

**Gentherapie: Etablierung und Optimierung
retroviraler Vektoren für den T-Zell-spezifischen
Gentransfer**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität

von
Sonja Thaler
aus Reinbek

Frankfurt am Main, im September 2002
(DF1)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1	Gentherapie 3
1.1.1	Korrektive Gentherapie 5
1.1.2	Zytotoxische Gentherapie 7
1.1.3	Immun-Gentherapie 8
1.2	Gentransfer 9
1.3	Vektoren für die Gentherapie 11
1.3.1	Virale Vektoren 11
1.3.1.1	Retrovirale Vektoren 12
1.3.1.2	Lentivirale Vektoren 15
1.3.1.3	Adenovirale Vektoren 16
1.3.1.4	Adeno-assoziierte Vektoren 17
1.3.1.5	Herpes Simplex Virus Vektoren 18
1.3.2	Nicht virale Vektoren 19
1.4	Zielzell-spezifisches Targeting 19
1.4.1	Protease Targeting 20
1.4.2	Inverses Targeting 21
1.4.3	Adapter-vermitteltes Targeting 22
1.4.4	Direktes Targeting 22
1.5	Einsatz von MLV/HIV in der Gentherapie 23
1.5.1	Gentherapie von AIDS 24
1.5.1.1	Die erworbene Immundefizienz (AIDS) 24
1.5.1.2	Aufbau und Vermehrungszyklus von HIV 25
1.5.1.3	Therapeutische Gene zur Behandlung von AIDS 27
1.5.2	Gentherapie von kutanen T-Zell Lymphomen 31
1.5.2.1	Humane kutane T-Zell Lymphome (CTCL`s) 31
1.5.2.2	Therapeutische Gene zur Behandlung von CTCL`s 34
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit 35
2. Material und Methoden	37
2.1	Materialien 37
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial 37
2.1.2	Puffer und Lösungen 37
2.1.3	Antikörper 38
2.1.4	Vektoren 40

2.1.5	Oligonukleotide	41
2.1.6	Bakterien und Medien	42
2.1.7	Zelllinien und Bakterien	43
2.2	Methoden	45
2.2.1	<u>Gentechnische Arbeitsmethoden</u>	45
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.2.1.2	Isolierung von genomischer DNA aus Mausorganen	45
2.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	46
2.2.1.4	Herstellung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	46
2.2.1.5	Transformation von <i>E. coli</i>	47
2.2.1.6	Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
2.2.1.7	Auffüllen von DNA Einzelstrangenden mit Klenow Polymerase	47
2.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	48
2.2.1.9	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.2.1.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	48
2.2.2	<u>Zellbiologische Arbeitsmethoden</u>	49
2.2.2.1	Kultivierung von Säugerzellen	49
2.2.2.2	Transiente Transfektion von Säugerzellen	49
2.2.2.3	Stabile Transfektion von Säugerzellen	50
2.2.2.4	Magnetische Zellseparation (MACS Cell Sorting)	51
2.2.2.5	Präparation von humanen peripheren Blutlymphozyten	51
2.2.2.6	Präparation von humanem Serum	52
2.2.2.7	Präparation von Mausmilz T-Lymphozyten	52
2.2.2.8	Titerbestimmung von Virusüberständen	53
2.2.2.9	X-Gal Färbung von Zellkulturzellen und Gewebeschnitten	53
2.2.2.10	Durchflußzytometrie (FACS)	54
2.2.3	<u>Proteinbiochemische Arbeitsmethoden</u>	54
2.2.3.1	Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen	54
2.2.3.2	Herstellung von Proteinextrakten aus Mausorganen	55
2.2.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung	55
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunblot	55
2.2.3.5	Strippen von Immunblots	56
2.2.3.6	Luciferase- und β -Galactosidase Assays	56
2.2.4	<u>Histologische und Immunhistochemische Arbeitsmethoden</u>	57
2.2.4.1	Immunhistochemische Analyse von Zellkulturzellen	57
2.2.4.2	Anfertigung von Gefrierschnitten von Mausorganen	58
2.2.4.3	Anfertigung von Paraffinschnitten von Mausorganen	58
2.2.4.4	Immunhistochemische Analyse von Gewebeschnitten	58
3.	Ergebnisse	60
3.1	Etablierung vektorfreier Verpackungszelllinien zur Produktion MLV/HIV pseudotypisierter retroviraler Vektoren	60

3.1.1	Etablierung MLV/HIV pseudotypisierter retroviraler Vektoren exprimierender Verpackungszelllinien mit Hilfe bicistronischer HIV Env Expressionskonstrukte	62
3.1.1.1	Klonierung der bicistronischen Expressionskonstrukte pEF-IRES-P-Tr712, pEF-IRES-P-SHIV-89.6P-Tr712 und pEF-IRES-P-Tr699	62
3.1.1.2	Stabile Transfektion von FLY Zellen mit dem bicistronischen Expressionskonstrukten pEF-IRES-P-Tr712, pEF-IRES-P-89.6P-Tr712 und pEF-IRES-P-Tr699	64
3.1.2	Etablierung einer tet induzierbar HIV-2 Env exprimierenden Verpackungszelllinien	68
3.1.2.1	Klonierung der tet induzierbaren HIV Env Expressionskonstrukt pBI-3 HIV-1 Tr712 und pBI-3 HIV-2 Tr699	69
3.1.2.2	Herstellung einer tet induzierbar HIV-2 Env exprimierenden Verpackungszelllinie FLY-HIV-2 i-Env	71
3.2	Charakterisierung der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10	75
3.2.1	Bestimmung der Titer von FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 produzierten Vektoren	75
3.2.1.1	Herstellung der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ	75
3.2.1.2	Herstellung der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP, FLY-SHIV-89.6P-GFP und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP	76
3.2.1.3	Herstellung der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-LHPLtr	77
3.2.2	Spezifität des Gentransfers MLV/HIV-1, MLV/SHIV-89.6P und MLV/ HIV-2 pseudotypisierter Vektoren	79
3.2.3	Immunhistochemische Analyse der HIV-1 Env Expression von FLY-HIV-87	83
3.2.4	Optimierung des Gentransfers MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren	84
3.2.5	Etablierung von Anreicherungsverfahren zur Konzentrierung von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln	87
3.2.5.1	Anionenaustauscher-Chromatographie	87
3.2.5.2	Kalziumphosphat-Präzipitation	88

3.2.5.3	Spin-Filtration	89
3.2.6	Spezifische und effiziente Transduktion von CD4 positiven humanen peripheren Blutlymphozyten durch MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren	92
3.2.7	Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der eingesetzten Multiplizität der Infektionen (MOI)	95
3.2.8	Einfluß von humanem Serum auf die Transduktion von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren	96
3.3	<i>In vivo</i> Anwendung MLV/HIV pseudotypisierter Vektoren in transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Mäusen	98
3.3.1	Die transgene Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4	98
3.3.2	<i>In vitro</i> Transduktion primärer Milz T-Lymphozyten der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren	99
3.3.3	<i>In vivo</i> Transduktion der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren	100
3.3.4	Nachweis des MLV/HIV-1 vermittelten <i>in vivo</i> Gentransfers in der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4	102
3.3.4.1	β -Gal Assay zum Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität in Organextrakten	103
3.3.4.2	X-Gal Färbung von Gefrieschnitten der Mausorgane zum Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität in transduzierten Zellen	105
3.3.4.3	PCR Nachweis der integrierten retroviralen Vektoren	106
3.4	Anwendung MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren zur Eliminierung humaner kutaner T-Zell Lymphome in Tumor-tragenden Nacktmäusen	108
3.4.1	Herstellung der Verpackungzelllinie FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus	108
3.4.2	<i>In vitro</i> Abtöten pEGFP/Tkfus transduzierter humaner kutaner T-Zell Lymphomzellen (MyLa) durch Ganciclovir Gabe	110
3.4.3	Etablierung eines Nacktmausmodells für humane kutane T-Zell Lymphome	110

3.4.4	Intratumorale Applikation von MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus Vektoren in Tumor-tragenden Nacktmäusen und anschließender Ganciclovir-behandlung	115
3.4.5	Verteilung der MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren im Tumor	118
4.	Diskussion	121
4.1	Abhängigkeit der Pseudotypisierung von der C-terminalen Verkürzung des HIV Env	122
4.2	Etablierung von Vektor-freien MLV/HIV Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinien	123
4.2.1	Abhängigkeit der Vektortiter vom HIV Env	125
4.2.2	Vergleich der konstitutiv MLV/HIV-1 und MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP und FLY-SHIV-89.6P-GFP	127
4.2.3	Abhängigkeit der Titer vom retroviralen Vektorkonstrukt	130
4.3	Einfluß von Fibronektin und Polykationen auf die Transduktions-effizienz von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren	131
4.4	Einfluß von humanem Serumkomplement auf MLV/HIV-1 Vektoren	134
4.5	<i>In vivo</i> Transduktion in der transgenen Maus [KO]CD4[Tg]hCD4	137
4.6	Nacktmausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome	143
4.6.1	Gentherapie humaner kutaner T-Zell Lymphome	145
4.7	Zusammenfassung	149
5.	Literaturverzeichnis	150
	Abkürzungsverzeichnis	159
	Danksagung	163
	Lebenslauf	164
	Posterpräsentationen und Vorträge	165
	Wissenschaftliche Publikationen	166

Zusammenfassung

Das Ziel von Gentherapie ist die Behandlung bzw. Heilung einer Erkrankung durch das Einbringen eines oder mehrerer Gene. Dazu werden Gentransfervektoren benötigt, die effizient therapeutische Gene in die zu behandelnden Zellen einbringen. Für eine systemische Applikation müssen Gentransfervektoren die Eigenschaft besitzen, ausschließlich die erkrankten Zellen zu transduzieren. Der Tropismus retroviraler Vektoren wird durch das Envelopeprotein (Env) festgelegt. Maus Leukämie Virus (MLV) basierende Kapsidpartikel können mit dem Envelopeprotein des humanen Immundefizienzvirus Typ-1 (HIV-1) pseudotypisiert werden. Diese MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren besitzen einen Tropismus für humane CD4 positive T-Helferzellen. Diese Vektoren sind geeigneten Kandidaten für die gentherapeutische Behandlung der HIV-Infektion und von kutanen T-Zell Lymphomen, einer lymphoproliferativen Erkrankung von CD4⁺ Zellen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden MLV/HIV Pseudotypvektoren exprimierende Verpackungszelllinien mit Hüllproteinen verschiedener Subtypen etabliert und charakterisiert. Die verwendeten Subtypen waren das T-trophe HIV-1 Isolat BH10, das T-trophe HIV-2 Isolat ISY und das dualotrophe SHIV Isolat 89.6P. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit der Vektortiter vom Subtyp. Die höchsten Titer wurden mit der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 erhalten und lagen in Abhängigkeit vom retroviralen Vektor zwischen 1×10^5 und 1×10^6 IU/ml. Die Transduktionsspezifität entsprach dem Korezeptorgebrauch des HIV-Subtyps. Da für die geplanten *in vivo* Experimente höhere Titer notwendig waren, wurden verschiedene Methoden zur Anreicherung MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren zunächst getestet, sowie die Beste dieser Methoden für die Konzentrierung der Partikel optimiert.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde an zwei Mausmodellen die *in vivo* Applikation MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren untersucht. An transgenen hCD4 Mäusen wurde der Gentransfer nach systemischer Applikation von MLV/HIV-1 LacZ Pseudotypvektoren untersucht. In den transduzierten Mäusen konnte Gentransfer in Lymphknoten und Thymus beobachtet werden.

Durch subkutane Implantation der humanen kutanen T-Zell Lymphomzellen MyLa in Nacktmäuse wurde ein Tiermodell Modell für humane kutane T-Zell Lymphome etabliert. Die intratumorale Applikation von MLV/HIV-1 Partikeln, deren Vektorgenom für das grüne Fluoreszenzprotein (EGFP) kodiert ergab, daß es zum effektiven und spezifischen Gentransfer in die CD4 positiven MyLa Zellen kam. In dem anschließend durchgeführte Therapieversuch mit Herpes Simplex Virus Thymidinkinase kodierenden Vektoren und darauf folgender systemischer Ganciclovir Behandlung konnte eine Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, daß MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren für den spezifischen und effizienten Transfer von Genen in primäre humane CD4⁺ T-Helferzellen geeignet sind und daß sowohl die systemische als auch die intratumorale Applikation dieser Vektoren möglich ist.

1. Einleitung

1.1 Gentherapie

Mit zunehmendem Verständnis der molekulargenetischen Ursachen von Krankheiten und den immer weiter fortschreitenden Methoden der rekombinanten DNA Technologie, ist eine Therapieform in den Bereich des möglichen gerückt, die nicht wie bisherige Therapieformen auf die medikamentöse oder operative Behandlung von Symptomen ausgerichtet ist, sondern versucht die genetischen Ursachen einer Erkrankung zu beheben oder Zellen mit therapeutischen Zusatzfunktionen auszustatten (Nabel et al., 1998).

Unter Gentherapie versteht man das Einbringen eines oder mehrerer Gene in einen Organismus mit dem Ziel, eine Erkrankung zu behandeln oder zu heilen. Diese neuartige Therapieform beruht auf der prinzipiellen Möglichkeit, korrektiv eine genetisch bedingte Erkrankung zu heilen, indem ein defektes Gen durch das gesunde Wildtypgen ersetzt wird. Während herkömmliche Therapieformen darauf abzielen, die Folgen des Gendefekts auszugleichen und damit die Symptome zu lindern, versucht die Gentherapie die Ursachen der Krankheit zu beheben und somit eine Heilung zu ermöglichen.

Gentherapie war ursprünglich zur Therapie monogenetischer Erkrankungen gedacht, das Fortschreiten der Forschung in der molekularen Genetik hat ermöglicht, daß Gentherapie auch eine neuartige Therapieform für komplexe und erworbene Erkrankungen darstellt. Als komplexe, multigenetische Erkrankungen werden z.B. Krebs, Arthritis, kardiovaskuläre sowie einige neuronale Erkrankungen bezeichnet, da an deren Ausbrechen und Fortschreiten mehrere Gene involviert sind. Erworbene genetische Erkrankungen sind Krankheiten, die auf Infektionen mit Viren zurück geführt werden. Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über einige angeborene und

erworbene Erkrankungen, die prinzipiell mit Gentherapie behandelt werden könnten (Verma et al., 1997).

Tab. 1.1 Erkrankungen, die mit Gentherapie prinzipiell behandelt werden könnten.

Erkrankung	Defekt	Auftreten	Zielzellen
Angeboren			
Schwerer kombinierter Immundefekt (SCID/ADA)	Adenosindeaminase (ADA) γ c chain in SCID-Patienten	selten	Hämatopoetische Stammzellen oder T-Lymphozyten
Hämophilie	A Faktor VIII-Mangel	1 : 10 000 Männern	Leber, Muskel, Fibroblasten oder Knochenmarkszellen
	B Faktor IX-Mangel	1 : 30 000 Männern	
Familiäre Hypercholesterinämie	Low-density lipoprotein (LDL) Rezeptor	1 : 1 000 000	Leber
Zystische Fibrose	CFTR-Gen, gestörter Salztransport im Lungenepithel	1 : 3 000	Epithelzellen der Lunge
Hämoglobinopathien: Thalassämie/Sichelzellanämie	Strukturdefekte des α - oder des β -Globingens	1 : 6 000 in bestimmten ethnischen Gruppen	Knochenmarkszellen, aus denen sich Erythrozyten bilden
Morbus Gaucher	Enzymdefekt der Glukozerebrosid- β -Glukosidase	1 : 450 bei Ashkenazi Juden	Knochenmarkszellen, Makrophagen
α 1-Antitrypsin-Mangelkrankheit	Fehlen von α 1-Antitrypsin	1 : 3 500	Lungen oder Leberzellen
Erworben			
Krebs	Viele Ursachen, u.a. genetische und umweltbedingte Faktoren	1 000 000 pro Jahr (USA)	Verschiedene Krebszelltypen
Neurologische Erkrankungen	M. Parkinson, M. Alzheimer, Rückenmarksverletzungen	1 000 000 Parkinson- und 4 000 000 Alzheimer Patienten In den USA	Direkte Injektion ins Gehirn, Neuronen, Gliazellen, Schwann'sche Zellen
Kardiovaskuläre Erkrankungen	Arteriosklerose	13 000 000 in den USA	Arterien, vaskuläre Endothelzellen
Infektionskrankheiten	AIDS, Hepatitis B	weltweit steigend	T-Lymphozyten, Leber, Makrophagen

Je nach Art des genetischen Defektes richten sich die unterschiedlichen Behandlungsstrategien zur Therapie. Die Strategien zur gentherapeutischen Behandlung von Tumorerkrankungen können in zwei Kategorien aufgeteilt werden. Entweder ist die genetische Korrektur oder die Zerstörung der defekten Zellen Ziel der Behandlung. Die Zerstörung der entarteten Zellen kann entweder durch direkte toxische Effekte oder durch eine Aktivierung des Immunsystems erreicht werden (Vile et al., 1994).

1.1.1 Korrektive Gentherapie

Bei monogenetischen Erkrankungen soll durch das Einbringen des Wildtypgens, das mutierte Gen komplementiert und somit eine vollständige Heilung erreicht werden. Ein Beispiel für die erfolgreiche Therapie einer monogenetischen Erkrankung durch das Einschleusen eines, dem defekten Gen komplementären Wildtypgens, war die Behandlung der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID)-X1 (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Diese Erkrankung wird durch eine Mutation in dem, für die γ c Zytokin-Rezeptor Untereinheit kodierenden Gens verursacht. Dadurch kommt es zu einem Defekt der Interleukin-2,-4,-7,-9 und-15 Rezeptoren. Durch Einschleusen des für die γ c Zytokin-Rezeptor Untereinheit kodierenden Gens in hämatopoetische Stammzellen und die anschließende Implantation dieser genetisch veränderten Zellen in die Patienten, führte zu einer fast vollständigen Rekonstitution der Immunfunktion in den betroffenen Kindern.

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Therapie einer monogenetischen Erkrankung durch das Einschleusen eines, dem defekten Gen komplementären Wildtypgens, war die Behandlung von Tumoren mit einer Mutation des p53-Tumorsuppressorgens. Tumorsuppressorgene regulieren u.a. die Transkription und die Zellproliferation. Die Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens kann zum Verlust der Wachstumskontrolle und somit zur Transformation der Zelle führen (Weinberg et al., 1991). Einer der

bedeutungsvollsten Tumorsuppressoren ist p53. Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen können bei über 50% aller humaner Tumore gefunden werden (Lane et al., 1992; Takahashi et al., 1989). Durch Einbringen des Wildtyp p53 Gens kommt es *in vitro* und in Mausmodellen zu einer Inhibition des Wachstums von p53 mutierten humanen Lungenkrebszellen (Cai et al., 1993; Fujiwara et al., 1994). Der Haupteffekt des p53 Gentransfers ist jedoch nicht die Wiederherstellung des normalen Zellwachstums, sondern das Auslösen von Apoptose in den transfizierten Zellen. Der Verlust eines Tumorsuppressorgens kann durch das Einbringen des komplementären Wildtypgens ausgeglichen werden.

Schwieriger wird es bei der Therapie von Tumoren, bei denen es zum Defekt von Protoonkogenen kommt, da diese nicht durch das Einbringen der komplementären Wildtypgene ausgeglichen werden können. Protoonkogene sind an wichtigen Zellfunktionen, wie Signaltransduktion oder Transkription beteiligt und tragen nach einer aktivierenden Genmodifikation (z.B. Punktmutation, Genamplifikation, Gentranslokation) zur malignen Transformation der Zelle bei. In diesem Fall ist es schwer möglich, durch Einbringen eines intakten Wildtypgens, eine Normalisierung der Situation wieder herzustellen. Es müssen somit andere Möglichkeiten benutzt werden, die Expression des mutierten Protoonkogens zu verhindern. Dazu können folgende Methoden benutzt werden:

Ribozyme: Ribozyme sind katalytische RNAs, die an spezifische Sequenzen in der Onkogenen mRNA binden, diese schneiden und damit inaktivieren (James et al., 1998).

antisense Oligonukleotide und small interfering RNAs (siRNA):

Oligonukleotide bzw. kurze RNAs, die mit komplementären Sequenzen einer mRNA hybridisieren, was nachfolgend eine Degradation der mRNA bewirkt (Kumar et al., 1998; Sui et al., 2002; Gladerisi et al., 1999; Paul et al., 2002).

Dominant negative Mutanten: Bilden Dimere oder Multimere mit konstitutiv aktiven Proteinen und führen zu einem Verlust der Funktionalität des konstitutiv aktiven Proteins.

Intrazelluläre Antikörperfragmente: intrazellulär exprimierte Antikörperfragmente (intrabodies) binden und inaktivieren spezifisch ein Genprodukt (BouHamdan et al., 1999; Shaheen et al., 1996).

1.2.2 Zytotoxische Gentherapie

Die Therapie von Tumoren zielt in der Regel nicht auf eine korrektive Gentherapie ab. Anstatt ein defektes Gen mit einer intakten Genkopie zu komplementieren, um damit beispielsweise angeborene Stoffwechselstörungen zu beheben, soll den Zellen eine neue Funktion vermittelt werden. Es besteht die Möglichkeit diese Zellen durch das Einschleusen eines Gens, das für ein toxisches Produkt oder für ein „Prodrug“ aktivierendes Enzym kodiert, abzutöten.

Ein Beispiel für ein solches toxisches Produkt, ist das Diphtheritoxin, von dem ein Molekül ausreicht eine Zelle zu töten (Yamaizumi et al., 1978). Es konnte gezeigt werden, daß durch das Einschleusen eines Vektors, der für das zytotoxischen Fragment A von Diphtherintoxin kodiert, Tumorzellen effizient abgetötet werden (Maxwell et al., 1991). Ein Nachteil jedoch ist, daß durch das Toxin nur die transduzierten Zellen abgetötet werden. Für die erfolgreiche Therapie eines Tumors müßten daher alle Zellen des Tumors transduziert werden. Dies setzt jedoch sehr hohe Transduktionseffizienzen voraus, die mit den meisten Vektorsystemen nicht erreicht werden. Die Effizienz der zytotoxischen Gentherapie kann gesteigert werden, wenn das eingeschleuste Gen für ein Toxin oder Enzym kodiert, daß außer den transduzierten Zellen zusätzlich benachbarte, nicht transduzierte Zellen tötet (Bystander-Effekt). Hierfür eignen sich einige sogenannte Prodrug-aktivierende Enzyme, die eine

nicht toxische Substanz (Prodrug) in ein toxisches Produkt umwandeln. Ein Beispiel für ein solches Prodrug-aktivierendes Enzym ist die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-Tk), die im Gegensatz zu zellulären Thymidinkinasen, Ganciclovir (GCV) zu Ganciclovirmonophosphat (GCV-MP) umsetzt. GCV-MP wird anschließend von zellulären Kinasen zu dem toxischen Ganciclovirtriphosphat (GCV-TP) umgewandelt (Miller et al., 1980). GCV-TP inhibiert die zelluläre DNA-Polymerase und führt zum Kettenabbruch bei der DNA Synthese. Dadurch werden in erster Linie proliferierende Zellen nach Expression der HSV-Tk und GCV-Behandlung getötet. Außer den HSV-Tk-exprimierenden Zellen werden auch die benachbarten, nicht transduzierten Zellen getötet (Bystander-Effekt), da GCV-TP durch Diffusion über gap-junctions in die benachbarten Zellen gelangt.

In vivo Experimente an Tumormodellen haben gezeigt, daß es genügt, 10 % der Tumorzellen zu transduzieren, um einen vollständigen Rückgang des Tumors zu erreichen (Culver et al., 1992). Außer zur Therapie von Tumoren, wird die HSV-Tk/GCV-Behandlung zur Vermeidung von graft-versus-host-disease nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation genutzt (Bonini et al., 1997). Der Vorteil Prodrug-aktivierender Enzyme besteht darin, daß der Zeitpunkt der Entfaltung ihrer zytotoxischen Wirkung durch die Zugabe des Prodrugs gesteuert werden kann.

1.2.3 Immun-Gentherapie

Ziel der Immun-Gentherapie ist die gezielte Aktivierung von Immunzellen zur Bekämpfung von Tumoren. Dies kann durch zwei unterschiedliche Strategien erreicht werden. Es können einerseits die Immunzellen durch das Einbringen von Genen so manipuliert werden, daß sie Tumorzellen besser erkennen und inaktivieren. Andererseits ist es aber auch möglich, die Tumorzellen genetisch so zu verändern, daß sie vom Immunsystem besser erkannt und eliminiert werden (Tumorvakzinierung).

Grundlage der Tumorstimmung ist die Beobachtung, daß die intramuskuläre Injektion von nackter Plasmid-DNA (Wolff et al., 1990) oder der ballistische Transfer (gene-gun) von DNA bedeckten Goldpartikeln (Yang et al., 1990) zur Expression des Transgens in den behandelten Zellen führt. Dabei kann die Injektion von nackter Plasmid-DNA sowohl eine MHC-I, wie eine MHC-II restringierte Immunantwort gegen das exprimierte Transgen induzieren (Spooner et al., 1995). Antigene, gegen die eine T-Zell vermittelte Immunantwort nach DNA-Vakzinierung hervor gerufen werden könnte, sind virale Proteine von sog. Tumor induzierenden Viren wie z. B. die Proteine E6, E7, und L1 aus humanen Papillomavirus (HPV) und EBNA-1 aus Epstein-Barr-Virus (EBV) oder Genprodukte mutierter Tumorsuppressor- oder Onkogene. Hierzu zählen mutiertes p53, p210^{BCR-ABL} und mutiertes p21^{ras} (Spooner et al., 1995).

Eine weite Möglichkeit für die Immun-Gentherapie von Tumoren besteht im Einsatz sog. onkolytischer Viren (Heise et al., 2000). Bei diesem Ansatz werden replikationskompetente adenovirale Vektoren in den Tumor injiziert. Durch die Vermehrung der Viren kommt es zur Expression von viralen Proteinen, die einerseits zytotoxisch sind und zum Absterben infizierter Zellen führen, zusätzlich kommt es auch zu einer Immunantwort gegen die, von den Tumorzellen exprimierten viralen Proteinen. Die Infektion immer neuer Tumorzellen führt zur einer verstärkten Eliminierung (Bystander Effekt). Der Einsatz onkolytischer Viren vereint sowohl die Eigenschaften der zytotoxischen und der Immun-Gentherapie miteinander.

1.2 Gentransfer

Der Gentransfer in einen Organismus kann auf unterschiedliche Weise vollzogen werden. Je nach Applikation des Gentransfervehikels können gentherapeutische Ansätze in drei Kategorien eingeteilt werden:

Ex vivo : Bei diesem Verfahren werden die Zellen aus dem Körper entfernt und mit einem Vektor transduziert. Die so nach dem Gentransfer erhaltenen, genetisch veränderten Zellen werden anschließend wieder in den Spender implantiert. Dieses Verfahren wird meist zur Transduktion von Blutzellen verwendet, da diese am einfachsten zu entnehmen und wieder zu reimplantieren sind. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Zielzellen *in vitro* vermehrt werden müssen.

In situ : Dabei erfolgt der Gentransfer im Körper des Patienten, indem der Vektor direkt in das zu behandelnde Gewebe appliziert wird. Beispiele hierfür sind die Injektion von Vektoren in solide Tumoren oder in die Muskeln von Patienten.

In vivo (systemische Applikation) : Bei diesem Verfahren wird der Vektor direkt in die Blutbahn des Patienten injiziert. Der Transport des Vektors zum Zielorgan oder den Zielzellen erfolgt mit dem Blutstrom. Voraussetzung für eine systemische Applikation von Gentherapievektoren ist, insbesondere bei der Verwendung von zytotoxischen Genen, daß das therapeutische Gen spezifisch nur in die Zielzellen übertragen wird oder, daß das therapeutische Gen nur in den Zielzellen exprimiert wird.

Durch die Verwendung von Zielzell-spezifischen Gentherapievektoren wird außerdem erreicht, daß Vektoren nach der Injektion bis zu ihren Zielzellen gelangen und nicht bereits auf ihrem Weg dorthin durch unspezifische Bindung an Nicht-Zielzellen verloren gehen oder durch Serumkomponenten inaktiviert werden.

Für die *in vivo* Applikation gibt es noch kein Beispiel für eine klinische Applikation, da die meisten bisher verfügbaren Vektoren auf Grund mangelnder Spezifität für die zu behandelnden Zielzellen für die systemische

Applikation ungeeignet sind. Die vorliegende Arbeit zeigt die Etablierung und präklinische Testung eines solchen Gentherapievektors.

1.3 Vektoren für die Gentherapie

Zur Übertragung therapeutischer Gene in Zielzellen werden Gentransfer-Vehikel sog. Vektoren eingesetzt. Die idealen Anforderungen, die an einen Vektor für den Einsatz in der Gentherapie gestellt werden sind (Verma et al., 1997):

1. hohe Titer, die es erlauben das Transgen in möglichst viele Zellen einzubringen.
2. leichte Handhabbarkeit und leichte reproduzierbare Herstellung.
3. die Fähigkeit gezielt an Stellen in das Genom einer Zielzelle zu integrieren ohne Insertionsmutagenesen zu verursachen.
4. einen Promoter, der eine regulierbare Kontrolle der Expression zulässt.
5. die Fähigkeit ausschließlich die gewünschten Zielzellen zu transduzieren.
6. möglichst keine oder nur schwache Immunogenität.

Zur Zeit gibt es jedoch keinen Vektor, der über alle dieser Eigenschaften verfügt. Die Vektoren, die in der Gentherapie eingesetzt werden, lassen sich in virale und nicht-virale Vektoren unterteilen.

1.3.1 Virale Vektoren

Bei der Mehrzahl der derzeitigen Gentherapieansätze werden virale Vektoren verwendet. Der Einsatz von viralen Vektoren für gentherapeutische Zwecke beruht darauf, daß im Laufe der Evolution Viren sehr effiziente Mechanismen entwickelt haben, um genetisches Material in Zellen einzubringen. Virale

Vektoren sind Viren, die noch über die Fähigkeit verfügen, genetisches Material effektiv in Zellen zu transferieren, denen aber alle pathogenen und die zur Replikation notwendigen Elemente entfernt wurden (Verma et al., 1997). Dies ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt, da die Vektoren in den Zielzellen nicht replizieren dürfen, um eine unkontrollierte Ausbreitung der Vektoren zu vermeiden. Außerdem sollten die verwendeten viralen Vektoren möglichst wenig immunogen sein, um eine wiederholte Applikation der Vektoren zu ermöglichen.

Außer den Retroviren werden hauptsächlich adenovirale und adeno-assoziierte Vektoren in der Gentherapie eingesetzt. Jeder dieser unterschiedlichen Vektoren hat bestimmte Vor- und Nachteile, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

1.3.1.1 Retrovirale Vektoren

Die Familie der Retroviren umfasst die drei Unterfamilien Onkoretroviren, Lentiviren und Spumaviren. Die im allgemeinen als retrovirale Vektoren bezeichneten Gentransfer-Vehikel leiten sich von der Unterfamilie der Onkoretroviren ab.

Retroviren bestehen aus einem Lipidmembran umhüllten Viruskapsid, das zwei identische, lineare, einzelsträngige RNA Genome in positiver Orientierung enthält. Die Größe des RNA Genoms liegt zwischen 7 kb (Maus Leukämie Virus, MLV), 9.2 kb (humanes Immundefizienz Virus, HIV) und 12 kb (humanes Foamy Virus, HFV) (Falke & Modrow). Nach dem Eintritt des Virus in die Zelle werden die RNA-Genome revers zu einer doppelsträngigen DNA transkribiert, die anschließend in das Genom der Zelle integriert wird. Das Genom der Retroviren besteht aus den Genen *gag*, *pol* und *env*, die von endständigen Sequenzwiederholungen (long terminal repeats, LTR's) eingerahmt sind. Die LTR's sind für die Integration des viralen Genoms in das

Genom der Zelle verantwortlich und steuern die Expression der viralen Gene. *Gag* und *env* kodieren für Bestandteile des Viruskapsids und der Virushülle (Strukturproteine), *pol* kodiert für die reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease. Vor den, für Proteine kodierenden Genen befindet sich das als Ψ bezeichnete Verpackungssignal, eine kurze Sequenzfolge, mit der sich die RNA Genome bei der Morphogenese an die Nukleokapsidproteine der sich bildenden Viruspartikel anlagern und somit die RNA Genome in die neu entstehenden Viruspartikel verpackt werden. Komplexen Retroviren wie das humane Immundefizienzvirus (HIV) besitzen zusätzlich noch mehrere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine kodieren. Auf diese Proteine sowie der Funktion und deren Bedeutung als Zielstrukturen der Gentherapie von AIDS wird in Abschnitt **1.5.1** eingegangen.

Der größte Teil der zur Zeit für gentherapeutische Ansätze verwendeten Vektoren leitet sich von Retroviren ab. Das Besondere dieser Vektoren besteht darin, daß Retroviren genetisches Material effizient in Zellen einbringen und stabil in das Genom der Zellen integrieren. Die Integration des Transgens in das Genom der Zelle und die damit verbundene stabile Expression in den transduzierten Zellen und den daraus resultierenden Tochterzellen, macht retrovirale Vektoren für viele Anwendungen zum bevorzugten Gentransfersystem. Die meisten retroviralen Vektoren basieren auf dem Moloney-Maus-Leukämie-virus (MLV). Nach Entfernen der viralen Gene können maximal 8 kb fremder DNA in das MLV Genom eingebaut werden. Die Expression des Transgens kann entweder von den viralen LTR's oder von zusätzlichen internen Promoter-Enhancer Elementen gesteuert werden. Die replikationsinkompetenten retroviralen Vektoren besitzen neben den LTR's nur noch die Verpackungssequenz Ψ . An Stelle der Strukturproteine wird ein Transgen in das virale Genom einkloniert. Die replikationsdefizienten retroviralen Vektoren müssen von Verpackungszelllinien produziert werden. Diese Zellen exprimieren die viralen Gene *gag*, *pol* und *env*, aber enthalten nicht die viralen LTR's und das Verpackungssignal Ψ . Daher werden die entsprechenden mRNAs nicht in die

entstehenden Vektorpartikel aufgenommen. Nur das Transgen enthaltende virale Vektorgenom wird in die entstehenden Viruspartikel verpackt. Auf diese Weise wird verhindert, daß sich die Vektorpartikel in den Zielzellen vermehren. Aus dem Kulturüberstand dieser Verpackungszelllinien können dann die rekombinanten defekten Viren gewonnen werden (Verma et al., 1997).

Die ersten Verpackungszelllinien enthielten zur Expression der zur Partikelbildung benötigten viralen Proteine provirale Genome, die lediglich eine Deletion in der Verpackungssequenz Ψ aufwiesen. Durch Rekombination mit der Verpackungssequenz Ψ der Vektor DNA, konnten diese wieder mit einem Verpackungssignal ausgestattet werden, was zur unerwünschten Entstehung replikationskompetenter Retroviren führte. Durch Expression der viralen Gene von getrennten DNA Konstrukten ist in neueren Verpackungszelllinien die Gefahr, daß es zur Entstehung von replikationskompetenten Retroviren kommt, stark eingeschränkt worden (Cosset et al., 1995).

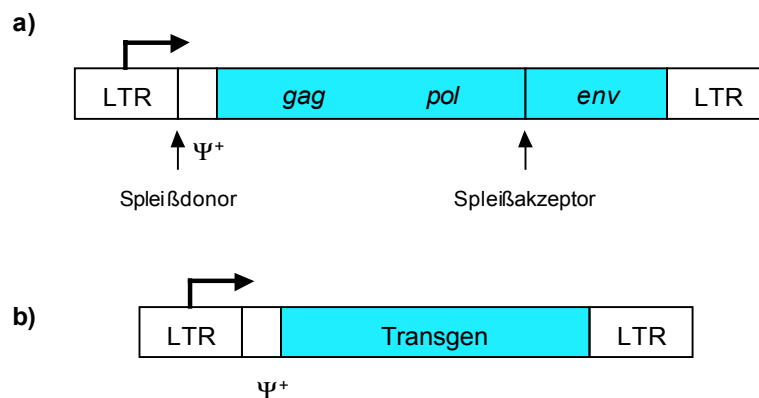


Abb. 1.3.1.1 Schematische Darstellung eines retroviralen Vektors im Vergleich mit einem retroviralen Vektorgenom. **a)** Retrovirales Vektorgenom **b)** Retroviraler Vektor

Retroviralen Vektoren können nur sich teilende Zellen transduzieren (Miller et al., 1990). Dies macht sie ungeeignet für die Transduktion von ruhenden Zellen z. B. Hirn-, Leber-, Lungen- und Muskelzellen. Sich teilende Zellen wie z.B. Tumorzellen lassen sich dagegen gut durch retrovirale Vektoren

transduziert werden. Auf Grund der stabilen Integration retroviraler Vektoren in das Wirtszellgenom können mit geringer Wahrscheinlichkeit Protoonkogene aktiviert oder Tumorsuppressorgene inaktiviert werden, was zu einer Transformation der Zelle führen kann. Diese Gefahr ist jedoch bei allen stabil integrierenden Vektoren gegeben.

