AR, 2002). Allerdings kann es auch durch zelluläre Ligasen zu einer Ligation der 5'- und 3'-LTR unter Ringbildung des viralen Genoms kommen, es entstehen dadurch sogenannte 2-LTR-Ringe. Eine weitere Möglichkeit innerhalb des Zellkerns ist die homologe Rekombination der 5' und 3'-LTR der viralen DNA. Dabei entstehen sogenannte 1-LTR-Ringe.

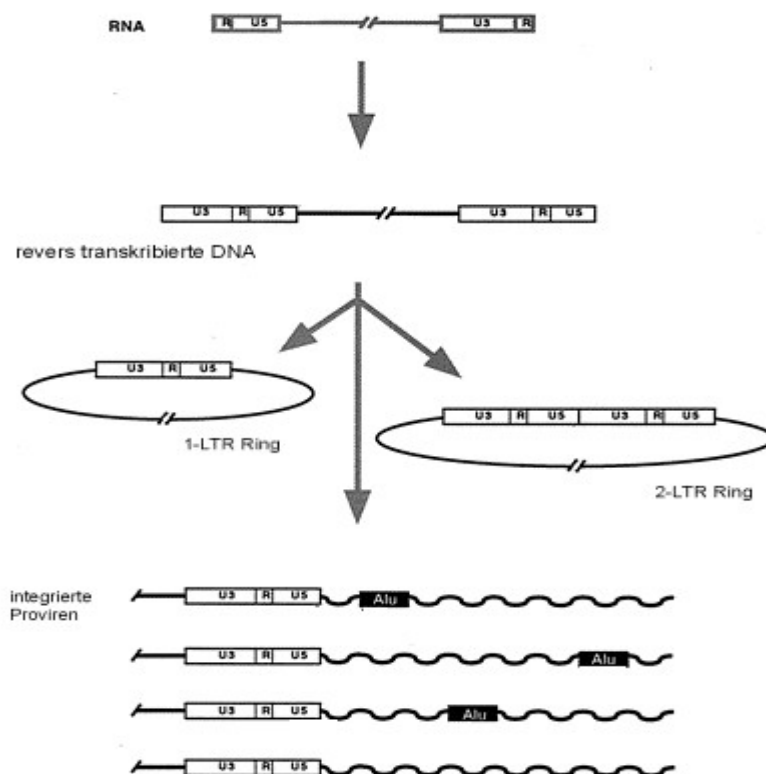


Abb. 3.18: Schematische Darstellung der verschiedenen Formen proviraler DNA, die in infizierten Zellen nach reverser Transkription vorliegen können. U3-R-U5 repräsentiert virale LTR. (nach: Butler SL, 2001)

Die verschiedenen Formen proviraler DNA lassen sich bei HIV-1-Viren und -Vektoren über Southern Blot Hybridisierung unterscheiden (Charneau P, 2000). Für die in dieser Arbeit verwendeten SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren wurde dieses Verfahren modifiziert angewendet (Abb. 3.19). Das Genom von SIVsmmPBj1.9 enthält 3 *XmnI*-

Schnittstellen (bp 1266, 3191 und 8396). Eine radioaktiv markierte DNA-Sonde homolog zu dem Genomabschnitt zwischen bp 766 und 1766 (PBj-Probe 1) kann mit den ersten beiden Fragmenten eines *XmnI*-verdauten SIVsmmPBj-Provirus/proviralen Vektors hybridisieren und diese somit in gleichem Maß detektieren. Ist die provirale DNA in den Zielzellen integriert, so kann nur das 2. Fragment mit Hilfe der Sonde bei einer definierten Fragmentgröße von hier 1,9 kb detektiert werden, da die Randfragmente auf Grund der zufälligen Integrationsstelle des Provirus keine definierte Bande bilden. Für alle Formen nicht integrierter proviraler DNA lässt sich abgesehen vom 1,9 kb-Fragment jeweils ein weiteres Fragment definierter Größe detektieren (linear: 1,8 kb; 1-LTR-Ring: 2,4 kb; 2-LTR-Ring: 3,2 kb). Der Anteil integrierter proviraler DNA kann durch Subtraktion der Intensität aller übrigen Banden von der Intensität der 1,9 kb-Bande ermittelt werden (Abb. 3.19).

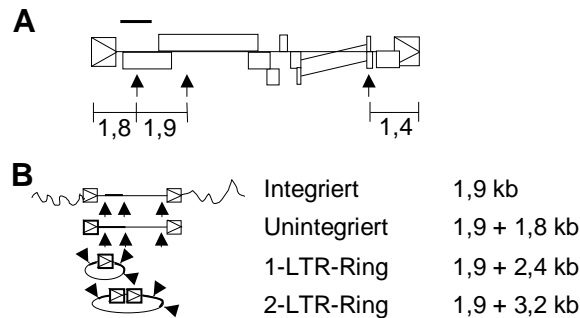


Abb. 3.19: Strategie zum Nachweis der verschiedenen DNA-Formen durch Southern Blot Hybridisierung. (A) Schema der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren. Pfeile zeigen *XmnI*-Schnittstellen an, die Größe der Restriktionsfragmente ist angegeben (kb). Die ^{32}P -markierte Hybridisierungssonde wird durch den schwarzen Balken repräsentiert. (B) Schema der verschiedenen DNA-Formen, die nach reverser Transkription in infizierten Zellen vorliegen können. Pfeile zeigen *XmnI*-Schnittstellen an. Spezifische Fragmente, die von der Hybridisierungssonde detektiert werden, sind fett dargestellt, ihre Größe ist angegeben.

Es wurden proliferierende sowie G_1/S -arretierte und G_0 -arretierte GHOST CXCR4 bzw. Alpha-1-Zellen bei gleicher $\text{moi} = 2$ mit [SIV_{PBj}(VSV)] bzw. [SIV_{PBj}-EGFP7(VSV)] wie beschrieben transduziert und 3 Tage kultiviert. Danach wurde die DNA der transduzierten Zellen isoliert und mit *XmnI* und *EcoRV* (*EcoRV* schneidet nicht im viralen Genom, aber erleichtert den Verdau genomischer DNA durch *XmnI* durch Verkleinerung der DNA-Fragmente) verdaut. Jeweils 15 μg verdaute DNA wurden pro Spur auf 0,8%-TAE-Agarose-Gele aufgetragen, bei 35 V aufgetrennt und auf eine geladene Nylon-Membran gebロットet. Am nächsten Tag erfolgte die Hybridisierung der UV-fixierten Blots mit durch $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markierter PBj-Probe1-Sonde. Die Autoradiogramme der Blots sind in Abb. 3.20 gezeigt.

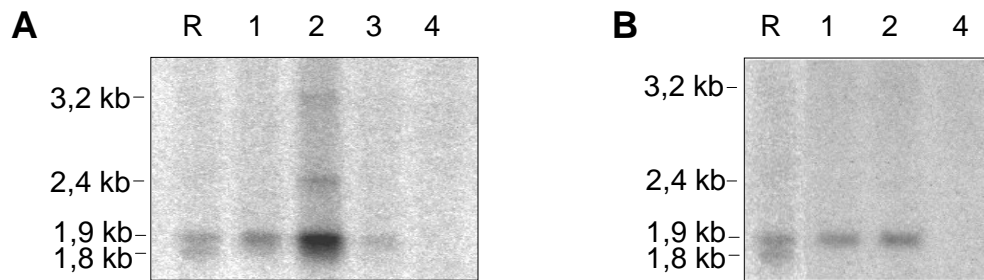


Abb. 3.20: Nachweis der Integration proviraler DNA: Southern Blots genomischer DNA PBJ-transduzierter Zellen (R = PM-1-Zellen infiziert mit PBJ1.9, 1 = proliferierend, 2 = G₁/S-arrestiert, 3 = G₀-arrestiert, 4 = Mock-Kontrolle) (A) GHOST CXCR4 transduziert mit [SIV_{PBJ}(VSV)], (B) Alpha-1 transduziert mit [SIV_{PBJ-EGFP7}(VSV)].

Deutlich ist zu erkennen, dass alle transduzierten Zielzell-Populationen prinzipiell dasselbe Bandenmuster aufwiesen. Als Kontrollen waren mit replikationsfähigem PBJ1.9 infizierte PM1-Zellen eingesetzt. Diese zeigten deutlich neben integrierter auch nicht-integrierte, lineare provirale DNA durch eine zusätzliche Bande bei 1,8 kb an. Dagegen sind bei den transduzierten Zellen hauptsächlich Banden bei 1,9 kb zu detektieren, die darauf hinweisen, dass der überwältigende Teil der in den Zielzellen detektierten Proviren in das zelluläre Genom integriert ist, unabhängig davon, in welcher Phase des Zellzyklus sich die transduzierten Zellen befanden. Lediglich bei den G₁/S-arrestierten GHOST-CXCR4 Zellen sind noch schwache Nebenbanden bei 2,4 und 3,2 kb zu beobachten, deren Intensität aber gegenüber der starken 1,9 kb-Bande zu vernachlässigen ist.

3.2.9 Transduktion von primären humanen Monozyten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die SIV_{smmPBJ}-abgeleitete Vektoren in Zellkultursystemen ruhende humane Zelle deutlich effizienter transduzieren konnten als korrespondierende HIV-1-abgeleitete Vektoren, sollten sie auch auf primären humanen Zellen getestet werden. Andere Arbeiten haben beschrieben, dass frisch isolierte, undifferenzierte humane Monozyten nicht durch HIV-1 abgeleitete Vektoren transduziert werden können, sondern *in vitro* zu Makrophagen oder DCs ausdifferenzieren müssen, um mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren transduzierbar zu sein (Neil S, 2001). Die Ausdifferenzierung transgener Monozyten in Antigen-präsentierende Zellen (APCs) *in vitro* und *in vivo* bietet Monozyten als Target-Zellen für verschiedene Gentherapieansätze an. Wir wählten diese primären Zellen daher aufgrund ihrer Relevanz für gentherapeutische Ansätze und zusätzlich wegen ihrer leichten Charakterisierbarkeit und einfachen Verfügbarkeit als Zielzellen für unsere nächsten Transduktionsexperimente aus.

Aus dem Citrat-Blut von 4 freiwilligen, gesunden anonymen Spendern wurden Leukozyten über einen Ficoll-Stufengradienten präpariert. Aus den Leukozyten wurden unbehandelte Monozyten durch Negative-Depletion über immunomagnetische MACS-Separierung

isoliert (routinemäßig =90% Reinheit, Kontrolle über FACS-Analyse, nicht gezeigt) und kultiviert. Die publizierte Ausdifferenzierung (Neil S, 2001) der Monozyten zu Makrophagen unter den Kulturbedingungen wurde anhand der morphologischen Veränderungen der kultivierten Zellen sowie der Abnahme der Oberflächenexpression des Zellmarkerproteins CD86 verfolgt (Abb. 3.21).

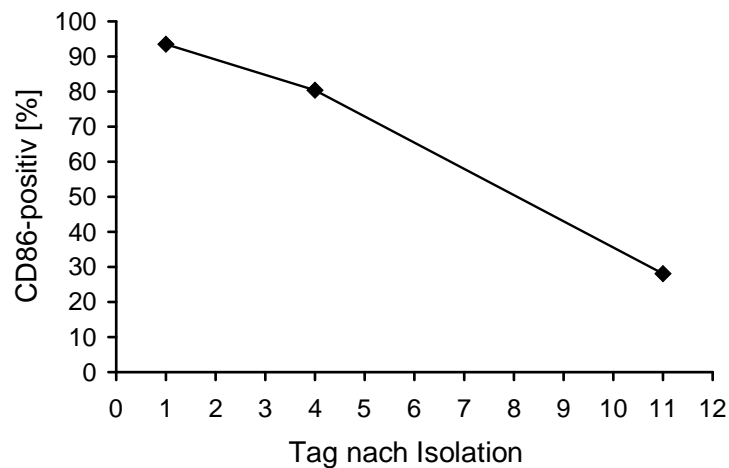


Abb. 3.21: Oberflächenexpression von CD86 auf kultivierten, primären humanen Monozyten. CD86-Expression in Monozyten bzw. abgeleiteten Makrophagen, die am angegebenen Tag nach Isolation gefärbt und im FACS analysiert wurden. Ein repräsentativer Donor.

Diese gleichmäßige Abnahme des zwar auf Monozyten und dendritischen Zellen, nicht jedoch auf Makrophagen exprimierten Markerproteins zeigt, bei gleichzeitig konstant hoher CD14-Expression (>90%, nicht gezeigt), dass die ausgesäten Monozyten wie erwartet in Makrophagen ausdifferenzieren.

Diese Zellen wurden an Tag 1, 2, 3, 4, 7 und 11 nach Isolation mit einer $moi = 10$ für 8 h mit [SIV_{PBj}-EGFP7(VSV)], [HIV_{NL4-3}-EGFP(VSV)] und den [HIV_{HR}-GFP(VSV)] und [MLV_{EGFP}(10A1)]-Vektoren (vgl. Kapitel 3.1) parallel transduziert. Nach gründlichem Waschen der transduzierten Zellen mit PBS wurden diese weitere 8 Tage kultiviert. Diese Kulturen wurden anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert und der Anteil transduzierter Zellen ausgezählt. Abb. 3.22 zeigt Bilder von transduzierten Monozyten/Makrophagen eines repräsentativen Donors. In Abb. 3.23 sind die Ergebnisse eines repräsentativen aus 3 unabhängigen Experimenten für alle 4 Donoren dargestellt.

Die getesteten MLV-abgeleiteten Vektoren zeigten wie erwartet keine Transduktion auf Monozyten bzw. differenzierten Makrophagen (nicht gezeigt). Auf den primären humanen Monozyten war im Vergleich zu den HIV-Vektoren eine deutlich höhere Effizienz der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren zu beobachten. Während beide HIV-1-abgeleiteten

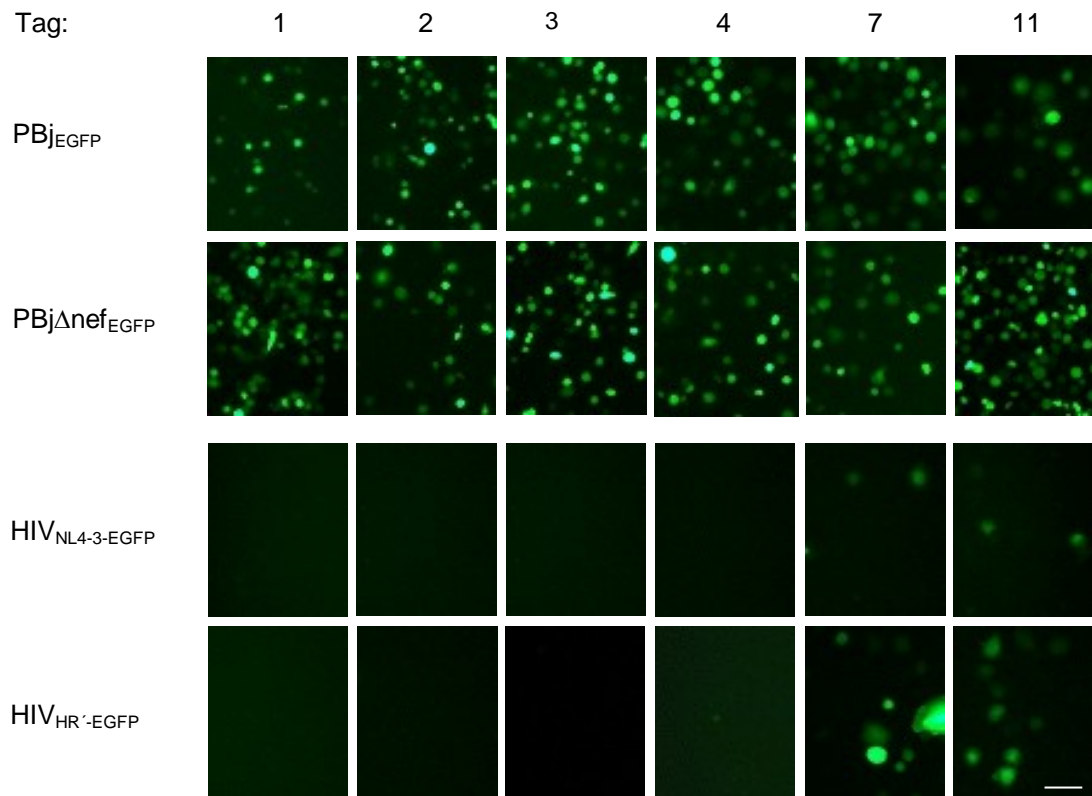


Abb. 3.22: Transduktion primärer humaner Monozyten mit verschiedenen *egfp*-transferierenden, HIV- und SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren. EGFP-Expression in Monozyten bzw. abgeleiteten Makrophagen, die am angegebenen Tag nach Isolation transduziert wurden. Die Analyse erfolgte 1 Woche nach Transduktion. Ein repräsentativer Donor, das gesamte Muster ließ sich in allen 6 getesteten Donoren reproduzieren. PBj_{EGFP}: [SIV_{PBj-EGFP7}(VSV)], PBj_{Δnef}_{EGFP}: [SIV_{PBjΔnef-EGFP7}(VSV)] (s. Kap 3.3.1.4), HIV_{NL4-3-EGFP}: [HIV_{NL4-3-EGFP}(VSV)], HIV_{HR}-EGFP: [HIV_{HR}-EGFP(VSV)]. (200x Vergrößerung, Maßstab, 100 μm).

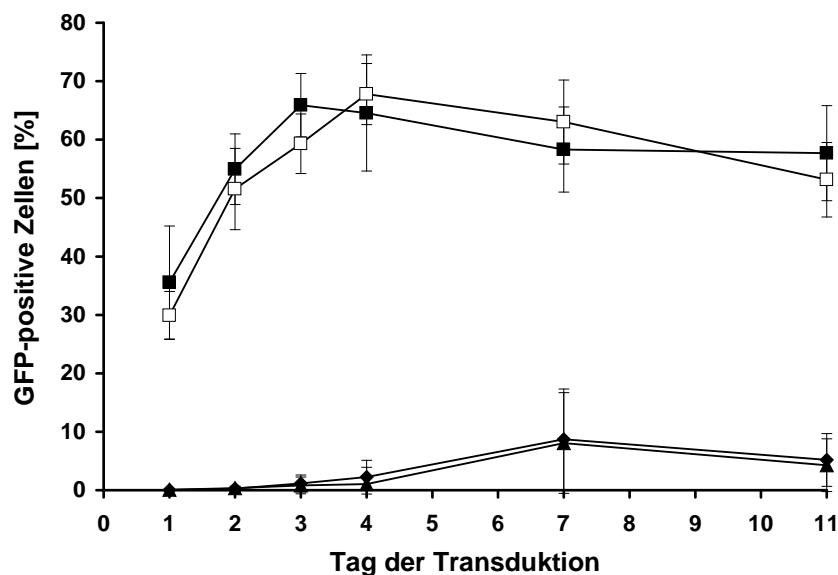


Abb. 3.23: Transduktion primärer humaner Monozyten mit verschiedenen *egfp*-transferierenden Vektoren. Prozentualer Anteil EGFP-exprimierender Monozyten/Makrophagen, die an unterschiedlichen Tagen nach Isolation der Monozyten transduziert und 1 Woche nach Transduktion analysiert wurden. Mittelwerte aus 4 verschiedenen Donoren in einem repräsentativen aus 3 unabhängigen Experimenten. □: [SIV_{PBj-EGFP7}(VSV)], ◻: [SIV_{PBjΔnef-EGFP7}(VSV)] (s. Kap 3.3.1.4), ▲: [HIV_{NL4-3-EGFP}(VSV)], △: [HIV_{HR}-EGFP(VSV)], Standardabweichung (Fehlerbalken).