1.3.1.2 Lentivirale Vektoren

Im Gegensatz zu den auf Onkoretroviren basierenden retroviralen Vektoren können die von Lentiviren abgeleiteten Vektoren sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen transduzieren (Naldini et al., 1992). Das bekannteste Lentivirus ist das humane Immundefizienzvirus (HIV). Wie die einfacher strukturierten Onkoretroviren (z.B. MLV) besitzt HIV die Gene *gag*, *pol* und *env*. Zusätzlich besitzt HIV noch sechs weitere Gene für die regulatorischen und akzessorischen Proteine *tat*, *rev*, *pol*, *vpr*, *nef* und *vif*. Analog zu den, von Onkoretroviren abgeleiteten retroviralen Vektoren wurden lentivirale Vektoren hergestellt. Diese enthalten wie die retroviralen Vektoren nur noch die, das virale Vektor Genom flankierenden LTR's, die Verpackungssequenz Ψ . Wie die replikationsdefekten retroviralen Vektoren müssen die lentiviralen Vektoren von Verpackungszelllinien hergestellt werden. Die Hauptanwendung von lentiviralen Vektoren besteht zur Zeit in der effektiven *ex vivo* Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sowie der daraus resultierenden lang anhaltenden Expression von Transgenen. Im Tiermodell konnten lentivirale Vektoren eine über Monate andauernde Expression des Transgens in hämatopoetischen Stammzellen vermitteln (Miyoshi et al., 1999). In letzter Zeit wurden viel Versuche unternommen lentivirale Vektoren so zu verändern, daß es in den Verpackungszelllinien nicht zu Rekombinationsprozessen zwischen viralen Sequenzen und dem, das Verpackungssignal Ψ enthaltenden Vektor kommt, da dies zur Bildung von replikationskompetenten HIV führen könnte. Dazu wurden die viralen Sequenzen sowie das Verpackungssignal Ψ auf unterschiedliche Konstrukte

verteilt und alle nicht essentiellen viralen Sequenzen zur Vermeidung von homologen Rekombinationsprozessen entfernt. Trotz dieser Maßnahmen bleiben Sicherheitsbedenken gegen die Anwendung dieser auf HIV basierenden Vektoren, da trotz dieser Vorkehrungen die Entstehung von replikationskompetenten HIV durch Rekombinationsprozesse in den Verpackungszellen nicht vollständig ausgeschlossen werden kann. Eine klinische Zulassung für die Anwendung lentiviraler Vektoren am Menschen gibt es deshalb zur Zeit noch nicht.

1.3.1.3 Adenovirale Vektoren

Adenoviren bestehen aus einem Kapsid ohne Membranhülle und besitzen die Eigenschaft sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infizieren zu können. Das Genom dieser Viren besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA mit einer Länge von 36 bis 38 kb (Falke & Modrow). Der Eintritt in die Zellen erfolgt über Rezeptor vermittelte Endozytose. Nach Aufnahme in die Zelle zerstört das Virus das Endosom und das Genom gelangt in den Zellkern, wo es extrachromosomal repliziert und nicht in das zelluläre Genom integriert. Adenoviren integrieren normalerweise nicht ins Wirtsgenom, sondern werden als episomale Elemente (extrachromosomal) im Zellkern repliziert. Adenovirale Vektoren können zu hohen Titern von bis zu 1×10^{13} IU/ml angereichert werden und exprimieren große Mengen des Transgens (Kay et al., 2001; Roth et al., 1997). Die Transgenexpression ist jedoch nur transient. Außerdem lösen die viralen Antigene eine starke Immunantwort aus, die sowohl die transduzierten Zellen zerstören, als auch eine wiederholte Applikation der Vektoren verhindert. Diese Vektoren bieten die Möglichkeit, bis zu 35 kb fremder DNA aufzunehmen und zu transduzieren (Anderson et al., 1998). Auf Grund ihrer sehr guten Transduktionseffizienzen, der transienten Transgenexpression und ihrer starken Immunogenität eignen sich adenovirale Vektoren vor allem für den Einsatz in zytotoxischen und immunmodulatorischen Gentherapieansätzen zur Behandlung von Tumoren

(Kay et al., 2001). Ein weiteres Anwendungsfeld adenoviraler Vektoren besteht in der gentherapeutischen Behandlung peripherer und koronarer Gefäßerkrankungen, durch das Einbringen von Genen in Epithelzellen, die für Angiogenese fördernde Faktoren (VEGF) kodieren (Rosengart et al., 1999).

1.3.1.4 Adenoassoziierte Virus Vektoren

Das Adeno-assoziierte Virus ist ein einfaches, nicht pathogenes, einzelsträngiges DNA-Virus. Seine beiden Gene, *cap* und *rep*, werden von inversen, endständigen Sequenzwiederholungen (inverted terminal repeats, ITR's) umgeben, die Anfang und Ende des viralen Genoms markieren und auch das Verpackungssignal enthalten (Muzyczka et al., 1992). Das *cap* Gen kodiert für die Kapsid-Proteine. Das *rep* Genprodukt ist essentiell für die virale Replikation und Integration. Zur Replikation benötigt das Adeno-assoziierte Virus allerdings noch weitere Genprodukte und ist deshalb auf ein sog. Helfervirus angewiesen. Diese sind normalerweise entweder Adenoviren oder das Herpes Simplex Virus. Das Virus kann in Anwesenheit des *rep* Genproduktes in das Genom integrieren, vorzugsweise in den kurzen Arm des menschlichen Chromosoms 19 (Muzyczka et al., 1992). Um einen adeno-assoziierten Viralen Vektor herzustellen, werden die *rep* und *cap* Gene durch das Transgen ersetzt. Ein Nachteil ist, dass nur bis zu maximal 4.8 kb fremder DNA verpackt werden können. Bis heute ist es nicht möglich, adeno-assoziierte virale Vektoren herzustellen, die wie das Wildtyp Virus bevorzugt in Chromosom 19 integrieren. Adeno-assoziierte Vektoren können in das zelluläre Genom integrieren, können aber auch wie Adenoviren extrachromosomal vorliegen (Duan et al., 1999). Außerdem wurde gezeigt, daß adeno-assoziierte virale Vektoren sowohl sich teilende und ruhende Zellen transduzieren (Miao et al., 2000), was sie insbesondere für den Gentransfer in Neuronen, Leber-, Lungen- und Muskelzellen interessant macht. In Hämophilie B Patienten, die mit für den Blutgerinnungsfaktor IX kodierenden adeno-assoziierten viralen Vektoren injiziert wurden, konnte eine

Transgenexpression nachgewiesen werden (Kay et al., 2000). Nachteilig für den Einsatz von adeno-assoziierten viralen Vektoren in der Gentherapie am Menschen ist jedoch, daß die Herstellung wegen der Beseitigung kontaminierender Helferviren sehr arbeitsaufwendig ist und daß ca. 80 % der erwachsenen Bevölkerung Antikörper gegen adeno-assoziierte Viren aufweisen (Verma et al., 1997).

1.3.1.5 Herpes Simplex Virus Vektoren

Das Herpes Simplex Virus ist ein neurotropes Virus, das vorwiegend neuronale Zellen infiziert (Fink et al., 2000). Das mit einer Hüllmembran umgebene Virus enthält ein 152 kb großes, doppelsträngiges DNA-Genom, das 84 Gene enthält, von denen ungefähr die Hälfte für die Virusvermehrung in Zellkultur nicht essentiell sind (Kriskey et al., 1998). Dies ermöglicht die Deletion einer Vielzahl von nicht essentiellen viralen Genen um Raum für Transgene zu schaffen. Insgesamt können bis maximal 30 kb fremder DNA in das Virusgenom eingebracht werden, was den Gebrauch eines großen oder mehrerer kleiner Transgene ermöglicht. Außer Genen könnten zusätzlich regulatorische Elemente z.B. gewebespezifische Promotersequenzen in das virale Genom eingebracht werden, wodurch ein transkriptionelles Targeting unter Umständen möglich werden würde. Die Eigenschaften bevorzugt neuronale Zellen zu transduzieren und sich teilende und ruhende Zellen transduzieren zu können, machen die Herpes Simplex Virus Vektoren zu potentielle Kandidaten für die gentherapeutische Behandlung von verschiedenen Hirnerkrankungen, Verletzungen des Rückenmarks und Schmerzzuständen (Kay et al., 2001). Nachteilig für die Anwendung von Herpes Simplex Virus Vektoren im Menschen könnte sein, daß eine Vielzahl der Bevölkerung Antikörper gegen das Herpes Simplex Virus besitzt.

1.3.2 Nicht virale Vektoren

Virale Vektoren sind wegen ihrer hohen Transduktionseffizienzen die zur Zeit am häufigsten angewandten Gentransfer-Vehikel in Gentherapiestudien. Allerdings gibt es aus Gründen der Sicherheit, Bedenken gegen ihren Einsatz im Menschen. Es könnten z.B. durch die Rekombination mit Wildtypviren in den transduzierten Zellen neue, replikationsfähige, rekombinante Viren entstehen, insbesondere dann, wenn Vektoren benutzt werden, die sich von humanpathogenen Viren ableiten. Aufgrund der Immunogenität der meisten viralen Vektoren, wird eine Immunreaktion hervor gerufen, die eine wiederholte Applikation der Vektoren verhindert. Zusätzlich ergeben sich Probleme bei der Herstellung und Lagerung von großen Mengen an viralen Vektoren, die für den klinischen Einsatz nötig wären. Aus diesen Gründen wurden alternativ einige nicht virale Gentransfer-Vehikel entwickelt. Dazu zählen Plasmid-DNA ohne irgendwelche zusätzlichen Modifikationen (nackte DNA), sowie komplexe aus kationischen Lipiden und Plasmid-DNA (Lipoplexe). Vorteile der nicht viralen Vektorsysteme sind geringe Immunogenität, was die wiederholte Applikation dieser Vektorsysteme ermöglicht, niedrige Produktionskosten sowie ihre wenig aufwendige Herstellung und Lagerung.

Virale Systeme sind jedoch bezüglich der Effizienz des Gentransfers sowie auf Grund der effektiven Integration einiger viraler Vektoren in das Genom der Zielzelle, was mit einer langanhaltenden Expression des Transgens verbunden ist, den nicht viralen Vektorsystemen überlegen.

1.4 Zielzell-spezifisches Targeting

Der größte Nachteil sowohl bei den nicht viralen, als auch bei den viralen Vektorsystemen ist die oft mangelnde Spezifität für den zu therapierenden Zelltyp. Zielzellspezifität ist neben Sicherheit, einer ausreichen hohen Transduktionseffizienz und einer ausreichend starken Expression des

Transgens die entscheidende Voraussetzung für die systemische Applikation eines Vektorsystems, besonders dann, wenn zytotoxische Transgene eingesetzt werden.

Um viralen Vektoren mit einem speziellen Tropismus für bestimmte Zielzellen auszustatten, wurden unterschiedliche Strategien benutzt. Diese sollen in dem folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

1.4.1 Protease Targeting

Bei dieser Strategie wird ausgenutzt, daß einige Zellen, insbesondere invasive Tumorzellen, Matrix-Metalloproteasen auf der Zelloberfläche exprimieren. Für das Targeting von Melanomzellen wurde ein Antikörperfragment (single chain antibody), das gegen das für Melanomzellen spezifische „High-molecular-weight-melanoma associated antigene“ (HMWMAA) gerichtet ist, zusammen mit einer Matrix-Metalloprotease Schnittstelle und eine Polyprolin reiche Region (PRR)-haltiges „blocking peptide“ an den N-Terminus des amphiotropen Env von Maus-Leukämie Virus (MLV) gehängt (Martin et al., 2002). Die Bindung des viralen Vektors an die Zelle erfolgte über das spezifische Antikörperfragment (single chain antibody) an HMWMAA. Die Aufnahme des Virus in die Zelle kann erst nach Bindung des aktivierten amphiotropen Env an die Zelle erfolgen. Dazu muß jedoch erst das, das amphiotrophe Env inaktivierende „blocking peptide“ inaktivierte amphiotrophe Env entfernt werden. Das Entfernen des Antikörperfragments und der PRP und die damit verbundene Aktivierung des amphiotropen Env erfolgt über die auf den Zielzellen exprimierten Matrix-Metalloproteasen. Somit findet das eigentliche Targeting nicht über die, durch den single chain antibody vermittelte Bindung des Virus an die Zelle statt, sondern erfolgt über die Anwesenheit der Matrix-Metalloproteasen auf den Zielzellen (Peng et al., 1999). Mit dieser Strategie konnte *in vivo* ein spezifisches Targeting von Melanomzellen erreicht werden (Martin et al., 2002).

1.4.2 Inverses Targeting

Bei dieser Strategie wird an das amphotrophe Env von MLV ein Polypeptid angehängt, das an einen Rezeptor oder ein Antigen an der Oberfläche der Nicht-Zielzellen bindet. Erfolgt die Bindung von Polypeptid und Rezeptor, findet keine Transduktion der Zelle statt, da der Rezeptor und der Vektorpartikel durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und nachfolgend in Endosomen abgebaut werden (Sequestering). Trifft der virale Vektor stattdessen auf die eigentliche Zielzelle, die nicht über den Peptid-bindenden Rezeptor oder das Antigen verfügt, kann der virale Vektor über das Env an die Zelle binden und die Transduktion einleiten. Diese Strategie wird inverses Targeting genannt, da die Zellen, die spezifisch durch das, an das Virus gekoppelte Peptid gebunden werden, nicht transduziert werden (Peng et al., 2001).

Für das inverse Targeting wurde an den N-Terminus der amphotropen MLV Env die Sequenz des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) gehängt und lentivirale Vektoren damit pseudotypisiert. Die systemische Applikation dieser Vektoren führte zu einer Transduktion von Milzzellen, aber nicht zur Transduktion der EGF-Rezeptor exprimierenden Leberzellen (Peng et al., 2001). Die systemische Applikation von lentiviralen Vektoren mit unverändertem amphotropem Env verursachte dagegen Gentransfer in Milz und Leber. Wurden die Tiere vor Applikation der Vektoren mit löslichem EGF vorbehandelt, so daß die EGF-Rezeptoren mit EGF abgeblockt waren, konnte ebenfalls Gentransfer sowohl in die Milz als auch in die Leber beobachtet werden (Peng et al., 2001). Ein Nachteil dieser Strategie ist jedoch, daß sehr hohe Vektormengen benötigt werden, da die meisten Vektoren durch die Bindung an Nicht-Zielzellen verloren gehen.

1.4.3 Adapter-vermitteltes Targeting

Diese Strategie basiert darauf, mit Hilfe bivalente Adaptoren eine molekulare Brücke zwischen Viruspartikel und Zielzelle herzustellen. In experimentellen Ansätzen wurden biotinylierte Antikörper eingesetzt, die gegen das ecotrope Env des Vektorpartikels bzw. gegen ein Zelloberflächenmolekül (MHC I oder MHC II) gerichtet waren. Die Kopplung der Antikörper erfolgte durch Streptavidin. Die Transduktion war zwar möglich, war jedoch nicht sehr effektiv (Roux et al., 1998).

1.4.4 Direktes Targeting

Diese Strategie basiert darauf, Vektorpartikel so zu verändern, daß sie spezifisch an einen bestimmten Rezeptor oder ein Antigen auf der Zielzelle binden und diese in Folge transduzieren.

Ein Verfahren zur Herstellung von viralen Vektoren, die einen Tropismus für einen bestimmten Zelltyp haben, ist die Pseudotypisierung. Pseudotypisierte Vektoren sind chimäre Vektorpartikel, bei denen das endogene Env durch ein Env ersetzt wird, das aus einem Virus stammt, das einen Tropismus für einen anderen Zelltyp besitzt. Beispiele für das direkte Targeting von bestimmten Zelltypen sind die Pseudotypisierung von Maus-Leukämie Virus mit dem Hüllprotein aus dem T-tropen HIV-Stamm HIV-1 (BH10) (Schnierle et al., 1997; Mammano et al., 1997) zur Transduktion humaner CD4 positiver T-Helferzellen. Die Pseudotypisierung von MLV Kapsiden ist jedoch nur möglich, wenn das HIV Env C-terminal verkürzt ist (Schnierle et al., 1997; Mammano et al., 1997).

Außer dem Austausch des endogenen Env durch das Env eines anderen Virus kann der Tropismus eines viralen Vektors auch durch den Einbau von membranständigen Rezeptoren beeinflusst werden. Ein Beispiel hierfür sind

retrovirale Vektoren, die mit dem humanen CD4 Rezeptor und den Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 (Endres et al., 1997) oder mit einem CD4/CXCR4 Fusionsprotein pseudotypisiert wurden (Bittner et al., 2002). Die Pseudotypisierung retroviraler Vektoren mit humanem CD4 und den Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 oder CD4/CXCR4 Fusionsproteinen ermöglicht die spezifische Transduktion von HIV infizierten Zellen. Es konnte gezeigt werden, daß retrovirale Vektoren, die mit CD4 Rezeptor und CCR5 pseudotypisiert sind, spezifisch Zellen transduzieren, die mit makrophagotropen oder dualotropen HIV-Stämmen infiziert sind (Endres et al., 1997). Die Pseudotypisierung von retroviralen Vektoren mit dem CD4 Rezeptor und dem CXCR4 Korezeptor verleiht den Vektoren Tropismus für Zellen, die mit T-tropen HIV-Stämmen infiziert sind (Endres et al., 1997; Bittner et al., 2002).

Ein Vorteil des direkten Targetings gegenüber dem inversen und dem Protease Targeting besteht darin, daß die Vektorpartikel nur an die Zellen binden, die sie gleichzeitig auch transduzieren. Es gehen somit keine Vektorpartikel durch unspezifische Bindung verloren.

1.5 Einsatz von MLV/HIV Pseudotypvektoren in der Gentherapie

Auf Grund der Eigenschaft, Gene spezifisch in primäre humane CD4 positive T-Zellen einschleusen zu können (Schnierle et al., 1997), sind MLV/HIV pseudotypisierte Vektoren aussichtsreiche Kandidaten für gentherapeutische Ansätze zur Behandlung von AIDS und kutanen T-Zell Lymphomen, die lymphoproliferative Erkrankungen CD4 positiver T-Zellen sind. Auf die charakteristischen Merkmale dieser beiden Erkrankungen, sowie mögliche Strategien zur gentherapeutischen Behandlung wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

1.5.1 Genterapie von AIDS

1.5.1.1 Die erworbene Immundefizienz (AIDS)

Unter AIDS versteht man eine durch Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus (HIV) verursachte erworbene Immundefizienz, bei der schwer verlaufende opportunistische Infektionen und das Karposi-Sarkom (ein Gefäßtumor) auftreten, sowie schwere zelluläre Immundefekte vorliegen.

Die HIV-Infektion führt nicht bei allen Infizierten direkt zu AIDS, es kann auch, zumindest für einen längeren Zeitraum zu anhaltenden Lymphknotenvergrößerungen ohne opportunistische Infektionen (ARC, AIDS-related-complex) oder zu einer Trägerschaft ohne klinische Symptome kommen (long-term non progressors) (van den Tweel., 1999). Bis jetzt ist nicht endgültig bewiesen, ob alle HIV-Infizierten Individuen AIDS entwickeln. Bei AIDS und dem AIDS-related-complex ist eine Anzahl charakteristischer immunologischer Veränderungen nachweisbar.

Der erste Befund bei AIDS sind opportunistische Infektionen, die durch einen Mangel an CD4 positiven Lymphozyten im peripheren Blut verursacht werden. Zusätzlich findet man keine oder eine stark erniedrigte Antwort der Lymphozyten auf Stimulation mit Mitogenen und Antigenen, eine verminderte NK-Zell-Funktion sowie eine gestörte spezifische Antikörperantwort nach Immunisierung mit primären Antigenen (Cooper et al., 1988). HIV kann einen Tropismus für CD4 positive Lymphozyten (T-troph) und/oder einen Tropismus für Makrophagen (M-troph) aufweisen (Endres et al., 1996; Feng et al., 1996; Akhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Dragic et al., 1996). HIV-Stämme, die sowohl Tropismus für CD4 positive Lymphozyten und Makrophagen besitzen werden als dualotroph bezeichnet (Simmons et al., 1996; Doranz et al., 1996). T-trophe und dualotrophe HIV-Stämme sind lymphotrophe Viren, die einen cytopathischen Effekt auf CD4 positive Lymphozyten ausüben.

Ein Teil der für AIDS charakteristischen immunologischen Veränderungen ist auf der Grundlage des Tropismus des HI-Virus für die CD4 positiven Lymphozyten gut zu verstehen, da die CD4 positiven Lymphozyten eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer wirksamen humoralen und zellulären Immunität spielen. Einige opportunistische Infektionen sowie das Auftreten von Demenzercheinungen werden vermutlich durch die Infektion von Makrophagen durch dualotrope und M-trophe HIV-Stämme verursacht (Levy et al., 1993).

1.5.1.2 Aufbau und Vermehrungszyklus von HIV-1

HIV-1 hat einen Durchmesser von etwa 100 nm. Die das Kapsid von HIV-1 umgebende Hüllmembran, die auch Envelope genannt wird, leitet sich von der Plasmamembran einer Zelle ab. In der Hüllmembran eingebettet ist das Transmembranprotein gp41, das extern nicht kovalent assoziiert mit dem Glykoprotein gp120 ist. Mit der Innenseite der Hüllmembran sind die Matrixproteine p17 über aminoterminal angefügte Myristinsäurereste verbunden. Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Viruskapsid, das auch als Core bezeichnet wird und bei HIV eine konische Form aufweist. Das Kapsid besteht aus dem Kapsidprotein p24. Im Kapsid befinden sich zwei virale RNA-Genome, die im Komplex mit den Nukleokapsidproteinen p7 vorliegen und alle Charakteristika einer zellulären mRNA haben. Das sog. Linkprotein p6 verbindet das Kapsid mit der Hüllmembran. Im Kapsid befinden sich außer dem viralen Genom noch die, für die Virusvermehrung und die Virusbildung verantwortlichen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Zusammensetzung und Funktion der Lateralkörperchen sind nicht bekannt (Falke & Modrow).

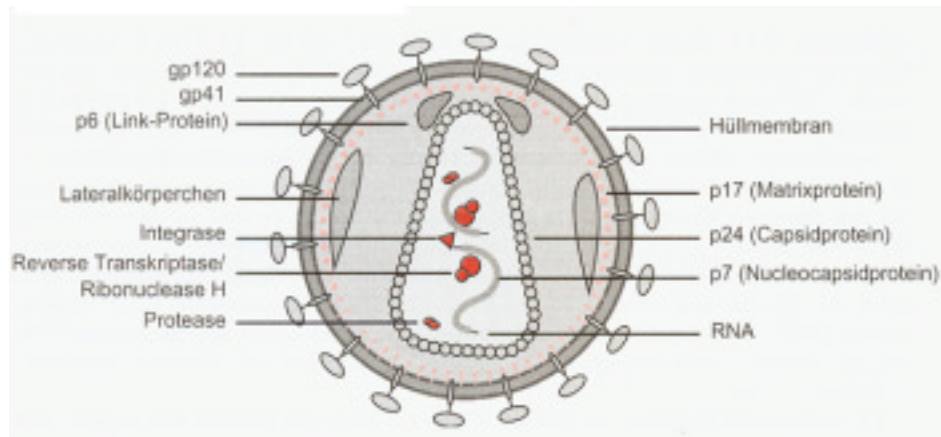


Abb. 1.5.1.2 Aufbau des humanen Immundefizienzvirus Typ 1 (HIV-1) (nach Falke & Modrow)

Die Replikation des humanen Immundefizienzvirus beginnt mit der Bindung des gp120 an den CD4 Rezeptor auf der Oberfläche von T-Lymphozyten oder Makrophagen. T-trophe HIV-Stämme benötigen außer dem CD4 Rezeptor den auf T-Zellen exprimierten Korezeptor CXCR4 (Endres et al., 1996; Feng et al., 1996), M-trophe HIV-Stämme dagegen benötigen außer dem CD4 Rezeptor den auf Makrophagen exprimierten Korezeptor CCR5, um Zellen infizieren zu können (Feng et al., 1996; Akhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Dragic et al., 1996). Dualotrophe HIV-Stämme infizieren sowohl CXCR4 exprimierende T-Zellen als auch CCR5 exprimierende Makrophagen (Simmons et al., 1996; Doranz et al., 1996).

Die Wechselwirkung des gp120 mit dem CD4 Rezeptor und einem der Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 führt zur Verschmelzung der viralen Hüllmembran mit der Zellmembran und in Folge dessen zum Eintritt des Viruskapsids in das Zytoplasma. Durch die Reverse Transkriptase kommt es zur Bildung einer doppelsträngigen DNA Kopie des viralen Genoms. Die Kopie wird in den Zellkern transportiert, durch die Integrase erfolgt die Integration in das zelluläre Genom. Das Provirus wird dann durch die zelluläre DNA-abhängige RNA Polymerase II transkribiert. In Folge der Transkription

entstehen zunächst nur gespleißte mRNAs, die im Zytoplasma translatiert werden und für die regulatorischen Proteine Tat und Rev kodieren. Diese regulatorischen Proteine gelangen anschließend in den Zellkern, wo sie eine Verstärkung der Transkription viraler Gene und die Bildung ungespleißter und einfach gespleißter mRNAs bewirken. Diese kodieren für Struktur- und akzessorische Proteine und werden durch das Rev Protein in das Zytoplasma transportiert. Dort erfolgt die Translation der Strukturproteine der Kapsid-bildenden Proteine Gag und Pol sowie der Reversen Transkriptase, Integrase und Protease und den akzessorischen Proteinen Vif, Vpr, Vpu und Nef. Die Strukturproteine und die als neue Virusgenome dienenden ungespleißten mRNAs lagern sich zusammen und werden an die Zellmembran transportiert. Zunächst sind die Viruspartikel noch nicht reif, die Reifung zu stabilen, infektiösen Viren erfolgt erst nach vollständigen Freisetzung aus der Zelle (siehe Abb. 1.5.1.3).

1.5.1.3 Therapeutisch Gene zur Behandlung der HIV-Infektion

Der Replikationszyklus von HIV ist ein komplexer, mehrstufiger Prozeß, der eine Vielzahl von Angriffspunkten bietet, durch die entweder der Eintritt in die Zelle oder die Vermehrung des Virus gestört werden könnte. Im Folgenden werden einige potentielle therapeutische Gene sowie deren Wirkmechanismus vorgestellt:

1. Eintritt des Virus in die Zelle :

Der Membran-Fusionsinhibitor M87 ist ein mit einem Membrananker ausgestattetes Peptid, das sich aus der Sequenz des Transmembranprotein gp41 aus dem Hüllglykoprotein von HIV-1 ableitet (Hildinger et al., 2001). Das aus gp41 abgeleitete Peptid wird als T20 bezeichnet (Kilby et al., 1998), durch das Anfügen eines Membranankers kann das Peptid auf der Oberfläche von HIV-Zielzellen exprimiert werden und auf diese Weise die Zelle vor der Infektion mit HIV schützen (Hildinger et al., 2001). Durch die Anwesenheit des

Peptids wird die Ausbildung des intermediären Stadium nach der Interaktion von gp120 mit dem CD4 Rezeptor und dem Korezeptor verhindert und somit die Fusion zwischen Virushülle und Zellmembran verhindert (Kilby et al., 1998).

2. reverse Transkription:

Intrazellulär exprimierte Antikörperfragmente, die spezifisch an die reverse Transkriptase binden und somit die reverse Transkription des viralen RNA Genoms in cDNA verhindert (Shaheen et al., 1996).

3. Integration:

Ribozyme, die spezifisch Sequenzen im LTR oder dem Integrase Gen auf der viralen genomischen RNA des HIV-1 Stammes HXB2 erkennen und schneiden (Wong-Staal et al., 1998; Klebba et al., 2000).

Intrazellulär exprimierte Antikörperfragmente, die spezifisch an die Integrase binden und somit den Einbau des Provirus in das zelluläre Genom verhindern (BouHamdan et al., 1999).

4. Regulation des RNA Transports:

Rev M10 ist der Zeit eines der effektivsten anti-HIV Gene *in vitro*. Rev M10 besitzt im Gegensatz zu Wildtyp Rev eine Mutation in der Effektor-domäne, an die vermutlich zelluläre Proteine binden müssen, damit Rev virale RNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportieren kann (Malim et al., 1990). Rev M10 bildet Oligomere mit Wildtyp Rev Molekülen, die dann nicht mehr virale RNAs transportieren. In Folge dessen gelangen die Rev abhängigen viralen RNAs, die für die viralen Proteine Env, Vif, Vpr, Vpu, Gag und das Gag/Pol Vorläufer Protein kodieren nicht mehr in das Zytoplasma und diese werden nicht mehr translatiert. Die Bildung neuer Viren wird dadurch inhibiert (Junker et al., 1998; Escaich et al., 1995; Reddy et al., 1999; Mukhtar et al., 2000).

Small interfering RNAs (siRNA) die komplementär zu Wildtyp Rev kodierende mRNA Sequenzen sind, führen zur Bildung doppelsträngiger RNAs, die nachfolgend degradieren. In Folge dessen wird Wildtyp Rev nicht mehr translatiert und dadurch die Bildung neuer Viren inhibiert (Lee et al., 2002).

5. Translation:

Anti-sense Oligonukleotide gegen HIV-1 *gag* und *pol* hybridisieren mit komplementären Sequenzen auf den viralen genomischen RNAs sowie den gespleißten mRNAs die für Gag und Pol kodieren. Nach der Hybridisierung kommt es zum Degradieren der doppelsträngigen RNA-Hybride. Dadurch kommt es zu keiner Translation der viralen Proteine Gag und Pol und somit zu keiner weiteren Bildung von Viruskapsiden (Veres et al., 1998; Junker et al., 1997).

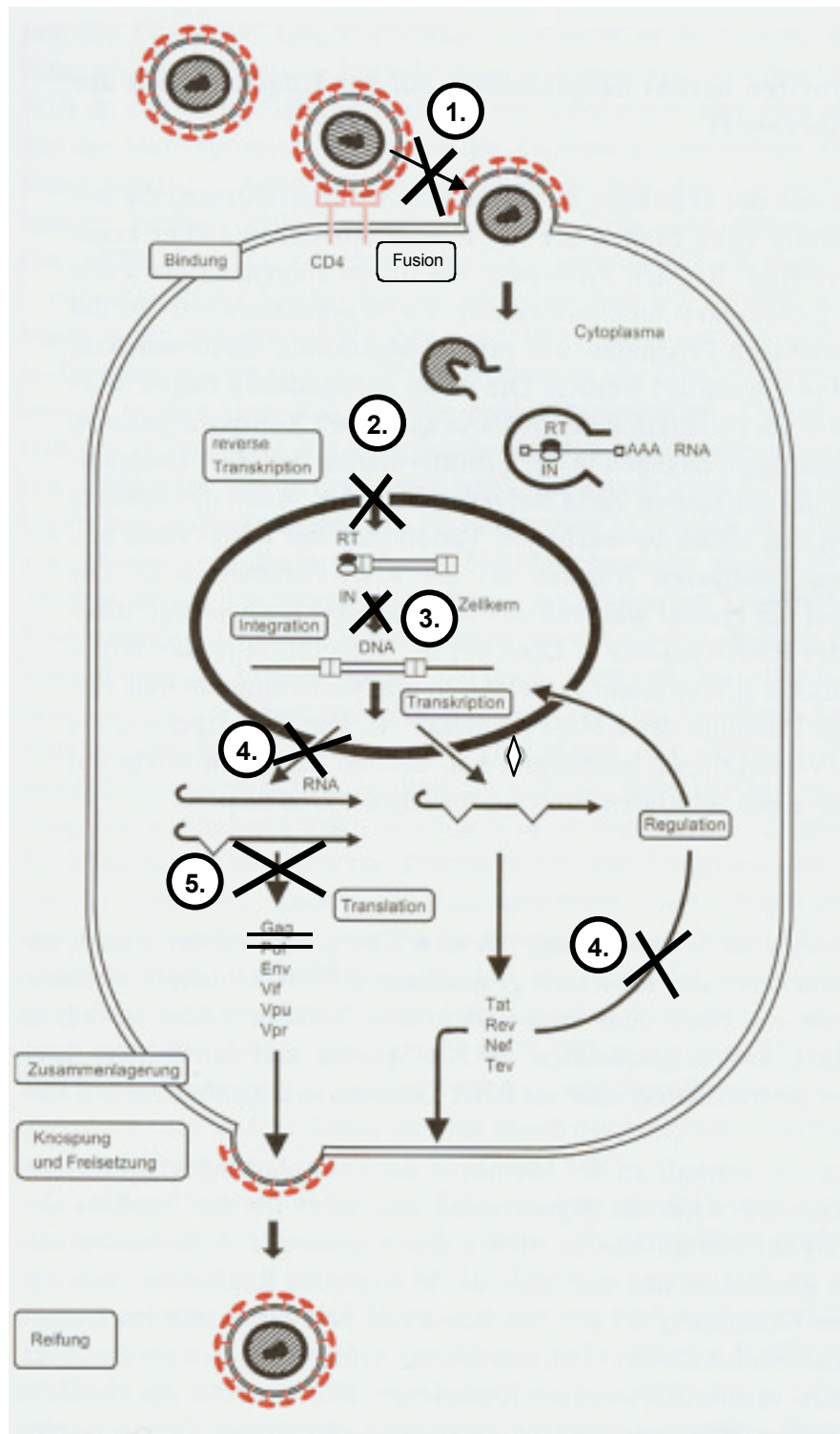


Abb. 1.5.1.3 Schematische Darstellung über den Replikationszyklus von HIV. Die Nummerierungen kennzeichnen die Angriffsstellen des jeweiligen therapeutischen Gens (Nach Falke & Modrow, verändert).

1.5.2 Genterapie von humanen kutanen T-Lymphomen

1.5.2.1 Humane kutane T-Zell Lymphome (CTCL's)

Mycosis Fungoides und das Sezary Syndrom sind die am häufigsten vorkommenden humanen kutanen Lymphome (CTCL). Im Verlauf dieser Erkrankungen kommt es zunächst durch das Einwandern CD4 positiver Lymphomzellen in die Haut. Durch klonale Expansion der Zellen kommt es bei Mycosis Fungoides (MF) zur Ausbildung von Plaques und beim Sezary Syndrom (SS) zu Rötungen der Haut (Erythrodermie). Zusätzlich findet man beim SS im Blut zirkulierende Lymphomzellen. Später kommt es bei SS und MF zur Bildung von Haut assoziierten Tumoren. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zum Auswandern der Tumorzellen aus der Haut über den Blutstrom in den gesamten Organismus und zum Befall von Organen, hauptsächlich in die Organe Lymphknoten, Milz und Leber (Edelson et al., 1980; Diamandidou et al., 1996).

Mycosis Fungoides und das Sezary Syndrom sind sehr selten vorkommende Lymphome. In den USA kommt im Durchschnitt 1 Betroffener auf 250 000 Personen. Davon betroffen sind hauptsächlich Erwachsene, die älter als 50 Jahre sind. (Weinstock et al., 1988; Epstein et al., 1972).

Über die Entstehung humaner kutaner T-Zell Lymphome ist wenig bekannt. Das gehäufte Auftreten von Mycosis Fungoides und Sezary Syndrom in einigen betroffenen Familien läßt eine genetisch bedingte Disposition vermuten (Sandbank et al., 1968). Es gibt aber auch Hinweise darauf, daß möglicherweise auch einige Viren an der Pathogene humaner kutaner T-Zell Lymphome beteiligt sind.

In einigen Fällen konnten in Biopsien aus betroffenen Hautbereichen von kutanen T-Zell Lymphompatienten retrovirale Sequenzen aus dem humanen T-Zell Lymphom Virus I und II (HTLV-I u. II) nachgewiesen werden (Zucker-

Franklin et al., 1994). HTLV-1 konnte eine Beteiligung bei der Entstehung der nur bei Erwachsenen auftretenden adulten T-Zell Leukämie (ATL) nachgewiesen werden (Hall et al., 1991). Die akute ATL besitzt ähnliche Symptome wie Mycosis Fungoides und das Sezary Syndrom und ist durch vergrößerte Lymphknoten, Leber und Milz, Hautläsionen und die Infiltration in verschiedene Organe gekennzeichnet (Falke & Modrow). Im Gegensatz zu CTCLs führt ATL meistens innerhalb eines halben Jahres zum Tod des Betroffenen. Ein weiterer Unterschied zwischen CTCLs und ATL besteht darin, daß ATL Patienten immer seropositiv für HTLV-1 sind. CTCL Patienten, bei denen HTLV-1 Sequenzen nachgewiesen werden konnten, sind in den meisten Fällen seronegativ. Daher wird vermutet, daß die, durch HTLV-1 bedingte Pathogenese bei CTCLs auf ein mutiertes Provirus zurück zu führen ist, bei dem die Gene *gag*, *pol* und *env* deletiert sind (Hall et al., 1991).

Der HTLV-1 Transaktivator Tax führt in den infizierten T-Zellen bei ATL Patienten zu einer erhöhten Konzentration von IL-2 Rezeptor (IL-2R) auf der Zelloberfläche und zu einer erhöhten Produktion von IL-2 und IL-1 β , dies konnte ebenfalls für einige Fälle von CTCLs beobachtet werden (Falke & Modrow). Dies spricht für eine Beteiligung von HTLV-1 in einigen Fällen von CTCLs. Trotz dessen werden für die Entstehung von CTCLs noch weitere Ursachen in Frage gezogen, da nicht in allen Fällen HTLV-1 Sequenzen gefunden werden konnten. Als weitere Ursachen werden Kontakte mit verschiedenen Allergenen, darunter Schwermetallsalze sowie bakteriellen Superantigenen vermutet (Fischmann et al., 1979; Tokura et al., 1995).

Nach Transplantation von Biopsien aus befallenen Hautarealen von Sezary Patienten in SCID Mäuse konnte beobachtet werden, daß Sezary Zellen nicht in die benachbarte Mäusehaut infiltrieren (Charley et al., 1990). Offensichtlich benötigen Sezary Zellen zum Wachsen und Überleben bestimmte Zytokine, die nur in menschlicher Haut vorhanden sind.

Für einige Zytokine und Zytokinrezeptoren wurde eine Beteiligung an der Pathogenese von CTCLs beschrieben. In einigen Fällen von CTCLs wurde eine erhöhte Sekretion von IL-1 α beobachtet werden. IL-1 kommt in den Isoformen IL-1 α und IL-1 β vor und wird in der menschlichen Haut von Keratinozyten produziert. Monozyten sekretieren einen IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1RA), wodurch ein Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1RA in der intakten Haut vorliegt. Eine erhöhte Produktion von IL-1 α verursacht inflammatorische Prozesse in der Haut von CTCL Patienten, wie man sie in frühen Stadien von CTCLs beobachtet. IL-2 fördert die Proliferation aktivierter T-Zellen nach Bindung an den IL-2 Rezeptor. Einige CTCL Zellen zeigen eine erhöhte Expression an IL-2 Rezeptor (IL-2R), neben dem auf der Oberfläche von T-Zellen gebundenen IL-2 gibt es auch sekretierten IL-2 Rezeptor (sIL-2R). In CTCL Patienten konnten erhöhte Mengen an sIL-2R beobachtet werden. Die Menge an sIL-2R korrelieren mit dem Stadium und der Prognose (Zachariae et al., 1991). In einigen Fällen von CTCLs findet man erhöhte Konzentrationen von IL-4 sowie eine erhöhte Anzahl an IL-4 Rezeptor auf Monozyten im peripheren Blut sowie erhöhte IL-6 Konzentrationen in Biopsien aus befallenen Hautläsionen von einigen Mycosis Fungoides Patienten (Lowlor et al., 1990). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass IL-15 für das Überleben und Wachstum von Sezary Zellen essentiell ist. Sezary Zellen sekretieren IL-15, wodurch sie sich autokrin stimulieren (Döbbeling et al., 1998). IL-7 führt wie IL-2, IL-6 und IL-15 ebenfalls zu einer erhöhten Proliferation von Sezary Zellen (Dallone et al., 1992; Döbbeling et al., 1998).

Zur Behandlung humaner kutaner T-Lymphome wurden unterschiedliche Therapien zur Anwendung gebracht. Die häufigste Therapie basiert auf der Gabe der photosensitiven Substanz Psoralen (8-Methoxypsoralen) mit einer anschließenden Bestrahlung der betroffenen Hautareale mit ultraviolettem Licht (UVA) (Thomsen et al., 1985; Stern et al., 1984; Stern et al., 1985). In Folge der UV Licht Bestrahlung werden Psoralen-Radikale gebildet, die eine Vernetzung der DNA-Stränge bewirken und zum Absterben der Zelle führen.

Um eine Verstärkung des Therapieeffektes zu erzielen, wird außer Psoralen eine zusätzliche Gabe von IFN- α . Außer dieser Therapie werden u.a. Total Skin Elektron Beam Radiation (TSEB) (Jones et al., 1995), kombinierte Chemotherapien (mit Cyclophosphamid, Dexamethason, Doxorubicin und Vinca-Alkaloiden), Retinoide und Immunkonjugate (IL-2 Toxin) verwandt. IL-2 Toxin ist ein Hybrid aus IL-2 und Diphtheritoxin. Bei der Therapie mit IL-2 Toxin wird ausgenutzt, daß CTCLs häufig eine erhöhte Anzahl an IL-2 Rezeptor exprimieren und somit bevorzugt IL-2 Toxin aufnehmen (Le Maistre et al., 1992; Kuzel et al., 1995).

Alle dieser Therapien führen zwar zu einer kurzfristigen Besserung der Symptome, nicht jedoch zu einer Heilung (Diamandidou et al., 1996).

1.5.2.2 Therapeutische Gene zur Behandlung von CTCL's

In einige humane kutane T-Zell Lymphomzellen konnte ein kausaler Zusammenhang mit konstitutiv aktivem STAT3 nachgewiesen werden (Nielson et al., 1997).

STATs sind „signal transducer and activator of transcription“ d.h. sie leiten Signale, die die Zelle von außen bekommt in den Zellkern, wo sie nachfolgend Zielgene anschalten. Als erstes werden, als Monomere vorliegende STATs von JAK Kinasen, die zuvor an einen aktivierten Zytokinrezeptor gebunden haben, phosphoryliert. Phosphorylierte STAT Monomere dimerisieren und erhalten die Fähigkeit an spezifische DNA-Sequenzen zu binden, wodurch es zur Transkription von STAT Zielgenen kommt.

Durch Behandlung von Mycosis Fungoides Zellen mit dem JAK Kinase Inhibitor AG410 konnte eine Inhibition der STAT3 Aktivierung erreicht werden, die mit einer Verlangsamung des Zellwachstums verbunden war. Daraus folgt, daß die Inhibition von STAT3 zur Therapie genutzt werden könnte.

Therapeutische Gene könnten z.B. anti-sense Oligonukleotide oder Ribozyme sein, die gegen Sequenzen in den für JAK3 Kinase oder STAT3 kodierenden mRNAs gerichtet sind und zu einer Inhibition der STAT3 Signalkaskade führen. Außerdem könnten Gene eingesetzt werden, die für dominant negative STAT3 Mutanten kodieren.

Da konstitutiv aktives STAT3 nicht in allen kutanen T-Zell Lymphom Zellen gefunden wurde, eignen sich zytotoxische Gene wie z.B. die unter **1.2.2** beschriebene Herpes Simplex Virus Thymidinkinase zur therapeutischen Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen, weil sie transduzierte Lymphomzellen unabhängig von ihrem genetischen Defekt nach Ganciclovir Behandlung abtöten.

Ein weiteres zytotoxisches Gen stellen für HIV Env kodierende Gene dar. HIV Env führt, wenn es in CD4 positiven Zellen exprimiert wird zur Verschmelzung von benachbarten CD4 positiven Zellen (Synzytienbildung), wodurch auch für nicht transduzierte Zellen ein toxischer Effekt verbunden ist (Bystander Effekt).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten Verpackungszelllinien etabliert werden, die MLV/HIV-1, MLV/HIV-2 und MLV/SHIV-89.6P pseudotypisierte retrovirale Vektoren exprimieren. Im Anschluß sollten die Vektor-freien Verpackungszelllinien zunächst mit retroviralen Reporterkonstrukten (LacZ, GFP, LNGF-R Δ) ausgestattet werden und die Anzahl, der gebildeten infektiösen Vektorpartikel (Titer) untersucht und Methoden zur Anreicherung etabliert werden. In *in vitro* Transduktionsexperimenten sollte die Transduktionsspezifität und die Transduktionseffizienz an primären humanen T-Lymphozyten überprüft werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte an zwei Mausmodellen die *in vivo* Applikation MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren untersucht werden.

Mit transgenen hCD4 Mäusen, die den humanen CD4 Rezeptor exprimieren, sollten Spezifität und Effizienz der systemischer Applikation von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren untersucht werden.

Zusätzlich sollte ein Nacktmausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome etabliert werden. Mit diesem Modell sollten Therapiestudien durch intratumorale Applikation von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren durchgeführt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Grundchemikalien (Reinheitsgrad p.a.) wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie stammten von New England Biolabs (Schwalbach), Hoffmann La Roche (Mannheim) oder Gibco BRL (Eggenstein).

Molekulargewichtsmarker für Proteine stammten von Gibco BRL (Eggenstein) und DNA-Fragmente von New England Biolabs (Schwalbach).

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zelllysaten wurde der Proteinassay Kit von Biorad (München) verwendet.

Bestandteile von Nährmedien und Agar zur Anzucht von Bakterien wurden von Difco (Augsburg) oder Gibco BRL (Eggenstein) geliefert.

Medien, Antibiotika, Zusätze für die Zellkultur und fötales Kälberserum wurden von BioWhittaker (Verviers, Belgien) oder Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Plastikwaren und Filtersysteme für die Zellkultur wurden von der Firma Greiner (Frickenhausen), Vivascience (Bimbrook Lincoln, UK), Sartorius (Göttingen), Millipor (Eschborn), Costar (Bodenheim), Nalgen (Rochester, NY, USA), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Schleicher & Schuell (Dassel) geliefert.

Fibronectin beschichtete Zellkulturschalen stammten von Takara (Shiga, Japan) und Ficoll von PAN Biotech GmbH (Aidenbach).

Als PCR-Primer eingesetzte Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech GmbH (Ebersberg) verwendet. Kits für Plasmidpräparationen und Transfektionsreagenzien für Säugerzellen wurden von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBST	PBS + 0.05% Tween 20 (Fluka)
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

TAE-Laufpuffer für Agarosegel-elektrophorese	40 mM Tris, 1 mM EDTA, auf pH 8.0 mit Essigsäure eingestellt
5 x DNA-Auftragspuffer	20% Ficoll 400, 1% SDS, 0.25% Bromphenolblau und 0.25% Xylencyanol
SDS-Gelelektrophoresepuffer	250 mM Glycin, 0.1% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0
Proteinauftragspuffer für SDS-PAGE	125 mM Tris pH 6.8, 2.5% SDS, 10% Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau (+ 1% β -Merkaptoethanol bei Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen)
Anodenpuffer I für Western Blot	300 mM Tris pH 10.4, 20% Methanol
Anodenpuffer II für Western Blot	25 mM Tris pH 10.4, 20% Methanol
Kathodenpuffer für Western Blot	25 mM Tris pH 10.4, 40 mM ϵ -Aminokapronsäure, 20% Methanol
“Stripping”-Puffer für Nitro-cellulosemembranen	62.5 mM Tris-HCl pH 6.7, 2 % SDS, 100mM β -Mercaptoethanol
Lysispuffer zum Aufschluß von Säugerzellen	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM EGTA pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF

Weitere in dieser Arbeit verwendete Puffer und Lösungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.1.3 Antikörper

Die folgende Übersicht zeigt die monoklonalen Antikörper und polyklonalen Seren, die bei Western Blots, Durchflußzytometrie-Messungen, Sorten von Zellen mit magnetischen Beads und Immunohisto-chemischen Färbungen von fixierten Zellen und Gewebeschnitten verwendet wurden.

Antigen	Name und Charakteristik	Hersteller bzw. Referenz
HIV-1 gp120	polyklonales Ziegen Serum	Biodesign-Dunn Labortechnik GmbH, (Asbach) (#B65961G)
HIV-2	Serum von HIV-2 Patienten	L. Gürtler (Greifswald)
Human-CD4	Maus IgG1 κ (monoklonal)	Pharmingen (#30151A)
Human-CD4	Maus IgG1 κ (monoklonal)	DAKO (#M0716)

Human-CD4	Maus IgG1 κ (monoklonal) an PE (Phycoerythrin) gebunden	Becton Dickinson (#30155X) (Heidelberg)
Human-CD4	Maus IgG1 κ (monoklonal) an Microbeats gekoppelt	Miltenyi Biotec (#451-01) (Bergisch Gladbach)
Human-CD8	Maus IgG1 κ (monoklonal)	DAKO (#M0707)
Human-CD3	Kaninchen IgG1 κ (monoklonal)	DAKO (#A0452) (Hamburg)
Human-Fusin (CXCR4)	Maus IgG2a κ (monoklonal)	Pharmingen (#36191A) (Heidelberg)
Human-LNGFR (nerve growth factor receptor)	Maus IgG1 κ (monoklonal)	Chemicon International (MAB5264) (Asbach)
GFP(green fluorescent protein)	Mix aus monoklonen Maus-antikörpern gegen synthetische Peptide aus GFP	Clontech (#8367-2) (Heidelberg)
Maus-CD3	Hamster IgG1 κ (monoklonal) an Biotin gekoppelt	Pharmingen (#01082A) (Heidelberg)
Maus IgG (H+L)	Ziegenantikörper IgG (H+L) gekoppelt an FITC (Fluorescein-Isothiocyant)	Dianova (#115-095-003) (Hamburg)
Maus IgG (H+L)	Ziegenantikörper IgG Fab Fragment gekoppelt an FITC ('second step antibody')	Dianova (#115-097-003) (Hamburg)
Maus IgG (H+L)	Ziegenantikörper IgG F(ab') ₂ Fragment gekoppelt an MicroBeats	Miltenyi Biotec (#484-01) (Bergisch Gladbach)
Ziege IgG (H+L)	Kaninchenantikörper IgG (H+L) gekoppelt an HRP (Meerrettichperoxidase)	Dianova (#305-035-003) (Hamburg)
Human IgG + IgM +IgA (H+L)	Ziegenantikörper IgG F(ab') ₂ Fragment gekoppelt an HRP (Meerrettichperoxidase)	Dianova (#109-036-064) (Hamburg)
Kaninchen IgG (H+L)	Ziegenantikörper IgG F(ab') ₂ Fragment gekoppelt an Biotin	Dianova (#111-066-045) (Hamburg)
Streptavidin	Streptavidin gekoppelt an HRP	Zymed HRP Strept #43-4323 (Heiden)

Die im einzelnen verwendeten Verdünnungen richteten sich nach den Angaben der Hersteller bzw. sind bei der Beschreibung der jeweiligen Experimente vermerkt.

2.1.4 Vektoren

Die folgende Übersicht zeigt die Vektoren, die für die stabilen und transienten Transfektionen von Säugerzellen verwendet wurden.

Expressionsvektoren für Eukaryonten

Name	Verwendungszweck/ kodiertes Insert	Referenz
PEF-IRES-P	Expressionsvektor	Hobbs et al., 1997
pEF-IRES-P-Tr712	Vektor zur stabilen Expression von HIV-1 Tr712 gp120 in Säugerzellen	diese Arbeit Thaler et al., 2001
pEF-IRES-P-89.6P-Tr703	Vektor zur stabilen Expression von SHIV-89.6P-Tr712 gp120 in Säugerzellen	diese Arbeit
pEF-IRES-P-Tr699	Vektor zur stabilen Expression von HIV-2 Tr699 gp120 in Säugerzellen	diese Arbeit
pBI-3	Tet-induzierbarer Expressionsvektor	Baron et al., 1995
pUHG 17-1	Tet-Repressor Expressionsvektor	Gossen et al., 1995
pBI-3 HIV-2 Tr699	Tet-induzierbarer Expression von HIV-2 Tr699 gp120 in Säugerzellen	diese Arbeit
pBI-3 HIV-1 Tr712	Tet-induzierbare Expression von HIV-1 Tr712 gp120 in Säugerzellen	diese Arbeit
pL β Ac/envTr712-neo	Vektor zur Expression von HIV-1 Tr712 gp120 in Säugerzellen	Schnierle et al., 1997
pcDNA89.6P-syn-CD5-Tmneu	Vektor zur Expression von SHIV-89.6P Tr703 gp120 in Säugerzellen	R. Wagner, unveröffentlichte Daten
pCMV-HIV-2 Tr699	Vektor zur Expression von HIV-2 Tr699 gp120 in Säugerzellen	Höhne et al., 1999

Antibiotikaresistenzvektoren für Eukaryonten

Name	Verwendungszweck/kodiertes Insert	Referenz
pPUR	Puromycinresistenzplasmid	Clontech
pX343	Hygromycinresistenzplasmid	L. Nagamine, FMI, Basel

Retrovirale Vektoren

Name	Verwendungszweck / kodiertes Insert	Referenz
pMFGnslacZ	Retroviral. Vektor + LacZ	Ferry et al., 1991
pMX-EGFP	Retroviral. Vektor + EGFP	Onishi et al., 1995
LHPLtr	Retroviral. Vektor + LNGFR (low affinity nerve growth factor receptor) für die Selektion mit Microbeats	Klebba et al., 2000
JGH2 oder pEGFP/Tkfus	Retroviral. Vektor + EGFP Tkfus	Paquin et al., 2001

Reporterplasmide

Name	Verwendungszweck / kodiertes Insert	Referenz
pSV2LUC	Reporterplasmid für Luziferaseassay	C. Uherek, (Dissertation, 1998)
pSV2 β -Gal	Reporterplasmid für β -Gal-Assay	AG Wels, Georg-Speyer-Haus

2.1.5 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Referenz
nls-lacZ	5'-CGA CTC CTG GAG CCC GTC AGT ATC-3'	Ferry et al., 1991
3'-LTR	5'-GAC CAC TGA TAT CCT GTC TTT AAC-3'	Ferry et al., 1991
F-hu-CD4	5'-CCG GTG CAG CCA ATG GCC-3'	diese Arbeit
R-hu-CD4	5'-CAG GAG AAA CAA TGG CAA ATT G-3'	diese Arbeit

2.1.6 Bakterien und Medien

Bakterien (*Escherichia coli*)

Stamm	Genotyp	Referenz
XL-1 blue (<i>E. coli</i>)	<i>SupE44, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, lac⁻, F'(traD36, proAB+, lacIq, lacZΔM15)</i>	Hanahan, 1983
DH-5α (<i>E. coli</i>)	<i>SupE44, hsdR17, recA1, endA1, deoR, gyrA96, thi-1, relA1, F' lacZΔM15</i>	Hanahan, 1983

Die Abkürzungen der Genotypen beziehen sich auf die Nomenklatur von B. Bachmann (Bachmann, 1990).

Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 220 Upm in LB-Medium (Sambrook et al., 1989) mit 100 – 200 µg/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe) angezogen. Die langfristige Lagerung der plasmidhaltiger Bakterienstämme erfolgte bei –80°C in LB-Medium mit 20% Glycerin.

Medien

Name	Zusammensetzung
Luria-Bertani-Medium (LB)	1% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl pH 7.5
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	1% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl, 1.5% Agar pH 7.5

Die Medien wurden unmittelbar nach dem Ansetzen bei 121°C und 1 bar Druck für 15 min autoklaviert.

2.1.7 Zelllinien und Zellkulturmedien

Zelllinien

Zelllinie	Typ	Medium	Referenz
FLY	humanes Fibrosarkom (HT1080), Verpackungszelllinie exprimiert stabil MLV gag und pol	DMEM	Cosset et al., 1995
FLY-HIV-87	FLY exprimiert stabil vektorfreie MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit u. Thaler et al., 2001
FLY-HIV-87- lacZ	FLY-HIV-87 + pMFGnslacZ exprimiert MLV/HIV-1 Pseudotyp- vektoren mit lacZ Gen	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit u. Thaler et al., 2001
FLY-HIV-87- GFP	FLY-HIV-87 + pMX-EGFP exprimiert MLV/HIV-1 Pseudotyp- vektoren mit EGFP Gen	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit u. Thaler et al., 2001
FLY-HIV-87 Klon 27 GFP GFP	Einzelzellklon aus FLY-HIV-87 GFP	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit
FLY-HIV-87- LHPLtr	FLY-HIV-87 + LHPLtr exprimiert MLV/HIV-1 Pseudotyp- vektoren mit LHPLtr-Vektor	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit u. Thaler et al., 2001
FLY-HIV-87- EGFP/Tkfus	FLY-HIV-87 + JGH2 exprimiert MLV/HIV-1 Pseudotyp- vektoren mit EGFP/Tkfus Gen	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit
FLY-HIV-87 Klon 85- EGFP/Tkfus	Einzelzellklon aus FLY-HIV-87- EGFP/Tkfus	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit
FLY-G-17-1 Nr. 3	FLY + pUHG 17-1 exprimiert stabil den Tetracyclin- Transaktivator (tet-Repressor)	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin	diese Arbeit
FLY-HIV-2 i-Env Klon 10	FLY-G-17-1 Nr. 3 + pBI-3 HIV-2 Tr699 exprimiert MLV/HIV-2 Pseudotypvektoren nach Zugabe von Tetracyclin o. Doxycyclin	DMEM + 2.5 µg/ml Puromycin + 1 mg/ml Hygromycin	diese Arbeit

FLYA-JET-LacZ	FLY + amphotropes Envelope von MLV + LacZ Vektor	DMEM	Gerstmayer et al., 1999
TELCeB6/Tr712-17	TELCeB6 + p β Ac/envTr712-neo exprimiert stabil MLV/HIV-1 LacZ-Vektor Pseudotypartikel	DMEM + 3 μ g/ml Neomycin	Schnierle et al., 1997
PG-13-LHPLtr	Mausfibroblasten exprimieren MLV/GaLV Pseudotypvektoren Mit LHPLtr-Vektor	DMEM	Klebba et al., 2000
293T	humane embryonale Nierenzellen	DMEM	CRL-1573
293 VSV.G	exprimiert tet-induzierbar Vesikuläres Stomatitis Virus-G Pseudotypisierte MLV-Vektoren	DMEM	Ory et al., 1996
NIH3T3	Mausfibroblasten	DMEM	CCL-92
NIH3T3 CD4	Mausfibroblasten, die humanen CD4 Rezeptor exprimieren	DMEM	Deng et al., 1997
NIH3T3 CD4/CXCR4	Mausfibroblasten, die h. CD4 und h. CXCR4 Rezeptor exprimieren	DMEM	Deng et al., 1997
NIH3T3 CD4/CCR5	Mausfibroblasten, die h. CD4 und h. CCR5 Rezeptor exprimieren	DMEM	Deng et al., 1997
NIH3T3 CD4/CCR3	Mausfibroblasten, die h. CD4 und h. CCR3 Rezeptor	DMEM	Deng et al., 1997
Jurkat	humane leukämische T-Zelllinie	RPMI 1640	TIB-152
MyLa	humane kutane T-Zell Lymphom Zelllinie	RPMI 1640	Döbbeling et al., 1998
MyLa EGFP/Tkfus	MyLa + JHG2	RPMI 1640	Diese Arbeit

Zellkulturmedien

Name	Zusammensetzung
DMEM Komplett	10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
RPMI 1640 Komplett	10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin
Einfriermedium	90% hitzeinaktiviertes FCS, 10% DMSO

FCS wurde zur Inaktivierung von Komplement vor Gebrauch 30 min bei 56°C erhitzt.

2.2 Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurden die molekularbiologischen Methoden und Puffer aus Sambrook et al., 1989 entnommen. Modifikationen sind an entsprechender Stelle erläutert.

2.2.1 Gentechnische Arbeitsmethoden

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Dabei wurden zur analytischen DNA Präparation ("Miniprep" bis 10 µg) der Qiaprep spin- und zur präparativen DNA-Isolierung (bis 500 µg) der Plasmid Maxi-Kit benutzt. Nach alkalischer Lyse der Zellen und RNaseA-Behandlung des Lysats wurde dieses zunächst mit Natriumacetat neutralisiert und dann abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde dann bei geringer Salzkonzentration an eine säulengepackte Silikatmatrix adsorbiert. Auf einen Waschschriff bei mittlerer Salzkonzentration zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verunreinigungen folgte die Elution der DNA in 1.25 M NaCl sowie die Präzipitation mit Isopropanol zur Konzentrierung und Entsalzung sowie einem abschließenden Waschriff mit 70% Ethanol.

2.2.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus Mausorganen

Lysepuffer : 10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8.0, 2 % SDS,
1 mg/ml Proteinase K (Hofmann La Roche)

Zur Isolierung von genomischer DNA wurden mit einer 10 µl Pipettenspitze die Reste der in OCT Medium eingebetteten Organreste in je 500 µl Lysebuffer gegeben und die Ansätze für 24 h bei 56°C bei einer Schüttelbewegung von 800 rpm inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Phenol/Chloroform (50:50) zu den 500 µl Lysisbuffer pipettiert. Die Phasen wurden durch mehrfaches invertieren oder vortexen gemischt und anschließend zum Trennen der Phasen für 10 min bei 13 000 rpm und RT in

einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugiert. Die ca. 500 μ l der oberen, wässrigen Phase wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der genomischen DNA 5 μ l 3M Natriumacetat pH 4.5, 3 μ l Glasmilch (Dianova, Hamburg) und 500 μ l Isopropanol zugesetzt. Der Ansatz wurde durch invertieren oder vortexen gemischt und zum Binden der DNA an die Glasmilch für 15 min bei RT stehen gelassen. Nach 15 min Zentrifugieren bei 13 000 rpm, wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol durch 5 min zentrifugieren bei 13 000 rpm gewaschen. Nach abziehen des Ethanols wurde das Pellet für 5 – 10 min bei RT getrocknet und in 65 μ l destilliertem Wasser aufgenommen und 15 min zum Lösen der DNA stehen gelassen. Für die Durchführung der PCR wurden 5 μ l der gelösten DNA pro Ansatz eingesetzt.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die präparierte DNA 1 : 100 verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Bei 260 nm entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration von 50 μ g/ml doppelsträngiger DNA.

Zur Abschätzung der Reinheit der DNA wurde zusätzlich die Absorption bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ stellt einen relativen Wert für die Reinheit der präparierten DNA dar. Werte niedriger als 1.8 deuten auf eine Verunreinigung mit Protein hin.

2.2.1.4 Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli*

Lösung I 150 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂,
13 % Glyzerin, pH 5.8 (sterilfiltriert)

Lösung II 10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13 % Glyzerin, pH 7.0
(sterilfiltriert)

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 3.4 herangezogen und anschließend bei 4°C für 10 min 2200 Upm in einem JA 10 Rotor abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und 1-2 h auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde die Suspension wie oben

beschrieben zentrifugiert und das Pellet in 12.5 ml eiskalter Lösung II resuspendiert. Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots in Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 10 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0.1 µg gereinigter Plasmid-DNA vermischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 45 s bei 42°C, 3 min Inkubation auf Eis und 45 min schütteln bei 37°C in 400 - 800 µl LB-Medium. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit 100 - 200 µg/ml Ampicillin ausplattiert und 14 -16 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden mindestens 5 Einheiten/µg DNA des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Zur Vermeidung unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym wurde darauf geachtet, daß der Restriktionsansatz nicht mehr als 5% Glyzerin enthielt. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1-3 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt. Wurde Vektor-DNA für Klonierungen geschnitten, wurde diese zusätzlich mit 10 Einheiten alkalischer Phosphatase (calve intestinal phosphatase, NEB, Schwalbach) pro µg DNA für 1 h bei 37°C behandelt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte ebenfalls durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte durch Elektrophorese in 0.7-1.5%-igen Agarosegelen (Gibco BRL, Eggenstein oder Roth, Karlsruhe) in TAE Laufpuffer bei 8 Volt/cm Gellänge. Die Ethidiumbromidkonzentration betrug 5 µg/ml Agarosegel.

2.2.1.7 Auffüllen von DNA Einzelstrangenden mit Klenow Polymerase

Diese Methode diente dazu, die nach Restriktionsendonuklease Verdaus entstandenen überhängenden Einzellstrangenden in glatte Enden zu überführen.

Zum Auffüllen von DNA Einzelstrangenden wurde 1 Einheit/ μg DNA Klenow Polymerase (NEB, Schwalbach) in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Das Volumen des Ansatzes betrug 20 μl . Zur Durchführung der Auffüllreaktion wurden 1 μl dNTP-Mix (1 mM je NTP) zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA Auftragspuffer gestoppt.

2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch Ethidiumbromid gefärbten DNA-Fragmente wurden zunächst auf einem UV-Transluminator sichtbar gemacht, zügig mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus den ausgeschnittenen Agarosegelstücken wurde der Qiaquick-Gelextraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Je nach Menge und Verwendungszweck wurde die DNA in 10 – 50 μl TE Puffer eluiert.

2.2.1.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden Vektor-DNA und DNA-Insert in verschiedenen molaren Verhältnissen (von ca. 1:10 bis 1:5) eingesetzt. Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16°C in einem Volumen von 10 μl in dem vom Hersteller gelieferten Ligasepuffer und 1-5 Einheiten an T4-Ligase (Hofmann La Roche, Mannheim).

2.2.1.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem GeneAmp 9600 oder GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin Elmer, Weiterstadt). Das Reaktionsvolumen der PCR Ansätze betrug im allgemeinen 50 μl und bestand aus der DNA-Matrize (50 -100 ng Plasmid-DNA), 0,5 - 1 Unit Platinum Pfx-Polymerase (Gibco BRL, Eggenstein), Pfx-Polymerase Puffer, je 25 - 35 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer und 200 μM jedes der vier Desoxyribonukleotide. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgte nach 2 min 94°C. Das Anlagern der Primer

erfolgte für 30 s bei der für die Primer angegebenen Schmelztemperatur zwischen 50 - 66°C. Die Polymerasereaktion zur Synthese der neuen DNA-Stränge erfolgte bei 68°C und die Denaturierung für 15 s bei 94°C. Es wurden pro PCR jeweils 25 - 35 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierte DNA-Fragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert bzw. isoliert.

2.2.2 Zellbiologische Arbeitsmethoden

2.2.2.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank (Heraeus, Fellbach) bei 37°C und 5 oder 10% CO₂ kultiviert. Adherente Zelllinien wurden zum Vereinzeln mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (2 ml/10cm Ø Zellkulturschale) durch Inkubation bei 37°C im Brutschrank von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellen wurden anschließend auf neue Zellkulturschalen verteilt und frisches Medium zugesetzt. Im allgemeinen wurden die Zellen zweimal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und nach Bedarf mindestens einmal pro Woche durch Trypsin-EDTA Behandlung abgelöst und verdünnt frisch ausgesät.

Suspensionszellen wurden zum Waschen durch zentrifugieren bei 1 000 g für 5 min pelletiert. Die Zellen wurden anschließend in frischem Medium aufgenommen und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

Die Lagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff in Einfriermedium aus FCS und 10% DMSO (Fluka, Neu-Ulm). Den Medien DMEM und RPMI 1640 wurden 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben

2.2.2.2 Transiente Transfektion von Säugerzellen

Zur transienten Transfektion wurden im allgemeinen 5 x 10⁴ Zellen/Vertiefung in 12 Well Platten, 2 x 10⁵ Zellen/Vertiefung in 6 Well Platten und 1 – 1,5 x 10⁶ Zellen/10 cm Ø Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Durchführung der transienten Transfektionen wurde das Transfektionsreagenz

Superfect der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.2.3 Stabile Transfektion von Säugerzellen

Zur stabilen Transfektion wurden $1-1,5 \times 10^6$ Zellen auf einer 10 cm \varnothing Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Zur Durchführung der stabilen Transfektion wurde das Transfektionsreagenz Superfect der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. 48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion der transfizierten Zellen begonnen. Hierzu wurden die Zellen auf 6 x 10 cm \varnothing Zellkulturschalen verteilt und das entsprechende Antibiotikum dem Medium zugesetzt. Nach 14 - 21 Tagen waren einzelne transfizierte, Antibiotika resistente Klone zu Zellhaufen von ca. 100 - 1000 Zellen herangewachsen. Diese wurden zum Weiterkultivieren mit Trypsin getränkten Whatman-Papier Stückchen abgelöst und mit einer sterilen Pinzette auf 12 well Zellkulturplatten übertragen. Die Klone, die nach Übertragung auf die 12 well Zellkulturplatten anwuchsen, wurden hinsichtlich der Expression der gewünschten Proteine untersucht.

2.2.2.4 Magnetische Zellseparation (MACS Cell Sorting)

Die magnetische Zellseparation wurde dazu genutzt, Zellen, die einen Oberflächenmarker exprimieren aus einer Mischpopulation zu isolieren. Dieses Verfahren wurde zur Herstellung der Zelllinie FLY-HIV-87-LHPLtr verwandt. Dazu wurden 1×10^7 Zellen durch kurze Trypsin-EDTA Behandlung von den Zellkulturschalen abgelöst und anschließend zweimal mit 10 ml PBS + 0,5 % BSA gewaschen und für 5 min bei 1000 rpm in einer Megafuge (Heraeus) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 90 μ l PBS + 0,5 % BSA aufgenommen, 10 μ l anti-human-LNGFR Antikörper (Konz. 1 μ g/ μ l) zugesetzt und die Zellen für 10 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml PBS + 0,5 % BSA gewaschen und für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Für die Markierung mit dem Zweitantikörper wurde das Zellpellet in 80 μ l PBS + 0,5 % BSA aufgenommen, 20 μ l des an MicroBeats (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) gekoppelten anti-Maus Antikörpers zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden durch zweimaliges Waschen der Zellen in 2-3 ml PBS + 0,5 %

BSA und 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren ungebundener Beats entfernt. Die Zellen wurden in 500 µl PBS + 0,5 % BSA aufgenommen und zum Separieren der markierten Zellen auf MiniMACS-Säulen (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) aufgetragen. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit je 500 µl PBS + 0,5 % BSA, zum Abtrennen der nicht markierten Zellen, wurde die Säule aus dem Magneten herausgenommen und die an MicroBeats gebundenen Zellen durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBS + 0,5 % BSA von der Säule herunter gespült und direkt in Medium aufgenommen.

Zur Gewinnung von CD4 positiven T-Helferzellen aus peripheren Blutlymphozyten wurde eine direkt an MicroBeats gekoppelter anti-human-CD4 Antikörper benutzt. Dazu wurden 5×10^7 periphere Blutlymphozyten in 400 µl PBS + 0,5 % BSA aufgenommen, 100 µl mit MicroBeats gekoppelte anti-human CD4 Antikörper zugesetzt und der Ansatz für 15 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in 5 ml PBS + 0,5 % BSA gewaschen und bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl PBS + 0,5 % BSA aufgenommen und auf MidiMACS-Säulen (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) aufgetragen. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

2.2.2.5 Präparation von humanen peripheren Blutlymphozyten

Zur Präparation peripherer Blutlymphozyten (PBLs) wurden je nach Bedarf 50 – 60 ml frisches peripheres Blut aus der Armvene eines Probanden entnommen und in heparinisierte Röhrchen (Sarstedt) überführt. Die Präparation der PBL's erfolgte mit FICOLL-Gradient der Firma PAN Biotech (Aidenbach). Dazu wurden 20 ml FICOLL (d=1077) der Firma PAN Biotech (Aidenbach) pro 50 ml Falcon (Becton Dickinson) vorgelegt. Das heparinisierte Blut wurde mit PBS im Verhältnis 50:50 gemischt und 25 ml pro Falcon auf 20 ml FICOLL geladen. Dazu wurde das mit PBS verdünnte Blut mit einer 25 ml Pipette aufgenommen und vorsichtig am Rand des Falcons auf den Gradienten laufen gelassen. Anschließend wurden die 50 ml Falcons bei RT für 30 min bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Die als helle Bande sichtbaren Lymphozyten wurden mit einer 10 ml Pipette aufgenommen, in ein neues 50 ml Falcon überführt und durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1500 g für 10 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in RPMI 1640 Medium aufgenommen, die Zellen gezählt und auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die

Aktivierung der Lymphozyten erfolgte durch Zugabe von 5 µg PHA/ml Medium (Sigma, Deisenhofen). Nach 48 h wurde das PHA durch waschen der Zellen entfernt. Dazu wurden die Zellen bei 1500 g für 10 min zentrifugiert und das PHA haltige Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frischem RPMI 1640 Medium resuspendiert, die Zellen gezählt und auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Dem Medium wurden 20 U/ml humanes IL-2 (Hofmann La Roche, Mannheim) zugesetzt.

2.2.2.6 Präparation von humanem Serum

Die Präparation des humanem Serums erfolgte, aufgrund der geringen Stabilität des Komplements erst unmittelbar vor Durchführung der Transduktion. Hierzu wurden aus dem gleichen Probanden 10 – 20 ml frisches peripheres Blut aus der Armvene entnommen und in nicht heparinisierte Röhrchen (Sarstedt) überführt. Zur Präparation des Serums wurde das Blut mindestens 30 min bei Raumtemperatur stehen gelassen (bis sich ein Klumpen aus geronnenem Blut gebildet hatte). Anschließend wurde das geronnene Blut vom Serum durch Zentrifugation bei 3000 g für 10 min getrennt. Das Serum wurde mit einer 5 ml Pipette aus dem Röhrchen entnommen und unmittelbar danach für den Versuch eingesetzt.