Vektorsysteme erst ab Tag 7 deutliche Transduktionsraten zeigten (zwischen 3,2 und 14,0%), transduzierten die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren donorunabhängig bereits an Tag 1 über 30% der frisch isolierten Monozyten, und zeigten über alle getesteten Zeitpunkte eine wesentlich höhere Effizienz (bis zu 64,5% EGFP⁺-Monozyten an Tag 4).

3.2.9.1 Nachweis der Integration in primären humanen Monozyten

Die Integration der retroviralen DNA in den Zielzellen sollte in dem folgenden Abschnitt auch für die Transduktion der primären humanen Zellen gezeigt werden. Dazu wurde die gleiche Southern blot Technik angewendet, die in Abschnitt 3.2.8 bereits erläutert wurde. Es wurden MACS-isolierte Monozyten in 175 cm² Kulturflaschen kultiviert und an Tag 2 nach Isolation mit einer $moi = 10$ für 8 h mit den Vektoren [SIV_{PBj}-EGFP7(VSV)] oder [SIV_{PBj} Δ nef-EGFP(VSV)] (s. Kap. 3.3.1.4) transduziert. Nach 3 Tagen Kultivierung wurde die DNA der transduzierten Zellen isoliert und wie in Kap. 3.2.8.1 dargelegt weiter verarbeitet. Die Autoradiogramme der Blots sind in Abb. 3.24A gezeigt. Um den Anteil integrierter proviraler DNA zu ermitteln, wurde die Intensität der verschiedenen Banden densitometrisch bestimmt und der entsprechende Anteil der verschiedenen DNA-Formen errechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnung sind in Abb. 3.24B dargestellt.

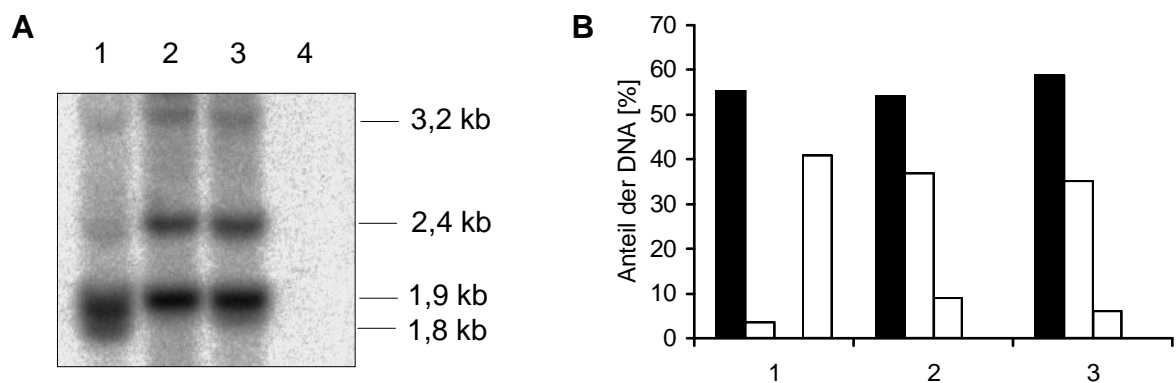


Abb. 3.24: Integration proviraler DNA. Southern Blots genomischer DNA PBj-transduzierter Zellen (1 = PM-1-Zellen infiziert mit PBj1.9, 2 = [SIV_{PBj}-EGFP7(VSV)], 3 = [SIV_{PBj} Δ nef-EGFP(VSV)], 4 = Mock-Kontrolle) (A) Autoradiogramm (B) densitometrische Auswertung (■ = integriert, ▣ = 1-LTR-Circle, □ = 2-LTR-Circle, □ = linear nicht-integriert).

Auch in primären Zellen ist somit erkennbar, dass der größte Teil der in den transduzierten Zellen gefundenen proviralen DNA chromosomal integriert vorliegt, wenn auch in diesen Zellen noch ein deutlicher Anteil der vorgefundenen DNA nicht-integriert nachgewiesen werden kann. Trotzdem belegen diese Ergebnisse eine retrovirale Transduktion dieser den bisherigen Vektoren nicht zugänglichen primären Zellpopulation durch die PBj-Vektoren.

3.3 Untersuchungen zur Aufklärung der besonderen Transduktionseigenschaften SIVsmmPBj-abgeleiteter Vektorsysteme

Es konnte in dieser Arbeit bisher gezeigt werden, dass die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren in der Lage sind, ruhende humane Zellen zu transduzieren, die resistent für eine Transduktion mit vergleichbaren HIV-1-abgeleiteten Vektoren sind. Die Grundlagen für das effiziente Transduktionsverhalten der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren waren allerdings unklar, da diese Vektoren noch alle viralen Gene mit Ausnahme von *env* sowohl in den Verpackungs- als auch in den Zielzellen exprimieren. Daher sollte in den abschließenden Experimenten der Einfluss des Nef-Proteins und der LTR-Aktivität von SIVsmmPBj1.9 auf das Transduktionsverhalten der Vektoren charakterisiert werden.

3.3.1 Einfluss des Nef-Proteins von SIVsmmPBj auf die Transduktionseffizienz

Aus vorangegangenen virologischen Arbeiten war bekannt, dass das viral Nef-Protein möglicherweise ein Hauptfaktor für die besonderen Eigenschaften des SIVsmmPBj1.9 darstellt. Für dieses Protein wurde außerdem gezeigt, dass es neben der 3'-LTR-Region in mit SIVagm chimären Viren dazu in der Lage ist, die Replikation in unstimulierten Primaten-PBMC zu ermöglichen (Dittmar MT, 1996). Ziel war daher, das *nef*-Gen der Vektoren zu inaktivieren, um seinen Einfluss auf das Transduktionsverhalten der resultierenden Vektoren zu studieren.

3.3.1.1 Herstellung einer *nef*⁻-Mutante von SIVsmmPBj

Um einen SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektor zu erhalten, der kein funktionelles *nef*-Gen mehr besitzt, sonst aber alle Charakteristika des Ausgangsvirus trägt, sollten möglichst minimale Änderungen im Vektorgenom vorgenommen werden. Um das *nef*-Gen vollständig auszuschalten, wurde das Start-ATG durch Punkt-gerichtete Mutagenese an Position bp 8573 (T→C) zerstört. Darüber hinaus wurden 3' des Start-ATG 2 Stop-Codons im *nef*-Leserahmen durch 2 gezielte Punktmutationen an den Positionen bp 8590 (A→T) und 8596 (C→T) erzeugt. Die Mutationen beeinflussten zwar außer dem *nef*-ORF noch den *env*-ORF, dieser wird jedoch in den Vektorkonstrukten nicht mehr exprimiert (s. Abb. 3.25).

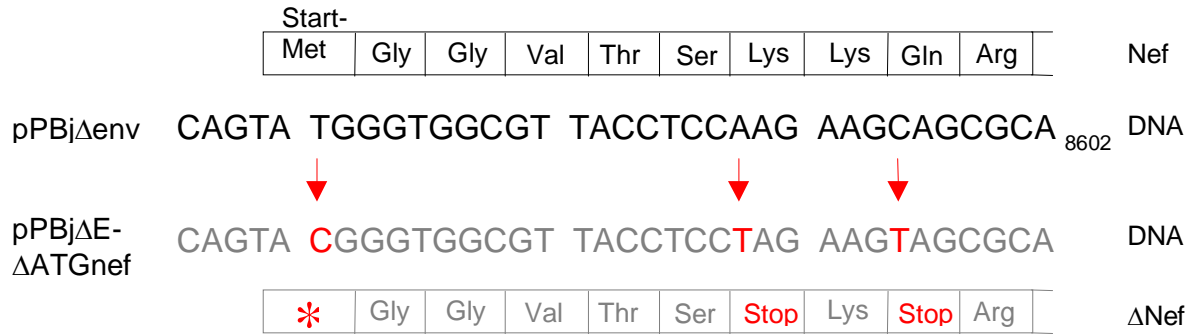


Abb. 3.25: Schematische Darstellung der DNA- und Aminosäuresequenzen der PBj-Vektorkonstrukte vor und nach gerichteter Punkt-Mutagenese (* : fehlendes Startcodon)

Die Mutagenese wurde in dem Plasmid pZeo-nef(PBj) durchgeführt. pZeo-nef(PBj) wurde durch Klonierung des *EcoRI/NotI*-Fragmentes (bp 7576 - 10008) aus pPBj1.9 in das mit denselben Enzymen geöffneten Klonierungsplasmid pZeoSV2+ hergestellt und enthält u.a. die zu mutierenden Sequenzen. In dieses Plasmid wurden mit dem QuickChange Site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) unter Verwendung der Mutageneseprimer PBjdelNef(+) und PbjdelNef(-) die entsprechenden Punktmutationen eingeführt. Nach der Mutagenese erhaltenen Klone mit korrektem Spaltungsmuster wurden sequenziert und es konnte Klon #1 identifiziert werden, der die gewünschten, aber keine sonstigen Punktmutationen enthielt. Aus diesem Klon wurde die mutierte *nef*-Region über *BsaBI/NotI* in pPBjΔenv inseriert. Klon #12-3 des so konstruierten Plasmids pPBjΔEΔATGnef wurde sequenziert. Ausschließlich die eingeführten Mutationen waren vorhanden. Zum Nachweis, dass die eingeführten Mutationen tatsächlich zu einer vollständigen Blockade des *nef*-ORFs führten, wurde die Nef-Expression in Lysaten und Überständen von 293T Zellen, die mit pPBjΔenv oder pPBjΔEΔATGnef transduziert waren, im Western Blot durch N. Wolfrum und B. Völker untersucht (s. Abb. 3.26).

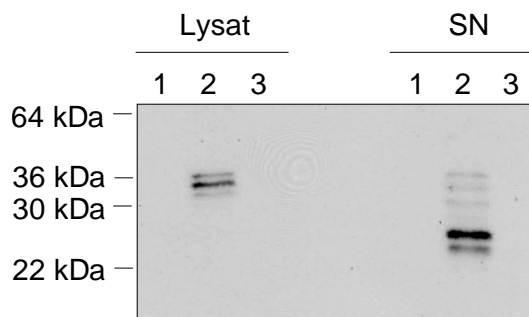


Abb. 3.26: Western Blot von 293T transfiziert mit PBj-Vektorkonstrukten. Nachweis der Expression des Nef-Proteins 2 Tage nach Transfektion in Zelllysaten und Zellkulturüberstand (SN). 1: Mock, 2: pPBjΔenv, 3: pPBjΔEΔATGnef

Die eingeführten Mutationen führten zu einer vollständigen Inhibition der Nef-Synthese im *nef*-Vektorkonstrukt pPBjΔEΔATG_{nef}, da im Western Blot im Vergleich mit der Nef-positiven Kontrolle pPBjΔenv das Nef-Protein weder im Zelllysate noch im Überstand nachweisbar war.

3.3.1.2 Funktionsfähigkeit von *nef*⁻-SIVsmmPBj-Vektorpartikeln

Für das neue *nef*⁻-Vektorkonstrukt sollte nun getestet werden, ob auch trotz der eingefügten Mutationen transduzierende Vektorpartikel generiert werden können. Dazu wurden 1 µg des Vektorkonstruktes pPBjΔEΔATG_{nef} und das VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G in variablen Mengen in 293T-Zellen kotransfiziert und der Überstand dieser Kulturen 48 h nach Transfektion auf proliferierenden GHOST CXCR4-Indikatorzellen austitriert. 48 h nach Transduktion wurden die transduzierten Zellen anhand der induzierten GFP-Fluoreszenz ausgezählt und der Vektortiter berechnet. Parallel wurden diese Zellen MeOH-fixiert und die Fluoreszenz-Titer durch IPA bestätigt. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tabelle 3.7 dokumentiert:

pMD.G	1000 ng	500 ng	200 ng	100 ng	50 ng
Titer [TU/ml]	8,4x10 ⁴	1,9x10 ⁵	1,5x10 ⁶	2,4x10 ⁶	2,6x10 ⁶

Tab. 3.7: Pseudotypisierung von Nef-deletierten SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren mit VSV-G. Transduktionstiter der Pseudotypvektoren aus der Kotransfektion von pPBjΔEΔATG_{nef} (1 µg) und pMD.G (in den angegebenen Mengen) auf GHOST CXCR4 Zellen. (Auswertung erfolgte durch Auszählen GFP-positiver Zielzellen).

Aus diesen Daten ist erkennbar, dass auch die *nef*⁻-SIVsmmPBj-Vektoren transduzierende Vektorpartikel bilden. Als optimales Plasmidverhältnis zur Generierung transienter Verpackungszellen wurden 1 µg pPBjΔEΔATG_{nef} zu 50 ng pMD.G bestimmt.

3.3.1.3 Transduktion proliferierender, G₁/S-arretierter und ruhender Zielzellen mit *nef*⁻-SIVsmmPBj-Vektoren

Im Folgenden sollten mit VSV-G pseudotypisierte *nef*⁻-Vektoren im Vergleich mit allen Kontrollvektoren (SIVsmmPBj-wt, HIV-1 und MLV) auf proliferierenden, G₁/S-arretierten und ruhenden Zielzellen getestet werden, um die mögliche Rolle des Nef-Proteins für die besonderen Transduktionseigenschaften der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren zu untersuchen.

3.3.1.3.1 Transduktion von GHOST CXCR4 Zellen

Als erste Zielzellpopulation wurden die Indikatorzellen GHOST CXCR4 ausgetestet. Diese wurden wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben in den verschiedenen Zellzyklusphasen arretiert und mit den [SIV_{PBj}(VSV)], [SIV_{PBjΔnef}(VSV)], [HIV(VSV)] und [MLV_{LacZ}(VSV)]-Vektoren parallel transduziert. 48 h nach Transduktion wurden die mit den lentiviralen Vektoren transduzierten Zielzellen auf Tat-induzierte GFP-Fluoreszenz untersucht. Die mit den MLV-Vektoren transduzierten Zellen wurden durch X-Gal-Färbung auf die Expression des Reportergens *lacZ* untersucht. Die so bestimmten relativen Effizienzen sind in Abbildung 3.27 dargestellt (Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten).

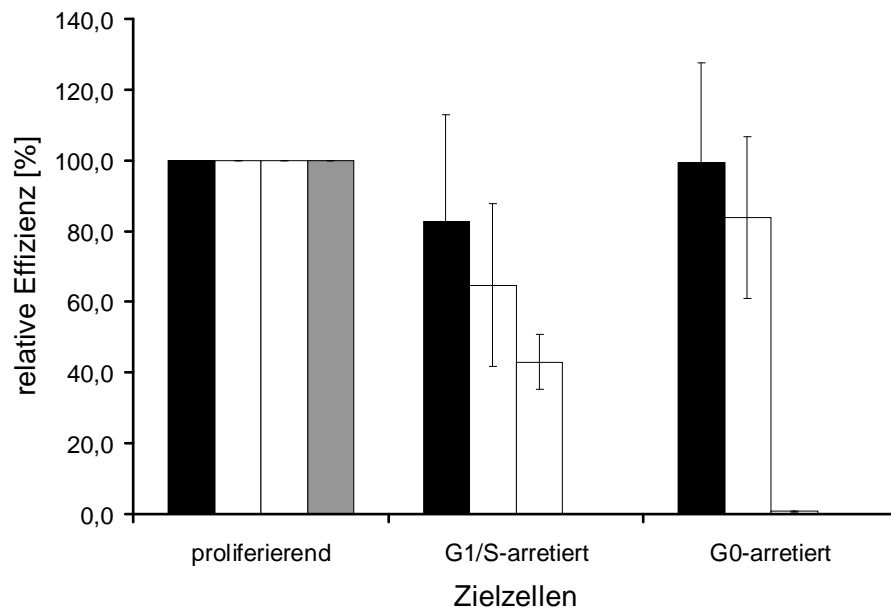


Abb. 3.27: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter GHOST CD4-CXCR4. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitern auf den proliferierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken). (■ = [SIV_{PBj}(VSV)], ▨ = [SIV_{PBjΔnef}(VSV)], □ = [HIV-1(VSV)], ▩ = [MLV_{lacZ}(VSV)])

Abb. 3.27 zeigt, dass sich die ruhenden GHOST CXCR4 Zellen von den Nef-defizienten Vektoren ebenso effizient transduzieren ließen wie von den wt-SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren. Die Kontrollen verhielten sich wie erwartet und bereits beschrieben.

3.3.1.3.2 Transduktion von humanen diploiden Fibroblasten Alpha-1

Nachdem in der GHOST-Indikatorzelllinie kein signifikanter Einfluss des Nef-Proteins auf die untersuchten Transduktionseigenschaften der SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren gefunden wurde, sollte diese Vektoren auch auf den diploiden humanen Fibroblasten Alpha-1 verglichen werden. Die in Abschnitt 3.3.1.3.1 vorgestellten Vektoren wurden wieder parallel auf den wie in Abschnitt 3.2.3 beschrieben behandelten Alpha-1 ausstrahlt. Die Titer der lentiviralen Vektoren wurden 48 h nach Transduktion über IPA bestimmt. Die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.28 dargestellt.