2.2.2.7 Präparation von Mausmilz T-Lymphozyten

Zur Präparation von Milz T-Lymphozyten wurde die Milz einer frisch getöteten Maus mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und mit dem Stempel einer 20 ml Spritze durch ein Metallsieb gerieben. Die Zellen wurden anschließend in ein 50 ml Falcon überführt und durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1500 g für 10 min in 20 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in RPMI 1640 Medium aufgenommen, die Zellen gezählt und auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Aktivierung der Milz T-Lymphozyten erfolgte durch Zugabe von 5 µg PHA/ml Medium (Sigma, Deisenhofen). Nach 48 h wurde das PHA durch Waschen der Zellen entfernt. Dazu wurden die Zellen bei 1500 g für 10 min zentrifugiert und das PHA-haltige Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde in frischem RPMI 1640 medium aufgenommen und, die Zellen gezählt und auf 3×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt. Dem Medium wurden 20 U/ml murines IL-2 (R&D Systems, Wiesbaden) zugesetzt.

2.2.2.8 Titerbestimmung von Virus-haltigen Überständen

Zur Titerbestimmung wurden ca. 24 Stunden vor der Transduktion mit den Virusüberständen 5×10^4 NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen pro Vertiefung einer 6 Well Zellkulturplatte ausgesät. Unter der Annahme, daß die Zellen alle 20 – 24 Stunden eine Teilung durchlaufen, wurde davon ausgegangen, daß sich zum Zeitpunkt der Transduktion 1×10^5 Zellen in jedem Well befinden. Die Transduktion wurde für die Titerbestimmung in allen Ansätzen mit der gleichen Anzahl von 1×10^5 Zielzellen und im gleichen Volumen von 3 ml durchgeführt. Hierzu wurde vor der Transduktion das Medium abgenommen und auf die Zellen 2 ml, 2900 μ l und 2990 μ l Medium gegeben und durch Zugabe von 1 ml, 100 μ l und 10 μ l Virusüberstand auf 3 ml ergänzt. 48 Stunden nach Zugabe der Virusüberstände, wurde der prozentuale Anteil der transduzierten Zellen im FACS analysiert.

Die Berechnung der Titer erfolgte nach der Formel:

$$\frac{(\% \text{ Anteil transd. Zellen} \times 10^5 \text{ Zellen})}{100} \times \frac{1}{\text{Vol. Virusüberstand (ml)}} = \text{IU/ml}$$

2.2.2.9 X-Gal Färbung von Zellkulturzellen und Gewebeschnitten

X-Gal Färbelösung : 5 mM Kaliumhexacyanoferrat (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}$,
5 mM Kaliumhexacyanoferrat (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 1 mM MgCl_2

Für die LacZ Färbung adhärenter Zellen wurden 2×10^5 Zellen/Vertiefung einer 6 Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert, das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Glutaraldehyd (1 ml PBS + 2 μ l 25 % Glutaraldehyd)/Vertiefung einer 6 Well Platte und 10 min Inkubation bei RT fixiert. Danach wurde die Fixierlösung abgezogen und die Zellen dreimal für 5 min mit 3 ml PBS gewaschen. Zum Färben der Zellen wurden 100 mg X-Gal in 1 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst und im Verhältnis 1 : 100 zur X-Gal Färbelösung zugesetzt. Von dieser Lösung wurden 1,5 ml auf die fixierten Zellen pipettiert und die Zellen für 2 – 24 h bei 37°C im

Brutschrank inkubiert. Die Färbung von Gewebeschnitten erfolgte durch Inkubation der, auf Objektträgern fixierten Schnitte in X-Gal Färbelösung für 48 h bei 37°C.

2.2.2.10 Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie wurde dazu genutzt, die Expression von membranständigen Proteinen nachzuweisen. Dazu wurden ca. 1×10^5 – 1×10^6 Zellen in 50 µl PBS mit dem jeweiligen Erstantikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 3 ml PBS gewaschen, 5 min bei 1500 rpm in einer Megafuge (Heraeus) abzentrifugiert und erneut 30 min in 50 µl PBS mit einem FITC- oder PE markierten Zweitantikörper inkubiert, wobei sich die eingesetzte Menge der Erst- und der Zweitantikörper nach den Angaben des Herstellers oder nach experimentell ermittelten Werten richtete. Anschließend wurden, durch oben beschriebenes, zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS ungebundene Antikörper entfernt. Das Zellpellet wurden nachfolgend in 250 – 500 µl PBS aufgenommen und im FACScan (Becton-Dickinson, Heidelberg) bestimmt.

2.2.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

2.2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus Säugerzellen

Lysepuffer : 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA pH 8.0, 1% NP40
1mM Pefabloc (Hofmann La Roche, Mannheim)

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl Lysepuffer/Vertiefung einer 6 Well Platte für 10 min auf Eis lysiert. Die lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber (Costar, Bodenheim) abgeschabt und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus) abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und nachfolgend für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunblot eingesetzt.

2.2.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Mausorganen

Zur Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde die Mausorgane gewogen und das Volumen, unter der Annahme, daß 1 mg einem 1 mm³ entspricht, bestimmt. Zu dem errechneten Gewicht eines jeden Organs, wurde die 10 fache Menge an Lysepuffer gegeben (2.2.3.4). Die Organe wurden anschließend in einem Homogenisator für 5 - 10 s bei 10 000 – 13 000 rpm zerkleinert und anschließend für 10 – 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die homogenisierten Organextrakte bei 13 000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Von dem Zelllysate wurden 3,3 μ l für die Durchführung der β -Galaktosidase Reaktion eingesetzt. Diese erfolgte wie unter 2.2.3.6 beschrieben.

2.2.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mit dem Protein Assay Kit von Biorad (München) durchgeführt. Es wurde dabei nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Pro Messung wurden 5 μ l Zellextrakt eingesetzt. Die Messung der Proben wurde bei 595 nm durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich der gemessenen OD-Werte mit einer BSA-Eichkurve.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Immunblot

Anodenpuffer I	300 mM Tris pH 10.4, 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris pH 10.4, 20 % Methanol
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 20 % Methanol, pH 10.4

Die Proteinproben wurden für 5 min in β -Mercaptoethanol haltigen Auftragspuffer bei 96°C unter reduzierenden Bedingungen und denaturiert und nachfolgend durch SDS-PAGE (Sambrook et al., 1989) in MINI-Protean II Kammern von Biorad (München) aufgetrennt. Die Elektrophorese durch das Sammelgel erfolgte im allgemeinen bei 180 V und durch das Trenngel bei 230 V. Die aufgetrennten Proteine wurden aus

dem Polyacrylamidgel in einer Halbtrockenblotapparat auf Nitrozellulosemembran (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Der Blot war folgendermaßen aufgebaut: Drei Lagen Whatman 3 MM Papier getränkt mit Anodenpuffer I, drei Lagen getränkt mit Anodenpuffer II, Nitrozellulosemembran, SDS-Polyacrylamidgel, sechs Lagen Whatman 3MM Papier getränkt mit Kathodenpuffer. Die Nitrozellulosemembran wurde zuvor kurz in destilliertem Wasser getränkt. Die Elektrophorese zum Transfer der Proteine wurde 1 h bei 100 mA (ca. 1 mA/cm² Membranfläche) durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindung auf der Nitrozellulosemembran zu reduzieren, wurde die Membran für mindestens 30 min in PBST (PBS + 0,05% Tween 20) mit 5% fettfreiem Milchpulver (Merck, Darmstadt) geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur (RT) unter leichtem Schütteln. Die Inkubation mit dem zweiten, HRP-gekoppelten Antikörper ebenfalls für 60 min bei RT unter leichtem Schütteln. Die jeweils eingesetzte Menge an Antikörpern richtete sich nach den Angaben des Herstellers oder nach experimentell ermittelten Werten. Nach den Antikörperinkubationsschritten, wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBST gewaschen. Der Bindungsnachweis der Antikörper erfolgte unter Verwendung des ECL-Chemolumineszenzsystems ECL-Amersham Plus (Amersham, Braunschweig). Das Kit wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers benutzt.

2.2.3.5 “Strippen” von Nitrozellulosemembranen

Sollte ein Immunblot erneut mit einem Erstantikörper inkubiert werden, wurde die entsprechende Nitrozellulosemembran durch 30 min Inkubation in “Stripping”-Puffer bei 45⁰C von den bereits gebundenen Antikörpern befreit. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min in TPBS gewaschen und erneut wie unter 2.2.3.4 beschrieben blockiert und mit Erst- und Zweitantikörper inkubiert.

2.2.3.6 Luciferase- und β -Galactosidase Assays

Lysepuffer : 25 mM Glycylglycin pH 7.8, 1 % Triton X-100, 8 mM MgSO₄,
1 mM DTT, 15 % Glyzerin, 1 mM EDTA und 1 % Triton X-100
(für Luciferase- und β -Galactosidase Assays)

β -Gal-

Reaktionspuffer : 1 mM MgCl₂, 100 mM Na₃PO₄ pH 8.0, 1x Galacton

Die Bestimmung der Luciferase- oder β -Galaktosidaseaktivität erfolgte 48 h nach transienter Transfektion. Dazu wurden die Zellen 2 x in PBS gewaschen, mit einem Zellschaber (Costar, Bodenheim) von den Zellkulturschalen abgeschabt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 5 min zentrifugieren bei 3000 rpm in einer Tischzentrifuge (Heraeus) wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 50 μ l Lysepuffer pro Vertiefung einer 12-well Zellkulturplatte lysiert und 10 min auf Eis inkubiert. Das lysierte Zellpellet wurden anschließend bei 13 000 rpm für 10 min bei 4°C in einer Tischzentrifuge (Heraeus) zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 10 μ l für die Durchführung von Luciferase- und 3,3 μ l für die β -Galaktosidase Reaktion verwandt. Für die β -Galaktosidase-Reaktion wurde der Überstand bei Dunkelheit 45 min bei RT in je 33 μ l β -Gal Reaktionspuffer inkubiert. Die Luminometer fügte automatisch 60 μ l Luciferase-Substrat [(20 ml 0.2M Tricine), 104 mg $\text{Mg}(\text{CO}_3) 4\text{xMg}(\text{OH})_2 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2 ml 10 mM EDTA pH 8.0 1 g DTT, ad 160 ml mit destilliertem Wasser auf pH 7.8, 212 μ l 0,5 M ATP, 40 mg Coenzym A, 26 mg Luciferin, ad 200 ml mit destilliertem Wasser] zu der Luciferase-Reaktion, und die gleiche Menge an Amplifier-Lösung (400 μ l 5 M NaOH, 1 ml Emerald Tropix, 8,6 ml destilliertes Wasser) der β -Galaktosidase-Reaktion hinzu. Die β -Galaktosidase Werte wurden durch die Luciferase Werte geteilt und mit dem Kehrwert der Proteinmenge multipliziert. Die so ermittelten Werte wurden als relative Lichteinheiten/mg Protein (RLU/mg Protein) angegeben.

2.2.4 Immunhistochemische Arbeitsmethoden

2.2.4.1 Immunhistochemische Analyse von Zellkulturzellen

Zur immunhistochemischen Analyse wurden sterile, 1 cm² große Deckgläschen in die Vertiefungen einer 6 Well Platte gelegt, 1 x10⁵ Zellen/Well ausgesät und über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Vor dem Fixieren der Zellen wurde das Medium abgezogen und die Zellen 1 x mit PBS gewaschen. Das Fixieren der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml auf -20°C vorgekühltem Methanol/Aceton (50% : 50%) und einer 10 min Inkubation bei -20°C. Anschließend wurde das Methanol/Aceton Gemisch abgesaugt und die Deckgläser getrocknet. Um zu verhindern, daß der in 100 μ l PBS gelöste Antikörper verläuft, wurden vor Zugabe der Antikörper die Deckgläser mit einem Pap Pen umrandet. Die Inkubation mit dem Erstantikörper und mit dem FITC gekoppelten Zweitantikörper erfolgten für jeweils 60

min in einer feuchten Kammer. Die jeweils eingesetzte Menge an Antikörpern richtete sich nach den Angaben des Herstellers oder nach experimentell ermittelten Werten. Nach den Antikörperinkubationsschritten, wurden die Deckgläschen drei mal für 5 min mit PBS gewaschen. Um ein schnelles Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden, wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Moviol (Sigma, Deisenhofen) eingedeckt. Der Bindungsnachweis der Antikörper erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops.

2.2.4.2 Anfertigung von Gefrierschnitten von Mausorganen

Zum Anfertigen von Gefrierschnitten wurden die frisch präparierten Organe zum Schutz vor dem Austrocknen mit OCT Medium überschichtet und anschließend mit Stickstoff tiefgefroren. Die eingefrorenen Organe wurden bis zur Anfertigung der Gefrierschnitte bei -80°C gelagert. Zum Anfertigen der Gewebeschnitte wurden die gefrorenen Organe mit einem Mikrotom in 2-5 μm dicke Scheiben geschnitten, auf Objektträger überführt und mit PBS + 2% Glutaraldehyd fixiert.

2.2.4.3 Anfertigung von Paraffinschnitten von Mausorganen

Für die Anfertigung von Paraffinschnitten wurden die frisch präparierten Organe unmittelbar nach der Entnahme in PBS + 4% Formalin überführt und durch eine 24 – 48 h Inkubation bei 4°C fixiert. Anschließend wurden die Organe für 48 h in 70% Ethanol eingelegt und nachfolgend für die Anfertigung von Gewebeschnitten in Paraffin eingebettet. Danach wurden die Paraffinblöcke mit einem Mikrotom in 2-5 μm dicke Scheiben geschnitten und auf Objektträger überführt.

2.2.4.4 Immunhistochemische Analyse von Gewebeschnitten

Vor Durchführung der immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten wurde eine Antigendemaskierung vorgenommen. Dazu wurden die Schnitte zunächst in 96% Ethanol getaucht, anschließend für 10 min in Methanol + 3% H_2O_2 inkubiert und nachfolgend kurz unter fließendem Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden die Schnitte bis zur Durchführung der Antikörperfärbung in PBS gestellt.

Wurde die Antigendemaskierung in der Mikrowelle vorgenommen, wurden die Schnitte in Citratpuffer pH 6.0 (Stammlösung A: Citronensäure-mono-hydrat 21,01 g + 1L dest. Wasser; Stammlösung B: Na-citrat-tri-hydrat 29,41 g + 1L dest. Wasser; Gebrauchslösung: Stammlösung A: 9 ml + Stammlösung B: 41 ml + 450 ml dest. Wasser) gestellt und für 1 x 3 min bis 9 x 3 min in Citratpuffer bei 750 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden die Schnitte für 20 min bei RT abgekühlt und nachfolgend mit dest. Wasser gespült. Bis zur Färbung wurden die Schnitte in PBS stehen gelassen.

Zur Durchführung der Immunhistochemischenfärbung wurde der primäre Antikörper entsprechend den Angaben des Herstellers in PBS verdünnt und die Schnitte 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte für mit fließendem Leitungswasser kurz abgespült und für 4 min in ACP-Puffer (Acetat-Puffer) pH 4.0 (Na-acetat-tri-hydrat 8,2 g + 1L dest. Wasser, pH mit Eisessig auf pH 4.0 einstellen) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 x für 3 min in PBS gewaschen.

Um eine Verstärkung des Signals zu erhalten, wurden die Schnitte nacheinander mit zwei sekundären Antikörpern (I+II) inkubiert. Der sekundäre Antikörper I und der sekundäre Biotin gekoppelte Antikörper II wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in PBS verdünnt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte für jeweils 30 min bei 37°C. Die Waschschrte wurden wie nach der Inkubation mit dem primären Antikörper durchgeführt. Das Streptavidin-HRP Konjugat wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verdünnt und die Antikörper markierten Schnitte für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mit fließendem Leitungswasser kurz gespült und für 5 min in ACP-Puffer pH 4.0 stehen gelassen.

Zur Durchführung der Färbereaktion wurden die Schnitte für 10 – 40 min mit AEC-Substratlösung (AEC-Stammlösung: 3-Amino-9-Ethylcarbazol 0,2 g + 50 ml N,N-Dimethylformamid; AEC-Substratlösung: ACP-Puffer pH 5.2 70 ml + 30% H₂O₂ 100 µl + 5 ml AEC-Stammlösung) inkubiert. Nach Abschluß der Färbereaktion wurden die Schnitte kurz mit Leitungswasser gespült und anschließend mit Aquatex (Merck, Darmstadt) eingedeckt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung vektorfreier Verpackungszelllinien zur Produktion MLV/HIV pseudotypisierter retroviraler Vektoren

Retrovirale Vektoren sind Gentransfervehikel, die Gene in Zellen einbringen können und weite Anwendung in der Gentherapie gefunden haben. Zielzellspezifische Vektoren ermöglichen eine systemische Anwendung der Vektorpartikel *in vivo* und würden die Prozedur der Gentherapie erheblich vereinfachen. Retrovirale Vektoren sind replikationsinkompetent und müssen durch Verpackungszellen produziert werden. Diese exprimieren stabil die kapsidbildenden Proteine von MLV Gag und Pol sowie das HIV-Envelopeprotein (Env), jedoch kein Vektorgenom.

Eine Zielzellspezifität des Gentransfers für CD4 positive Zellen wird durch Pseudotypvektoren bestehend aus Moloney Maus-Leukemie-Virus (Mo-MLV) Kapsiden und dem HIV Env erreicht. In Vorexperimenten wurde für MLV/HIV-1, MLV/HIV-2 und MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren gezeigt, daß ein effizienter Einbau der Env Proteine in MLV-Kapside nur möglich ist, wenn C-terminal verkürzte Varianten der HIV Env Proteine oder des SIV Env Proteins verwandt werden (Schnierle et al., 1997; Mammano et al., 1997; Höhne et al., 1999). Die zytoplasmatische Domäne des Transmembranproteins (gp41) besteht im Falle der verkürzten HIV Envelopeproteine aus nur noch 7 Aminosäuren. Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung des Wildtyp HIV-1 Env Proteins, sowie der abgeleiteten auf 7 Aminosäuren C-terminal verkürzten HIV-1, HIV-2 und SHIV-89.6P Env Varianten.

Erstes Ziel der Arbeit war, die Etablierung vektorfreier Verpackungszelllinien, die einen flexiblen Austausch des therapeutischen Vektors ermöglichen und hohe Mengen infektiöser Viruspartikel freisetzen. Vorangegangene Experimente hatten gezeigt, daß HIV Env Proteine offensichtlich toxische Eigenschaften in stabil HIV Env exprimierenden Zellen haben; die Zellen

verloren nach wenigen Wochen die Expression von HIV-1 Env (Klingenberg, Dissertation, Universität Freiburg, 1998). Daher wurden zwei unterschiedliche Strategien zur stabilen Expression von HIV Env getestet. Hierzu wurde versucht mit bicistronischen Expressionskonstrukten und mit Hilfe des Tet on induzierbaren Systems stabil HIV Env exprimierende Verpackungszelllinien zu etablieren.

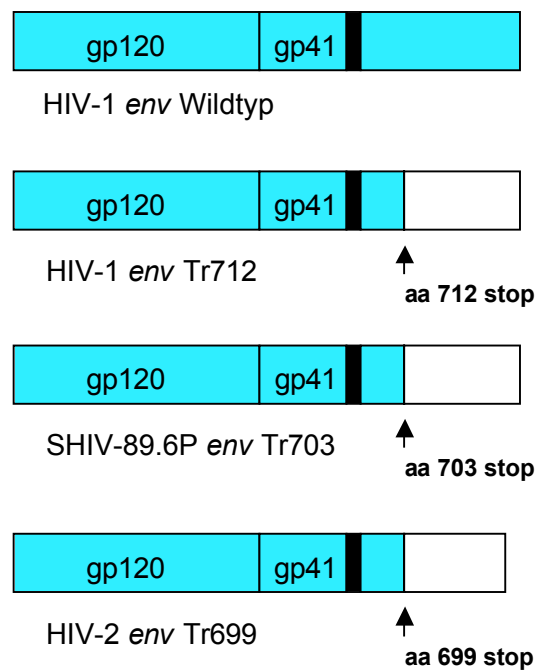


Abb.3.1 Schematische Darstellung des Wildtyp HIV-1 Env Proteins, sowie die C-terminal verkürzten HIV-1, HIV-2 und SHIV-89.6P Varianten. Als Vorläuferproteine gp160 werden die HIV Env Proteine durch zelluläre Proteasen in die N-terminale externe Domäne gp120 und die C-terminale Transmembrandomäne gp41 gespalten. Die Verkürzung der C-terminalen Transmembrandomäne gp41 wurde durch das Einfügen von Stopcodons durch Punktmutationen an Position 712 im gp41 von HIV-1 *env* (Schnierle et al., 1997) und an Position 703 im gp41 von SHIV-89.6P *env* (Wagner, nicht veröffentlichte Daten) und Position 699 im gp41 von HIV-2 *env* (Höhne et al., 1999) erreicht.

3.1.1 Etablierung MLV/HIV pseudotypisierter retroviraler Vektoren exprimierende Verpackungszelllinien mit Hilfe bicistronischer HIV *env* Expressionskonstrukte

In vorangegangenen Versuchen zur Herstellung stabil HIV-1 Env exprimierender Zelllinien, wurde die Expression des HIV Env und des Selektionsmarkers von zwei getrennten Promotoren kontrolliert. Trotz konstanten Selektionsdrucks ließ die HIV-1 Env Expression nach längerer Kultivierung der Zellen nach. Um diese Komplikationen zu vermeiden, wurde versucht mit Hilfe bicistronischer HIV-1 *env*, SHIV-89.6P *env* und HIV-2 *env* Expressionskonstrukte eine dauerhafte stabile Expression zu erreichen. Bei Gebrauch des bicistronischen eukaryontischen Expressionsvektors pEF-IRES-P (Hobbs et al., 1997) erfolgt die Expression des HIV *env* Gens und des Puromycinresistenzgens durch den selben Promoter. Beide Gene befinden sich auf einer bicistronischen mRNA, was eine besonders effiziente Selektion ermöglicht, da alle puromycinresistenten Zellen auch das HIV Env Protein exprimieren. Das Auftreten falsch positiver Klone wird dadurch minimiert. Ein weiterer Vorteil des Vektors pEF-IRES-P ist der Gebrauch des humanen Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α) Promoters. Im Gegensatz zu viralen Promotoren, werden eukaryontische Promotoren in humanen Zellen weniger häufig modifiziert, was eine lange Aufrechterhaltung der Expression des HIV *env* Gens ermöglichen sollte.

3.1.1.1 Klonierung der bicistronischen Expressionskonstrukte pEF-IRES-P-Tr712, pEF-IRES-89.6P-Tr712 und pEF-IRES-P-Tr699

Das T-trophe, C-terminal verkürzte HIV-1 *env* Gen wurde aus dem Plasmid pL β Ac/envTr712-neo (Schnierle et al., 1997) mit den Restriktionsenzymen *Sal* I und *Xho* I herausgeschnitten. Das 3,1 kb Fragment trägt ein Stopcodon an Aminosäure 712 des Env Proteins und wurde in die *Xho* I Schnittstelle des

bicistronischen Vektors pEF-IRES-P (Hobbs et al., 1997) kloniert. Das entstandene bicistronische HIV-1 *env* Expressionskonstrukt bekam die Bezeichnung pEF-IRES-P-Tr712 (Thaler et al., 2001). Die C-terminal verkürzte dualotrophe Variante des SHIV-89.6P *env* Tr703 Env Proteingens wurde aus dem Plasmid pcDNA89.6P-syn-CD5-Tmneu (R. Wagner, Regensburg unveröffentlichte Daten) mit den Restriktionsenzymen *Xho* I und *EcoR* I herausgeschnitten. Die Einzelstrangenden des 2,1 kb *Xho* I und *EcoR* I Fragments wurden im Anschluß durch Behandlung mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in den bicistronischen Vektor pEF-IRES-P, der zunächst mit *Xho* I geschnitten und die überhängenden Einzelstrangenden nachfolgend mit Klenow Polymerase aufgefüllt wurden, kloniert. Das entstandene bicistronische SHIV-89.6P *env* Tr703 Expressionskonstrukt bekam die Bezeichnung pEF-IRES-P-89.6P-Tr703.

Die T-trophe C-terminal verkürzte Variante des HIV-2 *env* Tr699 Envelopeproteingens wurde aus dem Plasmid pCMV-HIV-2 Tr699 (Höhne et al., 1999) durch einen Partialverdau mit *BamH* I und *Xho* I herausgeschnitten. Die Einzelstrangenden des 2,3 kb *BamH* I und *Xho* I wurden nachfolgend mit Klenow Polymerase aufgefüllt. Dieses Fragment wurde in den bicistronischen Vektor pEF-IRES-P, der zunächst mit *Xho* I geschnitten und die überhängenden Einzelstrangenden nachfolgend mit Klenow Polymerase aufgefüllt wurden, kloniert. Das entstandene bicistronische HIV-2 *env* Tr699 Expressionskonstrukt bekam die Bezeichnung pEF-IRES-P-Tr699.

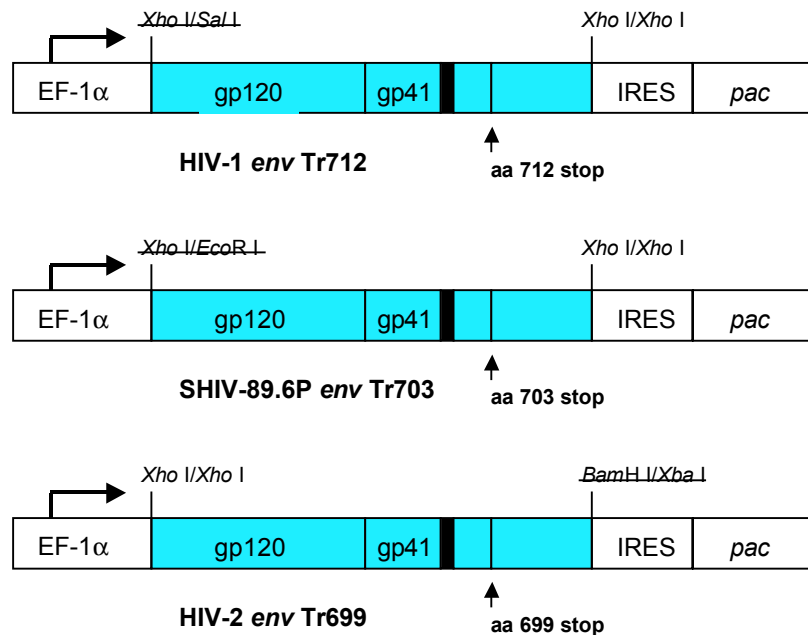


Abb. 3.1.1.1 Schematische Darstellung der drei bicistronischen HIV env Expressionskonstrukte pEF-IRES-P-Tr712 pEF-IRES-P-89.6P-Tr703 und pEF-IRES-P-Tr699.

3.1.1.2 Stabile Transfektion von FLY Zellen mit dem bicistronischen Expressionskonstrukten pEF-IRES-P-Tr712, pEF-IRES-P-89.6P-Tr712 und pEF-IRES-P-Tr699

Als Ausgangszelllinie zur Herstellung stabil MLV/HIV-1, MLV/HIV-2 oder MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren exprimierender Verpackungszellen, wurde die Verpackungszelllinie FLY benutzt (Cosset et al., 1995). FLY exprimiert bereits stabil die kapsidbildenden Proteine von MLV Gag und Pol.

Für die stabile Transfektion wurden 10^6 FLY Zellen auf einer 10 cm Ø Zellkulturschale ausgesät und am nächsten Tag mit 10 µg der bicistronischen Expressionskonstrukte pEF-IRES-P-Tr712 (Thaler et al., 2001) oder pEF-IRES-P-89.6P-Tr712 oder pEF-IRES-P-Tr699 transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde mit der Puromycinselektion der transfizierten Zellen

begonnen. 14 - 21 Tage später wurden (mit Ausnahme der mit pEF-IRES-P-Tr699 transfizierten Zellen) einzelne transfizierte, puromycinresistente Klone isoliert.

Wurden die FLY Zellen mit pEF-IRES-P-Tr699 transfiziert kam es nicht zur Bildung puromycinresistenter Einzelklone. Offensichtlich kam es zum Absterben der pEF-IRES-P-Tr699 transfizierten und HIV-2 Env exprimierenden Zellen.

Die mit pEF-IRES-P-Tr712 oder pEF-IRES-P-89.6P-Tr703 transfizierten Einzelzellklone wurden auf die Expression von HIV-1 Env oder SHIV-89.6P Env durch die Bildung von Synzytien nach Kokultivieren mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen getestet. Werden HIV Env exprimierende Zellen mit CD4/CXCR4 exprimierenden NIH3T3 Zellen kokultiviert, kommt es in Folge der Interaktion von T-tropen oder dualotropen HIV Env mit dem CD4 und dem CXCR4 Rezeptor auf der Oberfläche von benachbarten NIH3T3 Zellen zur Verschmelzung der Zellmembranen. In Folge kommt es zur Bildung mehrkerniger Riesenzellen (Synzytien).

Die Klone, die die stärkste Synzytienbildung zeigten, wurden nachfolgend im Western Blot auf Expression des HIV-1 oder SHIV-89.6P Env Proteins untersucht. Alle getesteten Klone zeigten HIV-1 oder SHIV-89.6P Env Expression, jedoch mit unterschiedlichen Expressionsstärken. Die Klone mit der höchsten Expression von Env waren für pEF-IRES-P-Tr712 der Klon FLY-HIV-87 und für pEF-IRES-P-89.6P-Tr703 der Klon FLY-SHIV-89.6P-152 (siehe Abb. **3.1.1.2-1a** u. **b**).

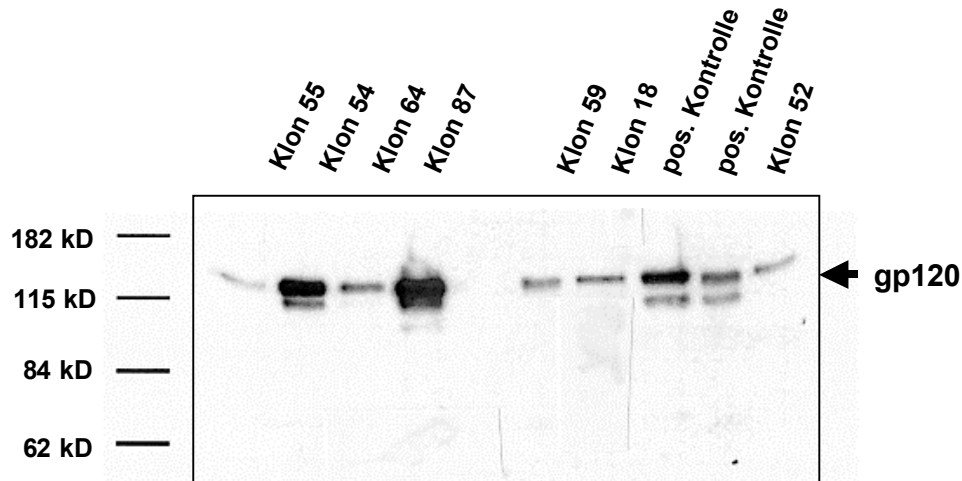


Abb. 3.1.1.2-1 a) Western Blot Analyse der mit pEF-IRES-P-Tr712 erhaltenen Einzelzellklone. Die nach der Puromycinselektion erhaltenen, mit dem Konstrukt pEF-IRES-P-Tr712 stabil transfizierten Einzelzellklone, waren zunächst im Synzytienassay durch Kokultivieren mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen auf Expression von HIV-1 Env untersucht worden. Von den nach der Puromycinselektion erhaltenen 40 Zellklonen zeigten alle Synzytienbildung. Zellen der 17 am stärksten synzytienbildenden Klone wurden anschließend für Western Blot Analyse lysiert. Von jedem Klon wurden 80 μ g Lysat aufgetragen und in einem 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch durch Inkubation mit dem anti gp120 Antiserum (Bioscience Resource Project, Asbach) und dem sekundären HRP-gekoppelten anti-Ziegen Antikörper (Dianova, Hamburg) nachgewiesen. Als positiv Kontrolle wurden 80 μ g und 40 μ g Lysat der HIV-1 gp120 exprimierenden Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17 (Schnierle et al., 1997) aufgetragen.

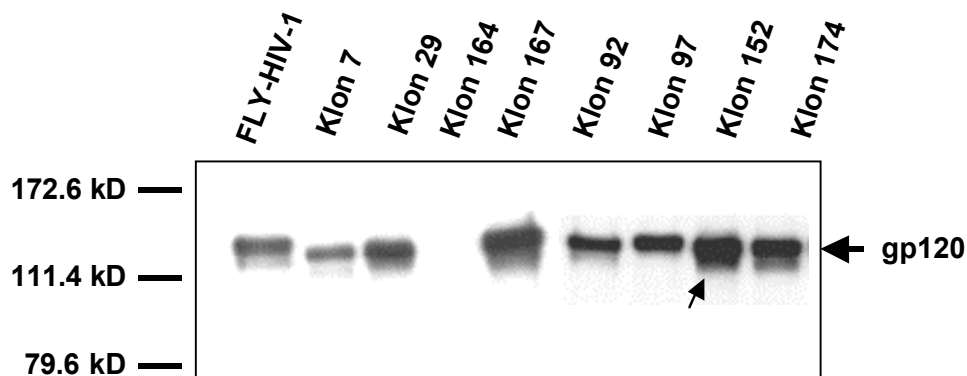
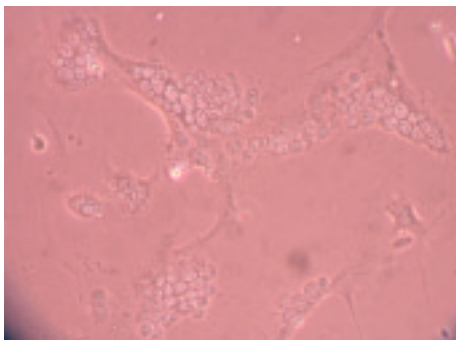


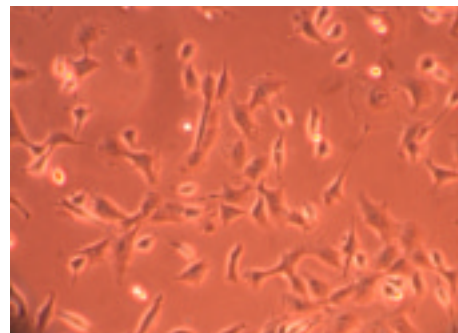
Abb. 3.1.1.2-1 b) Western Blot Analyse der mit pEF-IRES-P-89.6P-Tr712 stabil transfizierten Einzelzellklone. Von 45 im Synzytienassay getesteten Klone wurden nachfolgenden Zellen der 23 Klone, die die stärkste Synzytienbildung zeigten für Western Blot Analysen lysiert. Von jedem Klon wurden 80 μ g Lysat auf ein 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch durch Inkubation mit dem anti-gp120 Antiserum (Bioscience Resource Project, Asbach) und dem sekundären

HRP-gekoppelten anti-Ziegen Antikörper (Dianova, Hamburg) untersucht. Als positiv Kontrolle wurden gleiche Mengen an Lysat von FLY-HIV-87 aufgetragen.

Kokultivieren von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren exprimierenden FLY-HIV-87 Zellen mit CD4/CXCR4 exprimierenden NIH3T3 Zellen führt zur Bildung von Synzytien. Kokultivieren von FLY-HIV-87 mit NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen führt dagegen nicht zur Bildung von Synzytien (siehe Abb. **3.1.1.2-2 a)** u. **b)**). Kokultivieren von MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren exprimierenden FLY-SHIV-89.6P-152 Zellen führt auf Grund des dualotrophen SHIV-89.6P Env sowohl mit CD4/CXCR4 als auch mit CD/CCR5 exprimierenden NIH3T3 Zellen zur Bildung von Synzytien (siehe Abb. **3.1.1.2-2 c)** u. **d)**). Kokultivieren von untransfizierten FLY Zellen führt dagegen nicht zur Bildung von Synzytien (siehe Abb. **3.1.1.2-2 e)** u. **f)**).



**a) FLY-HIV-87 +
NIH3T3 CD4/CXCR4**



**b) FLY-HIV-87 +
NIH3T3 CD4/CCR5**

Abb. 3.1.1.2-2 a) Synzytienbildung durch Kokultivieren von FLY-HIV-87 mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen. Nach 90 min waren ungefähr 90% der Zellen zu Synzytien verschmolzen. **b)** Kokultivieren von FLY-HIV-87 Zellen mit NIH3T3 CD4/CCR5 führte nicht zur Bildung von Synzytien.