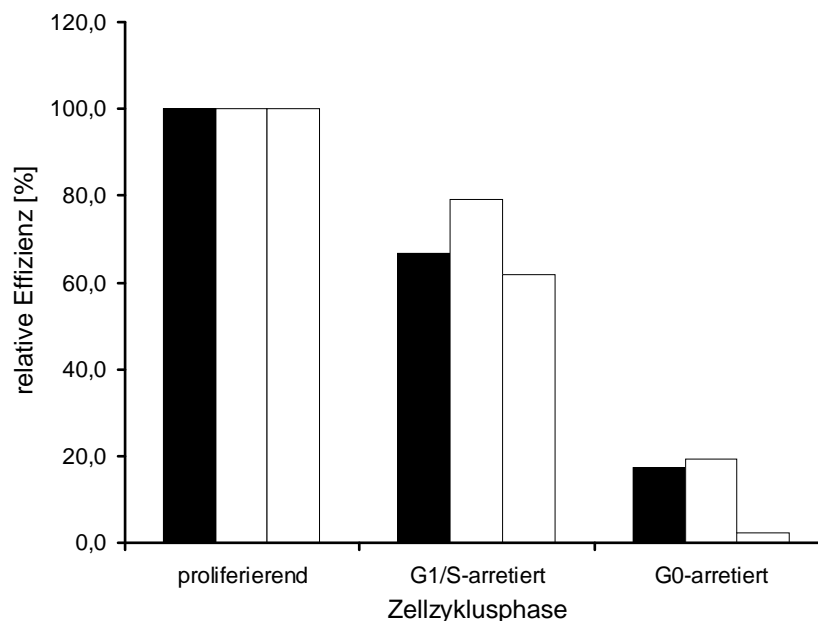


Abb. 3.28: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Alpha-1. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitern auf den proliferierenden Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten. (■ = [SIV_{PBJ}(VSV)], ▣ = [SIV_{PBJΔnef}(VSV)], □ = [HIV-1(VSV)])

Obwohl in diesen Experimenten die Transduktionsraten der PBJ-abgeleiteten Vektoren auf den ruhenden Zellen niedriger waren als bei den in Abb. 3.13 vorgestellten Versuchen, so unterschieden sich die beiden PBJ-abgeleiteten Vektoren nicht, unabhängig vom Nef-Protein. So zeigte sich auch auf den Alpha-1, dass das Nef-Protein keinen entscheidenden Einfluss auf das Transduktionsverhalten der SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren hatte.

3.3.1.4 Transduktion von Monozyten mit *nef*⁻-SIV_{smmPBj}-Vektoren

Um den Einfluss des Nef-Proteins auf das Transduktionsverhalten von SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren auch in primären Zellen studieren zu können, wurden *egfp*-übertragende *nef*⁻-Vektoren auf Basis der Konstrukte pPBjΔE-EGFP7 und

pPBj Δ E Δ ATGnef kloniert. Dazu wurde über *BsmBI/BclI*-Schnitte das die EGFP-Expressionskassette enthaltende Fragment von pPBj Δ E-EGFP7 in das mit den gleichen Schnitten geöffnete pPBj Δ E Δ ATGnef ligiert. Das so konstruierte Plasmid pPBj Δ E Δ ATGnef-EGFP7 ermöglicht nach Kotransfektion mit dem VSV-G Expressionsplasmid pMD.G in 293T-Zellen die Produktion *egfp*-übertragender, Nef-defizienter SIVsmmPBj-Vektorpartikel (nicht gezeigt).

Diese Vektoren wurden parallel zu wt-PBj- und HIV-1-abgeleiteten Vektoren in den in Abschnitt 3.2.9 vorgestellten Experimenten zur Transduktion von isolierten primären humanen Monozyten/Makrophagen mit einer $moi = 10$ eingesetzt. Wie die in Abb. 3.22 und 3.23 vorgestellten Resultate zeigen, waren die Transduktionsraten von Nef-enthaltenden und Nef-defizienten SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren zu allen Zeitpunkten fast identisch. Auch die in Abb. 3.24 vorgestellte Analyse auf chromosomale Integration dieser beiden PBj-abgeleiteten Vektoren zeigte keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anteile der Formen proviraler DNA in den transduzierten Monozyten. Diese Resultate belegen, dass auch bei der Transduktion von primären humanen Zellen das Nef-Protein von SIVsmmPBj keine essentielle Rolle zu tragen scheint.

3.3.2 Die LTR-Promotoraktivität verschiedener Lentiviren in humanen PBMC

Nachdem in Abschnitt 3.3.1 gezeigt wurde, dass das virale Nef-Protein, obwohl einer der vermuteten Hauptpathogenitätsfaktoren, nicht für die besonderen Transduktionseigenschaften von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren verantwortlich zu sein schien, sollte im folgenden Abschnitt die Promotoraktivität der PBj-LTR im Vergleich zu anderen lentiviralen LTRs untersucht werden. Diese Untersuchung erschien sinnvoll, da in schon beschriebenen virologischen Untersuchungen zum einen die Duplizierung einer NF κ b-Bindungsstelle in der PBj-LTR festgestellt worden war (Dewhurst S, 1990) und zum anderen eine Übertragung von der PBj-LTR (neben dem *nef*-ORF) in chimäre Viren zur Replikation der Chimären in unstimulierten PBMC führte (Dittmar MT, 1996). Da der auffälligste Unterschied von SIVsmmPBj1.9 zu anderen Lentiviren *in vitro* in der Replikation in unstimulierten PBMCs besteht, konzentrierten sich die Untersuchungen der lentiviralen LTR-Aktivitäten auf diese Zellen, die auch im natürlichen Infektionsverlauf die primären Zielzellen dieser Viren darstellen. Zum Nachweis der Promotoraktivität wurde der Luziferase-Assay gewählt.

3.3.2.1 Herstellung von Luziferase-Reporterkonstrukten

Um die Promotoraktivität der LTR von SIVsmmPBj1.9 mit anderen lentiviralen LTRs vergleichen zu können (als Vergleich wurden die LTRs des HIV-1 Klon NL4-3 und des apathogenen SIVagm3mc gewählt), wurden entsprechende Reporterplasmide konstruiert, die Luziferase unter der Kontrolle der jeweiligen Promotorregion exprimieren. Dazu wurden die kompletten Promotorregionen der entsprechenden Viren (U3, R, TAR-region) über PCR amplifiziert und mit *HindIII/BglII*-Schnittstellen versehen. Als Primer fanden folgende Oligonukleotide Verwendung:

PBj-LTR:	PBj-U3(+)	und	PBj-U3/R/TAR(-)
NL4-3-LTR:	NL4-3-U3(+)	und	NL4-3-U3/R/TAR(-)
SIVagm3-LTR:	Agm3-U3(+)	und	Agm3-U3/R/TAR(-)

Die PCR wurde auf dem Thermocycler PTC 200 (MJ Research, Boston, USA) unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden über ein Agarose-Gel aufgereinigt, Fragmente korrekter Größe mit *HindIII/BglII* geschnitten (für NL4-3-LTR partieller *BglII*-Verdau) und nochmals über Agarose-Gel aufgereinigt. Die aufgereinigten verdauten Fragmente wurden schließlich in das ebenfalls *HindIII/BglII*-verdaute Plasmid pGL3-Basic ligiert. Die somit erhaltenen Reporterkonstrukte werden als pGL3bas-PBjLTR-Luc, pGL3bas-NL4-3LTR-Luc und pGL3bas-Agm3LTR-Luc bezeichnet. Diese Plasmide wurden in *E. coli* Top 10 amplifiziert. Durch Sequenzierung konnte die Abwesenheit von Punktmutationen in den Promotorregionen bestätigt werden.

3.3.2.2 Promotoraktivität der lentiviralen LTRs nach Transfektion humaner PBMC

Um in humanen PBMC die Promotoraktivitäten zu studieren, wurden die im vorigen Abschnitt beschriebenen Reporterkonstrukte in stimulierte und unstimulierte humane T-Lymphozyten bzw. PBMCs durch Elektroporation (Nucleofector, Amaxa biosystems, Köln) transfiziert. Durch den zusätzlichen Vergleich auf stimulierten Zellen lassen sich die Ergebnisse auf den unstimulierten Zellen auch in der Hinsicht besser einschätzen, ob eventuelle Unterschiede Ausdruck einer generell unterschiedlichen LTR-Aktivität der analysierten Viren ist, oder ob sich in ihr eine Anpassung an ruhende Zielzellen widerspiegelt. Der Nucleofector ist für die Transfektion von primären humanen Zellen besonders geeignet, da die transfizierte DNA direkt in den Zellkern der transfizierten

Zellen geschleust wird. 6 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und anschließend auf Luziferase-Aktivität untersucht. Als Kontrolle der basalen Luziferase-Expression wurde das Plasmid pGL3-basic ohne Promotorsequenzen eingesetzt.

3.3.2.2.1 Promotoraktivität in stimulierten humanen T-Lymphozyten

In den ersten Experimenten mit den Luciferase-Reporterkonstrukten sollten die Untersuchung der LTR-Aktivitäten in den für alle untersuchten Viren permissiven stimulierten T-Lymphozyten erfolgen. Zu diesem Zweck wurden über einen Ficoll-Stufengradienten PBMCs aus Buffy-coats anonymer gesunder humaner Spender präpariert und 48 h mit PHA/IL-2 stimuliert. Während dieser Zeit überwachen die in der Präparation enthaltenen T-Lymphozyten die übrigen mononukleären Blutzellen. 5×10^6 dieser stimulierten T-Lymphozyten wurden in Triplikaten mit je 3 μg der entsprechenden Reporterplasmide mit Hilfe des Nucleofectors transfiziert. Nach 6 h erfolgten Zell-Lyse und Luziferase-Assay. Die hierbei gemessenen Luziferase-Werte eines repräsentativen von 2 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.29 dargestellt.

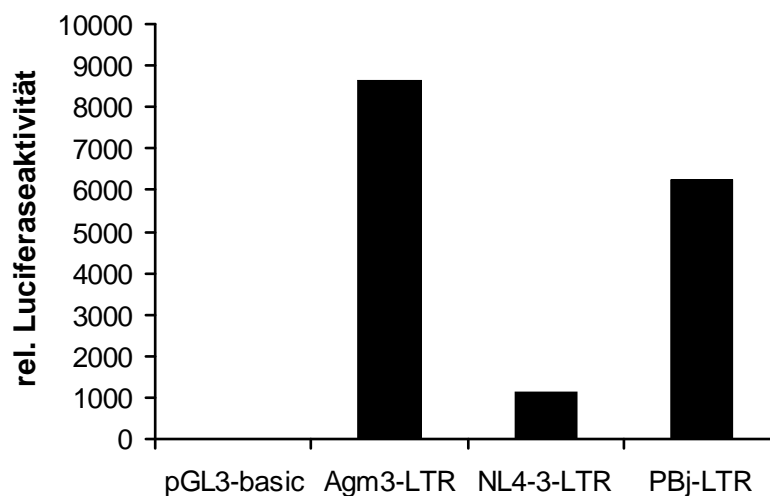


Abb. 3.29: Promotoraktivität verschiedener lentiviraler LTRs in stimulierten PBL. Luziferase-Aktivität im Lysat von stimulierten PBL nukleofiziert mit den entsprechenden Luziferase-Reporterkonstrukten. Darstellung eines repräsentativen Experimentes.

Aus diesen Werten ist erkennbar, dass alle untersuchten lentiviralen LTRs eine wenigstens 1500x höhere Promotor-Aktivität in stimulierten T-Lymphozyten aufwiesen als die Basal-Kontrolle. Interessanterweise findet sich die mit Abstand höchste Promotoraktivität unter den Lentiviren bei der SIVagm3-LTR. Die PBj-LTR hat im Vergleich zur Agm3-LTR eine relative Aktivität von ca. 70%, ist aber etwa 3,5 x transkriptionell aktiver als die NL4-3-LTR.

3.3.2.2 Promotoraktivität in unstimulierten humanen PBMCs

Nun sollten die Promotoraktivitäten der verschiedenen LTRs auch in den unstimulierten PBMCs getestet werden. Sollte die beobachtete höhere Effizienz der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren auf ruhenden Zellen tatsächlich auf einer auf diese Zellen adaptierten LTR beruhen, so wäre auf den unstimulierten PBMC eine wesentlich höhere Promotoraktivität der PBj-LTR im Vergleich zu den beiden Referenz-LTRs zu erwarten. Daher wurden über einen Ficoll-Stufengradienten PBMCs aus Buffy-coats anonym gesunder humaner Spender präpariert. 5×10^6 dieser PBMCs wurden direkt in Duplikaten mit je 3 μg der entsprechenden Reporterplasmide mit Hilfe des Nucleofactors transfiziert, nach 6 h erfolgte Zell-Lyse und Luziferase-Assay. Die Luziferase-Werte eines repräsentativen von 2 unabhängigen Experimenten sind in Abb. 3.30 dargestellt.

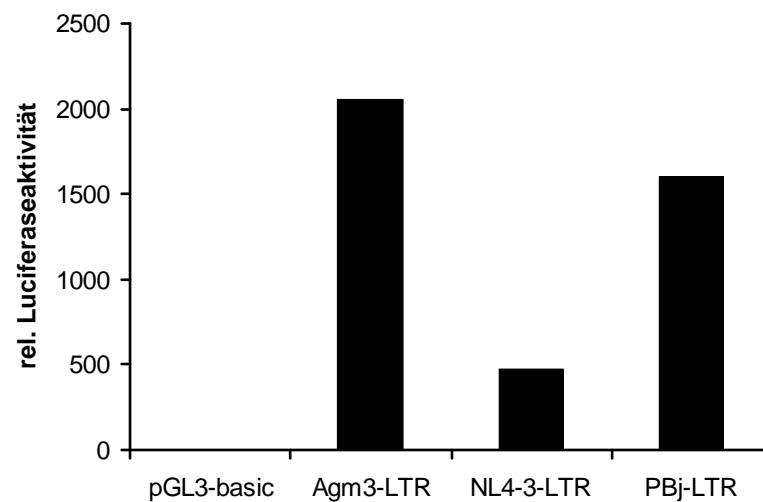


Abb. 3.30: Promotoraktivität verschiedener lentiviraler LTRs in unstimulierten PBMC. Luziferase-Aktivität im Lysat von unstimulierten PBMC nukleofiziert mit den entsprechenden Luziferase-Reporter-konstrukten. Darstellung eines repräsentativen Experimentes.

Diese Daten zeigen, dass zwar die transkriptionelle Aktivität aller 3 untersuchten lentiviralen LTRs in den unstimulierten PBMC um eine Faktor von 2 – 3x niedriger war als in den stimulierten Lymphozyten. Vergleicht man jedoch die relative Aktivität der viralen LTRs untereinander, so waren fast exakt die gleichen Verhältnisse zu beobachten wie in den stimulierten Lymphozyten. Dieses Ergebnis spricht gegen eine besonders hohe spezifische Aktivität der PBj-LTR in ruhenden Zellen.

3.4 Ein erstes auf SIVsmmPBj1.9 basierendes 3-Plasmid-Vektorsystem

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe der *env*-deletierten Vektoren gezeigt werden, dass ruhende Zellen von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren wesentlich effizienter transduziert werden als von herkömmlichen lentiviralen Vektoren. Für eine direkte Anwendung auf ruhenden Zellen sind die bis zu diesem Punkt vorgestellten Vektoren jedoch ungeeignet. Zum einen bieten die *env*-deletierten, aber ansonsten kompletten Vektorgenome das Risiko der Bildung replikationskompetenter Viren (s. Kap. 1.2.1). Zum anderen exprimieren diese Vektorkonstrukte auch in den Zielzellen noch virale Strukturproteine sowie akzessorischen Proteine; beides ist u.a. aus Gründen der Zytotoxizität der viralen Proteine nicht erwünscht. Schließlich ist die Verpackungskapazität der Viruspartikel limitiert; daher bietet sich in den *env*-deletierten Vektoren Platz für eine nur ca. 1,1 kb große Expressionskassette.

Durch Mitwirkung an der Entwicklung und Erprobung eines auf dem apathogenen Lentivirus SIVagm3mc basierenden 3-Plasmid-Vektorsystems (Stitz J, 2001), bestand persönlich und in unserer Arbeitsgruppe Erfahrung in der Entwicklung solcher Vektorsysteme. Das auf SIVagm3mc basierende Vektorsystem hat, wie auch in der Einleitung für ein typisches retrovirales Vektorsystem beschrieben, die genetische Information für Hüllprotein, Strukturproteine und Transfervektor auf 3 Plasmiden aufgeteilt und zeigt typische lentivirale Vektoreigenschaften. In den letzten Abschnitten dieser Arbeit sollte daher versucht werden, ein 3-Plasmid-Vektorsystem, das sich von SIVsmmPBj1.9 ableitet, zu konstruieren und auszutesten.

3.4.1 Herstellung eines SIVsmmPBj1.9-abgeleiteten Verpackungskonstrukts

Ein Verpackungskonstrukt eines retroviralen Vektorsystems stellt alle zur Bildung von funktionellen Virionen benötigten viralen Proteine in der Verpackungszelle *in trans* zur Verfügung, ohne dass es selbst in diese Virionen verpackt wird. Um diese Inkorporation in die Virionen zu vermeiden, muss auf dem Verpackungskonstrukt das Verpackungssignal Ψ deletiert werden. Ψ wird bedingt durch die RNA-Sekundärstruktur im Bereich zwischen 5'-LTR und Sequenzen innerhalb des *gag*-ORF. Eine vollständige Deletion dieses Bereiches ist aber nicht möglich, da er einmal mit dem Haupt-Spleiß-Donor (SD) des Virus (bei SIVsmmPBj1.9 bp 460 – 468, identifiziert über Sequenzhomologien zu dem publizierten SIVsmmH9 (Kuiken C, 2000) überlappt. Zum anderen überschneidet sich Ψ mit den ersten Bereichen des *gag*-ORF, der auch nicht deletiert werden kann. Daher sollte Ψ durch Deletion aller Bereiche außerhalb des SD und *gag* zerstört werden. Außerdem sollte die

Promotoraktivität der 5'-LTR durch einen CMV-Promotor und die 3'-LTR durch ein Polyadenylierungssignal ersetzt werden.

Dazu wurde mit Hilfe der PCR der CMV-Promotor aus pEGFP-N1 amplifiziert, und durch geeignete Primer (Pcmv(+) + Pcmv-SD(-), SD-gag(+) + gag-PBj(BsmI)(-)) direkt an den SD und dieser wiederum direkt an *gag* fusioniert. Das aus dieser Fusions-PCR erhaltene Fragment wurde über *HindIII/BsmI* in das ebenfalls *HindIII/BsmI*-verdaute Hauptfragment von pPBjΔenv kloniert. Es ergab sich so das Plasmid pPBj-K1, dessen Identität durch Sequenzierung der über PCR amplifizierten Bereiche bestätigt wurde. Um die 3'-LTR ersetzen zu können, wurde ebenfalls über Fusions-PCR direkt hinter den *nef*-ORF das polyadenylierungssignal des Rinder-Wachstumshormons („bovine growth hormone polyadenylation signal“; BGHpA) kloniert. Die PCR-Templates waren pPBj1.9 und für das BGHpA das Plasmid pcDNA3.1(+), als Primer fanden die Oligonukleotide *nef*-PBj(PstI)(+), *nef*-BGH-pA(-), *nef*-BGH-pA(+) und BGH-pA-*NotI*(-) Verwendung. Das entstandene PCR-Fragment wurde über ein Agarose-Gel aufgereinigt, *PstI/NotI* verdaut und in das mit den gleichen Enzymen verdaute Hauptfragment von pPBjΔenv ligiert. So entstand das Plasmid pPBj-K2, dessen Identität ebenfalls durch Sequenzierung der über PCR amplifizierten Bereiche bestätigt wurde. Das PBj-Verpackungskonstrukt pPBj-pack1 wurde über Ligation des kleineren *EcoRI/NotI*-Fragmentes aus pPBj-K2 in das Hauptfragment des ebenfalls *EcoRI/NotI* verdauten pPBj-K1 fertiggestellt. Die Klonierungsstrategie ist schematisch in den Abb. 3.31 dargestellt, während die Struktur des resultierenden Verpackungskonstruktes in Abb. 3.32 abgebildet ist.