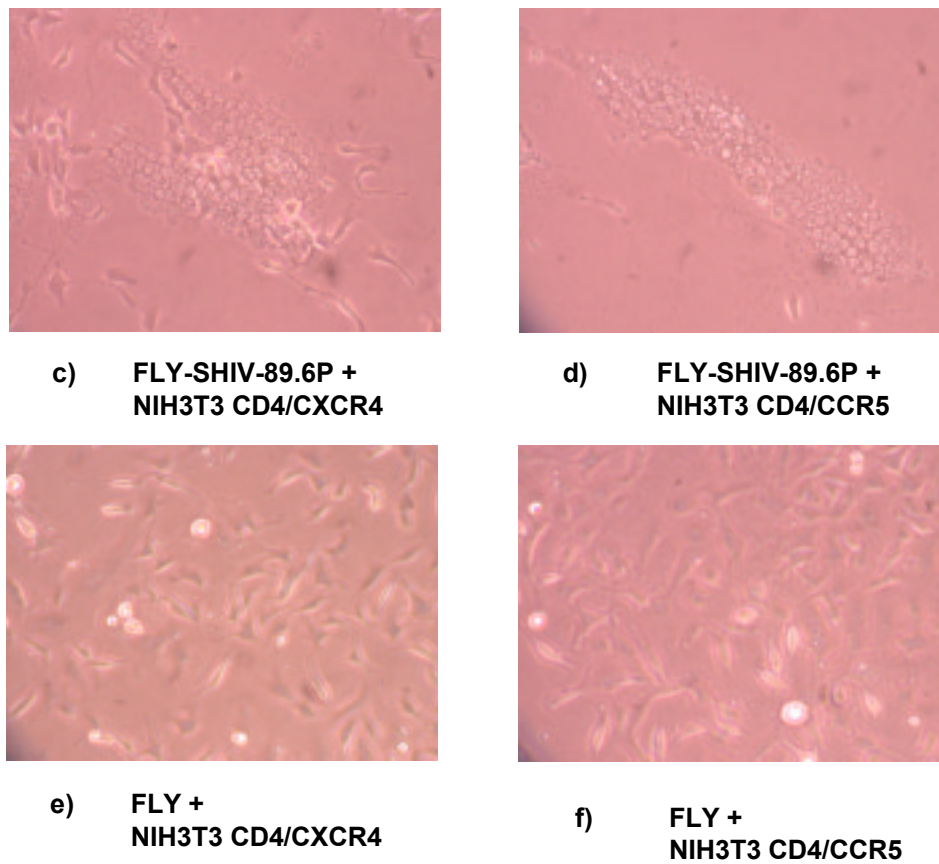


Abb. 3.1.1.2-2 c) Synzytienbildung durch Kokultivieren von FLY-SHIV-89.6P-152 mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen und d) NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen. Nach 90 min waren in beiden Ansätzen fast 100% der Zellen zu Synzytien verschmolzen. e) Kokultivieren von untransfizierten FLY Zellen mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen und f) NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen führt nicht zur Bildung von Synzytien.

3.1.2 Etablierung einer tet induzierbar HIV-2 Env exprimierenden Verpackungszelllinie

Alle vorangegangenen Bemühungen als auch der Versuch mit Hilfe eines bicistronischen HIV-2 Env Expressionskonstrukts zur Etablierung einer konstitutiv HIV-2 Env exprimierenden Verpackungszelllinie waren auf Grund der toxischen Eigenschaften des HIV-2 Env gescheitert. Daher wurde versucht eine tet induzierbar HIV-2 Env exprimierende Verpackungszelle zu etablieren.

Das Prinzip des “tet on“ induzierbaren Systems sieht vor, daß die Expression von Genen gezielt durch Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin angeschaltet werden kann. Dies ermöglicht Zellen mit Genen auszustatten, die für toxische Gene kodieren ohne die Zellen dadurch zu töten. D.h. das toxische HIV-2 Env wird nur nach Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin exprimiert (siehe Abb 3.1.2).

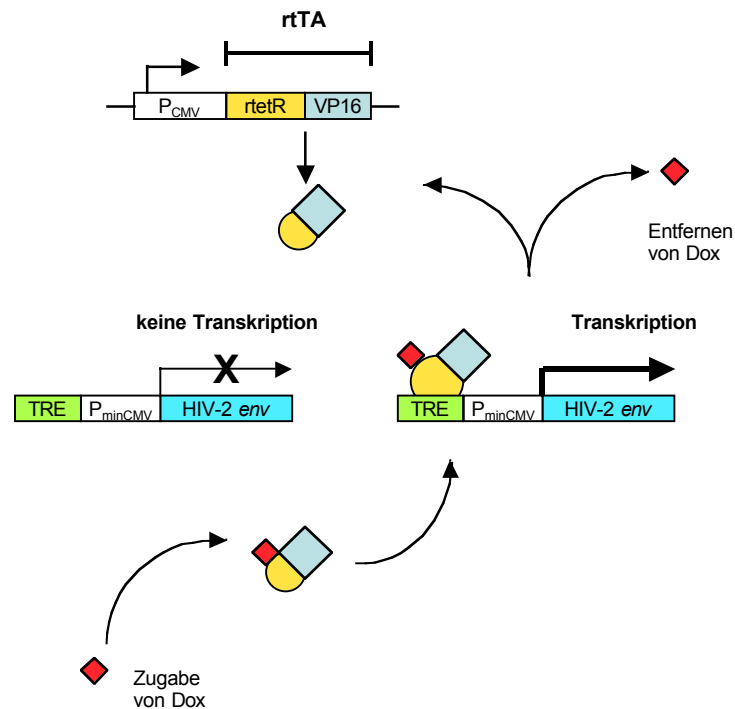


Abb. 3.1.2 Prinzip des tet on induzierbaren Systems. Der tet kontrollierte reverse Transkriptionsaktivator (rtTA) ist ein Fusionsprotein aus dem mutierten Tet Repressor und aus der VP16 Transaktivierungsdomäne des Herpes Simplex Virus. Der reverse tet Repressor (rTetR) besitzt eine vier Aminosäuren umfassende Mutation, die bewirkt, daß er im Gegensatz zum Wildtyp tet Repressor in Gegenwart von Tetracyclin oder Doxycyclin an die Sequenz des Transresponselement (TRE) bindet und die Transkription aktiviert (Gossen et al., 1995).

3.1.2.1 Klonierung der tet induzierbaren HIV Env Expressionskonstrukte pBI-3-HIV-1 Tr712 und pBI-3-HIV-2 Tr699

Zur Herstellung des tet induzierbaren HIV-1 Env Expressionskonstrukts, wurde das Gen für die C-terminal verkürzte Variante des HIV-1 *env* mit den Restriktionsenzymen *Sal* I und *Xho* I aus dem Ausgangskonstrukt

pL β Ac/envTr712-neo (Schnierle et al., 1997) herausgeschnitten und in die *Sal* I Schnittstelle des tet induzierbaren Plasmids pBI-3 (Baron et al., 1995) kloniert. Das entstandene tet induzierbare Konstrukt wurde als pBI-3 HIV-1 Tr712 bezeichnet (siehe Abb. 3.1.2.1 a)).

Für das tet induzierbare HIV-2 Env Expressionskonstrukt, wurde das Gen für die C-terminal verkürzte Variante des HIV-2 *env* mit den Restriktionsenzymen *Sal* I und *Xho* I aus dem Konstrukt pCMV-HIV-2 Tr699 (Höhne et al., 1999) herausgeschnitten und in die *Sal* I Schnittstelle des Plasmids pBI-3 kloniert. Das Konstrukt erhielt die Bezeichnung pBI-3 HIV-2 Tr699 (siehe Abb. 3.1.2.1 b)). Das Plasmid pBI-3 enthält einen bidirektionalen Promotor P_{bi-1}, welcher eine heptamerisierende tet-operator Sequenz enthält und von zwei entgegengesetzt orientierten hCMV minimal Promotoren flankiert wird. Dies ermöglicht die gleichzeitige tet induzierbare Expression des HIV Env Proteins und des Reportergens LacZ. Auf diese Weise können die pBI-3 Konstrukte nicht nur als HIV Env Expressionskonstrukte sondern auch als Reportergenkonstrukte genutzt werden.

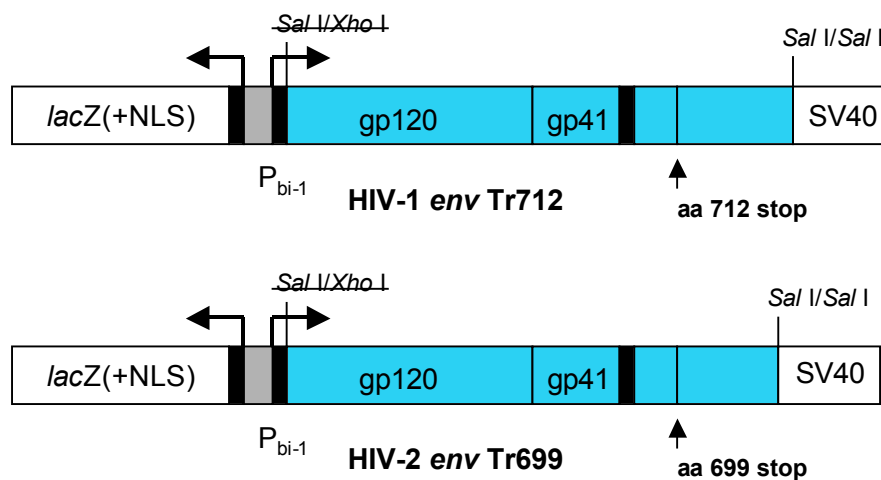


Abb. 3.1.2.1-1 a) Die tet induzierbaren HIV *env* Expressionskonstrukte pBI-3 HIV-1 Tr712 und **b)** pBI-3 HIV-2 Tr699. Das Plasmid pBI-3 enthält als regulatorische Elemente einen bidirektionalen Promotor P_{bi-1}, welcher eine heptamerisierte *tet*-operator Sequenz enthält und von zwei entgegengesetzt orientierten hCMV minimal Promotoren flankiert wird.

3.1.2.2 Herstellung einer tet induzierbar HIV-2 Env exprimierenden Verpackungszelllinie FLY-HIV-2 i-Env

Im ersten Schritt wurden das Puromycinresistenzplasmid pPUR und das tet-Repressorkonstrukt pUHG 17-1 (G-17-1) (Gossen et al., 1995) in die Verpackungszelllinie FLY transfiziert. Um zu gewährleisten, daß alle nach der Puromycinselektion erhaltenen Klone neben dem Puromycinmycinresistenzplasmid auch das tet-Repressorkonstrukt enthalten, wurden Resistenzplasmid und das Repressorkonstrukt im Verhältnis 1 : 10 für die Transfektion eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert und Einzelzellklone isoliert.

40 puromycinresistente Klone wurden auf Expression des tet-Repressors getestet. Hierzu wurden die Klone transient mit dem, die tet-Repressorbindungssequenz enthaltenden Plasmid pBI-3 (Baron et al., 1995) und einem Luciferase-Reporterplasmid transient transfiziert. 48 Stunden nach Induktion durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin wurden die Zellen geerntet und im β-Gal- und Luciferase-Assays getestet. Die Berechnung der Aktivierung erfolgte nach der Formel $[\beta\text{-Gal-Aktivität} : \text{Luciferaseaktivität}] : \text{Proteinkonzentration}$ (Daten nicht gezeigt). Die Klone, die im Reporter-Assay als positiv getestet wurden, wurden anschließend transient mit dem tet-induzierbar HIV-1 Env exprimierenden Konstrukt pBI-3 HIV-1 Tr712 transfiziert und 48 Stunden nach Induktion im Western Blot auf HIV-1 Env Expression getestet. Klon FLY G-17-1 Nr. 3 zeigte die höchste HIV-1 Env Expression und wurde nachfolgend für die stabile Transfektion mit dem induzierbaren HIV-2 Env Expressionskonstrukt pBI-3 HIV-2 Tr699 verwandt (siehe Abb. 3.1.2.2-2 a) u. b)).

Vor der stabilen Transfektion der Zelllinie FLY G-17-1 Nr. 3 mit dem tet induzierbaren HIV-2 Env exprimierenden Konstrukt pBI-3 HIV-2 Tr699 wurde das Konstrukt transienten auf Funktionalität und Expressionsstärke getestet. 48 Stunden nach Induktion wurden die transfizierten Zellen lysiert und im

Western Blot auf HIV-2 Env Expression im induzierten Zustand untersucht (siehe Abb. 3.1.2.2-3). FLY G-17-1 Nr. 3 zeigt nach transients Transfektion mit pBI-3 HIV-2 Tr699 und Doxycyclin Induktion eindeutig HIV-2 Env Expression ohne Zugabe von Doxycyclin war dagegen keine HIV-2 Env Expression zu erkennen.

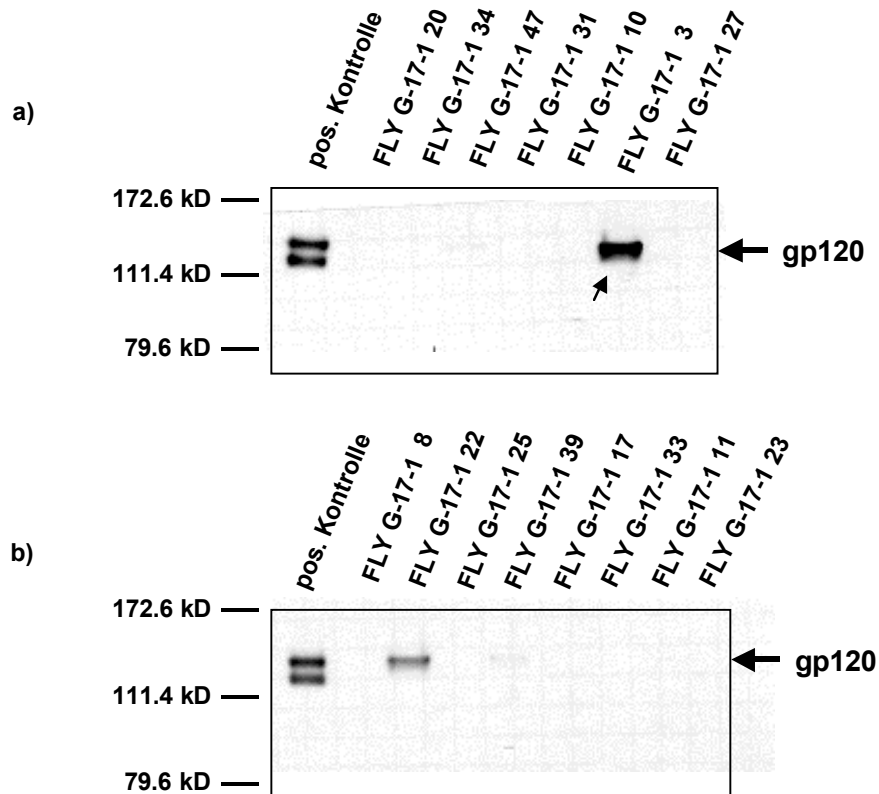


Abb. 3.1.2.2-2 a) u. b) Westernblot Analyse der, im Reporteragen-Assay positiv getesteten, stabil mit dem tet-Repressorkonstrukt pUHG 17-1 transfizierten FLY G-17-1 Klone. Die Klone wurden anschließend transient mit dem tet-induzierbaren HIV-1 Env Expressionskonstrukt pBI-3 HIV-1 Tr712 transfiziert und 48 h nach Induktion im Western Blot auf HIV-1 Env Expression getestet. Klon FLY G-17-1 Nr. 3 zeigte die höchste HIV-1 gp120 Expression.

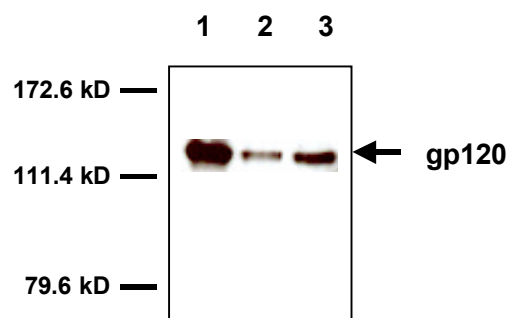


Abb. 3.1.2.2-3 Western Blot Analyse zur Überprüfung des tet-induzierbaren HIV-2 Env Konstrukts pBI-3 HIV-2 Tr699. 1) Als positiv Kontrolle wurden mit dem Konstrukt

pCMV-HIV-2 Tr699 (Höhne et al., 1999) transient transfizierte Phönix GP Zellen benutzt. **2)** Zum Testen der Funktionalität und der Expressionsstärke des tet-induzierbaren Konstrukts pBI-3 HIV-2 Tr699 wurde die Ausgangszelllinie FLY transient mit den Konstrukten pUHG 17-1 (G-17-1) und pBI-3 HIV-2 Tr699 transfiziert. **3)** Transiente Transfektion der Zelllinie FLY G-17-1 Nr. 3 mit dem tet-induzierbaren Konstrukt pBI-3 HIV-2 Tr699. Es wurden je Probe 80µg Zellysate aufgetragen und nach Transferieren auf eine Nitrozellulosemembran mit anti-HIV-2 Patientenserum (L.Gürtler, Greifswald) und dem sekundären HRP-gekoppelten anti-Human Antikörper (Dianova, Hamburg) detektiert.

Zur Herstellung einer tet induzierbaren MLV/HIV-2 Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinie wurde Klon FLY G-17-1 Nr. 3 mit dem Hygromycinresistenzplasmid pX343 (L. Nagamine, FMI, Basel) und dem induzierbaren HIV-2 Env Expressionskonstrukt pBI-3 HIV-2 Tr699 stabil transfiziert. Das Resistenzplasmid und das HIV-2 Env Expressionskonstrukt im Verhältnis 1 : 10 eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Hygromycin selektioniert und Einzelzellklone isoliert. Die Einzelzellklone wurden nach Induktion auf Expression von HIV-2 Env durch die Bildung von Synzytien nach Kokultivieren mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen getestet. Kommt es zur Expression von HIV-2 Env und zum Transport des Proteins an die Zelloberfläche, führt dies zur Interaktion von HIV-2 Env und den CD4/CXCR4 Rezeptoren auf der Oberfläche von benachbarten Zellen, wodurch es zur Verschmelzung der Zellmembranen kommt. In Folge kommt es zur Bildung mehrkerniger Riesenzellen (Synzytien).

4 von insgesamt 11 nach der Hygromycinselektion erhaltenen Einzelzellklonen zeigten 48 h nach Induktion mit Doxycyclin Synzytienbildung und wurden nachfolgend im Western Blot Expression im induzierten und nicht induzierten Zustand auf Expression von HIV-2 Env untersucht.

3 der 4 getesteten FLY-HIV-2 i-Env Klone zeigten nach Induktion HIV-2 Env Expression, jedoch mit unterschiedlichen Expressionsstärken. FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 zeigte die höchste HIV-2 Envelopeprotein Expression in der Western Blot Analyse sowie die stärkste Synzytienbildung (siehe Abb. **3.1.2.2-3** und **3.1.2.2-4**).

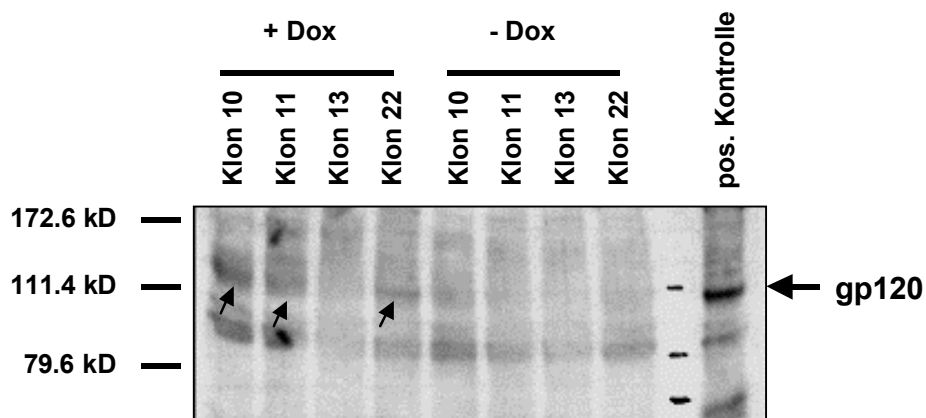
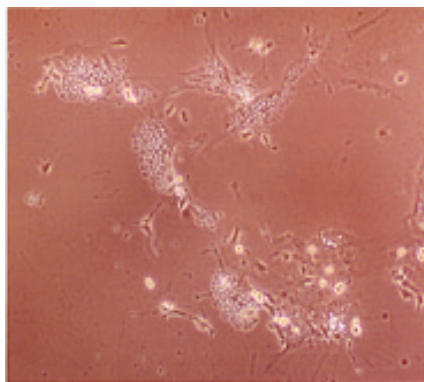
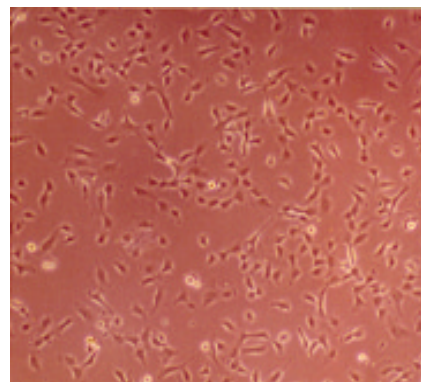


Abb. 3.1.2.2-3 Western Blot Analyse der durch Hygromycinselektion erhaltenen FLY-HIV-2 i-Env Einzelzellklone. Die Zellklone wurden 48 h nach Induktion und im nicht induzierten Zustand für die Western Blot Analyse lysiert und die Western Blot Analyse mit einem Anti-HIV-2 Patientenserum (L.Gürtler, Greifswald) durchgeführt. FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 zeigte nach Induktion die höchste Expression von HIV-2 Env. Als positiv Kontrolle wurde die gleiche Menge Lysat von Phoenix GP Zellen aufgetragen, die transient mit dem Konstrukt pCMV-HIV-2 Tr699 transfiziert (Höhne et al., 1999) worden waren. HIV-2 Env ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.



a) FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 induziert



b) FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 uninduziert

Abb. 3.1.2.2-4 Synzytienbildung durch Kokultivieren von FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen. 48 h vor Zugabe der NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen wurde in einem Ansatz die Expression von HIV-2 Env durch Zugabe von 1 μ g Doxacyclin pro ml Medium induziert, im zweiten Ansatz blieben die Zellen uninduziert. **a)** 2 h nach Kokultivieren der NIH3T3 Zellen mit dem induzierten FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 waren alle Zellen zu Synzytien verschmolzen. **b)** Im uninduzierten Ansatz bildeten sich keine Synzytien.

3.2 Charakterisierung der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87 und FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10

3.2.1 Bestimmung der Titer von FLY-HIV-87 und FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 produzierten Vektoren

Die von den Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 produzierten MLV/HIV-1, MLV/SHIV-89.6P und MLV/HIV-2 pseudotypisierten Partikel enthalten keine transduzierbare Vektor RNA. Zur Bestimmung der freigesetzten infektiösen Partikel (Titer) wurden daher die Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 mit unterschiedlichen retroviralen Vektoren ausgestattet, die detektierbare Markergene enthalten.

3.2.1.1 Herstellung der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ

Zur Herstellung der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ wurde FLY-HIV-87 mit, den retroviralen Vektor pMFGnslacZ (Ferry et al., 1991) enthaltenden Überständen der amphotropen MLV Vektoren exprimierenden Verpackungszelllinie FLY pJet lacZ (Gerstenmeyer et al., 1995) transduziert. Die Anzahl der pMFGnslacZ transduzierten FLY-HIV-87 Zellen wurde durch X-Gal Färbung und nachfolgend durch eine Färbereaktion mit Fluorescein-di- β -galactosid (FDG) im FACS analysiert. Der prozentuale Anteil an transduzierten Zellen betrug 97,38 %. Die so entstandene Zelllinie wurde in Analogie zur Ausgangszelllinie FLY-HIV-87-LacZ genannt. Die FACS-Färbung ergab, daß es sich bei der Zelllinie um eine Mischpopulation handelt, da die Zellen keine einheitliche β -Galaktosidase Aktivität zeigten (siehe Abb. **3.2.1 a**)). Die Bestimmung des von FLY-HIV-87-LacZ produzierten Titers wurde wie unter **2.2.2.8** beschrieben auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen durchgeführt und betrug $3,4 \times 10^5$ IU/ml.

3.2.1.2 Herstellung der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP und FLY-SHIV-89.6P-152-GFP und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP

Der für EGFP kodierende retrovirale Vektor pMX-EGFP (Onishi et al., 1995) wurde durch Transduktion mit MLV/VSV-G pseudotypisierten Vektoren in die Verpackungszellen eingebracht. Die Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP FLY-SHIV-89.6P-152-GFP und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 GFP wurden durch Transduktion von FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 GFP mit dem MLV/VSV-G pseudotypisierten Vektor, der den retroviralen Vektor pMX-EGFP (Onishi et al., 1995) enthält, hergestellt. MLV/VSV-G pseudotypisierte Vektoren wurden durch die tet induzierbare Verpackungszelllinie 293-GPG (Ory et al., 1996), die transient mit dem retroviralen Vektor pMX-EGFP transfiziert wurden, produziert. Die Anzahl der, mit dem retroviralen Vektor pMX-EGFP transduzierten FLY-HIV-87 Zellen wurde durch FACS-Analyse bestimmt und betrug 90,15% (siehe Abb. **3.2.1 b**)). Der Titer von FLY-HIV-87-GFP betrug 4×10^5 infektiöse Vektoren pro ml (siehe Tabelle **3.2.1**).

Zur Gewinnung eines pMX-EGFP transduzierten Einzelzellklons, wurden Zellen der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP vereinzelt. Die erhaltenen Einzelzellklone wurden im FACS auf uniforme EGFP Expression untersucht und die Titer bestimmt. Einzelklon 27 zeigte in der FACS-Analyse eine uniforme Expression von EGFP (siehe Abb. **3.2.1 c**)) und exprimierte den höchsten Titer, von 1×10^6 Vektoren pro ml (siehe Tabelle **3.2.1**). Die Durchführung der Titerbestimmung wurde wie unter **2.2.2.8** beschrieben auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen durchgeführt.

Die Anzahl der mit dem retroviralen Vektoren pMX-EGFP transduzierten FLY-SHIV-89.6P-152-GFP Zellen betrug 92,99% (siehe Abb. **3.2.1 e**)). Die Titerbestimmung wurde auf Grund des dualotropen SHIV-89.6P Env sowohl auf CD4/CXCR4 als auch auf CD4/CCR5 exprimierenden NIH3T3 Zellen durchgeführt. Der Titer von FLY-SHIV-89.6P-152-GFP betrug auf NIH3T3

CD4/CXCR4 Zellen $7,2 \times 10^4$ und auf NIH3T3 CD4/CCR5 $9,8 \times 10^4$ IU/ml (siehe Tabelle **3.2.1**). Die Titerbestimmung wurde wie unter **2.2.2.8** beschrieben durchgeführt.

Die Anzahl der transduzierten FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP betrug 89.78% (siehe Abb. **3.2.1 f**). Der Titer von FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP Zellen wurde in Gegenwart von $1 \mu\text{g}$ Doxycyclin pro ml Medium bestimmt. 48 h später wurden die Überstände aus dem induzierten und dem nicht induzierten Ansatz auf CD4/CXCR4 exprimierende NIH3T3 Zellen gegeben. Nur in dem Ansatz mit den induzierten Überständen waren transduzierte, GFP exprimierende Zellen zu beobachten. Der Titer der Verpackungszelllinie FLY-HIV-2 i-Env Tr699 Klon 10-GFP betrug 48 h nach Induktion $\leq 1 \times 10^3$ IU/ml und entspricht somit in etwa dem Titer von $6,4 \times 10^2$ IU/ml (Höhne et al., 1999), der durch transiente Transfektion von AnjouLacZ Zellen mit dem HIV-2 Env Expressionskonstrukt pCMV-HIV-2 Tr699 erreicht wurde.

Daraus folgt, daß stabil HIV-2 Env exprimierende Zellen nur dann überleben, wenn die HIV-2 Env Expression sehr gering ist. Dies bedeutet, die Produktion hoher Titer an MLV/HIV-2 Pseudotypvektoren und somit deren Einsatz in der Gentherapie nicht möglich ist.

3.2.1.3 Herstellung der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LHPLtr

Die Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LHPLtr wurde durch Transduktion von FLY-HIV-87 mit dem MLV/GaLV pseudotypisierten retroviralen Vektor LHPLtr (Klebba et al., 2000) hergestellt. Dieser Vektor enthält ein 'Hairpin Ribozym', das gegen das zweite GUC Triplet aus der 5' LTR Region des HIV-1 Stamm HXB2 gerichtet ist und das Gen für eine C-terminal verkürzte Variante des humanen 'low affinity nerve growth factor receptor' (LNGF-R Δ) als Selektionsmarker enthält.

Da nach der Transduktion der FLY-HIV-87 Zellen mit den PG-13-LHPLtr Überständen noch nicht alle Zellen LNGF-R Δ positiv waren, wurde unter Verwendung von Magnetic beats der Firma Milteney Biotech, die LNGF-R Δ exprimierenden Zellen selektioniert. Nach der Selektion der LNGF-R Δ exprimierenden Zellen über die MACS-Säulen zeigten 97,29% der Zellen in der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) Expression von LNGF-R Δ (siehe Abb. 3.2.1 d)). Die Titerbestimmung der selektionierten Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LHPLtr wurde wie unter 2.2.2.8 beschrieben auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen bestimmt und betrug $9,7 \times 10^4$ IU/ml (siehe Tabelle 3.2.1).

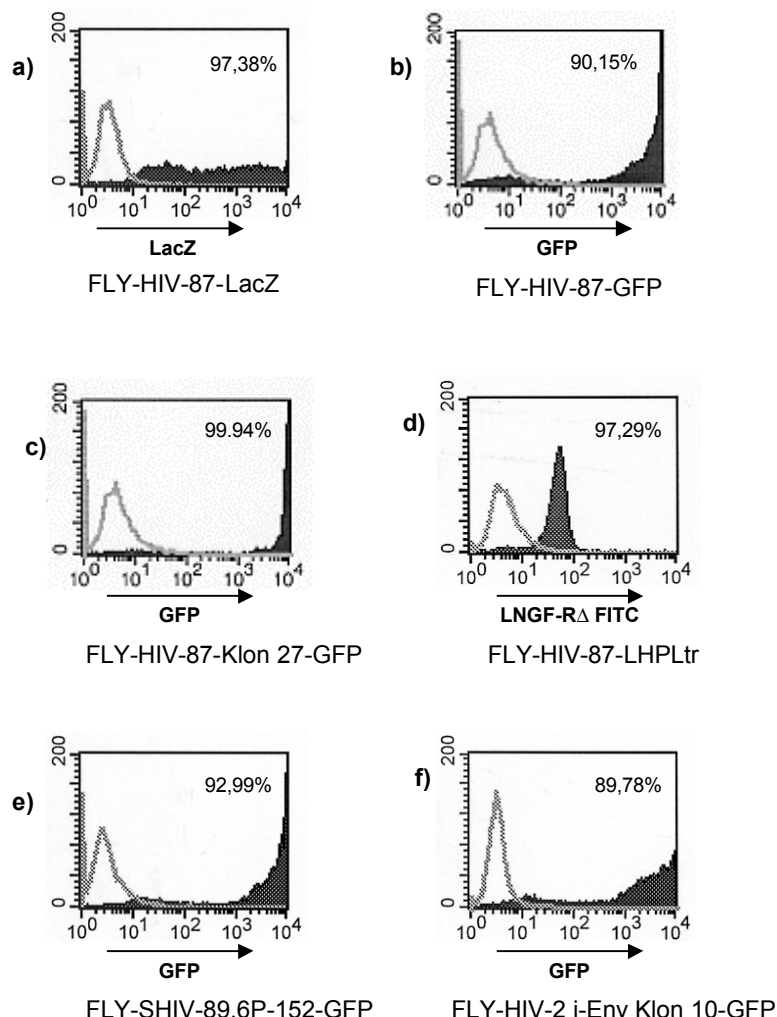


Abb. 3.2.1 Zellen der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 nach der Transduktion der Zellen mit retroviralen Vektoren. Durch FACS Analysen wurde der prozentuale Anteil an transduzierten Zellen

bestimmt. Zusätzlich ergaben die FACS Analysen, ob es sich bei den Zelllinien um Mischpopulationen handelt oder ob die Zellen eine uniforme Expression des Transgens zeigen **a)** FLY-HIV-87-LacZ **b)** FLY-HIV-87-GFP **c)** FLY-HIV-87 Klon 27-GFP **d)** FLY-HIV-87-LHPLtr **e)** FLY-SHIV-89.6P-152-GFP **f)** FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP. Der prozentuale Anteil der transduzierten Zellen ist in den Histogrammplots angegeben.

Verpackungszellen	Zielzellen		Tropismus
	NIH3T3 CD4/CXCR4	NIH3T3 CD4/CCR5	
FLY-HIV-87-GFP	4×10^5	-	T-troph
FLY-HIV-87 Klon 27-GFP	1×10^6	-	T-troph
FLY-HIV-87-LacZ	$3,4 \times 10^5$	-	T-troph
FLY-HIV-87-LHPLtr	$9,7 \times 10^4$	-	T-troph
FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP	$\leq 1 \times 10^3$	-	T-troph
FLY-SHIV-89.6P-152-GFP	$7,2 \times 10^4$	$9,8 \times 10^4$	dualotroph

Tabelle 3.2.1 Zellen der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 nach der Transduktion mit retroviralen Vektoren. Die Titerbestimmungen wurden wie unter **2.2.2.8** beschrieben auf NIH3T3 CD4/CXCR4 und NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen durchgeführt. Nur mit der dualotrophen Verpackungszelllinie FLY-SHIV-89.6P-152 konnte eine Transduktion von NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen beobachtet werden.

3.2.2 Spezifität des Gentransfers MLV/HIV-1, MLV/SHIV-89.6P und MLV/HIV-2 pseudotypisierter Vektoren

Bei der Infektion von Zellen durch das HI-Virus werden neben dem humanen CD4 Rezeptor auch Korezeptoren benötigt. Der jeweilige Korezeptor, den das Virus für die Infektion benötigt, ist abhängig vom Hüllprotein des jeweiligen Virussubtyp. Das HIV-1 *env* Gen, der Verpackungszelllinie Fly-HIV-87 stammt ursprünglich aus dem T-trophen HIV-1 Isolat BH10, das neben dem CD4 Rezeptor CXCR4, als Korezeptor für den Eintritt in die Zelle benötigt. Die Korezeptorspezifität des Gentransfers wurde auf NIH3T3 Zellen, die den

humanen CD4 Rezeptor entweder alleine, oder in Kombination mit den unterschiedlichen Korezeptoren CCR3 , CCR5 und CXCR4 (Deng et al., 1997) untersucht. Diese Zellen wurden mit FLY-HIV-87-LacZ Überständen transduziert und die Zellen durch X-Gal Färbung oder mit Fluorescein-di-β-galaktosid (FDG) gefärbt und die Anzahl an transduzierten Zellen im FACS analysiert. Eine Transduktion durch die von Fly-HIV-87-lacZ produzierten T-tropen MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikel konnte nur in CD4/CXCR4 exprimierenden NIH 3T3 Zellen beobachtet werden. Der CD4 Rezeptor alleine oder die Kombination von CD4 Rezeptor mit den Korezeptoren CCR3 oder CCR5 ist für eine Transduktion nicht ausreichend (siehe Abb. **3.2.2-1 a) – d)**).

Das HIV-2 Env stammt ursprünglich aus dem T-tropen Isolat ISY (Francini et al., 1989), daß neben dem CD4 Rezeptor, CXCR4 als Korezeptor für den Eintritt in die Zelle benötigt. Um zu überprüfen, ob die MLV/HIV-2 Pseudotypvektoren den selben Tropismus wie das HIV-2 Isolat ISY besitzen, wurden NIH3T3 Zellen, die den humanen CD4 Rezeptor entweder alleine, oder in Kombination mit den unterschiedlichen Korezeptoren CCR3, CCR5 und CXCR4 (Deng et al., 1997) exprimieren, mit den Überständen von transient transfizierten AnjouLacZ transduziert. Die transduzierten Zellen wurden 48 h später durch X-Gal Färbung detektiert. Eine Transduktion durch die MLV/HIV-2 pseudotypisierten Vektorpartikel konnte nur in CD4/CXCR4 exprimierenden Zellen beobachtet werden. Der CD4 Rezeptor alleine oder die Kombination von CD4 Rezeptor mit den Korezeptoren CCR3 oder CCR5 ist für eine Transduktion nicht ausreichend (siehe Abb. **3.2.2-2 a) – d)**).

Die von FLY-SHIV-89.6P-152-GFP produzierten dualotropen MLV/SHIV-89.6P pseudotypisierten Vektorpartikel führten zur Transduktion sowohl von CD4/CXCR4 als auch von CD4/CCR5 exprimierenden NIH3T3 Zellen (siehe Abb. **3.2.2-3 a) – d)**).