3.4.2 Herstellung eines *gag/pol*⁻, *egfp*-übertragenden Transfervektors

Aus meiner Diplom-Arbeit war bekannt, dass SIVsmmPBj-Vektorpartikel nicht in der Lage sind, HIV-1- oder SIVagm-Transfervektoren effizient zu verpacken. Daher musste ein einfacher Transfervektor auf Basis von SIVsmmPBj konstruiert werden, um das Verpackungskonstrukt testen zu können. Wie in Kap. 1.2.1 dargelegt, muss ein Transfervektor über bestimmte genomische Bestandteile verfügen (LTRs, Ψ-Signal, zentraler Polypurintrakt und Terminationssignal), die Verpackung, reverse Transkription und Integration des kodierten Genoms erlauben. Für den angestrebten SIVsmmPBj-abgeleiteten Transfervektor wurden große Teile von *gag* und *pol* aus pPBjΔE-EGFP7 über *BsmI/SpeI*-Verdau dieses Plasmids deletiert. Dem so entstandene Hauptfragment wurde mit der Klenow-Polymerase blunt-ends zugefügt und anschließend über eine blunt-end-Ligation

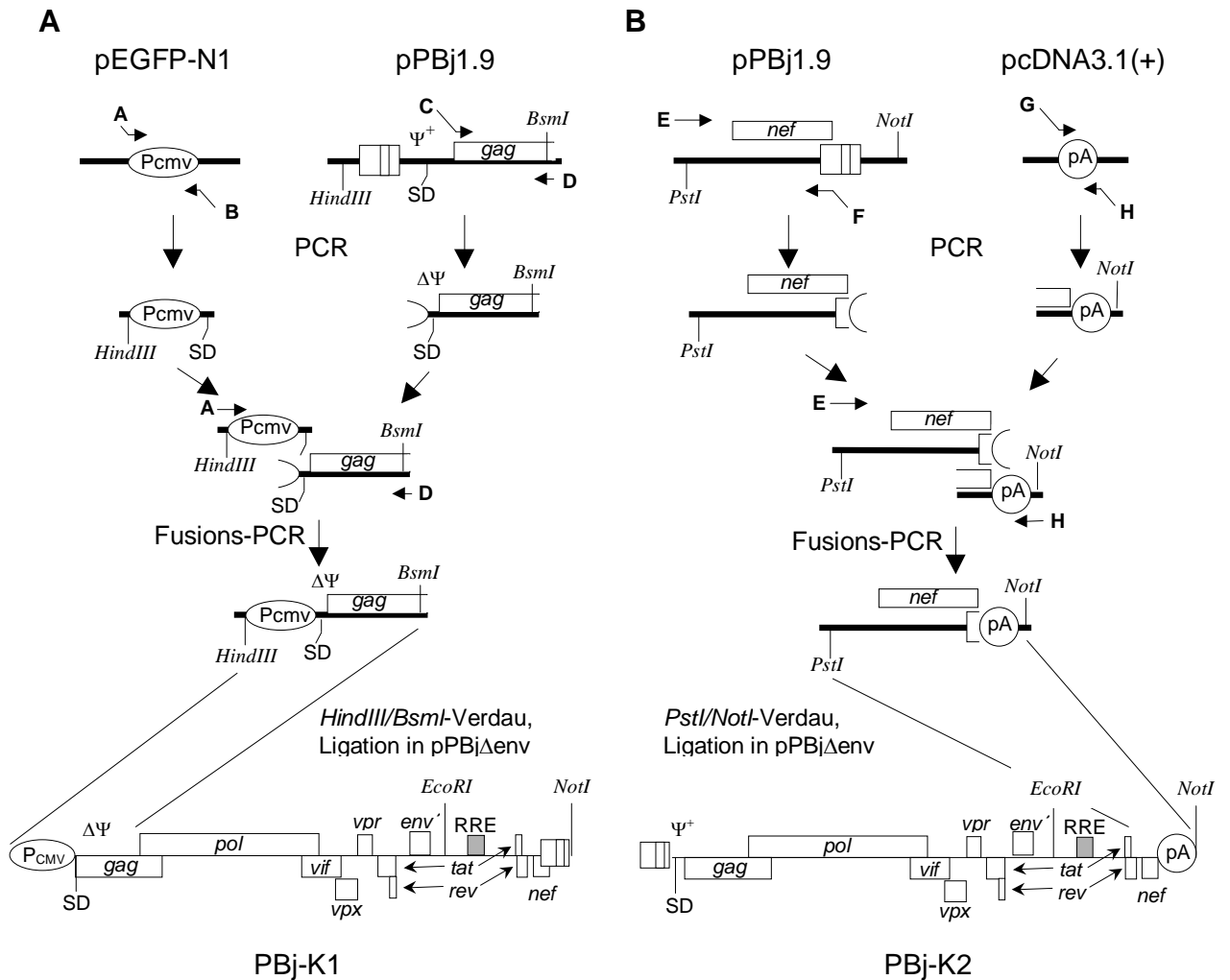


Abb. 3.31: Schematische Darstellung der Klonierung von pPBj-K1 (A) und pPBj-K2 (B). Gene wie angegeben kursiv in Boxen, Restriktionsschnittstellen kursiv, Promotorregionen (Pcmv) und Polyadenylierungssignale (pA). SD = Spleiß-Donor. (Primer, **A:** Pcmv(+), **B:** Pcmv-SD(-), **C:** SD-gag(+), **D:** gag-PBj(BsmI)(-), **E:** nef-PBj(PstI)(+), **F:** nef-BGH-pA(-), **G:** nef-BGH-pA(+), **H:** BGH-pA-NotI(-)). Zur Klonierung verwendete Schnittstellen sind angegeben.

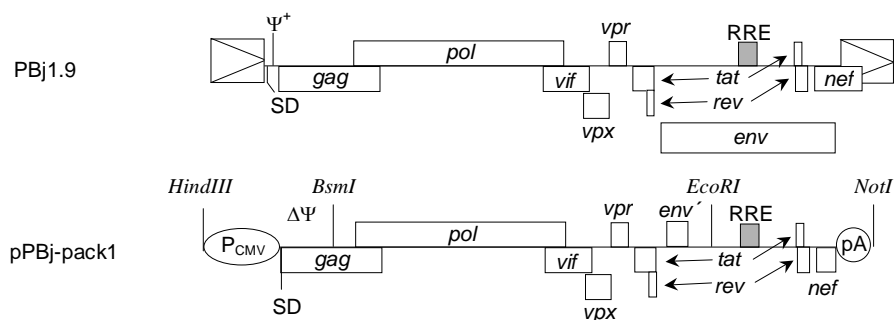


Abb. 3.32: Schematische Darstellung des Genoms von SIVsmmPBj1.9 und des abgeleiteten Verpackungskonstruktes. Gene wie angegeben in Kästchen dargestellt, in den Ovalen die Promotorregionen (Pcmv) und Polyadenylierungssignale (pA). Pfeile symbolisieren das Spleißen der Tat- und Rev-Exons. Ψ = Verpackungssignal, SD = Spleiß-Donor. Zur Klonierung verwendete Schnittstellen sind angegeben.

das Plasmid wieder geschlossen. Das resultierende Plasmid pPBj-V2-EGFP kodiert somit für alle akzessorischen Gene sowie eine CMV-Promotorgetriebene EGFP-Expressionskassette und enthält alle bekannten wichtigen genomischen Bestandteile, aber keine vollständigen Strukturproteine mehr (Abb. 3.33).

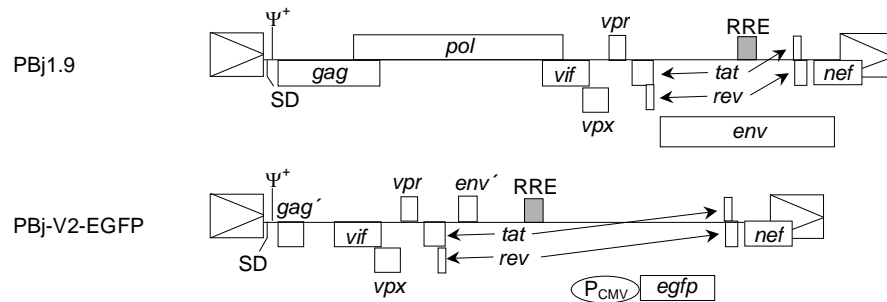


Abb. 3.33: Schematische Darstellung des Genoms von SIVsmmPBj1.9 und des abgeleiteten vorläufigen Transfervektors. Gene wie angegeben in Kästchen dargestellt, in den Ovalen die Promotorregionen (P_{cmv}) und Polyadenylierungssignale (pA). Pfeile symbolisieren das Spleißen der Tat- und Rev-Exons. RRE = Rev responsives Element, Ψ = Verpackungssignal, SD = Spleiß-Donor.

Somit sollte dieses Konstrukt zwar dazu in der Lage sein, in SIVsmmPBj-Vektorpartikel verpackt zu werden und *egfp* in die transduzierten Zellen zu transferieren, aber nicht mehr selbst Vektorpartikel zu bilden. Tatsächlich war 48 h nach Transfektion von pPBj-V2-EGFP in 293T-Zellen eine starke EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen feststellbar. Der zu diesem Zeitpunkt geerntete Überstand enthielt jedoch keine Vektorpartikel, die in der Lage waren, HT1080- oder GHOST CXCR4-Zellen zu transduzieren, unabhängig davon, ob ein Hüllprotein-Expressionsplasmid (pMD.G) in die 293T-Zellen kotransfiziert wurde (nicht gezeigt). pPBj-V2-EGFP benötigt also ein funktionales Verpackungskonstrukt zur Bildung transduzierender Vektorpartikel.

3.4.3 Funktionsfähigkeit des Vektorsystems

Nun sollte die Funktionsfähigkeit des SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektorsystems bestehend aus pPBj-pack1 und pPBj-V2-EGFP, getestet werden. Zu diesem Zweck wurden pPBj-V2-EGFP, pPBj-pack1 und das VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G in variablen Mengenverhältnissen in 293T-Zellen kotransfiziert. Als Kontrollen wurden alle Plasmide einzeln bzw. oder in unterschiedlichen Kombinationen ohne das notwendige 3. Plasmid transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Fluoreszenz der transfizierten 293T-Zellen untersucht und subkonfluente 293T- und GHOST CXCR4-Zellen mit dem Zellkulturüberstand dieser transfizierten Zellen 4 h inkubiert. Weitere 48 h nach dieser Transduktion wurden 293T und GHOST CXCR4-Zellen auf GFP-Fluoreszenz untersucht

und die entsprechenden Vektortiter bestimmt (Tab. 3.8). Alle Kontrollen zeigten erwartungsgemäß, dass bei Fehlen eines der 3 Plasmide des Vektorsystems keine transduzierenden Partikel detektiert werden konnten (nicht gezeigt).

293T		pPBj-Pack1 + pPBj-V2-EGFP		GHOST CXCR4		pPBj-Pack1 + pPBj-V2-EGFP	
		2 + 1 [µg]	2,5 + 0,5 [µg]			2 + 1 [µg]	2,5 + 0,5 [µg]
pMD.G	200 ng	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	pMD.G	200 ng	$5,1 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$
	100 ng	$1,8 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$		100 ng	$7,4 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$
	50 ng	$1,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^5$		50 ng	$5,1 \times 10^3$	$6,8 \times 10^3$

Tab. 3.8: Pseudotypisierung von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren mit VSV-G. Transduktionstiter der Pseudotypvektoren aus der Kotransfektion von pPBj-pack1, pPBj-V2-EGFP und pMD.G (in den angegebenen Mengen). (Auswertung erfolgte durch Auszählen EGFP-positiver Zielzellen).

pPBj-pack1 war eindeutig dazu in der Lage, den auf dem Plasmid pPBj-V2-EGFP kodierten Transfervektor funktional zu verpacken, so dass das Markergen *egfp* auf die entsprechenden Zielzellen mit Titern von ca. 2×10^5 TU/ml übertragen wurde. Als optimales Plasmidverhältnis von Verpackungs- zu Transfervektor- und Env-Expressions-konstrukt wurde 25:5:1 ermittelt.

Damit steht ein funktionierendes, von SIVsmmPBj-abgeleitetes Verpackungskonstrukt und zusammen mit dem Transfervektor pPBj-V2-EGFP ein erstes auf SIVsmmPBj-basierendes 3-Plasmid-Vektorsystem zur Verfügung.

4 Diskussion

Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Entwicklung und Analyse retroviraler Vektoren, die in der Lage sind, auch ruhende primäre humane Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus durch viralen Gentransfer effizient zu modifizieren. Zunächst sollte untersucht werden, ob durch Verwendung verschiedener Hüllproteine der Gentransfer in stimulierte oder unstimulierte primäre humane Lymphozyten/PBMC durch HIV-1- oder MLV-abgeleitete virale Vektoren optimiert bzw. erreicht werden kann. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit lag ein besonderes Augenmerk auf der Analyse und Weiterentwicklung von replikationsinkompetenten, von SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren. Letztere hatten schon in meiner vorangegangenen Diplom-Arbeit das Potential gezeigt, arretierte Zelllinien transduzieren zu können, die einem Gentransfer mit HIV-1-abgeleiteten Vektoren nicht mehr zugänglich waren.

4.1 *Gentransfer in humane periphere mononukleäre Blutzellen durch retrovirale Vektoren*

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Transduktionsrate gamma-retroviraler, von MLV abgeleiteter Vektorpartikel sowohl auf stimulierten CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Lymphozyten sehr stark von dem zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllprotein abhängt (Uckert W, 2000; Gladow M, 2000). Die höchsten Transduktionsraten wurden hier für Vektoren festgestellt, die mit den Hüllproteinen des amphotropen MLV-Klons 10A1 oder des GaLV pseudotypisiert worden waren. Bei HIV-1 abgeleiteten Vektoren wusste man dagegen, dass sich zwar VSV-G-pseudotypisierte Vektorpartikel prinzipiell auch zur Transduktion von T Lymphozyten eignen, allerdings blieb umstritten, ob eine Stimulation der T Lymphozyten vor oder nach der Transduktion Voraussetzung für eine erfolgreiche T Zell-Transduktion ist, oder ob die Transduktionseffizienz von den lentiviralen akzessorischen Proteinen abhängt (Costello E, 2000; Chinnasamy D, 2000). Im Zeitraum der vorliegenden Arbeit konnte weiterhin von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass durch den Einbau von T-Zell-Aktivierungsdomänen (mAb-Fragment [OKT-3] gegen T-Zell-Rezeptoruntereinheit CD3; Präsentation von Cytokin-Domänen [IL-7, IL-2]) in HIV-1-abgeleitete Vektorpartikel diese in der Lage waren, ruhende T Lymphozyten während des Transduktionsvorgangs gezielt zu stimulieren und effizient zu transduzieren (Maurice M, 2002; Verhoeyen E, 2003). Auch stellte sich heraus, dass für lentivirale Vektoren eine Aktivierung der Zielzellen durch Cytokine wie IL-7 ausreichend ist, um T Lymphozyten effizient transduzieren zu können, ohne durch Proliferation der Zielzellpopulation die

Balance der verschiedenen T-Zellgruppen zu verändern (Ducrey-Rundquist O, 2002). Diese Studien wurden allerdings ausschließlich mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren durchgeführt. Nur in einer Studie wurden während der experimentellen Durchführung dieser Arbeit verschiedene Hüllproteine zur Pseudotypisierung von HIV-1-abgeleiteten Vektoren im Hinblick auf die Transduktionseffizienz für primären T Lymphozyten ausgetestet. Allerdings handelte es sich lediglich um den parallelen Vergleich von VSV-G, RD114 und MLV-A auf stimulierten T Lymphozyten (Sandrin V, 2002). In der hier vorliegenden Arbeit wurden somit zum ersten Mal MLV- und HIV-1-Vektoren, die mit den Glykoproteinen von MLV-A, MLV-10A1, RD114, GaLV und VSV-G pseudotypisiert waren, unter den gleichen Bedingungen auf stimulierten und unstimulierten T Lymphozyten miteinander verglichen.

4.1.1 Herstellung und Titration der HIV-Pseudotypvektoren

Um die T Lymphozyten unter gleichen Bedingungen transduzieren zu können, musste für alle Vektoren ein Herstellungs- und Titrationsprotokoll etabliert werden, um gleiche Vektormengen auf den primären Zellen miteinander vergleichen zu können. In dieser Arbeit wurden HIV-1-abgeleitete Vektoren eingesetzt, deren Verpackungskonstrukt pCMV Δ R8.2 noch alle akzessorischen Gene enthielt. Eine Beeinträchtigung der HIV-Vektoren durch das Fehlen der entsprechenden Proteine konnte damit von vornherein ausgeschlossen werden. Tatsächlich konnte durch Optimierung der Transfektionsprotokolle zur Erzeugung der transienten Verpackungszellen und durch Optimierung des Zeitpunktes der Vektorernte für alle Vektoren ein Titer $>1 \times 10^5$ tu/ml erreicht werden. Das ermöglichte wie beabsichtigt eine Transduktion der T Lymphozyten mit einer $moi = 1$, ohne auf Konzentrierungsschritte für die Vektorsuspensionen zurückgreifen zu müssen. Die Verwendung einer höheren moi hätte zwar auch höhere Transduktionsraten zur Folge gehabt (Mühlebach MD, 2003), war aber wegen der höheren Wahrscheinlichkeit von Mehrfachintegration der Vektoren in einer Zielzelle (Woods NB, 2003) unerwünscht. Die Titration der HIV-1-abgeleiteten Vektoren wurde schließlich auf HT1080 Zellen durchgeführt, da diese Zellen für HIV-1-abgeleitete Vektoren sehr suzeptibel waren und daher die Detektion möglichst aller transduktionsfähigen HIV-Vektorpartikel ermöglichte.

Im ersten Abschnitt wurden damit alle Ziele erreicht. Dabei stellte der Einsatz der [HIV(GaLVtrAC)]-Vektoren eine Neuheit dar. Da unter den MLV-Vektoren die GaLV-Pseudotypen am effizientesten waren, konnte eigentlich auch bei den HIV-Vektoren eine verbesserte Effizienz nach Pseudotypisierung mit diesem entsprechend abgewandelten

Hüllprotein erwartet werden. Jedoch können HIV-abgeleitete Vektoren nicht durch Wildtyp GaLV-Env pseudotypisiert werden, sondern das Env-Protein musste in der zytoplasmatischen Domäne dem MLV-Env angeglichen oder genetisch trunziert werden (Sitz, J. unveröffentlicht; Christodoulopoulos I, 2001). In der hier vorgestellten Arbeit konnten erstmals GaLV-pseudotypisierte HIV-Vektoren zur Transduktion von primären T-Lymphozyten eingesetzt werden.

4.1.2 Transduktion humaner T-Lymphozyten

Die bisher für MLV-Vektoren maximal publizierten Transduktionseffizienzen bewegen sich bei einer moi von 5 für GaLV-Pseudotypen bei bis zu 36,0%, und für Vektoren, die mit dem 10A1-Env pseudotypisiert wurden, bei bis zu 49,1% (Uckert W, 2000; Gladow M, 2000). Das in dieser Arbeit angewendete Transduktionsprotokoll wurde von Frau Dr. I. Schmitt in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Mit MLV-abgeleiteten Vektorpartikeln, die mit GaLV-Env pseudotypisiert waren, wurden mit diesem Protokoll Transduktionsraten bis zu 80% erreicht (I. Schmitt, Doktorarbeit).

Unter diesen Bedingungen konnten in dieser Arbeit bei MLV-Vektoren bis ca. 40% der T-Lymphozyten transduziert werden, wobei im Prinzip die gleichen Effizienzunterschiede zwischen den verschiedenen Pseudotypvektoren beobachtet wurden wie zuvor publiziert mit einer Streuung zwischen 2% und 40% Markergen-positiver T-Lymphozyten, je nach Pseudotyp-Vektor. GaLV- und 10A1-Pseudotypen waren dabei am effizientesten. Diese Reproduktion publizierter Daten weist ebenso wie die erstaunlich niedrige Varianz der Ergebnisse bei der Verwendung von Lymphozyten verschiedener Donoren auf die Stabilität des Testsystems hin, mit dem die verschiedenen Vektoren miteinander verglichen wurden. Die erstmals in dieser Zusammenstellung mit einbezogenen [MLV(VSV)] Vektoren schnitten mit maximal 2% transduzierter Zielzellen überraschend schlecht ab. Im Vergleich mit bereits publizierten Daten zeigte sich jedoch, dass VSV-G pseudotypisierte MLV-Vektoren meistens mit einer sehr hohen moi eingesetzt werden. Gallardo *et al.* zeigten beispielsweise, dass 10- bis 100-fach höhere Vektormengen notwendig waren, um mit [MLV(VSV)] Vektoren vergleichbare Transduktionsraten wie die maximal in dieser Arbeit beschriebenen zu erreichen.

Die parallel getesteten HIV-Vektoren verhielten sich unerwartet. Alle getesteten Pseudotyp-Vektoren erreichten nach dreimaliger Transduktion bei einer $moi = 1$ eine fast identische Transduktionseffizienz von ca. 20-25% GFP-positiver Zielzellen. Keiner der Pseudotyp-Vektoren war den anderen signifikant überlegen. Andererseits bleibt festzuhalten, dass auch die genetische Trunkierung des GaLVtrAC-Glycoproteins die

Transduktionseffizienz der mit diesem Hüllprotein generierten Pseudotypvektoren nicht beeinflusste. Diese Ergebnisse stimmen mit parallel zu dieser Arbeit publizierten Daten überein (Sandrin V, 2002). Dort wurde gezeigt, dass bei einer $moi = 1$ mit HIV-abgeleiteten Vektoren donorabhängig zwischen ca. 5 und 25% der T-Lymphozyten transduziert wurden, wobei die verwendeten Hüllproteine MLV-A, VSV-G und eine modifizierte Variante von RD144 ebenfalls keine deutlichen Unterschiede untereinander aufwiesen.

Aus diesem Teil der Experimente ließ sich schlussfolgern, dass für HIV-Vektoren im Unterschied zu MLV-Vektoren die Verwendung verschiedener Hüllproteine zur Pseudotypisierung keine Unterschiede in der Transduktion primärer, stimulierter humaner T-Lymphozyten ergibt. Um diesen unerwarteten Gegensatz zwischen MLV- und HIV-Vektoren aufzuklären, wurden Stabilitätsstudien der Vektoren durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten HIV-Vektoren eine Halbwertszeit von mehr als 12 h hatten. Dies unterscheidet sie von den MLV-Vektoren, für die eine Streuung der Vektorhalbwertszeiten von 4 h bis 24 h nachgewiesen werden konnte (Uckert W, 2000). Da die Halbwertszeiten der verschiedenen MLV-Vektoren mit einer Ausnahme (RD114) gut mit den Transduktionseffizienzen korrelierten, wurde von Uckert *et al.* spekuliert, dass die unterschiedliche Stabilität der MLV-Vektoren und damit ihre unterschiedlich lang andauernde Verfügbarkeit während der Transduktion die Effizienzen determiniert. Somit könnte die insgesamt längere und untereinander kohärentere Halbwertszeit der HIV-Vektoren zu den sehr ähnlichen Transduktionseffizienzen der verschiedenen HIV-Vektoren beitragen. Darüber hinaus ist für HIV-abgeleitete Virus-/Vektorpartikel bekannt, dass sie während der Knospung eine ganze Reihe von Proteinen der Verpackungszelle inkorporieren, z.B. Cyclophilin A. So konnte festgestellt werden, dass das in die Partikelmembran inkorporierte zelluläre Cyclophilin unabhängig vom viralen Env-Protein essentiell für die Erstanbindung von HIV-Partikeln an ihre Zielzellen ist (Saphire ACS, 1999). Daher wäre es möglich, dass Unterschiede zwischen den verschiedenen Env-Glykoproteinen bei HIV-Vektoren durch diesen Env-unabhängigen Mechanismus nivelliert werden. Eine Untersuchung Cyclophilin-defizienter HIV-Vektoren war nicht möglich, da das Cyclophilin, wie bereits erwähnt, essentiell für die Infektiosität der HIV-Vektoren ist.

4.2 Gentransfer in ruhende humane Zellen

Bisher hatte sich innerhalb dieser Arbeit gezeigt, dass es auch durch Variation der Hüllproteine nicht möglich war, frisch isolierte, unstimulierte primäre PBMC mit MLV- oder HIV-Vektoren effizient zu transduzieren. Das machte in Übereinstimmung mit vorliegender und parallel publizierter Literatur (Maurice M, 2002) deutlich, wie notwendig die Entwicklung retro- bzw. lentiviraler Vektorsysteme mit der Fähigkeit zur Transduktion ruhender humaner Zellen ist.

4.2.1 Transduktion ruhender GHOST-Zellen mit HIV-1-Env pseudotypisierten Vektoren

Der Einsatz von *env*-deletierten SIV_{smmPBj}- und HIV_{NL4-3}-abgeleiteten Vektoren, die mit dem trunkierten HIV-1-Env pseudotypisiert wurden, ergab auf den arretierten GHOST CXCR4 Zellen die gleichen Resultate wie die Experimente meiner Diplomarbeit, die mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren durchgeführt worden waren. Ausschließlich SIV_{smmPBj}-abgeleitete Vektoren waren in der Lage, die G₀-arretierten Zellen effizient zu transduzieren. Diese Daten zeigen, dass diese besondere Fähigkeit der SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren unabhängig vom verwendeten Hüllprotein und damit unabhängig von evtl. auftretenden Hüllprotein-vermittelten Stimuli oder Eintrittswegen in die Zielzellen ist (VSV-G vermittelt endosomale Aufnahme in die Zielzelle, HIV-Env Membranfusion).

4.2.2 Konstruktion von SIV_{smmPBj} abgeleiteten, Markergen-übertragender Vektorsysteme

Um den Gentransfer PBj-abgeleiteter Vektoren unabhängig von der Expression viraler Genprodukte und auch in primäre Zellen nachweisen zu können, war es notwendig, SIV_{smmPBj}-Vektoren zu entwickeln, die ein Markergen auf ihre Zielzellen übertragen. Als Markergen wurde *egfp* gewählt, da es neben der einfachen Detektion durch Fluoreszenzmikroskopie lebender, unfixierter Zellen auch die Möglichkeit zur FACS-Analyse der transduzierten Zellen bietet. Von den konstruierten Vektorsystemen erwiesen sich das PBj-Konstrukt pPBj Δ E-EGFP7 und das korrespondierende HIV-Konstrukt pNL4-3 Δ E-EGFP4 als die am besten geeigneten, da sie sowohl hohe Titer (mit bis zu 10⁷ TU/ml im Bereich von publizierten SIV-Vektorsystemen (Négre D, 2000) erreichten als auch eine starke Expression des Markergens in transduzierten Zellen aufwiesen. In diesen Konstrukten wurde das *egfp*-Gen durch einen internen Fremdpromotor, den CMV-

Promotor, exprimiert und diese Expressionskassette war 3' des RRE in den jeweiligen Vektor kloniert. Die Expression des Transgens durch den konstitutiv aktiven und starken CMV-Promotor hatte den Vorteil, dass die Provirus-Detektion unabhängig von der jeweiligen LTR-Aktivität in den transduzierten Zellen ist. Dadurch konnte eine Beeinflussung der Transduktionsraten durch unterschiedlich aktive lentivirale Promotoren ausgeschlossen werden.

Von dem ähnlich aufgebauten Vektor pPBjΔE-EGFP6 unterschied sich dieses Konstrukt #7 lediglich durch die Position der Expressionskassette, die sich in Konstrukt #6 upstream des RRE befindet. Trotz starker Expression des Markergens in den Verpackungszellen lassen sich mit Konstrukt #6 nur mangelhafte Vektortiter erreichen. Das lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass in diesem Konstrukt die beiden unterschiedlichen mRNAs (virale mRNA, getrieben durch LTR, und Markergen-mRNA, getrieben durch P_{CMV}) das RRE enthalten. Möglicherweise kann die Markergen-mRNA dadurch soviel virales regulatorisches Rev-Protein abfangen, dass der Kern-Export der ungespleissten oder nicht vollständig gespleissten viralen mRNA erheblich gestört ist. Somit könnte schließlich entweder die virale Proteinsynthese im Ungleichgewicht sein oder aber auf Grund der Deregulation des Kernexports und Spleißmuster in den Verpackungszellen keine vollständige Vektor-RNA mit Verpackungssignal vorliegen. Ein ähnlicher Mechanismus liegt dem Einsatz sogenannter „RNA-decoys“ zur Inhibition von HIV-Infektionen von T-Lymphozyten zu Grunde (Lee TC, 1992).

Die schlechte Detektierbarkeit aller Konstrukte, die *egfp* über eine IRES exprimieren sollten (Konstrukte #1 bis #3) lässt sich dadurch erklären, dass die eingesetzten IRES-Elemente *per se* eine schwächere Expression des Markergens zur Folge haben. Das war bereits an der relativ schwachen EGFP-Expression in den transfizierten Verpackungszellen zu beobachten. In den IRES-Konstrukten dient nur die virale LTR als einziger Promotor der Transkription einer Vielzahl von viralen RNAs, von denen nur 2 die IRES-EGFP-Kassette enthalten. Dagegen wird in den weiter oben vorgestellten Konstrukten die Expression des Markergens unabhängig von anderen viralen Genen durch den konstitutiv sehr starken CMV-Promotor bedingt.

Zusammenfassend war es in dieser Arbeit gelungen, *egfp*-übertragende Vektorsysteme von SIVsmmPBj und korrespondierend von HIV_{NL4-3} zu konstruieren, die es ermöglichten, hochtitrige Vektorpräparationen zu generieren, die stabil und deutlich detektierbar das Markergen *egfp* in den transduzierten Zellen exprimieren.

4.2.3 Transduktion ruhender Alpha-1-Fibroblasten

Die zweite Zielzellpopulation, die sich gut in der G₁/S-Phase und der G₀-Phase des Zellzyklus arretieren ließ, waren diploide humane Fibroblasten mit der Bezeichnung Alpha-1. Diese Zellen befinden sich erst in den Passagen 13 – 16 nach Isolation aus einer humanen primären Zellkultur und sind weder immortalisiert noch haben sie die Kontaktinhibition verloren (Neumann-Haefelin D, 1983). Daher kommen sie primären humanen Zellen wesentlich näher als die bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten GHOST Zellen. Die Arretierung der Alpha-1 Zellen in der G₁/S-Phase durch den DNA-Polymerase-Inhibitor Aphidicolin sowie in der G₀-Phase durch Konfluenz und 18-tägigen Serumentzug konnte gut durch die Färbung des DNA-Gehaltes der arretierten Kulturen mit Propidium-Iodid und anschließende FACS-Analyse gezeigt werden. Es stand nun also ein zweiter Zelltyp in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zur Verfügung, um die neuen SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren mit HIV- und MLV-abgeleiteten Vektoren vergleichen zu können. Wurden diese proliferierenden und arretierten Fibroblasten nun parallel mit SIVsmmPBj-, HIV- oder MLV-abgeleiteten Vektoren transduziert, so zeigten sich prinzipiell das gleiche Ergebnis wie auf den GHOST Zellen. Nur die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren waren in der Lage, G₀-arretierte Fibroblasten zu transduzieren und bestätigten damit die mit GHOST Zellen gewonnenen Daten. Auch die in dieser Arbeit neu konstruierten, *egfp*-transferierenden Vektorsysteme zeigten die gleichen Fähigkeiten. Das machte deutlich, dass die neu in die Vektoren klonierte EGFP-Expressionskassette keinen Einfluss auf die besonderen Transduktionseigenschaften des SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektorsystems hat. Damit standen für SIVsmmPBj und HIV analoge Vektorsysteme zur Verfügung, die sich durch ihre einfache Detektierbarkeit dazu anboten, auf primären, ruhenden Zellen getestet zu werden.

4.2.4 Transduktion primärer humaner Monozyten

CD4⁺ T-Lymphozyten sowie Monozyten bzw. die aus Monozyten ausdifferenzierten Makrophagen und dendritische Zellen bilden die Hauptzielzellen einer HIV-Infektion. Trotzdem sind frisch isolierte, ruhende PBMC bzw. T-Lymphozyten oder Monozyten in der G₀-Phase des Zellzyklus nicht mit HIV infizierbar oder mit HIV-abgeleiteten Vektoren transduzierbar (Korin YD, 1998; Maurice M, 2002). Da sich verschiedene PBMC-Populationen gegenseitig unter bestimmten Umständen stimulieren können (Swingler S, 2003) und myeloische Zellen zu den ersten infizierten Zellen während einer HIV- oder SIV-Infektion zählen, wurden frisch isolierte Monozyten als Modell für ruhende primäre

humane Zellen zur Untersuchung der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren gewählt. Darüber hinaus sind Monozyten die Vorläufer der myeloischen Antigen-präsentierenden Zellen, DCs und Makrophagen. Ein erfolgreicher Gentransfer in diese würde daher auch neue Möglichkeiten für eine immunmodulatorische Gentherapie eröffnen.

Die Isolation der Monozyten über MACS erreichte routinemäßig eine Reinheit von 90%, die sich durch die alleinige Adhärenz der Monozyten bis zur 1. Transduktion nochmals steigerte. Das konnte anhand der CD14-Expression der aufgereinigten Zellen gezeigt werden. Dieser hohe Reinheitsgrad stellte sicher, dass es sich bei transduzierten Zellen mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit auch um Monozyten oder aus Monozyten differenzierte Zellen handelte und schloss Effekte durch die Kultivierung einer gemischten PBMC-Population weitestgehend aus. Die konstante CD14-Expression über die gesamte Kulturdauer bei abnehmender CD86-Oberflächenexpression und die gleichzeitige morphologische Veränderung der Zellen zu einer „Spiegeleier-Form“ während der Tage 3-21 nach Isolation wiesen darauf hin, dass die Monozyten unter den gewählten Kulturbedingungen in Übereinstimmung mit der Literatur (Neil S, 2001) tatsächlich in Makrophagen ausdifferenzierten.

Wurden diese Monozyten/Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Isolation der Monozyten transduziert, so zeigte sich, dass nur die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren in der Lage waren, schon an Tag 1 nach Isolation die Monozyten effizient zu transduzieren. Die Effizienz der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren ist über den frühen Zeitpunkt der Transduzierbarkeit der Monozyten hinaus auch in ihrem Ausmaß bemerkenswert. Während für die auch in dieser Arbeit als Vergleich eingesetzten HIV-abgeleiteten Vektoren, basierend auf dem Verpackungskonstrukt pCMVAR8.2 und dem Transfervektor pHR⁺CMV-GFP, eine maximale Transduktionsrate von ca. 20% GFP-positiver Zielzellen für die Transduktion 14 Tage nach Isolation der Monozyten beschrieben ist (Neil S, 2001), werden schon am 1. Tag nach Isolation über 30% der Monozyten durch den SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektor transduziert. Die Transduktionsrate für PBj-Vektoren steigerte sich bis im Einzelfall auf über 85% für die Transduktionen an Tag 3 oder 4 nach Isolation. Dagegen verhielten sich beide eingesetzte HIV-Vektoren untereinander fast identisch. Während der ersten 4 Tage nach Isolation lassen sich nur weniger als 1% der isolierten Monozyten durch HIV-abgeleitete Vektoren transduzieren, erst an Tag 7 nach Isolation können 5 – 10% der Monozyten transduziert werden. Dieser Wert bleibt dann auch an Tag 11 stabil. Diese hier für die HIV-Vektoren etwas niedrigeren Transduktionsraten als von Neil *et al.* publiziert lassen sich bei gleichem Zeitverlauf durch das veränderte

Transduktionsprotokoll erklären. Während Neil *et al.* die Monozyten für 12 h mit dem Vektor-Überstand inkubierten, wurde in dieser Arbeit nur eine Inkubationszeit von 8 h angesetzt. Bei der beschriebenen langen Halbwertszeit der [HIV_{EGFP}(VSV)] Vektoren von ca. 20 h (s. Abschnitt 3.1.6) bedingt wahrscheinlich die kürzere Transduktionsdauer die niedrigere absolute Transduktionsrate der HIV-Vektoren.

Somit ließ sich in diesem Abschnitt zeigen, dass sich die Überlegenheit der SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektorsysteme gegenüber anderen lentiviralen Vektoren in arretierten Zelllinien und Fibroblasten auch tatsächlich in einer effizienten Transduktion ruhender primärer Zellen widerspiegelt, die einer Transduktion mit bisher entwickelten lentiviralen Vektoren nicht zugänglich waren. Damit steht prinzipiell ein Vektorsystem zur Transduktion ruhender primärer Zellen zur Verfügung, auch wenn die bis zu diesem Punkt eingesetzten SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren selbstverständlich noch weiter entwickelt werden müssen, um tatsächlich eingesetzt werden zu können.

4.2.5 Nachweis der echten retroviralen Transduktion durch PBj-Vektoren

Beim Nachweis eines Gentransfer können verschiedene experimentelle bedingte Artefakte auftreten, die ein positives Ergebnis vortäuschen können. Außerdem konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass SIV_{smmPBj} andere Mechanismen der Genexpression in infizierten Zellen abseits des normalen retroviralen Replikationszyklus (Infektion der Zelle → reverse Transkription → Integration des Provirus → Genexpression) nutzen würde. Daher musste experimentell nachgewiesen werden, dass es die bei den mit PBj-Vektoren beobachteten Transduktionen tatsächlich durch echte retrovirale Transduktionen bedingt sind.