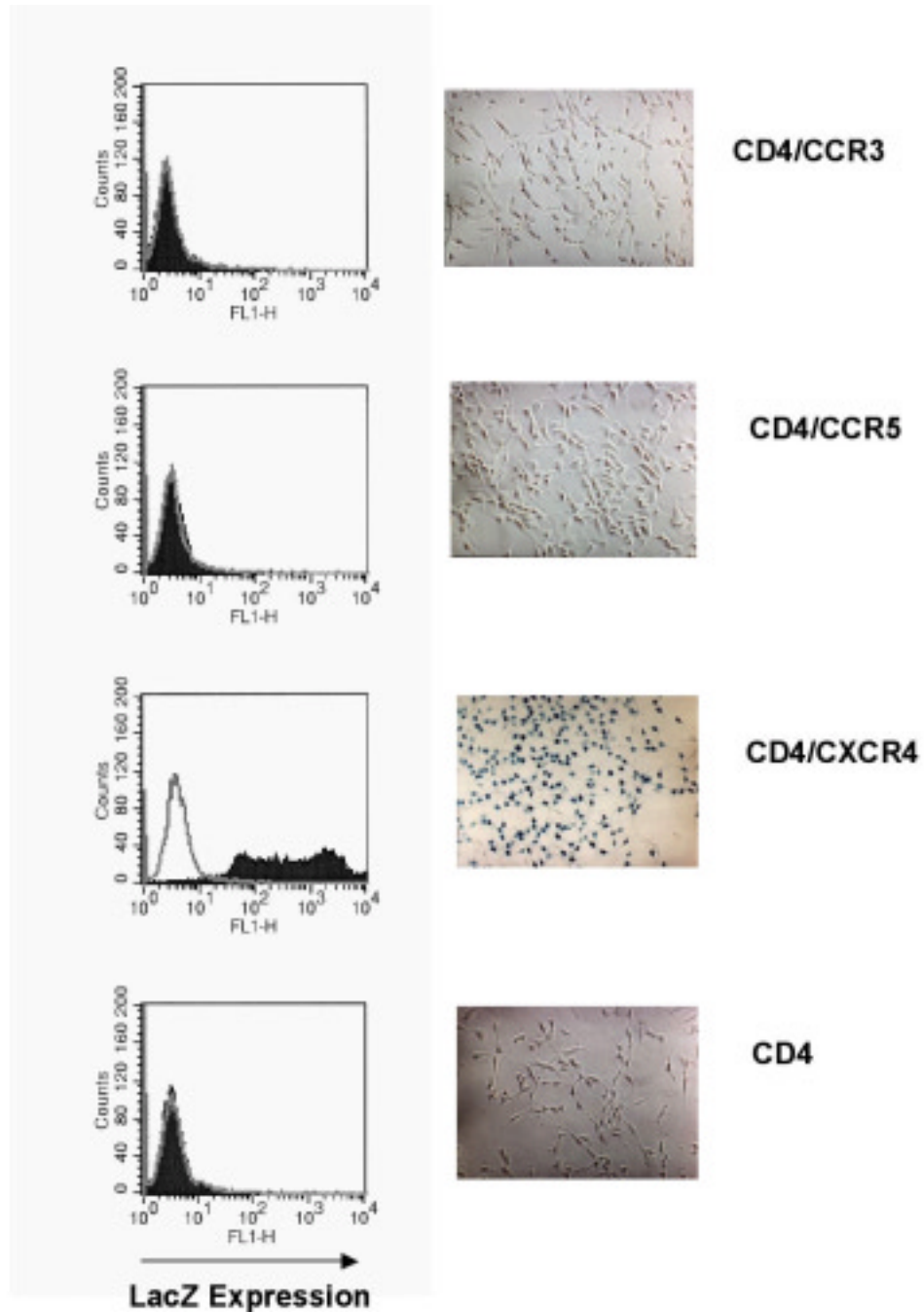


Abb. 3.2.2-1 Nachweis für die spezifische Transduktion von CD4/CXCR4 exprimierenden. Jeder der unterschiedlichen NIH3T3 Zelllinien wurde mit sterilfiltrierten Überständen der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ transduziert und anschließend mit X-Gal Färbelösung behandelt. Die Zellen aus dem zweiten Ansatz, wurden mit Fluoreszein-di- β -galaktosid (FDG) gefärbt und die Anzahl der transduzierten Zellen im FACS analysiert. Beide Nachweismethoden ergeben, daß nur die CD4 und CXCR4 exprimierenden NIH3T3 Zellen durch die MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren transduziert wurden.

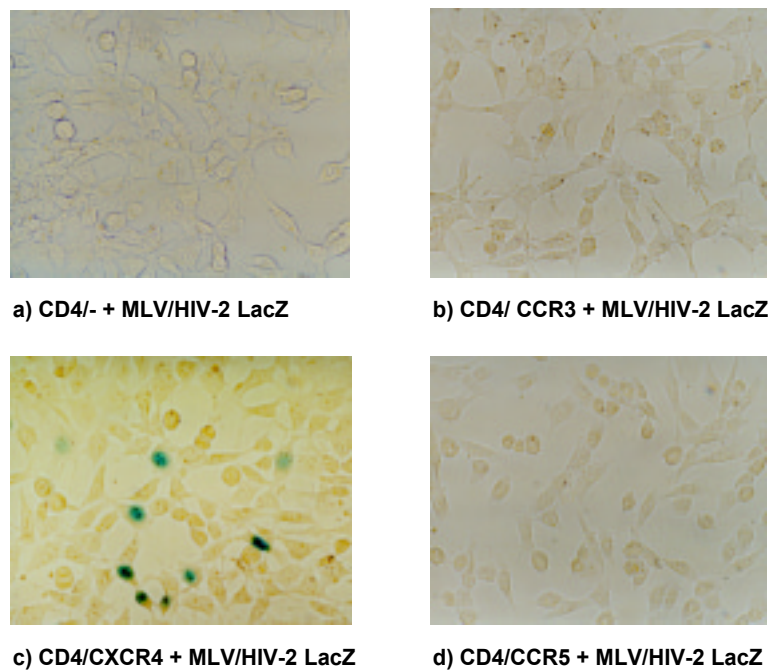


Abb. 3.2.2-2 a) – d) Die durch transiente Transfektion von AnjouLacZ Zellen mit dem HIV-2 Env Expressionkonstrukt pCMV-HIV-2 Tr699 produzierten MLV/HIV-2 pseudotypisierten Vektorpartikel führten nur zur Transduktion von CD4/CXCR4 exprimierenden NIH3T3 Zellen.

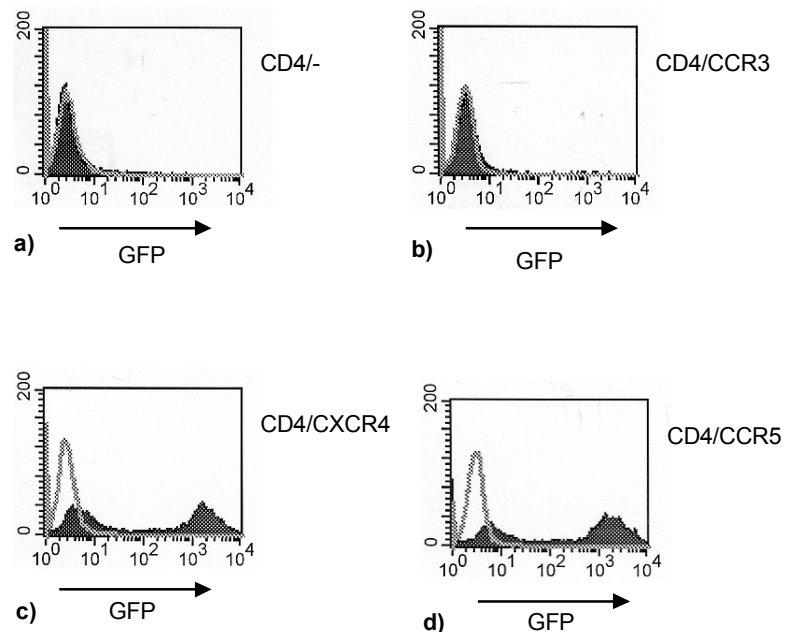


Abb. 3.2.2-3 a) – d) Nachweis für die spezifische Transduktion von CD4/CXCR4 und CD4/CCR5 exprimierende Zellen. Die unterschiedlichen NIH3T3 Zelllinien wurden mit je 3 ml sterilfiltrierter Überstände der Verpackungszelllinie FLY-SHIV-89.6P-152-GFP überschichtet. Nach 48 h wurden die Zellen im FACS auf GFP Expression analysiert. Eine Transduktion durch MLV/S HIV-89.6P GFP konnte nur in CD4/CXCR4 und CD4/CCR5 exprimierende Zellen beobachtet werden.

3.2.3 Immunohistochemische Analyse der HIV-1 Env Expression von FLY-HIV-87

Die Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 exprimierte die höchsten Titer und wurde für die nachfolgenden *in vitro* und *in vivo* Transduktionsexperimente genutzt und zusätzlich durch immunhistochemische Analyse charakterisiert.

Da in vorangegangenen Versuchen zur Etablierung der stabil HIV-1 Env exprimierender Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17 beobachtet wurde, daß die Expression des HIV-1 Env Proteins innerhalb weniger Wochen reduziert oder gänzlich verloren ging, wurde vermutet, daß außer toxischer Eigenschaften des Proteins ein Überwachsen HIV-1 Env exprimierender durch schneller wachsende, nicht HIV-1 Env exprimierender Zellen möglich sein könnte (Schnierle, unveröffentlichte Daten).

Daher wurde zur genaueren Charakterisierung der Zelllinie FLY-HIV-87 zunächst durch eine immunhistochemische Fluoreszenzfärbung überprüft, ob es sich bei Klon FLY-HIV-87 um einen Einzelzellklon handelt. Da in diesem Fall alle Zellen des Klons aus ein und der selben Zelle hervorgegangen sind, sollte FLY-HIV-87 eine uniforme Expression des HIV Env Proteins zeigen. Dies wurde durch immunhistochemische Analyse auf fixierten FLY-HIV-87 mit dem anti HIV-1 gp120 Antiserum (Bioscience Resource Project, Asbach) und dem FITC-gekoppelten anti-Ziegen Antikörper (Dianova, Hamburg) untersucht. Hierbei zeigte sich, daß alle Zellen des Klons FLY-HIV-87 eine einheitlich starke Fluoreszenzfärbung aufwiesen. Untransfizierte FLY Zellen reagierten dagegen nicht mit dem Antikörper. Hieraus folgte, daß es sich bei FLY-HIV-87 um einen Einzelzellklon handelt.

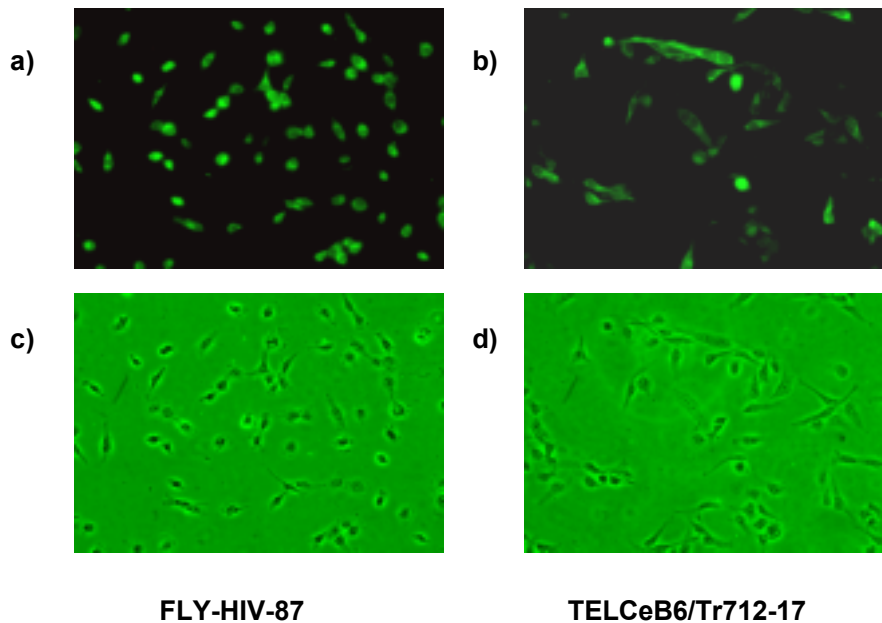


Abb. 3.2.3 a) Immunhistochemische Analyse von Klon FLY-HIV-87. Für die immunhistochemische Färbung der Zellen zum Nachweis der HIV-1 gp120 Expression wurde als primärer Antikörper ein polyklonales anti-gp120 Ziegenserum (Biodesign-Dunn Labortechnik, Asbach) und als sekundärer Antikörper ein FITC-gekoppelter anti-Ziegen Antikörper (Dianova, Hamburg) benutzt. c) u. d) Die Durchlichtaufnahmen zeigen die Gesamtanzahl an Zellen. Der Vergleich mit dem Fluoreszenzaufnahme verdeutlicht, daß alle vorhandenen Zellen eine identisch starke Fluoreszenz besitzen. b) Zellen der HIV-1 Env exprimierende Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17 dagegen zeigen keine uniforme Fluoreszenz Dies bedeutet, daß es sich bei TELCeB6/Tr712-17 wahrscheinlich nicht um einen Einzelzellklon handelt oder daß sich die Expressionsstärke in den zunächst einheitlich HIV-1 Env exprimierenden Zellen verändert.

3.2.4 Optimierung des Gentransfers MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren

Eine Erhöhung der Transduktionseffizienz retroviraler Vektoren ist in Gegenwart der extrazellulären Matrixkomponente Fibronectin beschrieben worden (Hanenberg et al., 1996; Pollak et al., 1998). Um den Einfluß von Fibronectin auf die Transduktion MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren zu untersuchen, wurden die Maus Fibroblasten Zelllinie NIH3T3 CD4/CXCR4 und die humane T-Zelllinie Jurkat mit sterilfiltrierten Überständen von FLY-

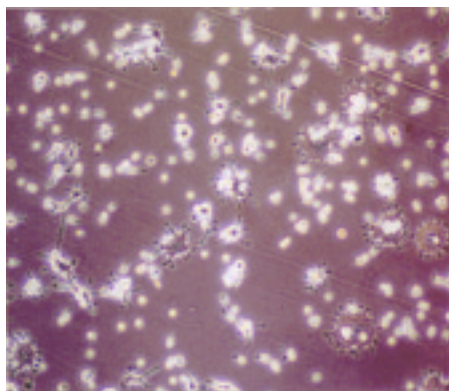
HIV-87-GFP in Abwesenheit und in Gegenwart von Fibronectin transduziert. 48 Stunden nach der Transduktion wurden die transduzierten Zellen im FACS auf GFP Expression analysiert. Es zeigte sich, daß die Transduktion von Jurkat Zellen in Gegenwart von Fibronectin 45-fach höher war (siehe Tabelle **3.2.4**). Auf die Transduktionseffizienz von murine NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen hat Fibronectin hingegen nur einen geringen positiven Einfluß (siehe Tabelle **3.2.4**).

Zusätzlich wurde der Einfluß des Polykations Protaminsulfat auf die Transduktionseffizienz von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren untersucht. Hierzu wurden wieder Jurkat Zellen mit und ohne Fibronectin in Gegenwart von Protaminsulfat mit Überständen der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP wie oben beschrieben transduziert und analysiert. Hierbei zeigte sich, daß das üblicherweise zur Erhöhung der Transduktionseffizienz von retroviralen Vektoren eingesetzte Protaminsulfat, im Falle von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren einen negativen Einfluß auf die Transduktionseffizienz besitzt (siehe Tabelle **3.2.4**). Einen negativen Einfluß auf die Transduktionseffizienz von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren wurde auch für Polyprene, das ein ähnliches Polykation wie Protaminsulfat ist, in vorangegangenen Experimenten beobachtet (B. Schnierle, nicht veröffentlichte Daten). Die Ergebnisse der Transduktionsexperimente zeigen, daß Fibronectin einen positiven Einfluß auf die Transduktionseffizienz von humanen CD4/CXCR4 exprimierenden Zellen durch MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren besitzt. Die Polykationen Polyprene und Protaminsulfat haben negativen Einfluß auf die Transduktionseffizienz.

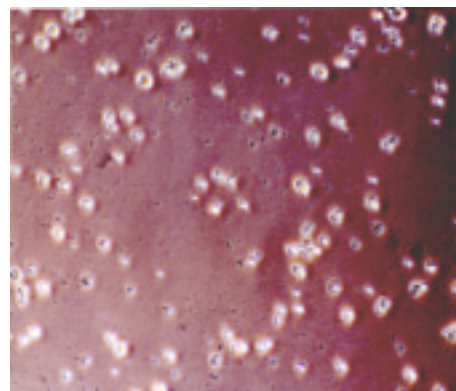
		Zielzellen	
Fibronektin	Protamin-sulfat	Jurkat	NIH3T3 CD4/CXCR4
+	-	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
-	-	$2,7 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$
+	+	4×10^5	-
-	+	$2,5 \times 10^4$	-

Tabelle 3.2.4 Einfluß von Fibronektin und Protaminsulfat auf die Effizienz der Transduktion MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren. NIH3T3 CD4/CXCR4 und Jurkat Zellen wurden ohne oder in Gegenwart von Fibronektin mit oder ohne Protaminsulfat mit gleichen Mengen an MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren transduziert. Die Anzahl der infektiösen Partikel (Titer) wurde durch FACS Analyse des Transgens EGFP bestimmt. Die Titer sind als Anzahl infektiöser Einheiten pro ml (IU/ml) angegeben.

Nach Aussähen von Jurkat Zellen auf Fibronektin beschichtete Zellkulturschalen (Takara, Japan) beginnen die, normalerweise in Suspension wachsenden Jurkat Zellen zu adherieren. Dabei nehmen die an sonst kugelförmigen Zellen sternförmige Gestalt an (siehe Abb. 3.2.4).



a) Jurkat + Fibronektin



b) Jurkat - Fibronektin

Abb. 3.2.4 Einfluß von Fibronektin auf die Morphologie humaner Suspensionszellen. **a)** Kultivieren von Jurkat Zellen auf Fibronektin beschichteten Zellkulturschalen führt zum Adhieren der Zellen. **b)** In Abwesenheit von Fibronektin besitzen die Jurkat Zellen eine kugelige Gestalt.

3.2.5 Etablierung von Anreicherungsmethoden zur Konzentrierung von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln

Die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 abgeleiteten, und mit unterschiedlichen retroviralen Vektorkonstrukten ausgestatteten Verpackungszelllinien produzierten Vektormengen liegen, in Abhängigkeit vom retroviralen Vektorkonstrukt zwischen 1×10^5 - 1×10^6 IU/ml. Da die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 abgeleiteten Verpackungszellen exprimierten Titer zu gering für eine direkte Anwendungen in *in vivo* Experimenten sind, war es notwendig eine Methode zur Anreicherung von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren zu etablieren. Es wurden drei unterschiedliche Methoden zur Virusanreicherung etabliert und die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden miteinander verglichen.

1. Anionenaustauscher-Chromatographie
2. Kalziumphosphat-Präzipitation
3. Spin-Filtration

3.2.5.1 Anionenaustauscher-Chromatographie

Für die Anreicherung von MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren mittels Anionenaustauscher-Chromatographie wurde die Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr-712-17 in 750 ml Zellkulturflaschen kultiviert, bis die Zellen konfluent waren. Ca. 16 Stunden vor Ernten der Virusüberstände wurde das fötale Kälberserum-haltige DMEM komplett Medium abgesaugt und durch Phenol-Rot und FCS freies, 1% L-Glutamin-haltiges X-vivo 10 Medium der Firma BioWhittaker ersetzt. Die verwendete Anionenaustauscher-Säule Fractoflow® (Merck, Darmstadt) ist eine Hohlfasermembran, an der kovalent TMA-Ankergruppen gebunden sind. Vor Beginn des Experiments mußte zunächst die Säule durch Aufladen von 50 ml 2 M NaCl in PBS mit 20 % Ethanol equilibriert und nachfolgend mit 50 ml PBS gespült werden. Auf die

vorbereitete Säule wurden anschließend mit einer Peristaltikpumpe (Greiner, Frickenhausen) 250 ml des sterilfiltrierten Virus-haltigen Überstands geladen. Nach zweimaligem Spülen der Säule mit je 20 ml PBS wurde das, an die Säule gebundene Virus mit 10 ml einer 3 M NaCl Lösung eluiert. Zur Entsalzung wurde die Virus-haltige Hochsalzlösung auf Spin-Filter der Firma Greiner aufgetragen und zur Entfernung der Salzlösung 10 - 15 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die im Filter verbliebenen Vektorpartikel mit PBS gewaschen. Hierzu wurden zweimal nacheinander 10 - 14 ml PBS auf den eingengten Virusüberstand gegeben und für jeweils 5 - 10 min zentrifugiert. Das im Filter verbliebene, in PBS gelöste Virus wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Mit der Anionenaustauscher-Chromatographie wurde eine 12,93-fache Konzentrierung der Vektorpartikel erreicht. Der Verlust an infektiösen Vektorpartikel lag bei 90,69 % (siehe Tabelle **3.2.5**).

3.2.5.2 Kalziumphosphat-Präzipitation

Die Kalziumphosphat-Präzipitation basiert auf einem modifizierten Protokoll von Pham et al. (Pham et al., 2001), wonach Viruspartikel durch Kalziumphosphatkristalle gebunden und präzipitiert werden.

Für die Durchführung des Experiments wurden die Verpackungszelllinien TELCeB6/Tr-712-17 oder FLY-HIV-87-LacZ in 750 ml Zellkulturflaschen kultiviert, bis die Zellen konfluent waren. 16 Stunden vor dem Ernten der Viruspartikel haltigen Überstände wurde das fötale Kälberserum (FCS) haltige komplett DMEM Medium abgesaugt und durch FCS freies, 1% L-Glutamin-haltiges DMEM ersetzt, die Überstände sterilfiltriert und der pH-Wert mit 1M Natronlauge auf 7.7 eingestellt. Anschließend wurde unter kontinuierlichem Rühren eine 3M CaCl₂ Lösung bis zu einer Endkonzentration von 60 mM zugesetzt. Das, durch die Zugabe des CaCl₂ gebildete, Virus-haltige Präzipitat

wurde durch 4 min zentrifugieren bei 3000 rpm und 4°C pelletiert. Nach Absaugen des Überstands, wurde anschließend solange eine 100mM EDTA pH 8.0 Lösung zugesetzt, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte. Da EDTA in einer Konzentration von 100 mM toxisch für Zellen ist, wurde das gelöste Pellet in eine Slide-A-Lyser Dialyse Kassette (Pierce-Europe) überführt und ca. 90 min bei 4°C gegen PBS dialysiert. Die Volumina der Virus-haltigen Lösung betragen nach der Dialyse zwischen 0,4 – 2,8 ml.

Mit der Kalziumphosphat-Präzipitation wurde im Durchschnitt eine 8,2-fache Konzentrierung der MLV/HIV-1 Vektoren erreicht. Der Verlust an infektiösen Vektoren lag im Durchschnitt bei 71,5 % (siehe Tabelle **3.2.5**).

3.2.5.3 Spin-Filtration

Die Spin-Filtration basiert darauf, daß ein Filter benutzt wird, durch den das Medium und die Proteine, die ein geringeres Molekulargewicht als 100 000 kDa haben, unter dem Einfluß der Zentrifugalkräfte durch den Filter laufen. Die Vektorpartikel werden durch den Filter zurückgehalten.

Für die Anreicherung wurden die Verpackungszelllinien FLY-HIV-87 Klon 27-GFP oder TELCeB6/Tr-712-17 in 750 ml Zellkulturflaschen kultiviert, bis die Zellen konfluent waren. 16 Stunden vor Ernten der Viruspartikel haltigen Überstände wurde das fötale Kälberserum haltige komplett DMEM Medium abgesaugt und durch FCS freies, 1% L-Glutamin-haltiges DMEM oder RPMI 1640 Medium ersetzt. Zur Durchführung der Anreicherung wurden Volumina von 500 ml an serumfreien Vektorüberständen sterilfiltriert und auf Viva-spin Filter (Greiner, Frickenhausen) überführt. Die Überstände wurden solange bei 3000 g und 4°C zentrifugiert, bis das Restvolumen im Filter 1 ml betrug.

Mit der Spin-Filtration wurden mit Ausgangsvolumen von 500 ml im Durchschnitt eine 83,86-fache Konzentrierung der Vektoren erreicht. Der

Verlust an infektiösen Vektoren lag im Durchschnitt bei 83,23 % (siehe Tabelle **3.2.5**, Seite 91).

.

Die Spin-Filtration war die beste Methode zur Anreicherung der Vektoren, da man mit ihr die höchsten Konzentrationsfaktoren erreichte. Diese Methode wurde weiter hin benutzt um Vektorüberstände aufzukonzentrieren.

	Anionenaustauscher- chromatographie	Spin-Filtration	Kalziumphosphat- Präzipitation
Startvolumen (ml)	a ₂ 50	500 (^b 500, ^b 500, ^a 500)	52 (^a 46, ^c 50, ^c 60)
Anzahl an infektiösen Partikeln (IU)	a ₂ ,9 x 10 ⁷	2,55 x 10⁸ (^b 1,92 x 10 ⁸ , ^b 2,23 x 10 ⁸ , ^a 3,5 x 10 ⁸)	6,7 x 10⁶ (^a 4,6 x 10 ⁶ , ^c 9,5 x 10 ⁶ , ^c 6 x 10 ⁶)
Starttiter (IU/ml)	a ₁ ,16 x 10 ⁵	5,1 x 10⁵ (^b 3,84 x 10 ⁵ , ^b 4,46 x 10 ⁵ , ^a 7 x 10 ⁵)	1,3 x 10⁵ (^a 1 x 10 ⁵ , ^c 1 x 10 ⁵ , ^c 1,9 x 10 ⁵)
Endvolumen (ml)	a ₁ ,8	1,0 (^b 1,0, ^b 1,0, ^a 1,0)	1,73 (^a 0,4, ^c 2,0, ^c 2,8)
Anzahl an infektiösen Partikeln (IU)	a ₂ ,7 x 10 ⁶	4,27 x 10⁷ (^b 2,63 x 10 ⁷ , ^b 4,56 x 10 ⁷ , ^a 5,67 x 10 ⁷)	6,7 x 10⁶ (^a 4,6 x 10 ⁶ , ^c 9,5 x 10 ⁶ , ^c 6 x 10 ⁶)
Endtiter (IU/ml)	a ₁ ,5 x 10 ⁶	4,27 x 10⁷ (^b 2,63 x 10 ⁷ , ^b 4,56 x 10 ⁷ , ^a 5,67 x 10 ⁷)	1,95 x 10⁶ (^a 1 x 10 ⁵ , ^c 1 x 10 ⁵ , ^c 1,9 x 10 ⁵)
Konzentrations- faktor	a ₁ 2,93 x	83,86 x (^b 68,4 x, ^b 102,2 x, ^a 81 x)	8,2 x (^a 7,3 x, ^c 11 x, ^c 6,3 x)
Verlust	a ₉₀ ,69 %	83,23 % (^b 86,31 %, ^b 79,6 %, ^a 83,8 %)	71,5 % (^a 93,66 %, ^c 76,85 %, ^c 44 %)

Tab. 3.2.5 Methoden zur Anreicherung MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren. Von den Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-LacZ, FLY-HIV-87-GFP und TELCeB6/Tr712-17 produzierte Vektorpartikel wurden durch die unterschiedlichen Methoden konzentriert. Die Methoden Spin-Filtration und Kalziumphosphat-Präzipitation wurden 3 x durchgeführt. Die bei den einzelnen Versuchen gemessenen Werte sind in Klammern angegeben. Die aus den Einzelwerten berechneten Durchschnittswerte sind fett dargestellt. Die hochgestellten Buchstaben kennzeichnen, mit welcher Zelllinie die jeweilige Anreicherung durchgeführt wurde: **a)**=TELCeB6/Tr712-17, **b)**=FLY-HIV-87 Klon 27-GFP und **c)**=FLY-HIV-87-LacZ.

3.2.6 Spezifische und effiziente Transduktion von CD4 positiven humanen peripheren Blutlymphozyten durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren

Nach dem unter **3.2.2** gezeigt wurde, dass MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren nur den CD4-Rezeptor und den Korezeptor CXCR4 exprimierende Zellen transduzieren, wurde nachfolgend untersucht, ob MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren ebenfalls primäre humane Blutlymphozyten transduzieren und ob der Gentransfer spezifisch nur in CD4 positive T-Zellen erfolgt.

Für die Transduktion wurden periphere Blutlymphozyten (PBLs) über FICOLL-Gradient der Firma PAN Biotech ($d = 1,077 \text{ g/cm}^3$) aus frischem Spenderblut isoliert und nachfolgend in RPMI komplett Medium kultiviert. Da auf MLV basierende retrovirale Vektoren nur sich teilende Zellen transduzieren, wurden zur Stimulation der Lymphozyten $5 \mu\text{g/ml}$ Phytohämagglutinin (PHA) (Sigma, Deisenhofen) dem Medium zugesetzt. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in RPMI komplett Medium mit 20 U/ml humanem IL-2 (Hoffmann La Roche, Mannheim) kultiviert. 24 Stunden später erfolgte die Transduktion auf Fibronectin beschichteten Gewebekulturschalen (Takara, Japan). Die Transduktion wurde mit MLV/HIV-1 und MLV/GaLV pseudotypisierten Vektorpartikeln durchgeführt. Im Gegensatz zu MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren transduzieren MLV/GaLV Pseudotypen unspezifisch alle humanen Zellen. Die Transduktionen wurden mit angereicherten Überständen der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren produzierenden Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP und FLY-HIV-87-LHPLtr, sowie der MLV/GaLV LHPLtr Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinie PG-13-LHPLtr durchgeführt. Um die Transduktionseffizienzen zwischen MLV/HIV-1 GFP, MLV/HIV-1 LHPLtr und MLV/GaLV LHPLtr vergleichen zu können, wurden die Transduktionen mit gleichen Virusmengen bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 1 durchgeführt. Die Titer der, für die Transduktion eingesetzten Vektoren wurde vorher auf Jurkat Zellen bestimmt. Die Spezifität und Effizienz

der Transduktion der PBL's wurde nachfolgend durch FACS-Färbung analysiert (siehe Abb. **3.2.6-1 a),b**) u. **c**). Im Gegensatz zu den MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren (siehe Abb. **3.2.6-1 c**) transduzieren MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren (siehe Abb. **3.2.6-1 a**) u. **b**) nur CD4 exprimierende T-Zellen. Der spezifische Gentransfer in CD4 positive Zellen mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren ist höher als mit MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren. Wurden die Transduktionen von PBL's mit gleichen MOIs von 0.125; 0.25 und 0.5 von MLV/HIV-1 und MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren durchgeführt, zeigte sich eine Zunahme der Transduktionseffizienz mit steigenden MOIs. MLV/GaLV Vektoren zeigen im Vergleich zu MLV/HIV-1 Vektoren 30 – 50% höhere Transduktionseffizienzen an der Gesamtpopulation der PBLs (siehe Abb. **3.2.6-2 a**). Betrachtet man dabei nur die Effizienz des Gentransfers in die CD4 positiven Zellen, zeigt sich, daß der durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren vermittelte spezifische Gentransfer in CD4 positive Zellen höher ist, als mit MLV/GaLV Vektoren (siehe Abb. **3.2.6-2 b**)).

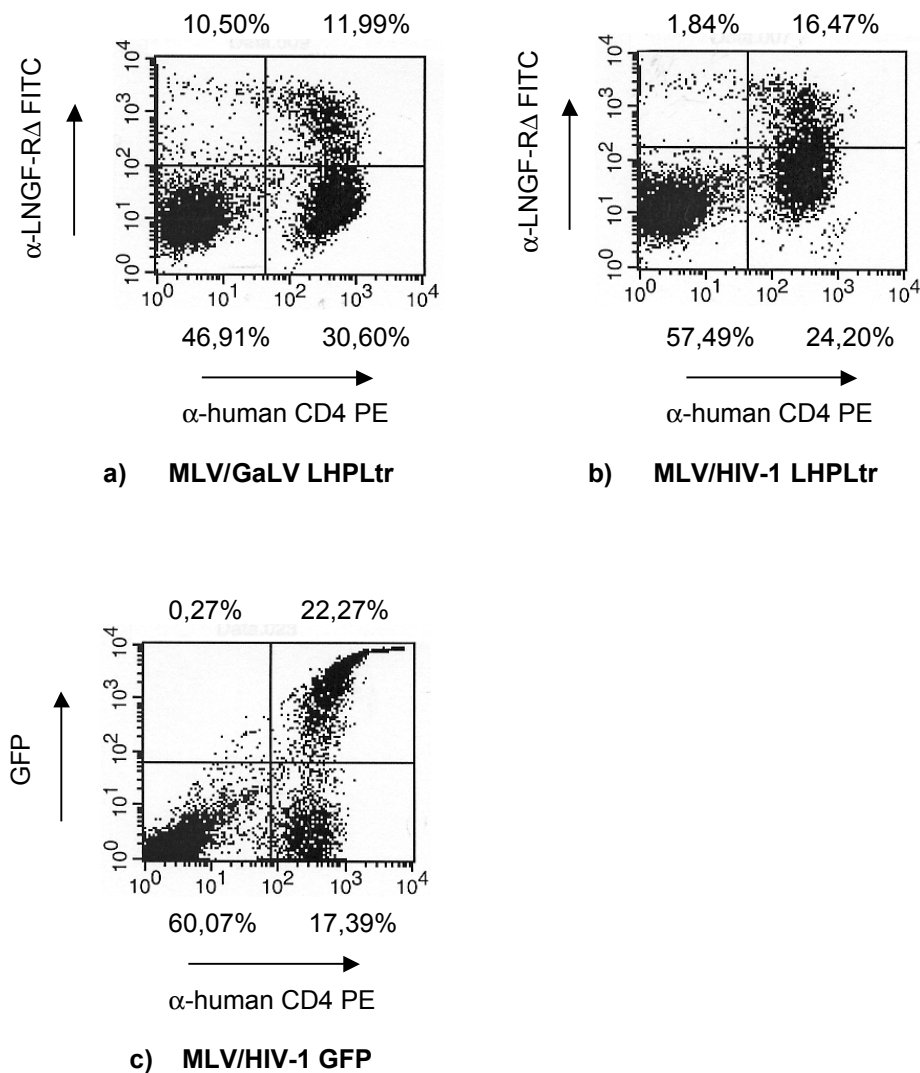


Abb. 3.2.6-1 FACS Doppelfärbung transduzierter PHA stimulierter peripherer Blutlymphozyten (PBL's). Humane PBL's wurden mit folgenden Überständen bei einer MOI von 1 transduziert: mit Überstand der Verpackungszelllinie **a)** FLY-HIV-87-Klon 27-GFP **b)** FLY-HIV-87-LHPLtr **c)** PG-13-LHPLtr. LNGF-R Δ exprimierende T-Zellen wurden mit einem anti- LNGF-R Δ Antikörper (Hoffmann La Roche, Mannheim) detektiert und mit einem FITC gekoppelten anti-Maus Antikörper (Dianova, Hamburg) gefärbt (**b** und **c**). Der Nachweis der FITC markierten Zellen erfolgte, wie bei GFP Expression durch einen Shift nach FL-1. Der humane CD4 Rezeptor wurde durch Färben der Zellen mit einem PE gekoppelten anti-human CD4 Antikörper (Beckton Dickinson, Heidelberg), durch einen Shift nach FL-2 nachgewiesen. Im Gegensatz zu den MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren transduzieren MLV/HIV-1 nur CD4 positive T-Helferzellen (oberer, rechter Quadrant). Die Anzahl der Zellen pro Quadrant ist in % angegeben.

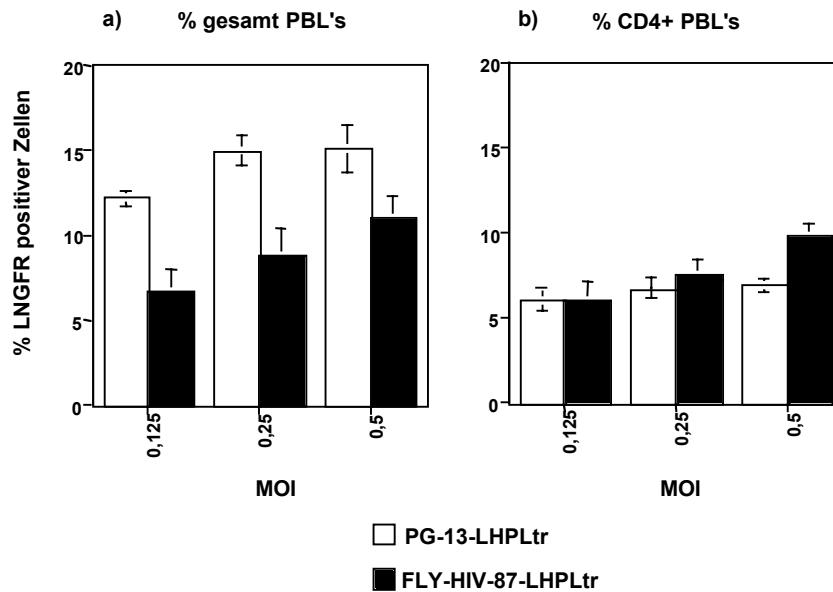


Abb. 3.2.6-2 Vergleich der Transduktionseffizienz PHA stimulierter PBL's mit MLV/HIV-1-LHPLtr und MLV/GaLV-LHPLtr Vektoren. Humane PBL's wurden mit MOIs von 0.125; 0.25 und 0.5 mit MLV/HIV-1-LHPLtr oder MLV/GaLV-LHPLtr Vektoren transduziert. Die Effizienz des Gentransfers wurde durch Messung des prozentualen Anteils an LNGFR- Δ exprimierenden Zellen durch FACS Analyse bestimmt. **a)** Prozentualer Anteil an LNGFR- Δ exprimierender Zellen in der Gesamtpopulation an PBLs. **b)** FACS Doppelfärbung mit einem PE-gekoppelten anti-human CD4 Antikörper und der prozentuale Anteil an LNGFR- Δ exprimierenden Zellen, ergibt die spezifische Transduktion von CD4+ Zellen.

3.2.7 Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der eingesetzten Multiplizität der Infektionen (MOI)

Der Einfluß hoher Vektormengen auf die Transduktionseffizienz, wurde mit einer konstanten Anzahl vorstimulierter peripherer Blutlymphozyten mit verschiedenen Mengen an MLV/HIV-1 GFP Pseudotypvektoren untersucht. Die Transduktionen wurden mit PBL's oder CD4+ selektionierten PBL's durchgeführt. Es zeigte sich, daß die höchsten Transduktionseffizienzen mit MOIs zwischen 1 und 2 erreicht wurden (siehe Abb. 3.2.7). Transduktionen mit MOIs über 2 brachten keine weiter Erhöhung der Transduktionseffizienz,

statt dessen kam es zu einem Rückgang der Transduktionseffizienz mit steigenden MOIs (siehe Abb. 3.2.7).

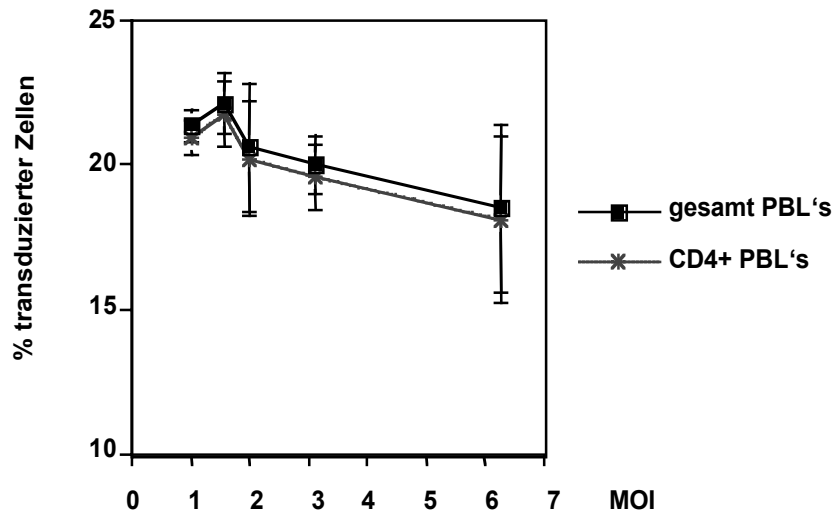


Abb. 3.2.7 Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der eingesetzten Anzahl an infektiösen MLV/HIV-1 GFP Vektorpartikel bezogen auf die Anzahl an Zielzellen ('Multiplizität der Infektion'). Je höher die eingesetzte Vektormenge, d.h. die MOI desto geringer wird die Transduktionseffizienz. Die Transduktionsrate wurde über die Anzahl der GFP exprimierenden Zellen nach FACS Messung bestimmt.

3.2.8 Einfluß von humanem Serum auf die Transduktion von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren

Für *in vivo* Anwendungen von MLV/HIV-1 Partikeln am Menschen, ist eine Resistenz der Vektorpartikel gegenüber humanem Komplement von entscheidender Bedeutung. Von der Verpackungszelllinie FLY exprimierte MLV Partikel sind resistent gegenüber humanem Serumkomplement (Cosset et al., 1995). Es wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob eine Resistenz der Vektorpartikel gegenüber humanem Serum auch dann noch gegeben ist, wenn eine Pseudotypisierung mit HIV-1 Env vorliegt. Hierzu wurden die serumfreien Vektorüberstände in zwei gleiche Portionen aufgeteilt und entweder mit dem unmittelbar zuvor präparierten humanem Serum oder mit Hitze inaktiviertem FCS versetzt. Die Serumkonzentration betrug 10%. Die Virusüberstände wurden nach Zugabe der Seren für 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend zur Transduktion der stimulierten Lymphozyten eingesetzt. Die Transduktion wurde in den beiden Ansätzen mit MLV/HIV-1 LHPLtr und MLV/GaLV LHPLtr mit der gleichen Anzahl an Vektorpartikeln (MOI 2) durchgeführt. Bei der Transduktion mit MLV/HIV-1 GFP Vektoren betrug die MOI 2,5. Die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil transduzierter Zellen mit FCS inkubierten Virusüberständen und den, mit humanem Serum inkubierten Virusüberständen entsprach der Menge an Viruspartikeln, die durch das humane Komplement inaktiviert wurden. Im Fall der MLV/GaLV Vektoren liegt der Verlust bei 60,6%. Bei den MLV/HIV-1 Vektoren liegt der Verlust bei den MLV/HIV-1 LHPLtr Vektoren bei 56,3% und bei den MLV/HIV-1 GFP Vektoren bei 23,4%, bei letzterem ist zu beachten, daß mit MOI 2,5 transduziert wurde (siehe Abb. 3.2.8).

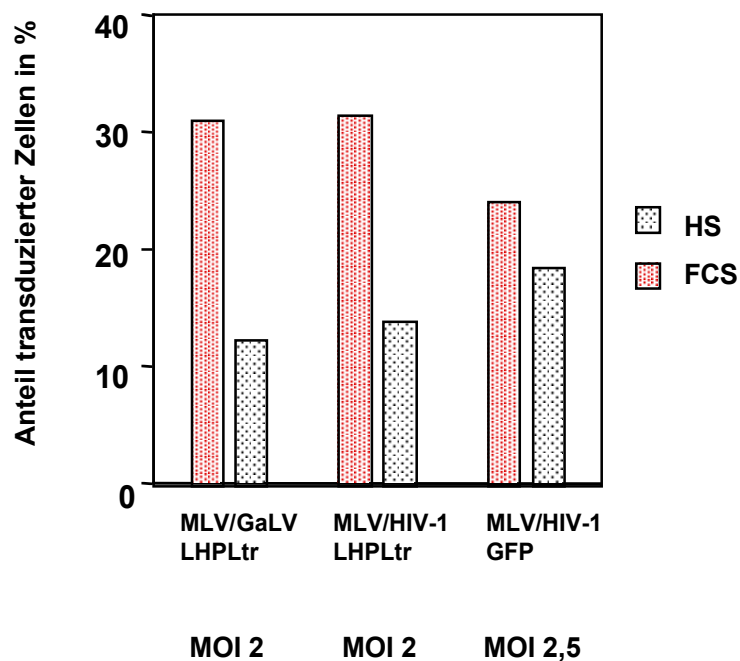


Abb. 3.2.8 Vergleich der Transduktionseffizienz von MLV/HIV-1 und MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren mit und ohne humanem Serum. Die Transduktionen wurden in den Ansätzen mit MLV/HIV-1 LHPLtr und MLV/GaLV LHPLtr mit der gleichen Anzahl von Vektorpartikeln durchgeführt (MOI 2). In den Ansätzen mit MLV/HIV-1 GFP wurde mit einer MOI von 2,5 transduziert. Die Differenz zwischen dem prozentualen Anteil transduzierter Zellen mit FCS inkubierter Virusüberstände und mit humanem Serum inkubierter Virusüberstände entspricht der Menge an Viruspartikeln, die durch das humane Komplement inaktiviert wurden.

3.3 *In vivo* Anwendung MLV/HIV pseudotypisierter Vektoren in transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Mäusen

3.3.1 Die transgene Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4

MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren transduzieren spezifisch CD4/CXCR4 exprimierende Zelllinien und primäre CD4⁺ T-Helferzellen *in vitro*. Die *in vivo* Transduktion wurde an der transgenen, den humanen CD4 Rezeptor, exprimierenden Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 untersucht (Killeen et al., 1993). Es sollte geklärt werden, ob auch *in vivo* ein zielgerichteter Gentransfer durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren möglich ist. In den transgenen Mäusen [KO] CD4 [Tg] hCD4 wurde zuerst das murine Gen für den CD4 Rezeptor deletiert ([KO] CD4) und in den KO Stämmen das humane CD4 Gen unter Kontrolle des endogenen CD4 Promoter/Enhancers als Transgen eingebracht (siehe Abb. 3.3.1 a) u. b)). Dadurch wird der humane CD4 Rezeptor, wie ursprünglich der endogene Maus CD4 Rezeptor auf Vorläufer T-Zellen, reifen T-Helferzellen und Makrophagen exprimiert (Killeen et al., 1993).

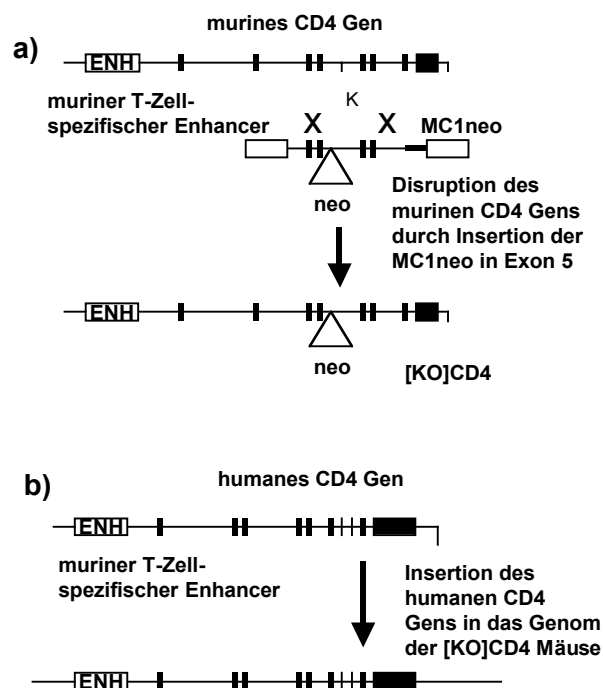


Abb. 3.3.1 Schematische Darstellung des Austauschs des murinen CD4 Gens durch das humane Analog (nach Killeen et al., 1993). **a)** Insertion einer MC1neo Kassetten

in eine der *Kpn* I Schnittstellen von Exon 5 zur Disruption des murinen CD4 Gens. **b)** Insertion des humanen CD4 Gens. Das murine CD4 Promoter/Enhancer Element wurde mit dem humanen CD4 Gen ligiert und in das Genom der murinen CD4 - Mäuse inseriert.

3.3.2 *In vitro* Transduktion primärer Milz T-Lymphozyten der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren

Um zu testen, ob eine Transduktion von primären T-Lymphozyten aus der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren generell möglich ist, wurden zunächst T-Zellen aus der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 *in vitro* transduziert. Hierzu wurden aus der Milz einer frisch getöteten Maus T-Zellen präpariert und in Kultur genommen. Zur Überprüfung der humanen CD4 Expression, wurden die T-Zellen mit anti-humanem CD4 und anti-Maus CD3 Antikörpern markiert und durch FACS-Doppelfärbung analysiert. Die FACS Messung ergab eindeutig, daß der humane CD4-Rezeptor in CD3 positiven Zellen exprimiert wird (siehe Abb. **3.3.2-1**). Vor Durchführung der Transduktion wurden die T-Zellen mit 5 µg/ml PHA (Sigma, Deisenhofen) und 20 U/ml murinem IL-2 (R&D Systems, Wiesbaden) vorstimuliert. Die Transduktion mit MLV/HIV-1 GFP Vektoren erfolgte 48 Stunden nach Stimulation. Nach weiteren 48 Stunden waren einige wenige GFP exprimierende Zellen zu sehen (siehe Abb. **3.3.2-2 a)** u. **b)**). Die Anwesenheit des humanen CD4-Rezeptors ist ausreichend um die Transduktion der Maus T-Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren zu ermöglichen, da an Stelle des humanen CXCR4 Rezeptors auch der analoge murine Rezeptor verwandt werden kann (Mitnacht-Kraus et al., 2002).

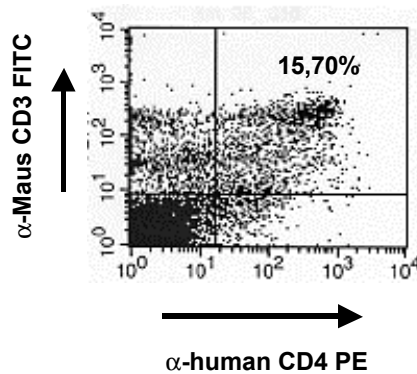


Abb. 3.3.2-1 FACS Analyse zum Nachweis der Expression des humanen CD4-Rezeptors auf T-Zellen der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4. Die FACS Färbung wurde durch Markieren der Milzzellen mit einem anti-human CD4-PE (Becton Dickinson, Heidelberg) und einem anti-Maus CD3-FITC gekoppelten Antikörper (Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Die prozentuale Anzahl der doppelt positiven Zellen ist angegeben.

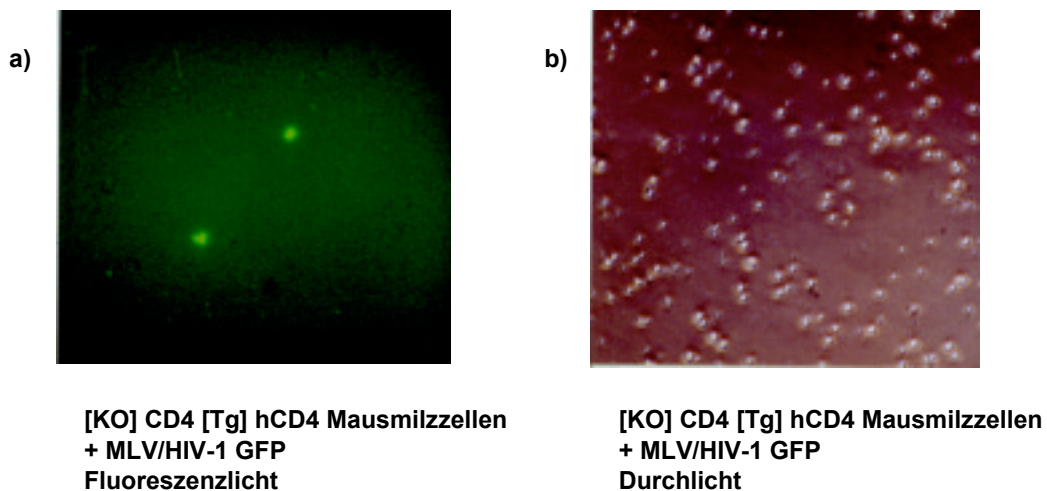


Abb. 3.3.2-2 a) Fluoreszenzlichtaufnahme und b) Durchlichtaufnahme der mit MLV/HIV-1 GFP transduzierten Milzzellen der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4. Die Zellen waren zuvor mit PHA und IL-2 stimuliert worden.

3.3.3 *In vivo* Transduktion der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4 mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren

Primäre Milzzellen aus transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Mäusen konnten durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren transduziert werden. Dies war die

Grundlage einen zielgerichteten Gentransfer *in vivo* zu untersuchen. Hierzu wurde der Transfer des LacZ Gens benutzt.

Da retrovirale Vektoren nur in Teilung befindliche Zellen transduzieren und deshalb die Transduktionseffizienz von der Proliferationsrate der Zellen abhängig ist, wurden die Mäuse vor der Transduktion mit MLV/HIV-1 Vektoren durch Gabe von T-Zell aktivierenden Substanzen behandelt. Zur Aktivierung der Maus T-Zellen wurden Lektinol (Madaus, Köln) oder Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) (Sigma, Deisenhofen) benutzt. Lektinol ist eine aus Mistelextrakten gewonnene Mischung von Lektinen, das in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen verwandt wird (Hajito et al., 1989; Schultze et al., 1991; Beuth et al., 1997). Lektinol aktiviert T-Zellen (Stein et al., 1997; Stein et al., 1998). Staphylococcus Enterotoxin B ist ein Superantigen, daß im Gegensatz zu Lektinol jedoch nur eine bestimmte Gruppe von T-Zellen aktiviert. SEB bindet direkt an die Außenseite von MHC Klasse II Molekülen und an die V β 8+ Domäne einiger T-Zell Rezeptoren, wodurch es zu einer Aktivierung der gebundenen T-Zellen kommt. SEB bindet jedoch nicht an alle V β Domänen, dadurch werden von SEB nur V β 8+ T-Zellen aktiviert (Hermann et al., 1990; Kawabe et al., 1990; Rellahan et al., 1990). Lektinol führt zu einer Multimerisierung des CD3 T-Zell-Rezeptors und in Folge zu einer Aktivierung der T-Zellen. Da Lektine unspezifisch an alle CD3 Rezeptoren binden, wird jede T-Zelle aktiviert, an die Lektine binden.

Die Mäuse wurden in zwei Gruppen aus je 4 Tieren aufgeteilt. Die Mäuse der ersten Gruppe wurden subkutan mit 10 μ l Lektinol (Stocklösung 1 : 10 in PBS verdünnt) gespritzt. Den Mäusen der zweiten Gruppe wurden 50 μ g SEB (gelöst in 50 μ l PBS) intravenös gespritzt. 24 Stunden nach Vorbehandlung der Mäuse wurden je drei Mäuse jeder Gruppe mit 150 μ l ($2,25 \times 10^5$ IU) angereicherter MLV/HIV-1 LacZ Virusüberstände intravenös gespritzt. Eine Maus pro Gruppe wurde nicht mit Virusüberständen behandelt und diente als negativ Kontrolle. Am darauf folgenden Tag 3 und an Tag 6 nach der Stimulation der Mäuse erfolgten zwei weitere intravenöse Injektionen in die

behandelten Mäuse von je 230 μl ($3,45 \times 10^5$ IU) angereicherter MLV/HIV-1 LacZ Vektoren (siehe Behandlungsschema in Abb. 3.3.3). 29 Tage nach Beginn des Experiments wurden die Mäuse getötet. Die Organe Milz, Thymus, Lunge, Leber und periphere Lymphknoten wurden entnommen und in zwei Teile geschnitten, ein Teil jedes Organs wurde zur Anfertigung von Gefrierschnitten benutzt. Der zweite Teil der Organe wurde zur Herstellung von Proteinextrakten für β -Gal-Assays benutzt. Die Behandlung der Mäuse mit Lektinol und SEB sowie mit den angereicherten Vektoren wurde gut vertragen. Weder durch die Gabe von Lektinol und SEB, noch durch die Applikation der Vektorpartikel wurden sichtbare Nebenwirkungen verursacht.

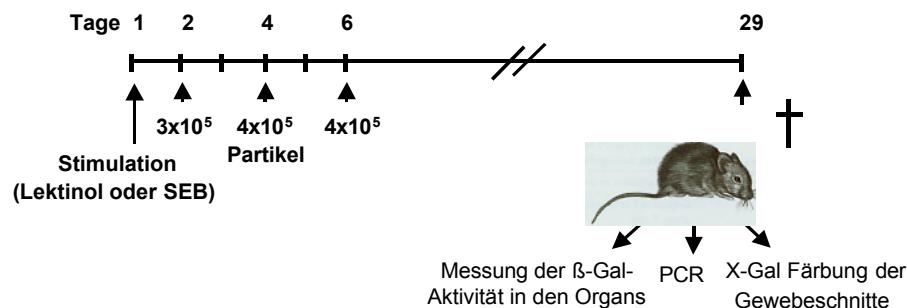


Abb. 3.3.3 Schematische Darstellung der *in vivo* Transduktion der transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Mäuse.

3.3.4 Nachweis des MLV/HIV-1 vermittelten *in vivo* Gentransfers in der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4

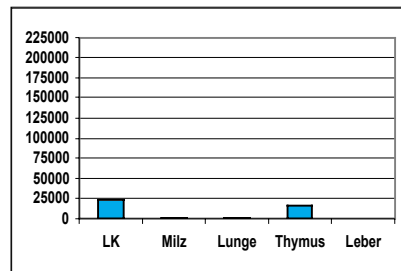
Der MLV/HIV-1 vermittelte Transfer des LacZ Gens in Mauszellen wurde mit drei verschiedenen Nachweismethoden untersucht.

1. β -Gal-Assays zum Nachweis von β -Galactosidase Aktivität in Organextrakten.
2. X-Gal Färbung von Gefrierschnitten zum Nachweis der β -Galactosidase Aktivität in transduzierten Zellen.

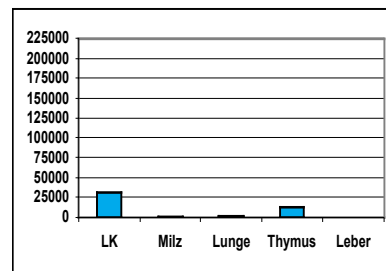
3. Polymerase Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis der Transduktion durch Integration des retroviralen Vektors in das Genom der transduzierten Zellen.

3.3.4.1 β -Gal Assay zum Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität in Organextrakten

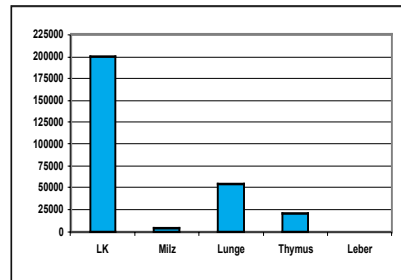
Aus den Organen der Mäuse wurden Proteinextrakte hergestellt und im β -Gal Assay getestet. Anschließend wurden die Proteinkonzentration in den Extrakten bestimmt. Die Berechnung der relativen β -Gal Aktivität erfolgte durch β -Gal Aktivität : Proteinkonzentration. Die Lymphknoten, der Lektinol als auch der SEB stimulierten und mit Vektoren transduzierten Mäuse, hatten die höchste relative β -Gal Aktivität. Erhöhte β -Gal Aktivität war ebenfalls in den Thymusextrakten der transduzierten Tiere und in der Lunge einer Lektinol stimulierten Maus zu beobachten. In den Milzextrakten und in den Leberextrakten der transduzierten und der nicht transduzierten Mäuse wurden keine erhöhten Werte gemessen. In den Proteinextrakten der untransduzierten Mäuse war keine erhöhte β -Gal Aktivität zu finden Abb. **3.3.4.1 a)-h)** zeigt die Einzelwerte der β -Gal Aktivität aus 3 mit Lektinol vorstimmulierten und Vektor behandelten Tieren, 3 mit SEB vorstimmulierten und Vektor behandelten Tieren und zwei negativ Kontrolltieren. Die Werte für die Lymphknoten konnten nur aus den SEB behandelten Mäusen Nr.1 u. Nr.3 berechnet werden, da in der SEB Maus Nr.2 kein Lymphknoten gefunden wurde. Aus der SEB behandelten negativ Kontrollmaus konnte ebenfalls kein Lymphknoten präpariert werden.



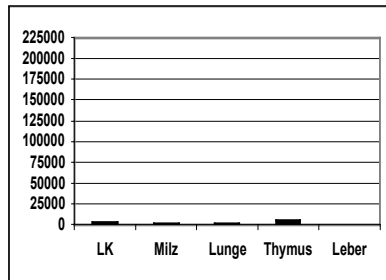
a) Lektinol 1 + MLV/HIV-1 LacZ



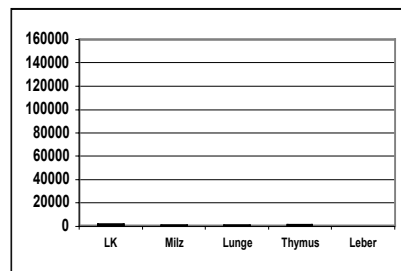
b) Lektinol 2 + MLV/HIV-1 LacZ



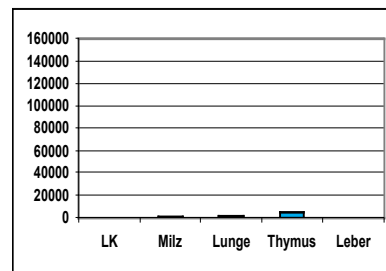
c) Lektinol 3 + MLV/HIV-1 LacZ



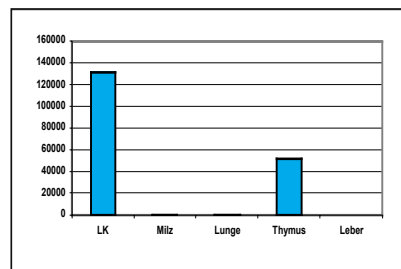
d) Lektinol -



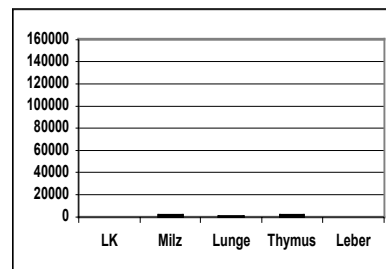
e) SEB 1 + MLV/HIV-1 LacZ



f) SEB 2 + MLV/HIV-1 LacZ



g) SEB 3 + MLV/HIV-1 LacZ



h) SEB -

Abb. 3.3.4.1 Relative β -Gal Aktivität in unterschiedlichen Organen transduzierter transgener hCD4 Mäuse. Untransduzierte hCD4 Mäuse dienten als negativ Kontrolle. Die relative β -Gal Aktivität ergab sich aus der gemessenen β -Gal Aktivität : Proteinkonzentration der Zelllysate. In den Mäusen SEB 2 und der SEB stimulierten neg. Kontrollmaus wurden keine Lymphknoten gefunden. In den Mäusen Lektinol 3 und SEB 3 wurden die höchsten β -Gal Werte gemessen.

3.3.4.2 X-Gal Färbung von Gefrierschnitten der Mausorgane zum Nachweis von β -Galaktosidase Aktivität in transduzierten Zellen

In den Lymphknoten aller drei mit Lektinol stimulierten und mit Vektorüberständen behandelten Mäuse waren blau gefärbte Zellen zu sehen. In den Lymphknoten zweier mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimulierter und mit Virusüberstand behandelte Mäuse waren ebenfalls gefärbte Zellen zu finden. In den restlichen Organen waren keine gefärbten Zellen zu sehen. Die größte Anzahl blau gefärbter Zellen befanden sich in den Lymphknoten der Mäuse Lektinol 2 und 3 sowie SEB 3 (siehe Abb. 3.3.4.2 a-f)).

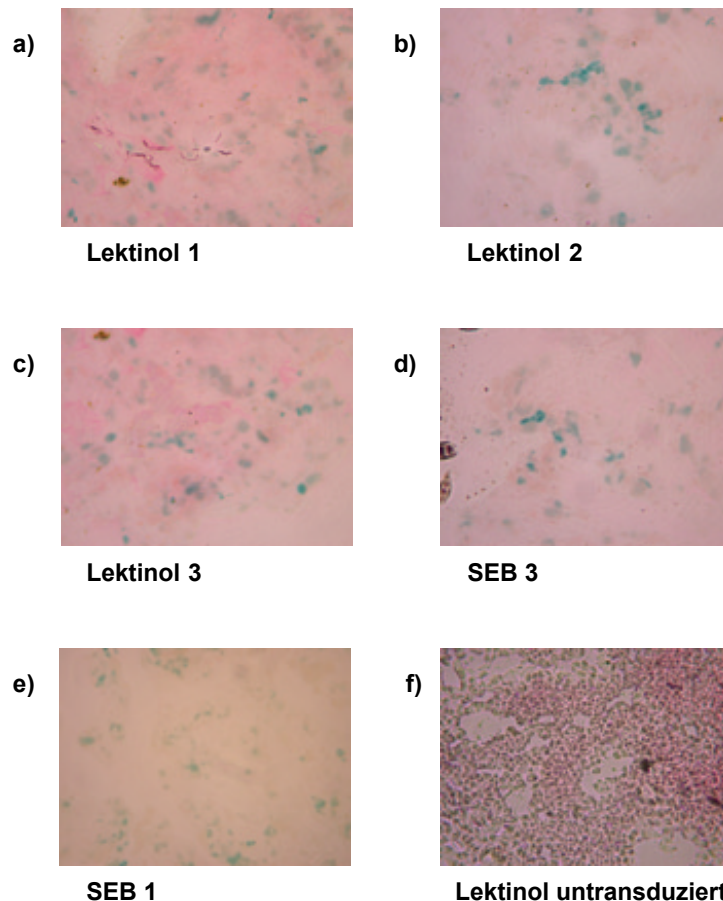


Abb. 3.3.4.2 a) – f) X-Gal Färbung der Gewebeschnitte von Lymphknotengewebe. Aus allen Lektinol behandelten Tieren konnten Lymphknoten präpariert werden. Aus den SEB behandelten Mäusen nur aus 1 und 2. Gezeigt sind Photos der X-Gal gefärbten Lymphknoten der Mäuse Lektinol 1 a), 2 b) und 3 c) sowie SEB 3 d) und 2

e) im Vergleich zum Lymphknoten der untransduzierten Lektinol behandelten Maus
f).

Da das LacZ Gen eine Kernlokalisationssequenz besitzt sollten die transduzierten Zellen nur in den Kernen gefärbt sein. An Hand der Schnitte war jedoch nicht zu erkennen, ob nur die Kerne oder die Zellen komplett gefärbt waren.

3.3.4.3 PCR Nachweis der integrierten retroviralen Vektoren

Aus den Geweberesten der Gefrierschnitte wurde genomische DNA präpariert. Zum Nachweis des integrierten LacZ Gens (nls-lacZ) des retroviralen Vektors pMFGnslacZ wurde der 5'-Primer nls-lacZ (5'-CGACTCCTGGAG-CCCGTCAGTATC-3'), der komplementär zu der Sequenz des nls-lacZ Gens ist und der 3'-Primer 3'-LTR (5'-GACCACTGATAT-CCGTCTTTAAC-3'), der komplementär zu der stromaufwärts vom 3' LTR liegenden Vektorsequenz ist, benutzt (Ferry et al., 1991) (siehe Abb. **3.3.4.3 a**)).

Das amplifizierte Fragment hat eine Größe von ca. 400 bp. Es wurden aus den Resten der Lymphknoten zweier SEB behandelte Mäuse (Nr.1 u. Nr.3), aus dem Lymphknoten einer untransduzierten Maus (Lektinol) sowie aus dem Lymphknoten und der Leber einer Lektinol behandelten Maus (Nr.3) genomische DNA präpariert und nachfolgend zur Durchführung der PCR mit den oben beschriebenen Primern eingesetzt. Im Lymphknoten einer SEB behandelten Maus (Nr.3) wurde ein positives PCR-Produkt gefunden, was bedeutet, daß der virale Vektor nach der Transduktion in das Genom der Zelle integriert wurde (siehe Abb. **3.3.4.3 b**)).

Parallel wurde zur Überprüfung der DNA-Präparation eine Kontroll-PCR mit den Primern F-hu-CD4 und R-hu-CD4 durchgeführt, die komplementär zur Sequenz des humanen CD4 Gens sind. Nur aus den Lymphknoten der SEB

Maus (Nr.3) und der Lektinol behandelten negativ Kontrollmaus konnte das humane CD4 Gen amplifiziert werden (siehe Abb. 3.3.4.3 c)).

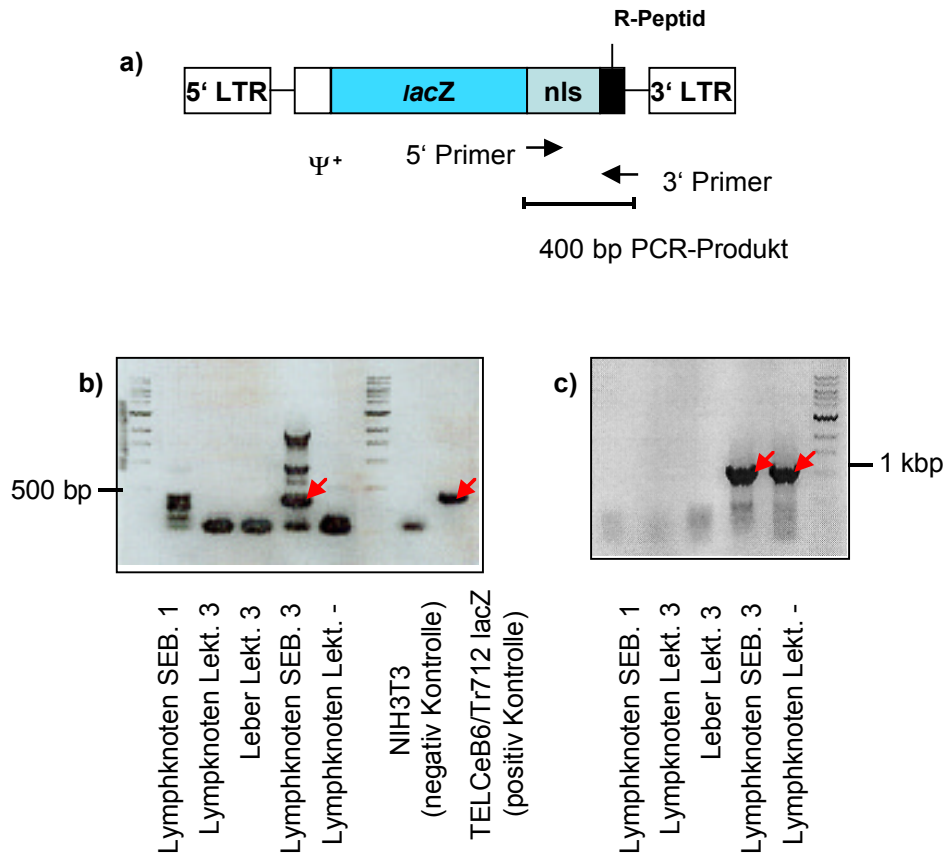


Abb. 3.3.4.3 a) Darstellung der Primer aus der Sequenz des retroviralen Vektorkonstrukts pMFGnslacZ. Das Konstrukt enthält ein modifiziertes LacZ Gen. Dieses kodiert für ein Fusionsprotein aus der *Escherichia coli* β -Galaktosidase und der Kernlokalisationssequenz (nls) des Large Tumor antigens aus Simian Virus 40 (SV40). Die von den Primern amplifizierte Sequenz ist 400 bp lang. **b)** Ergebnis der PCR aus genomischer DNA zum Nachweis der Integration des retroviralen Vektors. Im Lymphknoten einer SEB behandelten Maus (Nr.3) konnte ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Die unteren Banden sind unspezifische PCR-Produkte. **c)** Ergebnis der PCR aus genomischer DNA zur Überprüfung der DNA Präparation mit humanen CD4 Primern. Das von den humanen CD4 Primern amplifizierte PCR-Produkt ist ca. 1 kbp groß und durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Mengen an genomischer DNA war in keinem Ansatz bestimmbar, wodurch nicht sicher ist, daß in beiden PCR Ansätzen ähnliche Mengen an Template-DNA eingesetzt wurden. Dies bedeutet, daß nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann, daß die negativ Kontrollmaus eventuell ein positives Signal ergeben könnte.

3.4 Anwendung MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren zur Eliminierung humaner kutaner T-Zell Lymphome in Tumor-tragenden Nacktmäusen

Die humanen kutanen T-Zell Lymphome Sezary-Syndrom (SS) und Mycosis Fungoides (MF) werden durch CD4 positive Lymphomzellen verursacht. Zunächst kommt es zum Einwandern der Lymphomzellen in die Haut. Durch klonale Expansion kommt es zur Bildung von Plaques (MF). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zum Auswandern der Tumorzellen in den gesamten Organismus (SS) (Diamandidou et al., 1996).

Da sich Mycosis Fungoides und das Sezary-Syndrom durch autonome Proliferation und Akkumulation von peripheren CD4 positiven T-Lymphozyten an lokal begrenzten Stellen in der Haut auszeichnen, besteht die Möglichkeit einer lokalen Applikation MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren zur Therapie der Lymphome. Die Vektoren, die Gene tragen, die eine zelltoxische Wirkung haben, müssen lokal in die befallenen Bereiche injiziert werden.

3.4.1 Herstellung der Verpackungzelllinie FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus

FLY-HIV-87 wurde durch Transduktion mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren mit dem retroviralen Vektorkonstrukt pEGFP/Tkfus (Paquin et al., 2001) ausgestattet. pEGFP/Tkfus kodiert für ein chimäres Fusionsprotein (EGFP/TKfus) aus dem grünen Fluoreszenzprotein (EGFP) und der Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK). Das Konstrukt dient als Suizid- und gleichzeitig als Markergen. Da HSV-TK eine Kernlokalisationssequenz besitzt, ist das Fusionsprotein nur im Zellkern zu finden (siehe Abb. **3.4.1-1 b**)), EGFP ist in der gesamten Zelle verteilt (**3.4.1-1 a**)). Die resultierende Verpackungszelle FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus produzierte nur $2,65 \times 10^4$ Partikel/ml und zeigte eine für Mischpopulationen typische uneinheitliche Expression von EGFP/Tkfus (siehe Abb. **3.4.1-2 a**)).

Zur Gewinnung eines pEGFP/Tkfus transduzierten stärker exprimierenden Einzelklons wurden Zellen der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus vereinzelt. Es wurden 40 Einzelklone isoliert, im FACS auf uniforme EGFP/Tkfus Expression untersucht und anschließend die Titer bestimmt. Klon 85 EGFP/Tkfus zeigte in der FACS Analyse eine uniforme Expression von EGFP/Tkfus und exprimierte den höchsten Titer von 1×10^5 Partikel/ml (Siehe Abb. 3.4.1-2 b)).