Ein in diesem Zusammenhang bekanntes Phänomen insbesondere bei der Verwendung VSV-G pseudotypisierter Vektoren ist die direkte Übertragung der in den Verpackungszellen exprimierten Markerproteine auf die Zielzellen ohne eine *de novo* Proteinsynthese, die sogenannte Pseudotransduktion (Liu ML, 1996). Die Experimente, bei denen der RT-Inhibitor AZT eingesetzt wurde, zeigten, dass alle beobachteten Transduktionen zu mehr ungefähr 90% von einer funktionierenden reversen Transkription abhängig sind. Dieses Ergebnis unterstreicht, dass keine Pseudotransduktion für die beobachteten Effekte verantwortlich sein kann und dass die SIV_{smmPBj}-abgeleiteten Vektoren zumindest bis zum Ende der reversen Transkription einen „normalen“ retroviralen Infektionsmechanismus verwenden.

Allerdings ließ sich anhand dieser Daten bisher nicht ausschließen, dass die Expression der Markergene von einer nicht-integrierten proviralen DNA erfolgt. So ist zum Beispiel für HIV beschrieben, dass die Expression der frühen viralen Proteine Rev und Nef in den infizierten Zellen schon vor der Etablierung des integrierten Provirus erfolgt (Wu Y, 2001). Die durchgeführte Southern Blot Analyse aller mit SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren transduzierten Zielzellen (GHOST, Alpha-1 und primäre Monozyten) zeigte jedoch in allen analysierten Zellzyklusphasen, dass der größte Teil der in den Zielzellen detektierbaren proviralen DNA tatsächlich in das Genom dieser Zielzellen integriert ist. Dieser direkte Integrationsnachweis geht weit über eine PCR-Analyse verschiedener RT-Intermediate hinaus und zeigt, dass die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren auch in den ruhenden Zielzellen wie in den proliferierenden Zielzellen integrieren. Das unterscheidet sie deutlich von HIV-abgeleiteten Vektoren, für die gezeigt werden konnte, dass in ruhenden Zellen entweder schon die reverse Transkription unvollständig bleibt (Korin YD, 1998), oder die DNA-Proviren nicht integrieren (Neil S, 2001).

Es ließen sich in dieser Arbeit folglich keine Anhaltspunkte dafür finden, dass die für SIVsmmPBj-abgeleitete Vektoren gezeigte Fähigkeit zur Transduktion ruhender Zellen auf experimentellen Artefakten oder einem ungewöhnlichen Replikationsmechanismus beruht. Die SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren verhielten sich in allen durchgeführten Kontrollexperimenten wie das vergleichbare HIV-abgeleitete lentivirale Vektorsystem. Durch SIVsmmPBj-Vektoren transduzierte ruhende Zellen ließen sich dabei nicht von transduzierten proliferierenden Zellen unterscheiden, was für die gleichen Transduktionsmechanismen für beide Zellpopulationen spricht.

4.3 Einfluss des Nef-Proteins und der LTR-Aktivität auf die Gentransfereffizienz in ruhende Zellen

Um die besondere Transduktionsfähigkeit der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren genauer zu charakterisieren und evtl. einen Mechanismus der Transduktion ruhender Zellen durch diese Vektoren beschreiben zu können, sollten zwei Bestandteile dieser Vektoren genauer untersucht werden. Diese standen im Verdacht, das besondere Verhalten der PBj-Vektoren zu determinieren. Es handelt sich hierbei um das Nef-Protein und die LTR-Region von SIVsmmPBj1.9.

4.3.1 Einfluss des Nef-Proteins von SIVsmmPBj auf die Effizienz des Gentransfers in ruhende Zellen

Das Nef-Protein von SIVsmmPBj unterscheidet sich in einigen Punkten von dem der parentalen Viren und anderen Lentiviren, die die ungewöhnliche Eigenschaft von SIVsmmPBj nicht aufweisen. Einige Arbeiten hatten dieses Protein als eine der Hauptpathogenitätsdeterminanten von SIVsmmPBj charakterisiert, und u.a. wurde auch das Replikationspotential dieses Virus in unstimulierten PBMC mit dem Vorhandensein bestimmter Nef-Sequenzen korreliert (Novembre FJ, 1996; Du Z, 1996). Daher wurden in dieser Arbeit Nef-defiziente Vektoren konstruiert und auf ruhenden Zellen getestet. Die generierten Vektoren enthielten tatsächlich kein Nef-Protein mehr und auch in den Verpackungszellen wurde kein Nef-Protein mehr exprimiert, wie anhand der Western Blot Analyse gezeigt werden konnte. Diese Nef-defizienten Vektoren transduzierten ruhende Zellen einschließlich der primären Monozyten jedoch genau so effizient wie die parentalen, Nef-enhaltenden Vektoren. Das zeigte eindeutig, dass das beobachtete Transduktionspotential der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren unabhängig vom Nef-Protein ist, was wiederum bedeutet, dass auf die Hauptpathogenitätsdeterminante Nef zur Generierung von effizienten PBj-Vektoren verzichtet werden kann.

Für die Rolle des Nef-Proteins im Replikationszyklus von SIVsmmPBj bedeuten diese Ergebnisse umgekehrt, dass die beschriebenen Nef-Effekte wahrscheinlich auf Prozessen beruhen, die erst nach der Integration des DNA-Provirus in den infizierten Zellen wichtig werden oder die uninfizierte, benachbarte Zellen betreffen. So wurde z.B. für das Nef-Protein von HIV-1 gezeigt, dass infizierte Makrophagen Nef-vermittelt durch Sezernierung von Cytokinen (sICAM und sCD23) parakrin B- und T-Lymphozyten beeinflussen. Dadurch werden die normalerweise ruhenden CD4⁺ T-Lymphozyten so weit aktiviert, dass sie mit HIV infiziert werden können (Swingler S, 2003). Eine stark aktivierende Wirkung in infizierten Zellen wurde auch für das Nef-Protein von SIVsmmPBj beschrieben (Du Z, 1995, 1996). Daher wäre eine Erklärung für die Rolle des Nef-Proteins in der SIVsmmPBj-Infektion, dass zwar ruhenden Zielzellen weitestgehend unabhängig vom Nef-Protein infiziert werden können, aber nach Integration und Expression des DNA-Provirus PBj-Nef die infizierten Zellen (über)aktiviert. Durch dabei auftretende auto- oder parakrine Stimulation (z.B. Ausschüttung von IL-6 oder TNF- α) würde das ganze Immunsystem derart aktiviert, dass zum einen die Infektion nun aktivierter Immunzellen erleichtert wird, dass es zum anderen aber zu der für PBj geschilderten, pathogenen Symptomatik kommt, die in Ausmaß und Mechanismus einer hämorrhagischen Erkrankung gleicht (Birx DL

1993). Um diese Einflüsse des Nef-Proteins zu vermeiden, sollte in Zukunft das *nef*-Gen aus dem PBJ-abgeleiteten Vektorsystem ausgeschlossen werden, was, wie bereits dargelegt, möglich ist.

4.3.2 Charakterisierung der LTR-Aktivitäten von SIVsmmPBJ, SIVagm und HIV-1

Die U3-Promotorregion der LTRs von SIVsmmPBJ1.9 enthält eine für SIV ungewöhnliche Duplikation einer NFκB-Bindungsstelle, die sonst hauptsächlich bei pathogenen HIV-1-Isolaten gefunden wird. Außerdem überlappen sich der *nef*-ORF und die 3'-LTR teilweise, so dass Mutationen im *nef*-Gen 3' von bp 9246 sowohl das Gen als auch die Promotorregion des Virus verändern.

Bei den *env*-deletierten Vektorkonstrukte pPBJΔ*env* und pNL4-3Δ*env*, die kein Markergen auf die Zielzellen übertragen, wurden die nachgewiesenen Proteine unter der Kontrolle der viralen LTR-Promotoren exprimiert. Daher konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass zwar beide betrachteten Vektoren mit gleicher Effizienz integrieren, jedoch nur der Vektor mit der höheren LTR-Aktivität detektiert werden konnte, wenn nur bei diesem Vektor die Expression des Markergens über dem Detektionslimit wäre. Deswegen wurden die vollständigen Promotorregionen von HIV_{NL4-3}, SIVsmmPBJ1.9 und SIVagm3mc in das Luziferase-Reporterkonstrukt pGL3-basic kloniert und durch Nukleofektion in primären PBMC bzw. PBL getestet. Die Sequenzanalyse der getesteten Konstrukte zeigten keine Mutationen durch die Klonierungsprozedur, es wurde also die tatsächliche Promotoraktivität dieser 3 Lentiviren miteinander verglichen. Die Luziferase-Tests der nucleofizierten Zellen zeigten zwar, dass die NL4-3-LTR tatsächlich eine etwas geringere Promotoraktivität wie die PBJ-LTR aufweist, doch die Differenz zwischen beiden LTRs war auf unstimulierten und stimulierten Zellen gleich. Außerdem besaß die SIVagm-LTR auf stimulierten und auf unstimulierten Zellen die bei weitem stärkste Promotoraktivität. Diese Ergebnisse lassen es als unwahrscheinlich erscheinen, dass die im Vergleich zu HIV leicht erhöhte Promotoraktivität der PBJ-LTR ausschlaggebend für die unterschiedlichen Transduktionsereignisse ist. Außerdem zeigten auch die *egfp*-übertragenden Vektorkonstrukte mit internen CMV-Promotoren die gleichen Unterschiede zwischen SIVsmmPBJ- und HIV-1-abgeleiteten Vektorkonstrukten. In den getesteten Konstrukten wird das gleiche Markergen von demselben CMV-Promotor aus der gleichen Position im Vektorgenom exprimiert. Diese Expressionskassette sollte unabhängig von anderen Bestandteilen der Vektoren sein und daher in gleichen Zielzellen auch gleiche

Ergebnisse liefern. Die ermittelten Unterschiede zwischen HIV- und SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren beruhen somit wahrscheinlich nicht auf Unterschieden der Genexpression beider Vektoren.

4.4 Entwicklung lentiviraler 3-Plasmid Vektorsysteme

Wie schon in Kap. 1.2.1 erwähnt bestehen retro- und lentivirale Vektorsysteme hauptsächlich aus Sicherheitsgründen aus wenigstens 3 Plasmiden, auf denen die essentiellen Vektorbestandteile getrennt kodiert werden. Die im Rahmen dieser Arbeit extensiv getesteten Konstrukte sind jedoch lediglich im *env*-Gen defekt, d.h. Verpackungskonstrukt und Transfervektor sind in diesen Konstrukten identisch. Eine einfache Rekombination dieser Vektorkonstrukte mit einem Env-Expressionskonstrukt wäre daher ausreichend, um replikationskompetente Lentiviren zu generieren, was ein erhebliches Sicherheitsrisiko darstellt (Otto E, 1994).

Außerdem übertrugen diese *env*-deletierten Konstrukte alle anderen viralen Gene auf die Zielzellen. Diese wurden dort auch wenigstens teilweise exprimiert, was anhand der IPA-Färbungen und der Tat-abhängigen GFP-Induktion in GHOST-Zellen gezeigt werden konnte. Diese Expression viraler Gene in den transduzierten Zielzellen ist aber für eine spätere Anwendung unerwünscht. Die lentivirale Protease z.B. ist zytotoxisch für infizierte/transduzierte Zellen (Kaplan AH, 1991), und die Expression der *gag/pol*-Gene führt zur Knospung von VLPs in den Überstand der transduzierten Zellen (Delchambre M, 1989). In den Zellen vorhandene lentivirale Gensequenzen können somit wesentlich leichter mobilisiert und auf andere Zellen übertragen werden.

Um diese Risiken und Einschränkungen zu vermeiden war die Aufteilung der essentiellen SIVsmmPBj-Gensequenzen auf ein Verpackungs- und ein Transfervektorkonstrukt notwendig. Ein von Dr. J. Stitz konstruiertes 3-Plasmid Vektorsystem, das von SIVagm3mc abgeleitet wurde, konnte von uns als typisch lentivirales Vektorsystem charakterisiert werden (Stitz J, 2001). So konnte gezeigt werden, dass der gereinigte SIVagm3-Vektor in der Lage war, *in vivo* nicht-proliferierende Neurone, Astrozyten und Oligodendrozyten in intakten Rattenhirnen zu transduzieren. Damit entspricht das Potential dieses Vektors dem von HIV-1-abgeleiteten Vektoren (Naldini L, 1996). Daher wurde das gleiche Konstruktionsprinzip auf das angestrebte SIVsmmPBj-abgeleitete 3-Plasmid Vektorsystem übertragen. Tatsächlich zeigte das so konstruierte auf SIVsmmPBj1.9 basierende Verpackungskonstrukt pPBj-pack1, dass es zusammen mit dem SIVsmmPBj-Transfervektor pPBj-V2-EGFP in der Lage war, transduzierende Vektorpartikel zu

generieren. Somit steht ein erstes SIVsmmPBj-abgeleitetes Vektorsystem zur Verfügung, mit dem funktionsfähige PBj-Vektoren generiert werden können.

4.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ließ sich feststellen, dass SIVsmmPBj-abgeleitete Vektoren tatsächlich in der Lage sind, Fremdgene stabil in ruhende primäre Zellen zu transferieren und integrieren, die sich mit bisher etablierten Vektorsystemen nicht transduzieren ließen.

Damit steht ein neues retrovirales Vektorsystem zur Verfügung, welches das Zielzellspektrum für retroviralen Gentransfer wahrscheinlich beträchtlich ausweitet. Über den in dieser Arbeit geführten Beweis des Prinzips hinaus müssen die SIVsmmPBj-abgeleiteten aber noch weiterentwickelt werden, um voll für die angestrebten Gentransfer-Anwendungen an ruhenden Zellen zur Verfügung zu stehen. Transfervektor- und Verpackungskonstrukt können weiter optimiert werden. Mit dem in dieser Arbeit vorgestellten Vektorsystem ist der erste Schritt in diese Richtung getan, allerdings besteht immer noch die Notwendigkeit der Optimierung des Transfervektors, der nur noch so wenige virale Gensequenzen wie möglich enthalten sollte. Außerdem wäre es auch möglich, das Verpackungskonstrukt noch weiter zu verändern. pPBj-pack1 exprimiert noch alle virale Proteine in den Verpackungszellen außer Env, so auch das Nef-Protein, von dem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass es für die gewünschte Transduktionskapazität entbehrlich ist. Somit kann das *nef*-Gen im Verpackungskonstrukt der nächsten Generation ausgeschlossen werden. Über das Nef-Protein hinaus sollte ebenfalls evaluiert werden, ob die anderen akzessorischen Proteine Vif, Vpr und Vpx essentiell an der Transduktion ruhender Zellen beteiligt sind. Neben den Implikationen für die Konstruktion eines verbesserten Verpackungskonstruktes würden diese Untersuchungen einen Einblick in die Besonderheiten des Infektions- und Pathogenesemechanismus von SIVsmmPBj geben, der bis zu diesem Zeitpunkt noch unklar ist und weiterer Aufklärung bedarf.

Neben den Arbeiten am Design einer nächsten Vektorgeneration sollten die Untersuchungen der Transduzierbarkeit anderer interessanter primärer Zielzellen über die Monozyten hinaus weiterverfolgt werden. Weitere momentan nur schwer zugängliche Zelltypen wie unstimulierte hämatopoetische Stammzellen oder Hepatozyten würden den Anwendungsbereich der SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren beträchtlich ausweiten. Schließlich böten sich Untersuchungen dieses Vektorsystems im Tiermodell *in vivo* an, die auch eine Aussage über die Sicherheit der hier vorgestellten SIVsmmPBj-Vektoren erlauben würden.

5 Zusammenfassung

Für bestimmte Gentherapiestrategien bieten sich retrovirale Vektoren auf Grund der stabilen Integration der von ihnen übertragenen genetische Information an. Mit bisher vorhandenen retro- und lentiviralen Vektorsystemen kann jedoch kein effizienter Gentransfer in ruhende primäre Zellen wie unstimulierte PBMC oder undifferenzierte Monozyten erreicht werden. Ziel dieser Arbeit war es daher, retrovirale Vektorsysteme zu etablieren, die naive primäre Zellen effizient transduzieren können.

Zunächst wurden HIV-1-Vektoren mit den Hüllproteinen (Env) des amphotropen MLV, des MLV-Klons 10A1, des feline endogenen Retrovirus RD114 und des VSV sowie einem modifizierten GaLV-Env pseudotypisiert, um ihre Eignung für die Transduktion von primären T-Lymphozyten zu untersuchen. Mit diesen Vektoren konnten primäre stimulierte humane T-Lymphozyten mit ähnlichen Transduktionsraten von ca. 20% transduziert werden. Im Gegensatz dazu wurden mit MLV-Vektoren, die mit den gleichen Hüllproteinen pseudotypisiert waren, bei gleichem Transduktionsprotokoll untereinander deutlich unterschiedliche Transduktionsraten zwischen 1 – 45% erreicht. Dieser unerwartete Unterschied ist möglicherweise auf eine längere, dabei untereinander ähnliche Halbwertszeit der HIV-1-abgeleiteten Vektoren zurückzuführen. Unstimulierte PBMC konnten allerdings unabhängig vom verwendeten Hüllprotein weder von den MLV- noch von den HIV-1-abgeleiteten Vektoren transduziert werden.

Demgegenüber hatte sich in meiner vorangegangenen Diplomarbeit die Transduzierbarkeit ruhender humaner Zellen durch Vektoren angedeutet, die von dem akut pathogenen simianen Immundefizienzvirus SIVsmmPBj1.9 abgeleitet waren. In der hier vorgestellten Arbeit zeigten die PBj-Vektoren, die nur im *env*-Gen eine Deletion aufwiesen, dass sie auch in der G₀-Phase des Zellzyklus arretierte GHOST-Indikatorzellen oder diploide Fibroblasten effizient und unabhängig von dem zur Pseudotypisierung verwendeten Hüllprotein transduzieren können. Die korrespondierenden HIV-1-Vektoren waren dazu nicht in der Lage. Auch PBj- und HIV-1-Vektoren, die *egfp* als Markergen transferieren, zeigten das gleiche Transduktionsverhalten. Die *egfp*-transferierenden SIVsmmPBj-Vektoren konnten schließlich im Unterschied zu den entsprechenden HIV-1-Vektoren auch frisch isolierte primäre humane Monozyten sehr effizient transduzieren. Mit Nef-deletierten Mutanten wurde schließlich gezeigt, dass die beschriebenen Fähigkeiten PBj-abgeleiteter Vektoren nicht vom viralen Nef-Protein abhängen, obwohl dieses regulatorische Gen die pathogenen Eigenschaften und die Replikationsfähigkeit von SIVsmmPBj-Viren bestimmt.

Für alle mit SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren transduzierten Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit ferner die chromosomale Integration des Transfervektors gezeigt werden.

Schließlich gelang die Konstruktion eines ersten 3-Plasmid-Vektorsystems, mit dem transduktionsfähige Vektorpartikel generiert werden können.

Mit SIVsmmPBj-abgeleiteten Vektoren steht somit ein neues retrovirales Vektorsystem zur Verfügung, mit dem auch ruhende primäre Zellen stabil genetisch modifiziert werden können. Durch die Erschließung dieser wichtigen Zielzellen werden die Perspektiven einer dauerhaften Gentherapie *in vitro* und *in vivo* beträchtlich erweitert.

6 Literaturverzeichnis

A

- Adachi, A.; Gendelman, H.E.; Koenig, S.; Folks, T.; Willey, R.; Rabson, A.; Martin, M.A.: 'Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone' (J Virol. **59** (2) [1986] S. 284-291).
- Adkins, B.; Hunter, T.: 'Identification of a packaged cellular mRNA in virions of rous sarcoma virus.' (J Virol **39** (2) [1981] S. 471-80).
- Aiken, C.: 'Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A' (J Virol. **71** (8) [1997] S. 5871-7).
- Anderson, W.F.: 'Prospects for human gene therapy.' (Science **226** (4673) [1984] S. 401-9).
- Aruffo, A.; Hollenbaugh, D.; Wu, L.H.; Ochs, H.D.: 'The molecular basis of X-linked agammaglobulinemia, hyper-IgM syndrome, and severe combined immunodeficiency in humans.' (Curr Opin Hematol **1** (1) [1994] 12-8).
- Ayuk, F.A.; Zander, A.R.; Fehse, B.: 'T lymphocytes as targets of gene transfer with Moloney-type retroviral vectors.' (Curr Gene Ther **1** (4) [2001] S. 325-37).

B

- Baier, M.; Werner, A.; Cichutek, K.; Garber, C.; Muller, C.; Kraus, G.; Ferdinand, F.J.; Hartung, S.; Papas, T.S.; Kurth R.: 'Molecularly cloned simian immunodeficiency virus SIVagm3 is highly divergent from other SIVagm isolates and is biologically active in vitro and in vivo.' (J Virol. **63** (12) [1989] S. 5119-23).
- Baskar, P.; Narayan, O.; McClure, H.M.; Hildreth, J.E.: 'Simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj 1.9 induces multinucleated giant cell formation in human peripheral blood monocytes.' (AIDS Res Hum Retroviruses **10** (1) [1994] S. 73-80).
- Birx, D.L.; Lewis, M.G.; Vahey, M.; Tencer, K.; Zack, P.M.; Brown, C.R.; Jahrling, P.B.; Tosato, G.; Burke, D.; Redfield, R.: 'Association of interleukin-6 in the pathogenesis of acutely fatal SIVsmm/PBj-14 in pigtailed macaques.' (AIDS Res Hum Retroviruses **9** (11) [1993] S. 1123-9).

- Blömer, U.; Naldini, L.; Kafri, T.; Trono, D.; Verma, I.M.; Gage, F.H.: "Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector." (J Virol **71** (9) [1997] S. 6641-9).
- Bukrinsky, M.I.; Haggerty, S.; Dempsey, M.P.; Sharova, N.; Adzhubel, A.; Spitz, L.; Lewis, P.; Goldfarb, D.; Emerman, M.; Stevenson, M.: "A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells." (Nature **365** (6447) [1993] S. 666-9).
- Bunnell, B.A.; Muul, L.M.; Donahue, R.E.; Blaese, R.M.; Morgan, R.A.: "High-efficiency retroviral-mediated gene transfer into human and nonhuman primate peripheral blood lymphocytes." (PNAS **92** (17) [1995] S. 7739-43).
- Burns, J.C.; Friedmann, T.; Driever, W.; Burrascano, M.; Yee, J.K.: "Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells" (PNAS **90** (17) [1993] S. 8033-7).
- Butler, S.L.; Hansen, M.S.; Bushman, F.D.: "A quantitative assay for HIV DNA integration in vivo" (Nat Med **7** (5) [2001] S. 631-4).

C

- Cavazzana-Calvo, M.; Hacein-Bey, S.; de Saint Basile, G.; Gross, F.; Yvon, E.; Nusbaum, P.; Selz, F.; Hue, C.; Certain, S.; Casanova, J.L.; Bousso, P.; Deist, F.L.; Fischer, A.: "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." (Science **288** (5466) [2000] S. 669-72).
- Charneau, P.; Alizon, M.; Clavel, F.: "A second origin of DNA plus-strand synthesis is required for optimal human immunodeficiency virus replication." (J Virol **66** (5) [1992] S. 2814-20).
- Charneau, P.; Mirambeau, G.; Roux, P.; Paulous, S.; Buc, H.; Clavel, F.: "HIV-1 reverse transcription. A termination step at the center of the genome." (J Mol Biol **241** (5) [1994] S. 651-62).
- Chinnasamy, D.; Chinnasamy, N.; Enriquez, M.J.; Otsu, M.; Morgan, R.A.; Candotti, F.: "Lentiviral-mediated gene transfer into human lymphocytes: role of HIV-1 accessory proteins." (Blood **96** (4) [2000] S. 1309-16).

- Christodoulopoulos, I.; Cannon, P.M.: 'Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors.' (J Virol **75** (9) [2001] S. 4129-38).
- Clay, T.M.; Custer, M.C.; Sachs, J.; Hwu, P.; Rosenberg, S.A.; Nishimura, M.I.: 'Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity.' (J Immunol **163** (1) [1999] S. 507-13).
- Coffin, J.M.: 'Retroviridae and their Replication' in: Fields, B.N. et al. (Ed.) 'Virology' ([1996] S. 1767-848, Raven Press, New York).
- Coffin, J.M.; Hughes, S.H.; Varmus, H.E.: 'Retroviruses' ([1997] Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- 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 **206** (2) [1995] S. 935-44).
- Cosset, F.-L.; Takeuchi, Y.; Battini, J.-L.; Weiss, R.A.; Collins, M.K.: 'High-Titer packaging cells producing recombinant retroviruses resistant to human serum' (J Virol **69** (12) [1995] S. 7430-6).
- Costello, E.; Munoz, M.; Buetti, E.; Meylan, P.R.; Diggelmann, H.; Thali, M.: 'Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors.' (Gene Ther **7** (7) [2000] S. 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 a sooty mangabey monkey after cross-species transmission to a pig-tailed macaque.' (J Virol. **66** (1) [1992] S. 414-9).

D

- Danos, O.; Mulligan, R.C.: 'Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges.' (PNAS **85** [1988] S. 6460-4).
- Delchambre, M.; Gheysen, D.; Thines, D.; Thiriart, C.; Jacobs, E.; Verdin, E.; Horth, M.; Burny, A.; Bex, F.: 'The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles.' (EMBO J **8** (9) [1989] S. 2653-60).
- Dewhurst, S.; Embretson, J.E.; Anderson, D.C.; Mullins, J.I.; Fultz, P.N.: 'Sequence analysis and acute pathogenicity of molecularly cloned SIVSMM-PBj14' (Nature **345** [1990] S. 636-40).

- Dewhurst, S.; Embretson, J.E.; Fultz, P.N.; Mullins J.I.: „Molecular clones from a non-acutely pathogenic derivative of SIVsmmPBj14: characterization and comparison to acutely pathogenic clones.“ (AIDS Res Hum Retroviruses **8** (6) [1992] S. 1179-87).
- Dittmar, M.T.; Cichutek, K.; Fultz, P.N.; Kurth, R.: „The U3 promoter region of the acutely lethal simian immunodeficiency virus clone smmPBj1.9 confers related biological activity on the apathogenic clone agm3mc“ (PNAS **92** (5) [1995] S. 1362-6).
- Dorn, P.; DaSilva, L.; Martarano, L.; Derse, D.: ‘Equine infectious anemia virus tat: insights into the structure, function, and evolution of lentivirus trans-activator proteins.’ (J Virol **64** (4) [1990] S. 1616-24).
- 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 **82** (4) [1995] S. 665-74).
- Du, Z.; Ilyinskii, P.O.; Sasseville, V.G.; Newstein, M.; Lackner, A.A.; Desrosiers, R.C.: ‘Requirements for lymphocyte activation by unusual strains of simian immunodeficiency virus.’ (J Virol **70** (6) [1996] S. 4157-61).
- DuBridge, R.B.; Tang, P.; Hsia, H.C.; Leong, P.M.; Miller, J.H.; Calos, M.P.: ‘Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system.’ (Mol Cell Biol **7** (1) [1987] S. 379-87).
- Ducrey-Rundquist, O.; Guyader, M.; Trono, D.: ‘Modalities of interleukin-7-induced human immunodeficiency virus permissiveness in quiescent T lymphocytes.’ (J Virol **76** (18) [2002] S. 9103-11).

E

- Emi, N.; Friedmann, T.; Yee, J.K.: „Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus.“ (J Virol **65** (3) [1991] S. 1202-7).

F

- Fehse, B.; Schade, U.M.; Li, Z.; Uhde, A.; Koch, S.; Goller, B.; Ruger, R.; Fehse, N.; Stockschlader, M.; Zander, A.R.: ‘Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin.’ (Br J Haematol **102** (2) [1998] S. 566-74).
- Fischer, A.; Hacein-Bey, S.; Cavazzana-Calvo, M.: ‘Gene therapy of severe combined immunodeficiencies.’ (Nat Rev Immunol **2** (8) [2002] S. 615-21).

- 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/SIV(SM)." (EMBO J **15** (22) [1996] S. 6155-65).
- Fouchier, R.A.; Malim, M. H.: "Nuclear import of human immunodeficiency virus type-1 preintegration complexes." (Adv Virus Res **52** [1999] S. 275-99).
- Fultz, P.N.; McClure, H.M.; Anderson, D.C.; Swenson, R.B.; Anand, R.; Srinivasan, A.: (Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from naturally infected sooty mangabey monkeys (*Cercocebus atys*.) (PNAS **83** (14) [1986] S. 5286-90).
- 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 **5** (4) [1989] S. 397-409).
- Fultz, P.N.: "Replication of an acutely lethal simian immunodeficiency virus activates and induces proliferation of lymphocytes." (J Virol **65** (9) [1991] S. 4902-9).

G

- Gallay, P.; Swingler, S.; Aiken, C.; Trono, D.: "HIV-1 infection of nondividing cells: C-terminal tyrosine phosphorylation of the viral matrix protein is a key regulator." (Cell **80** (3) [1995] S. 379-88).
- Gallay, P.; Swingler, S.; Song, J.; Bushman, F.; Trono, D.: "HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase." (Cell **83** (4) [1995] S. 569-76).
- Gallay, P.; Hope, T.; Chin, D.; Trono, D.: "HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway." (PNAS **94** (18) [1997] S. 9825-30).
- Gartner, S.; Markovits, P.; Markovitz, D.M.; Kaplan, M.H.; Gallo, R.C.; Popovic, M.: "The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection." (Science **233** [1986] S. 215-9).
- Gladow, M.; Becker, C.; Blankenstein, T.; Uckert, W.: "MLV-10A1 retrovirus pseudotype efficiently transduces primary human CD4⁺ T lymphocytes." (J Gene Med **2** (6) [2000] S. 409-15).

H

- Hacein-Bey-Abina, S.; Von Kalle, C.; Schmidt, M.; *et al.*: ‘LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1.’ (Science **302** (5644) [2003] S. 415-9).
- Haddrick, M.; Brown, C.R.; Plishka, R.; Buckler-White, A.; Hirsch, V.M.; Ginsberg, H.: ‘Biologic studies of chimeras of highly and moderately virulent molecular clones of simian immunodeficiency virus SIVsmPBj suggest a critical role for envelope in acute AIDS virus pathogenesis.’ (J Virol **75** (14) [2001] S. 6645-59).
- Hanenberg, H.; Xiao, X.L.; Dilloo, D.; Hashino, K.; Kato, I.; Williams, D.A.: ‘Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells.’ (Nat Med **2** (8) [1996] S. 876-82).
- 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 **69** (11) [1995] S. 6705-11).
- Heinzinger, N.K.; Bukrinsky, M.I.; Haggerty, S.A.; Ragland, A.M.; Kewalramani, V.; Lee, M.A.; Gendelman, H.E.; Ratner, L.; Stevenson, M.; Emerman, M.: ‘The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells.’ (PNAS **91** (15) [1994] S. 7311-5).
- 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 **4** (12) [1998] S. 1401-8).
- Hodge, S.; Novembre, F.J.; Dewhurst, S.: ‘Endogenous tumor necrosis factor- α contributes to lymphoproliferation induced by simian immunodeficiency virus variant, SIVsmmPBj14.’ (Immunol Lett **63** (1) [1998] S. 49-51).

I

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

J

Johnson, L.G.: „Gene Therapy for Cystic Fibrosis“ (Chest **107** (2. Suppl) [1995] S. 77S-81S).

K

Kaplan, A.H.; Swanstrom, R.: “The HIV-1 gag precursor is processed via two pathways: implications for cytotoxicity.” (Biomed Biochim Acta **50** (4-6) [1991]: 647-53).

Kikukawa, R.; Koyanagi, Y.; Harada, S.; Kobayashi, N.; Hatanaka, M.; Yamamoto, N.: „Differential susceptibility to the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus in cloned cells of human leukemic T-cell line Molt-4.“ (J Virol **57** (3) [1986] S. 1159-62).

Kirchhoff, F.; Carl, S.; Sopper, S.; Sauermann, U.; Matz-Rensing, K.; Stahl-Hennig, C.: “Selection of the R17Y substitution in SIVmac239 nef coincided with a dramatic increase in plasma viremia and rapid progression to death.” (Virology **254** (1) [1999] S. 61-70).

Kuiken, C.; Foley, B.; Hahn, B.; Marx, P.; McCutchan, F.; Mellors, J.; Mullins, J.; Sodroski, J.; Wolinski, S.; Korber, B. (Ed.): “HIV Sequence Compendium” (Los Alamos National Laboratory [2000], Los Alamos, USA).

Korin, Y.D.; Zack, J.A.: “Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells.” (J Virol **72** (4) [1998] S. 3161-8).

Korin, Y.D.; Zack, J.A.: “Nonproductive human immunodeficiency virus type 1 infection in nucleoside-treated G0 lymphocytes.” (J Virol **73** (8) [1999] S. 6526-32).

L

Lam, J.S.; Reeves, M.E.; Cowherd, R.; Rosenberg, S.A.; Hwu, P.: “Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope.” (Hum Gene Ther **7** (12) [1996] S. 1415-22).

Lapointe, R.; Royal, R.E.; Reeves, M.E.; Altomare, I.; Robbins, P.F.; Hwu, P.: “Retrovirally transduced human dendritic cells can generate T cells recognizing multiple MHC class I and class II epitopes from the melanoma antigen glycoprotein 100.” (J Immunol **167** (8) [2001] S. 4758-64).

Lee, T.C.; Sullenger, B.A.; Gallardo, H.F.; Ungers, G.E.; Gilboa, E.: “Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells.” (New Biol **4** (1) [1992] S. 66-74).

- Liu, M.L.; Winther, B.L.; Kay, M.A.: 'Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer.' (J Virol **70** (4) [1996] S. 2497-502).
- Lusso, P.; Cocchi, F.; Balotta, C.; Markham, P.D.; Louie, A.; Farci, P.; Pal, R.; Gallo, R.C.; Reitz, M.S. Jr.: 'Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1.' (J Virol **69** (6) [1995] S. 3712-20).

M

- Maurice, M.; Verhoeyen, E.; Salmon, P.; Trono, D.; Russell, S.J.; Cosset, F.L.: 'Efficient gene transfer into human primary blood lymphocytes by surface-engineered lentiviral vectors that display a T cell-activating polypeptide.' (Blood **99** (7) [2002] S. 2342-50).
- Merril, G.F.: 'Cell synchronization' (Meth. Cell Biol **57** [1998] S. 229-49).
- Mühlebach, M.D.: 'Transduktion ruhender Zellen mit lentiviralen, von SIVsmmPBj abgeleiteten Vektoren' (Diplomarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main 2000).
- 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 **81** (12) [2003] S. 801-10).
- Moore, G.E.; Gerner, R.E.; Franklin, H.A.: 'Culture of normal human leukocytes.' (JAMA **199** (8) [1967] S. 519-24).

N

- Naldini, L.; Blömer, 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 **272** (5259) [1996] S. 263-7).
- Naldini, L.; Blömer, U.; Gage, F.H.; Trono, D.; Verma, I.M.: 'Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector.' (PNAS **93** (21) [1996] S. 11382-8).

- Negre, D.; Mangeot, P.E.; Duisit, G.; Blanchard, S.; Vidalain, P.O.; Leissner, P.; Winter, A.J.; Rabourdin-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 **7** (19) [2000] S. 1613-23).
- Neil, S.; Martin, F.; Ikeda, Y.; Collins, M.: 'Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes.' (J Virol **75** (12) [2001] S. 5448-56).
- Neumann-Haefelin, D.; Rethwilm, A.; Bauer, G.; Gudat, F.; zur Hausen, H.: 'Characterization of a foamy virus isolated from Cercopithecus aethiops lymphoblastoid cells.' (Med Microbiol Immunol (Berl) **172** (2) [1983] S. 75-86).
- 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 **294** (5544) [2001] S. 1105-8).
- Novembre, F.J.; Johnson, P.R.; Lewis, M.G.; Anderson, D.C.; Klumpp, S.; McClure, H.M.; Hirsch, V.M.: 'Multiple viral determinants contribute to pathogenicity of the acutely lethal simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj variant.' (J Virol. **67** (5) [1993] S. 2466-74).
- Novembre, F.J.; Lewis, M.G.; Saucier, M.M.; Yalley-Ogunro, J.; Brennan, T.; McKinnon, K.; Bellah, S.; McClure H.M.: 'Deletion of the nef gene abrogates the ability of SIV smmPBj to induce acutely lethal disease in pigtail macaques.' (AIDS Res Hum Retroviruses **12** (8) [1996] S. 727-36).

O

- 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.' (PNAS **93** (21) [1996] S. 11400-6).
- Otto, E.; Jones-Trower, A.; Vanin, E.F.; Stambaugh, K.; Mueller, S.N.; Anderson, W.F.; McGarrity, G.J.: 'Characterization of a replication-competent retrovirus resulting from recombination of packaging and vector sequences.' (Hum Gene Ther **5** (5) [1994] S. 567-75).

Owen, S.M.; Ellenberger, D.; Rayfield, M.; Wiktor, S.; Michel, P.; Grieco, M.H.; Gao, F.; Hahn, B.H.; Lal, R.B.: „Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry.“ (J Virol **72** (7) [1998] S. 5425-32).

P

Peng, K.W.; Pham, L.; Ye, H.; Zufferey, R.; Trono, D.; Cosset, F-L.; Russell, S.J.: “Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors.” (Gene Ther **8** (19) [2001] S. 1456-63).

Pollok, K.E.; Hanenberg, H.; Noblitt, T.W.; Schroeder, W.L.; Kato, I.; Emanuel, D.; Williams, D.A.: “High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments.” (J Virol **72** (6) [1998] S. 4882-92).

S

Sambrook, J.; and Russel, D.W.: „Molecular Cloning – a laboratory manual“ (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd Ed. [2001]).

Sandrin, V.; Boson, B.; Salmon, P.; Gay, W.; Negre, D.; Le Grand, R.; Trono, D.; Cosset, F-L.: “Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and nonhuman primates.” (Blood **100** (3) [2002] S. 823-32).

Saphire, A.C.; Bobardt, M.D.; Gallay, P.A.: “Host cyclophilin A mediates HIV-1 attachment to target cells via heparans.” (EMBO J **18** (23) [1999] S. 6771-85).

Schmitt, I: “Optimierung des CD4-spezifischen Gentransfers in primäre humane T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Hinblick auf die Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS” (Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main, 2002).

Schnierle, B.S.; Stitz, J.; Bosch, V.; Nocken, F.; Merget-Millitzer, H.; Engelstädter, M.; Kurth, R.; Groner, B.; Cichutek, K.: „Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells.“ (PNAS **94** (16) [1997] S. 8640-5).

- Schroder, A.R.; Shinn, P.; Chen, H.; Berry, C.; Ecker, J.R.; Bushman, F.: „HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots” (Cell **110** (4) [2002] S. 521-9).
- Scripture-Adams, D.D.; Brooks, D.G.; Korin, Y.D.; Zack, J.A.: “Interleukin-7 induces expression of latent human immunodeficiency virus type 1 with minimal effects on T-cell phenotype.” (J Virol **76** (24) [2002] S. 13077-82).
- von Schwendler, U.; Kornbluth, R.S.; Trono D.: „The nuclear localization signal of the matrix protein of human immunodeficiency virus type 1 allows the establishment of infection in macrophages and quiescent T lymphocytes.” (PNAS **91** (15) [1994] S. 6992-6).
- 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 **68** (9) [1994] S. 5538-47).
- Sigurdsson, B: “Observations on three slow infection of sheep. Maedi, paratuberculosis, rida, a slow encephalitis of sheep with general remarks on infection which develop slowly and some of their special characteristics” (Br Vet J **110** [1954] S. 255-70).
- 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 **23** (4) [1995] S. 628-33).
- Southern, E.M.: „Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis” (J Mol Biol **98** [1975] S. 503-17).
- Steidl, S.; Stitz, J.; Schmitt, I.; König, R.; Flory, E.; Schweizer, M.; Cichutek, K.: “Coreceptor Switch of [MLV(SIVagm)] pseudotype vectors by V3-loop exchange.” (Virology **300** (2) [2002] S. 205-16).
- Stephens, E.B.; Mukherjee, S.; Liu, Z.Q.; Sheffer, D.; Lamb-Wharton, R.; Leung, K.; Zhuge, W.; Joag, S.V.; Li, Z.; Foresman, L.; Adany, I.; Narayan, O.: “Simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the nef/long terminal repeat region of the highly virulent SIVsmmPBj14 causes PBj-like activation of cultured resting peripheral blood mononuclear cells, but the chimera showed No increase in virulence.” (J Virol **72** (6) [1998] S. 5207-14).
- Stitz, J.; Steidl, S.; Merget-Millitzer, H.; König, R.; Müller, P.; Nocken, F.; Engelstädter, M.; Bobkova, M.; Schmitt, I.; Kurth, R.; Buchholz, C.J.; Cichutek, K.: „MLV-derived retroviral vectors selective for CD4-expressing cells and resistant to

neutralization by sera from HIV-infected patients. “(Virology **267** (2) [1999] S. 229-36).

Stitz, J.; Buchholz, C.J.; Engelstädter, M.; Uckert, W.; Bloemer, U.; Schmitt, I.; Cichutek, K.: „Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1 “ (Virology **273** (1) [2000] S. 16-20).

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 **291** (2) [2001] S. 191-7).

Swingler, S.; Brichacek, B.; Jacque, J.M.; Ulich, C.; Zhou, J.; Stevenson, M.: “HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection.” (Nature **424** (6945) [2003] S. 213-9).

T

Thormar, H.: “The growth cycle of Visna virus in monolayer cultures of sheep cells” (Virology **19** [1963] S. 273-8).

U

Uckert, W.; Becker, C.; Gladow, M.; Klein, D.; Kammertoens, T.; Pedersen, L.; Blankenstein, T.: “Efficient gene transfer into primary human CD8+ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype.” (Hum Gene Ther **11** (7) [2000] S. 1005-14).

V

Válle, H.; Carré, H.: “Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval” (C.R. Hebd Seances Acad Sci Ser D Sci Nat **139** [1904] S. 331-3).

Verhoeven, E.; Dardalhon, V.; Ducrey-Rundquist, O.; Trono, D.; Taylor, N.; Cosset, F-L.: “IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes.” (Blood **101** (6) [2003] S. 2167-74).

W

Wagener, S.; Dittmar, M.T.; Beer, B.; König, R.; Plesker, R.; Norley, S.; Kurth, R.; Cichutek, K.: „The U3 promoter and the nef gene of simian immunodeficiency virus

- (SIV) smmPBj1.9 do not confer acute pathogenicity upon SIVagm. "(J Virol. **72** (4) [1998] S. 3446-50).
- Watanabe, S.; Temin, H.M.: „Construction of a helper cell line for avian reticuloendotheliosis virus cloning vectors.“(Mol Cell Biol. **3** (12) [1983] S. 2241-9).
- Whetter, L.; Novembre, F.J.; Saucier, M.; Gummuluru, S.; Dewhurst, S.: “Costimulatory pathways in lymphocyte proliferation induced by the simian immunodeficiency virus SIVsmmPBj14.”(J Virol **72** (7) [1998] S. 6155-8).
- Wilk, T.; Pfeiffer, T.; Bosch, V.: „Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the C-terminal tail of the env gene product.“(Virology **189** (1) [1992] S. 167-77).
- Woods, N.B.; Muessig, A.; Schmidt, M.; Flygare, J.; Olsson, K.; Salmon, P.; Trono, D.; von Kalle, C.; Karlsson, S.: “Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis.”(Blood **101** (4) [2003] S. 1284-9).
- Wong, F.S.; Hibberd, M.L.; Wen, L.; Millward, B.A.; Demaine, A.G.: “The human T cell receptor V beta repertoire of normal peripheral blood lymphocytes before and after mitogen stimulation.”(Clin Exp Immunol **92** (2) [1993] S. 361-6).
- Wu, X.; Li, Y.; Crise, B.; Burgess, S.M.: “Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration”(Science **300** (5626) [2003] S.1749-51).
- Wu, Y.; Marsh, J.W.: “Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA.”(Science **293** (5534) [2001] S. 1503-6).

Z

- Zavada, J.; Rosenbergova, M.: „Pseudotypes of vesicular stomatitis virus with the coat of murine leukaemia and of avian myeloblastosis viruses.“(J Gen Virol **15** (3) [1972] S. 183-91).
- Zennou, V.; Petit, C.; Guetard, D.; Nerhbass, U.; Montagnier, L.; Charneau, P.: „HIV-1 Genome Nuclear Import Is Mediated by a Central DNA Flap“(Cell **101** [2000] S. 173-85).
- Zufferey, R.; Nagy, D.; Mandel, R.J.; Naldini, L.; Trono, D.: “Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo.”(Nat Biotechnol **15** (9) [1997] S. 871-5).

7 Abkürzungsverzeichnis

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
C	Cys	Cystein	K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
D	Asp	Aspartat	L	Leu	Leucin	T	Th	Threonin
E	Glu	Glutamat	M	Met	Methionin	V	Val	Valin
F	Phe	Phenylalanin	N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
G	Gly	Glycin	P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin
H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin			

Abkürzungen

aa	„aminoacid“; dt. Aminosäure
AAV	Adeno-assoziierte Viren
Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische grüne Meerkatze
AIDS	„Acquired Immunodeficiency Syndrome“; dt. erworbene Immunschwäche
A-MLV	amphotropes murines Leukämievirus
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz-Gen
APC	Antigen-präsentierende Zelle
β -Gal	beta-Galaktosidase
BGH	„bovine growth hormone“
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
<i>bsr</i>	Blasticidin-Resistenzgen
CA	Kapsid-Protein
CD	„cellular marker of differentiation“; dt. zelluläres Membranprotein
CIA	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1
CIP	„Calf intestinal phosphatase“; dt. Phosphatase aus Kälberdarm
CMV	Cytomegalievirus
cPPT	zentraler Polypurintrakt
C-terminal	Carboxy-terminal
CTS	„central termination signal“; dt. zentrales Terminationssignal
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
ds	„double stranded“; dt. doppelsträngig

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced Green Fluorescence Protein
<i>env</i>	„envelope“; Gen für virales Hüllprotein
Env	virales Hüllprotein
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung/-analyse
FCS	fötales Kälberserum
FITC	5'-Fluoroisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
<i>gag</i>	„Group-specific antigen“ dt. virales Strukturgen
GaLV	Gibbonaffen Leukämievirus
h	Stunde(n)
HFV	humanes Foamy-Virus
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HSC	hämatopoetische Stammzelle(n)
hu	human
HTLV	humanes T-Zell-Leukämievirus
i.d.R.	in der Regel
IL	Interleukin
IN	virale Integrase
IPA	<i>In situ</i> Immun-Peroxidase-Assay
IRES	„Internal ribosomal entry site“
Kap	Kapitel
kD	Kilodalton
<i>lacZ</i>	β-Galaktosidase-Gen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
Lsg	Lösung
LTR	„long terminal repeat“
Luc	Luziferase
M	molar
MA	virales Matrixprotein
mac	Makake
MACS	Magnetische Zellsortierung
min	Minute(n)
MLV	murines Leukämievirus
MMTV	Maus Mamma Tumor Virus
moi	„multiplicity of infection“ dt. Multiplizität der Infektion
MPMV	Mason-Pfizer Affen Virus
mRNA	„messenger RNA“; dt. Boten-RNA
NC	virales Nukleokapsidprotein
Nef	Negative Factor; akzessorisches virales Protein
NLS	„nuclear localisation signal“; dt. Kernlokalisationssequenz
NSP	Kombination Neomycin-Streptomycin-Penicillin

nt	nicht getestet
OD	optische Dichte
ORF	„open reading-frame“, dt. offener Leserahmen
ori	„origin of replication“, dt. Replikationsursprung
P	Promotor
pA	Polyadenylierungssignal
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	PE conjugiert mit Cyan5
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
PHA	Phytohemagglutinin
PI	Propidiumiodid
PIC	Pre-Integration Complex
<i>pol</i>	Gen für virale Enzyme (RT, PR, IN)
PPT	Polypurintrakt
PR	virale Protease
Prom	Promotor
Ψ (Psi)	Verpackungssignal
R	repetitive Sequenz der LTR
RCR	„replivation competent retrovirus“, dt. replikationskompetentes Retrovirus
RD114	felines endogenes Retrovirus
Rev	virales regulatorisches Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“, dt. Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium aus dem „Roswell Park Memorial Institute“
RRE	Rev-responsives Element
RT	virale reverse Transkriptase oder Raumtemperatur
RSV	Rous Sarcoma Virus
s.	siehe
S.	Seite
SA	Spleiß-Akzeptor
SCID	„severe combined immunodeficiency“
SD	Spleiß-Donor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIV	simianes-humanes Immundefizienzvirus (Hybrid)
SIV	simianes Immundefizienzvirus
smm	„sootey mangabey monkey“, dt. Schopfmangabe
SP	Kombination Streptomycin-Penicillin
ss	„single stranded“, dt. einzelsträngig
SU	Oberflächeneinheit des Hüllproteins
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA

Tat	viraler transkriptioneller Transaktivator
TE	Tris-EDTA
TM	Transmembraneinheit des Hüllproteins
TU	„transducing unit“, dt. transduzierende Vektorpartikel
UZ	Ultrazentrifuge
Vif	„viral infectivity factor“, akzessorisches Protein
VLP	„virus-like particle“
Vpr	„viral protein r“, akzessorisches Protein
Vpu	„viral protein u“, akzessorisches Protein
Vpx	„viral protein x“, akzessorisches Protein
VSV	vesicular stomatitis virus
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-galactopyranosid
Zeo ^r	Zeocin-Resistenz-Gen

Teilergebnisse dieser Arbeit sind in nachfolgenden Publikationen veröffentlicht worden:

J. STITZ, M.D. MÜHLEBACH, U. BLÖMER, M. SCHERR, M. SELBERT, P. WEHNER, S. STEIDL, I. SCHMITT, R. KÖNIG, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK (2001). „A Novel Lentiviral Vector Derived from Apathogenic Simian Immunodeficiency Virus.” *Virology* **291**(2), 191-197.

M.D. MÜHLEBACH, I. SCHMITT, S. STEIDL, J. STITZ, M. SCHWEIZER, T. BLANKENSTEIN AND W. UCKERT (2003). „Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes.” *J Mol Med* **81**, 801-810.

S. STEIDL, S. SCHÜLE, M.D. MÜHLEBACH, J. STITZ, K. BOLLER, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER (2004). „Genetic engineering of onco/lenti hybrid viruses results in formation of infectious particles but not of replication competent viruses.” *J Gen Virol* **85**, 665-678.

M.D. MÜHLEBACH, N. WOLFRUM, B. VÖLKER, U. TSCHULENA, R. SANZENBACHER, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. „Stable transduction of quiescent human primary cells by simian lentiviral vector PBJ.” Eingereicht im Januar 2004.

U. TSCHULENA, R. SANZENBACHER, R. PLESKER, C. COULIBALY, S. RAUPP, R. WENIG, H. MUCKENFUSS, M. HAMDORF, M.D. MÜHLEBACH, M. SCHWEIZER, K. CICHUTEK AND E. FLORY. „Raf-binding domain in Nef of SIV-PBJ is essential for lethal enteropathic disease.” Eingereicht bei *Nature Med*, Januar 2004.

Teile dieser Arbeit wurden als Vorträge auf verschiedenen Kongressen vorgestellt:

M. MÜHLEBACH, J. STITZ, W. UCKERT, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK. „Transduktion humaner PBL mit [HIV(GaLV)] und [HIV(10A1)]-Pseudotypvektoren.“ Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden, 14. – 17.3.2001

M. SCHWEIZER, M. MÜHLEBACH, S. STEIDL, W. UCKERT, J. NEUMANN, J. STITZ, E. FLORY, K. CICHUTEK: “Transduction of human hematopoietic cells with onco-retroviral and lentiviral vectors.” 9th Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antalya, Türkei 2001

M.D. MUEHLEBACH, N. WOLFRUM, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. „Infection of quiescent, G0-arrested cells by acutely pathogenic SIVsmmPBj.” XIIth meeting of the International Union of Microbial Societies, Paris, Frankreich, 27.07. – 01.08.2002

M.D. MUEHLEBACH, N. WOLFRUM, S. STEIDL, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. “Transduction of G0-arrested human cells using a novel SIVsmmPBj-derived vector.” 10th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy, Antibes, Frankreich, 12. – 16.10.2002

M. MÜHLEBACH, N. WOLFRUM, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. “An SIVsmmPBj-derived vector allows transduction of quiescent, G0-arrested primary human cells including non-stimulated T lymphocytes.” Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26. – 29.03.2003

N. WOLFRUM, M. MÜHLEBACH, M. SCHWEIZER AND K. CICHUTEK. „The viral vif, vpx, vpr and nef genes are dispensable for G0-arrested cell transduction achievable by SIVsmmPBj-derived vectors.” Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26. – 29.03.2003

Teile dieser Arbeit wurden als Posterpräsentation auf Kongressen vorgestellt:

M. MÜHLEBACH, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. “Transduction of G0-arrested cells with an SIVsmmPBj-derived viral vector.” Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen, 08. – 11.04.2002

M. MÜHLEBACH, E. FLORY, K. CICHUTEK AND M. SCHWEIZER. „Transduction of G0-arrested cells with an SIVsmmPBj-derived viral vector.” 5th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Boston, Massachusetts, USA, 2002

Danksagung

An oberster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek herzlich dafür danken, dass ich in seiner Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ dieses hochinteressanten Thema bearbeiten konnte, sowie für seine wissenschaftliche Anleitung und Diskussion bei der Durchführung dieser Arbeit. Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut in Langen danke ich Prof. Dr. Johannes Löwer.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig vom Institut für Biochemie des Fachbereichs Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt danke ich für die freundliche, fachübergreifende und unkomplizierte Betreuung von Seiten der Universität.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Matthias Schweizer, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit durchgeführt werden konnte. Dadurch, dass er zwar prinzipiell immer für Fragen und Diskussionen zur Verfügung stand, mich aber auch meine eigenen Erfahrungen machen ließ, machte er die vergangenen Jahre doppelt wertvoll für mich.

Allen momentanen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung 6, insbesondere den Mitglieder der Arbeitsgruppen 6/2 und 6/3, möchte ich an dieser Stelle herzlich danken für das sehr gute Arbeitsklima, die sehr hilfreichen fachlichen Diskussionen und den problemlosen Austausch von Wissen, Methoden und Material. Besonders danken möchte ich Tanja Kearns und Sylvia Raupp, die mich bei der Bewältigung experimenteller Probleme wirkungsvoll unterstützen konnten.

Schließlich möchte ich bei meiner Familie, und hier ganz besonders bei meiner Frau Sabine bedanken, die mich über diese 3 Jahre begleitet und unterstützt haben. Durch sie hatte ich in vielen Situationen und Entscheidungen den für mich notwendigen Rückhalt, der weit über den Laboralltag hinausgeht.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Dieter Mühlebach
Geburtstag	03.12.1974
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet

Ausbildungsdaten

Schule	1981 – 1985	Grundschule (Friedrich-Ebert-Schule/Schöneck)
	1985 – 1987	Förderstufe (Otto-Hahn-Schule/Hanau)
	1987 – 1994	Gymnasium (Georg-Büchner-Gymnasium/Bad Vilbel) Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1,0
Studium	1995 – 2000	Studium der Biochemie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main Studienschwerpunkte: Biochemie, Biophysikalische Chemie, Organische Chemie
	10/98 – 03/99	Gaststudent an der University of Oxford, Großbritannien
Diplom	11/99 – 12/99	Diplomhauptprüfung Biochemie
	01/00 – 08/00	Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: <i>„Transduktion ruhender Zellen mit lentiviralen, von SIVsmmPBj abgeleiteten Vektoren“</i> am Paul-Ehrlich-Institut, Langen in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek Abschluss: Diplom-Biochemiker Gesamtnote: „sehr gut“; Prädikat: „mit Auszeichnung“
Promotion	ab 08/00	Anfertigung der Doktorarbeit mit dem Thema: <i>„Lentivirale Vektoren für den stabilen Gentransfer in primäre humane mononukleäre Blutzellen“</i> am Paul-Ehrlich-Institut, Langen in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ unter der Leitung von Prof. Dr. K. Cichutek

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über *„Lentivirale Vektoren für den stabilen Gentransfer in primäre humane mononukleäre Blutzellen“* selbstständig angefertigt habe, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Schöneck, den 17.02.2004

Michael D. Mühlebach