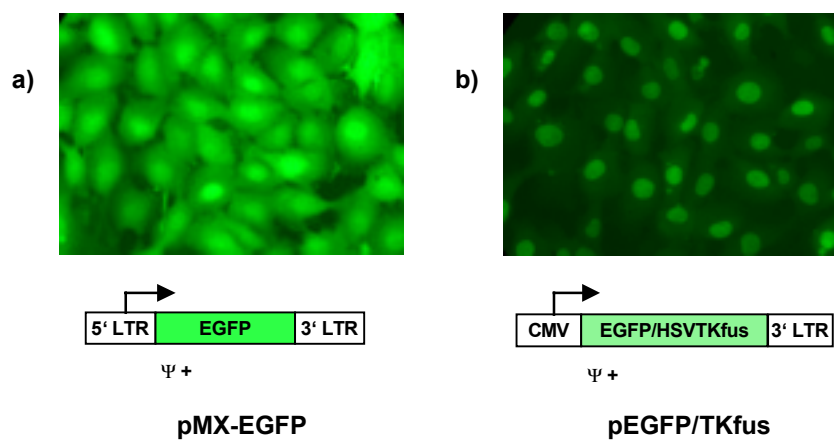


Abb. 3.4.1-1a) Vergleich von FLY-HIV-87 Klon 27-GFP und **b)** FLY-HIV-87 Klon 85-EGFP/Tkfus bei Fluoreszenzlicht. Im Gegensatz zu FLY-HIV-87 Klon 27-GFP ist bei FLY-HIV-87 Klon 85 EGFP/Tkfus EGFP nur in den Kernen lokalisiert. Schematische Darstellung der retroviralen Vektoren **c)** pMX-EGFP **d)** pEGFP/Tkfus

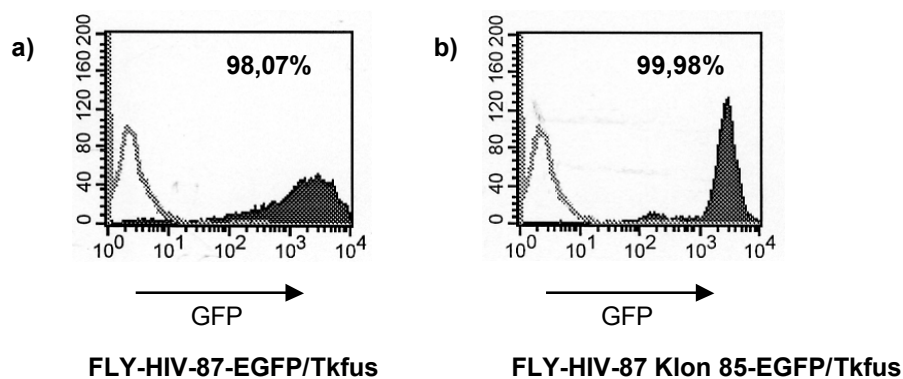


Abb. 3.4.1-2 FACS Analyse der Ausgangszelllinie FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus und der, durch Vereinzeln der Zellen erhaltenen Einzelzellklon 85-EGFP/Tkfus **a)** Mischpopulation FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus **b)** Klon 85-EGFP/Tkfus. (Im Histogrammplot ist der prozentuale Anteil an EGFP/Tkfus exprimierenden Zellen angegeben.)

3.4.2 *In vitro* Abtöten pEGFP/Tkfus transduzierter humaner kutaner T-Zell Lymphomzellen (MyLa) durch Ganciclovir Gabe

Die Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) ist ein Prodrug aktivierendes Enzym. Um therapeutisch wirksam zu sein, muß Ganciclovir (GCV) in Ganciclovir-Triphosphat (GCV-TP) überführt werden. In HSV-TK exprimierenden Zellen wird Ganciclovir effizient zu Ganciclovir-Monophosphat (GCV-MP) umgewandelt (Moolten et al., 1986; Moolten et al., 1990). Zelluläre Kinasen katalysieren anschließend die Phosphorylierung zu toxischem Ganciclovir-Triphosphat (Miller et al., 1980; Mullen et al., 1994). In nicht transduzierten Zellen fehlt die HSV-TK und Ganciclovir wird ineffizient monophosphoryliert, dadurch werden die HSV-TK exprimierenden Zellen selektiv durch Ganciclovir getötet.

Dieses Prinzip wird in der Gentherapie benutzt. Das HSV-Tk Gen wird transferiert und die genetisch modifizierten Zellen können durch Ganciclovir abgetötet werden.

Zunächst wurde die therapeutische Wirksamkeit des EGFP/Tkfus Konstrukts *in vitro* an der humanen kutanen T-Zell Lymphomzelllinie MyLa (Döbbeling et al., 1998) überprüft.

Um zu Überprüfen ob bzw. wie effektiv die transduzierten MyLa pEGFP/Tkfus Zellen getötet werden, und welche Ganciclovir Konzentrationen dazu nötig sind, wurde zur Durchführung einer Kinetik, eine Mischpopulation hergestellt, die zu 55% aus transduzierten und zu 45% aus nicht transduzierten MyLa Zellen bestand. Die gleiche Anzahl von Zellen wurde mit Ganciclovir (Cymeven[®], Roche) in Konzentrationen von 1 µg, 5 µg, 10 µg und 50 µg pro ml Medium kultiviert. Ein Ansatz ohne Ganciclovir diente als Kontrolle, zur Überprüfung, ob sich das prozentuale Verhältnis zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen ohne den Einfluß von Ganciclovir verändert.

Nach Ganciclovir Gabe wurde täglich für 5 Tage mittels FACS-Analysen die prozentualen Verhältnisses zwischen transduzierten (EGFP/Tkfus positiven) und nicht transduzierten (EGFP/Tkfus negativen) MyLa Zellen gemessen. In allen Ansätzen kommt es in Abhängigkeit der Ganciclovirkonzentration zu einem Rückgang der transduzierten Zellen. 5 Tage nach der Behandlung der Zellen wurden bei einer Ganciclovirkonzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ 90% der EGFP/Tkfus positiven Zellen eliminiert. Im Ansatz ohne Ganciclovir kam es zu keiner Veränderung des Verhältnisses zwischen transduzierten und nicht transduzierten Zellen (siehe Abb. 3.4.2).

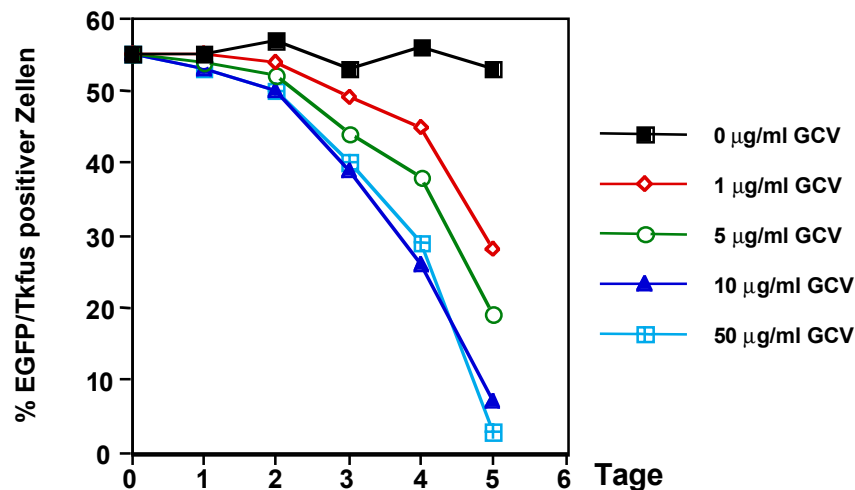


Abb. 3.4.2 Veränderung des prozentualen Verhältnisses von EGFP/Tkfus transduzierten und nicht transduzierten MyLa Zellen nach Ganciclovir Gabe. 5 Tage nach Behandlung der Zellen mit Ganciclovir in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ sind 90 % der transduzierten Zellen eliminiert worden. Im Ansatz ohne Ganciclovir kommt es nicht zum Absterben transduzierter Zellen.

3.4.3 Etablierung eines Nacktmausmodells für humane kutane T-Zell Lymphome

Eine neue Form der Therapie humaner kutaner T-Zell Lymphome am Menschen könnte eine intratumorale Applikation MLV/HIV-1 pseudotypisierter Vektoren sein. Um die *in vivo* Applikation von MLV/HIV-1 Vektoren zu testen, wurde ein Nacktmausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome etabliert.

Hierzu wurden 1×10^7 Zellen der humanen kutanen T-Zell Lymphomzelllinie MyLa subkutan injiziert. Nach 50 Tagen hatten ca. 81% der mit MyLa Zellen gespritzten Nacktmäuse unter der Haut Tumore von ca. 0,5 – 1 cm im Durchmesser gebildet (siehe Abb. 3.4.3-1 a)). Das Tumormaterial wurde erneut in Mäuse subkutan implantiert und passagiert.

Zur Charakterisierung der, in der Maus passagierten MyLa Zellen wurden Tumore immunhistochemisch auf Expression von humanem CD3 Rezeptor untersucht. In dem, von dem Tumor angefertigten Paraffinschnitten befinden sich proliferierende Tumorzellen in der oberen Hautschicht, abgekapselt zwischen der äußeren Hautschicht und dem Bindegewebe (siehe Abb. 3.4.3-1 b) und c)) In der Mitte des Tumors befindet sich nekrotisches Gewebe (siehe Abb. 3.4.3-1 b)). Im Fall des Sezary Syndroms und bei großen Mycosis Fungoides Tumoren kommt es zum Auswandern der Tumorzellen aus der Haut, über den Blutstrom, in den gesamten Organismus und zum Befall der Organe Lymphknoten, Lunge und Leber (Diamandidou et al., 1996).

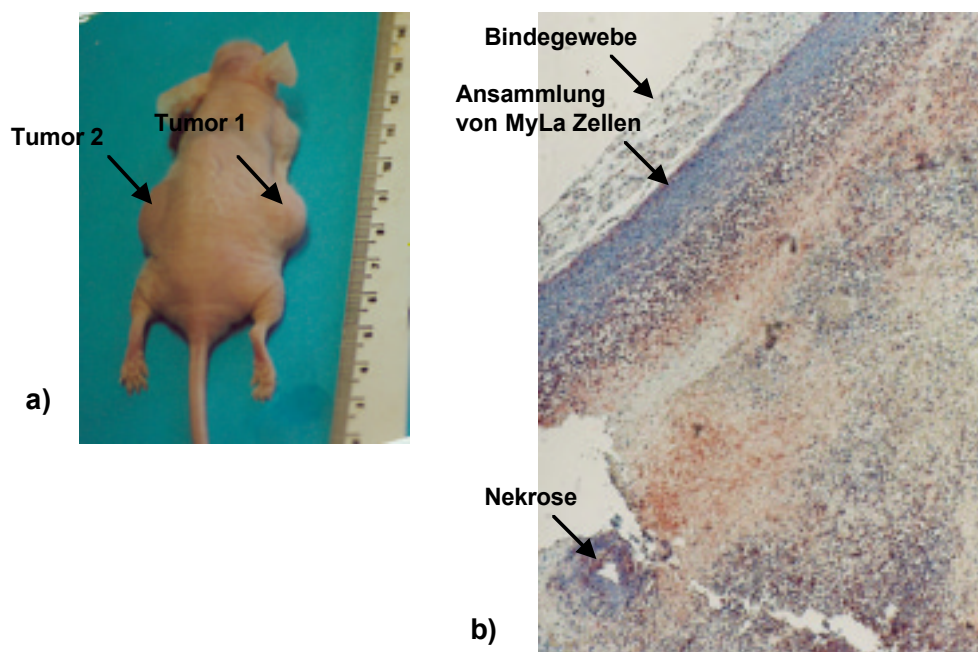


Abb. 3.4.3-1 a) Nacktmaus mit zwei subkutan wachsenden Tumoren von ca. 1 cm im Durchmesser. **b)** Durchschnitt durch einen Nacktmaustumor. Die humanen MyLa

Zellen wurden durch Inkubation mit einem Kaninchen anti-human CD3 Antikörper (DAKO, Hamburg), einem Biotin gekoppelten sekundären Antikörper (Dianova, Hamburg) und Streptavidin-HRP Konjugat (Zymed, Heiden) in einer anschließenden Färbung mit AEC-Substratlösung wie unter 2.2.4.4 sichtbar gemacht. Die MyLa Zellen erscheinen als rot gefärbte Punkte.

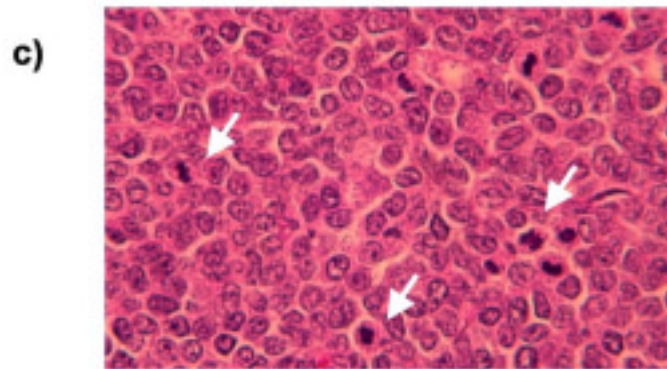


Abb. 3.4.3-1 c) Durchschnitt durch einen Nacktmaustumor. Zum sichtbar machen der Zellkerne wurde der Gewebeschnitt mit Mayer's Hematoxylin gefärbt. Innerhalb des Tumors sind proliferierende Tumorzellen zu erkennen. Diese sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zur Erörterung der Frage, in wie weit sich die MyLa Zellen wie Lymphomzellen im Körper eines Patienten mit Sezary Syndrom oder Mycosis Fungoides verhalten, wurden aus 3 Tumor-tragenden Nacktmäusen die Tumore sowie die Organe Herz, Lunge, Leber, Nieren, periphere Lymphknoten, Milz und Muskel entnommen und auf die Anwesenheit von humanem CD3 Rezeptor als Marker für die Tumorzellen untersucht. In den Organen Leber, Lunge und den peripheren Lymphknoten befinden sich human CD3 exprimierende MyLa Zellen (siehe Abb. 3.4.3-2 a)-h)). Außer in den Organen waren humane CD3 Rezeptor positive Zellen auch im Blut vorhanden. In den Blutresten innerhalb des Herzens waren CD3 Rezeptor positive MyLa Zellen vorhanden.

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, daß MyLa Zellen in Nacktmäusen subkutan Tumore bilden und daß vereinzelt Tumorzellen in inneren Organen sowie im Blut auftreten. Es kommt jedoch nicht zum Auswandern vieler Tumorzellen und in den Organen findet keine Expansion der Zellen statt, da nur einzelne Zellen gefunden wurden.

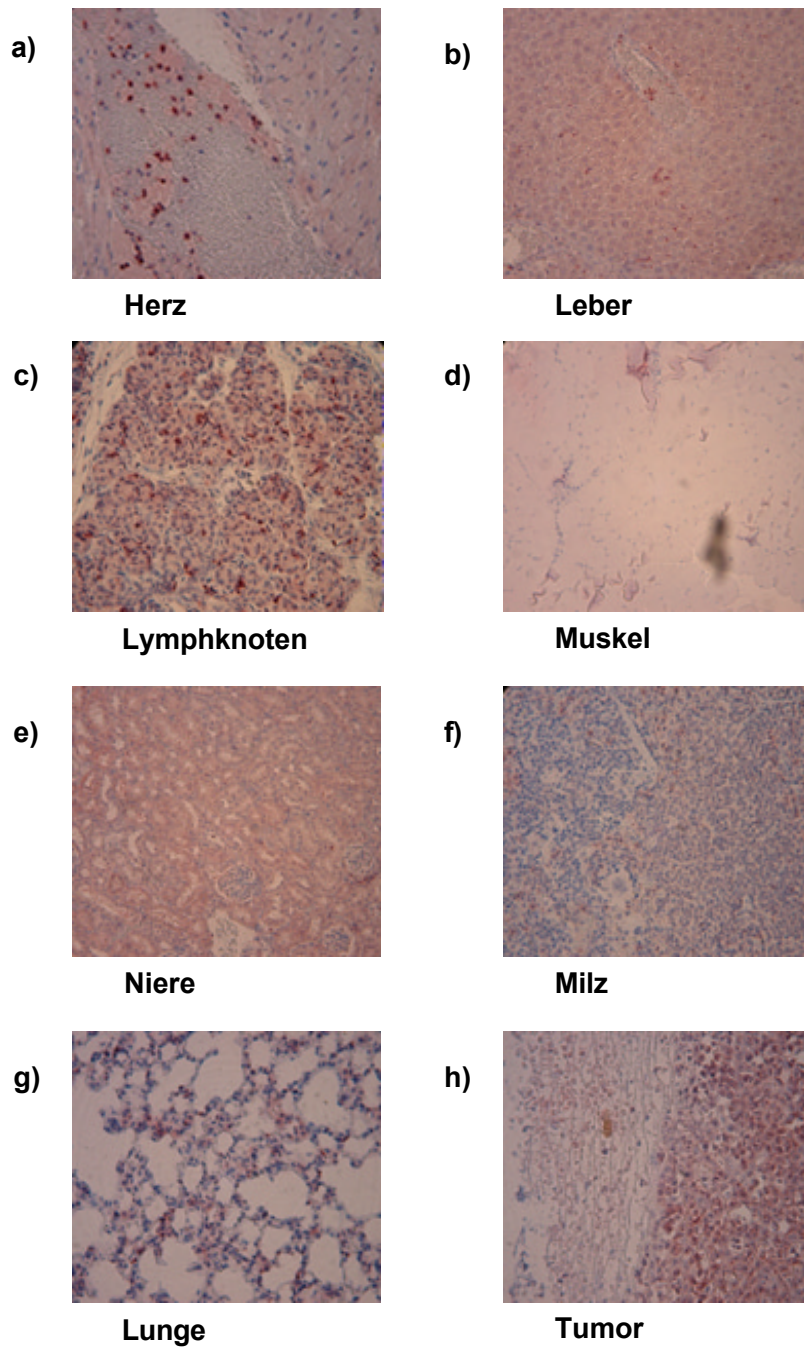


Abb. 3.4.3-2 a)-h) Paraffinschnitte von den aus einer Tumornacktmaus entnommenen Organen Herz, Lunge, Leber, Nieren, Lymphknoten, Milz und Muskel, sowie der beiden Tumore. Die geschnittenen Organe und die Tumore wurden wie oben beschrieben zum Nachweisen von MyLa Zellen mit dem Kaninchen anti-human CD3 Antikörper (DAKO, Hamburg) markiert und in einer anschließenden Färbereaktion wie unter 2.2.4.4 beschrieben sichtbar gemacht. In Lymphknoten, Lunge und Leber sind vereinzelt positive Zellen als rote Punkte zu sehen. Im Herz befinden sich Blutreste, in denen sich ebenfalls rot gefärbte Tumorzellen befinden.

3.4.4 Intratumorale Applikation von MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus Vektoren in Tumor-tragenden Nacktmäusen und anschließender Ganciclovir Behandlung

Nachdem unter **3.4.2** *in vitro* demonstriert werden konnte, daß die humane kutane T-Zell Lymphom Zelllinie MyLa nach Transduktion mit MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus Vektorpartikeln durch anschließende Behandlung mit Ganciclovir effektiv getötet werden können, wurde untersucht, ob die intratumorale Applikation von MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus Vektorpartikeln und eine anschließende Behandlung mit Ganciclovir einen Rückgang der Tumormasse in Tumor-tragenden Mäusen bewirkt.

Zuerst wurde die höchst mögliche *in vivo* applizierbare Dosis an Ganciclovir bestimmt. Hierzu wurden Nacktmäusen 2 x täglich Ganciclovir in Konzentrationen von 300 mg/kg/d, 200 mg/kg/d, 150 mg/kg/d, 100 mg/kg/d und 50 mg/kg/d intraperitoneal injiziert. Über die Dauer des Experiments wurde das Gewicht der Tiere kontrolliert. Konzentrationen an Ganciclovir über 100 mg/kg/d, 2 x täglich, führten zu starken Gewichtsverlusten und zum Tod der Tiere. Die Konzentration von 2 x 50mg/kg/d erwies sich als Dosis bei der die Tiere bei minimalen Gewichtsverlusten überlebten.

Es wurden 3 Gruppen aus jeweils vier Tieren gebildet, die jeweils zwei Tumore gebildet hatten, die nach vier Passagen von MyLa Zellen in der Maus hervor gegangen sind. Den Mäusen der ersten Gruppe wurden an den ersten drei aufeinanderfolgenden Tagen angereicherte Überstände mit je 7×10^4 MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus pseudotypisierten Vektoren intratumoral gespritzt. Den Tiere der zweiten Gruppe wurden parallel zur ersten Gruppe an den drei Tagen angereicherte Überstände mit je 7×10^4 MLV/HIV-1 GFP pseudotypisierte Vektoren, die nur EGFP kodieren, intratumoral injiziert. Den Tieren der dritten Gruppe wurde parallel zu den beiden Gruppen zur gleichen Zeit gleich Volumina an PBS intratumoral gespritzt. Es wurde immer nur ein Tumor behandelt, somit konnte man den unbehandelten Tumor als negativ

Kontrolle verwenden. 6 Tage nach Beginn des Experiments erfolgte die Behandlung mit Ganciclovir (Cymeven®, Roche). Hierzu wurde über 6 Tage den Mäusen aus beiden Gruppen jeweils 2 x täglich 50 mg/kg intraperitoneal appliziert (siehe Abb. 3.4.4-1). Alle drei Tage wurde die Größe der Tumore durch Messen von Länge, Breite mit einer Schieblehre bestimmt. Die Größe des Tumors wurde nach der Formel $[Länge \times (Breite \times 2)] : 2$ berechnet. Die unbehandelten Kontrolltumore, die PBS behandelten sowie die pMX-EGFP behandelten Tumore zeigten keine signifikante Veränderung im Wachstum. Bei den pEGFP/Tkfus behandelten Tumoren kommt es nach 12 Tagen zu einer Verringerung des Tumorwachstums (siehe Abb. 3.4.4-2 a) u. b)).

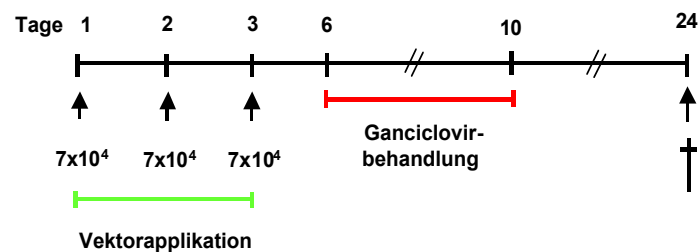


Abb. 3.4.4-1 Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Vektorapplikation und der Ganciclovir Behandlung. (Während der ersten 3 Tage wurden pro Tag 7×10^4 infektiöse Vektoren in einen der beiden Tumore pro Maus intratumoral appliziert. In einer weiteren Gruppe wurden zu den gleichen Zeitpunkten PBS in einen der beiden Tumore pro Maus intratumoral appliziert. Von Tag 6 – 10 erfolgte die Ganciclovirbehandlung. Es wurden 2 x täglich 50 mg/kg Ganciclovir intraperitoneal gespritzt. Nach 24 Tagen wurden die Mäuse getötet.)

24 Tage nach Beginn des Versuchs wurden die Tiere getötet und die Tumore zur Anfertigung von Paraffinschnitten entnommen. Anschließend wurden Gewebeschnitte angefertigt sowie die immunhistochemische Analyse der MyLa Zellen mit dem und einem Kaninchen anti-GFP Antikörper (Clontech, Heidelberg) durchgeführt. In den pMX-EGFP transduzierten Tumoren gibt es eine Vielzahl EGFP exprimierender Zellen. In den pEGFP/Tkfus transduzierten Tumoren finden sich keine gefärbten Zellen, da infolge der Ganciclovir Behandlung die HSV-TK positiven Zellen eliminiert wurden. Als negativ Kontrolle diente ein nicht mit Vektoren behandelter Tumor (siehe Abb. 3.4.4-3 a),b) u. c))

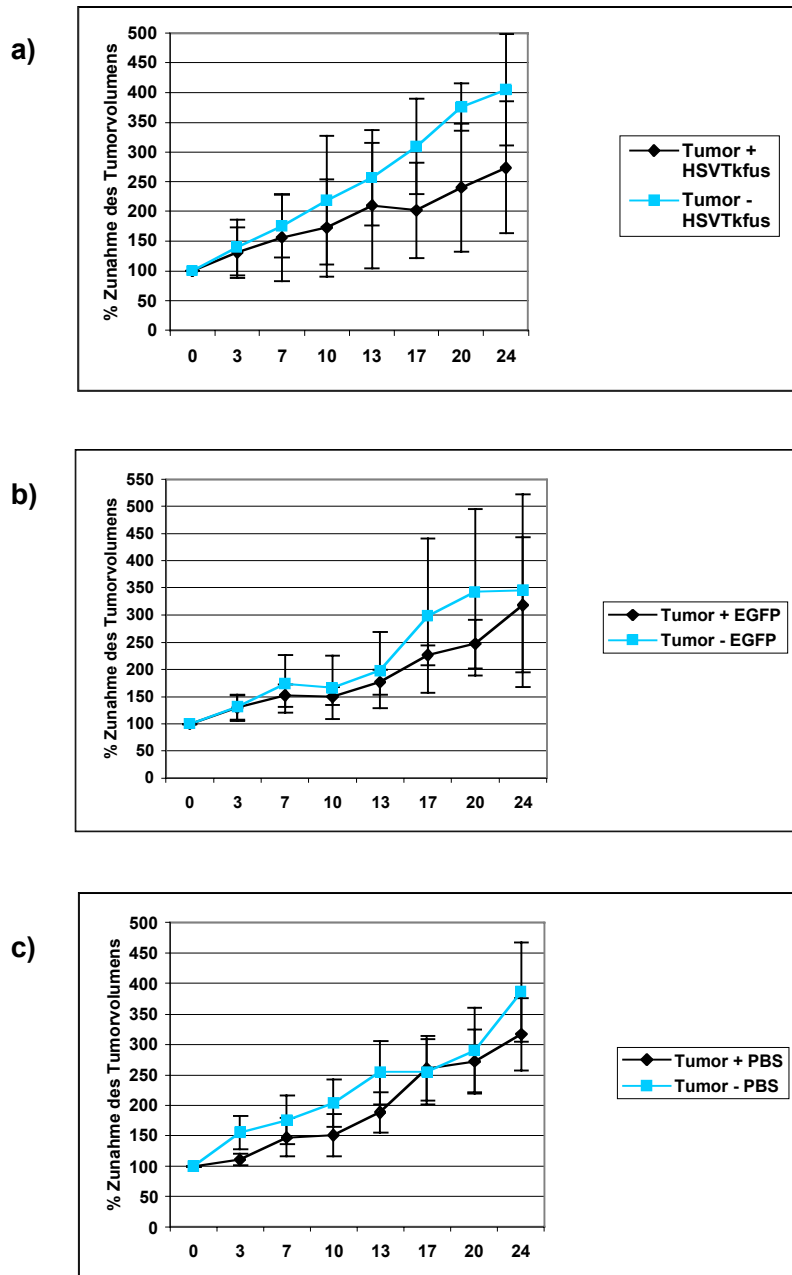


Abb. 3.4.4-2 a), b) u. c) Verlauf des Tumorwachstums während der intratumoralen Vektorapplikation und der anschließenden Ganciclovirbehandlung. Die Applikation der Vektorpartikel erfolgte nur in einen der beiden Tumore pro Maus. **a)** Applikation von $3 \times 7 \times 10^4$ MLV/HIV-1 GFP Vektorpartikeln und Ganciclovirbehandlung. **b)** Applikation von $3 \times 7 \times 10^4$ MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus Vektorpartikeln und Ganciclovirbehandlung. **c)** Applikation von $3 \times 50 \mu\text{l}$ PBS und Ganciclovirbehandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorummens sowie die Standardabweichungen.

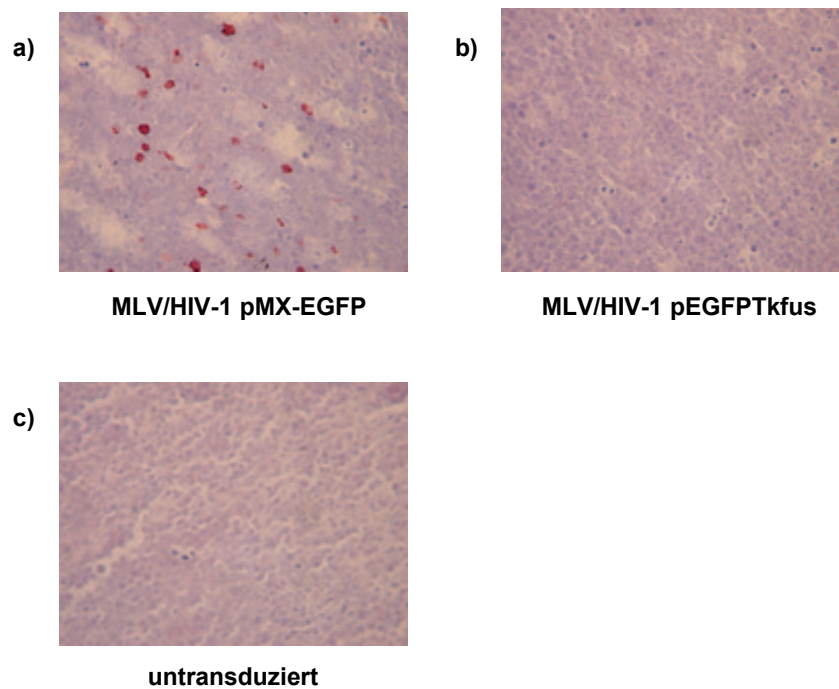


Abb. 3.4.4-3 Mit anti-GFP Antikörper gefärbte Schnitte von Tumoren **a)** MLV/HIV-1 GFP behandelter Tumor, **b)** MLV/HIV-1 pEGFP/Tkfus behandelter Tumor **c)** Vektor-unbehandelter Tumor. Nur in dem mit dem negativ Kontrollvektor pMX-EGFP behandelten Tumoren befinden sich gefärbte Zellen, da die, mit dem therapeutischen Vektor pEGFP/Tkfus transduzierten Zellen durch die Ganciclovir Behandlung eliminiert wurden. Die Tumorschnitte wurden zum Nachweisen von EGFP positiven Zellen mit einem Maus anti-GFP Antikörper (Clontech, Heidelberg) markiert und in einer anschließenden Färbereaktion wie unter **2.2.4.4** beschrieben sichtbar gemacht. EGFP positive Zellen sind durch Rotfärbung zu erkennen.

3.4.5 Verteilung der MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren im Tumor

Zur Analyse der Spezifität und der Effizienz des Gentransfers, wurden 3 Tumor tragenden Nacktmäusen $4,9 \times 10^5$ MLV/HIV-1 GFP Vektoren oder $2,1 \times 10^5$ MLV/HIV-1 GFP Vektoren intratumoral injiziert. 12 Tage nach der Vektorbehandlung wurden die Mäuse getötet und die Tumore entnommen. Zwei der Mäuse hatte zwei und die dritte Maus einen Tumor, von ca. 0,8 – 1,4 cm Durchmesser. Die Tumore wurden in zwei Teile geschnitten, ein Teil wurde zur Anfertigung von histologischen Schnitten benutzt. Aus dem zweiten Teil wurden MyLa Zellen isoliert und wieder in Kultur genommen. 4 Tage nach

Präparation der MyLa Zellen wurden diese im FACS auf EGFP Expression analysiert. Der prozentuale Anteil EGFP exprimierender MyLa Zellen gibt Auskunft über die Effizienz des intratumoralen Gentransfers. Die Spezifität des Gentransfers, wurde durch FACS Doppelfärbungen mit einem PE gekoppelten anti-human CD4 Antikörper durchgeführt. Die Messung ergab, daß nur CD4 positive, aus dem Tumor präparierte Zellen EGFP exprimierten. Es wurden somit spezifisch nur CD4 positive Zellen innerhalb des Tumors transduziert.

Die Effizienz des Gentransfers lag in Abhängigkeit von der Anzahl der applizierten Vektoren zwischen 11.3% und 4.6%.

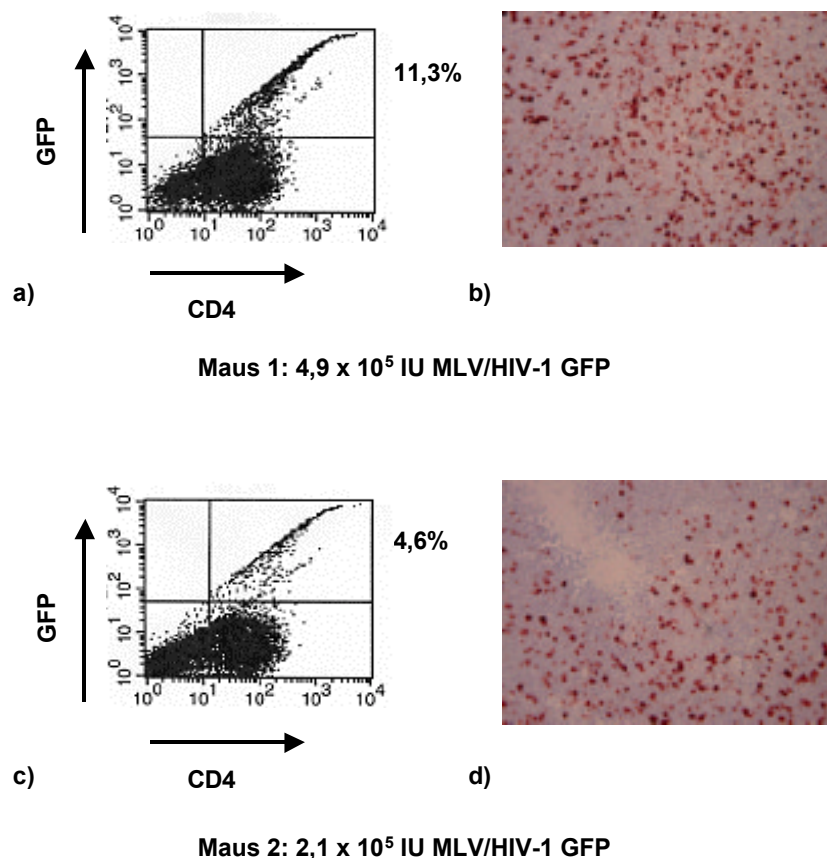


Abb. 3.4.5 a) und c) zeigen die Ergebnisse der FACS Analyse zur Bestimmung des prozentualen Anteils an EGFP exprimierenden Tumorzellen. Zum Nachweis des spezifischen Gentransfers wurden die, aus dem Tumor isolierten Zellen mit einem PE gekoppelten anti-human CD4 Antikörper (Becton Dickinson, Heidelberg) gefärbt.

b) und **d)** zeigen Immunhistochemisch gefärbte Paraffinschnitte der Formalinfixierten Tumorfragmente. Die immunhistochemische Färbung wurde mit einem Maus anti-GFP Antikörper (Clontech) durchgeführt.

4. Diskussion

Ziel der Gentherapie ist es, durch das Einbringen eines oder mehrerer Fremdgene in einen Organismus, eine Erkrankung zu behandeln oder zu heilen. Voraussetzung für die systemische Anwendung retroviraler Vektoren am Menschen sind die Spezifität für bestimmte Zielzellen, ausreichend hohe Titer und Resistenz gegenüber humanem Serumkomplement.

Um diese Probleme zu lösen, wurden im ersten Teil dieser Arbeit verschiedene MLV/HIV Pseudotypvektoren exprimierende, Vektor-freie Verpackungszelllinien etabliert und charakterisiert.

Vektor-freie Verpackungszelllinien können je nach Verwendungszweck mit beliebigen retroviralen Vektorkonstrukten ausgestattet werden. Durch die Pseudotypisierung von Kapsiden des Maus Leukämie Virus (MLV) mit Envelopeproteinen (Env) aus T-tropen oder dualotropen Stämmen des humanen Immundefizienzvirus (HIV) eignen sich die Vektoren für den zielgerichteten Transfer von therapeutischen Genen in humane CD4 positive T-Helferzellen.

Erkrankungen, bei denen CD4 positive T-Helferzellen beteiligt sind, sind die durch HIV verursachte Immunschwächekrankheit AIDS und kutane T-Zell Lymphome. Für die Durchführung von anti-HIV Therapieansätzen könnten mit anti-HIV Genen ausgestattete MLV/HIV Pseudotypvektoren systemisch appliziert werden. In Folge dessen würden T-Helferzellen mit anti-HIV Genen ausgestattet werden, welche die Zellen prophylaktisch gegen eine Infektion mit HIV schützen oder welche die Virusvermehrung in bereits infizierten Zellen inhibieren.

Humane kutane T-Zell Lymphome wie das Sezary Syndrom und Mycosis Fungoides werden durch entartete CD4 positive T-Zellen verursacht, wodurch sich diese Zellen ebenfalls als Zielzellen für den Transfer von therapeutischen Genen durch MLV/HIV Pseudotypvektoren eignen. Sollten jedoch

zytotoxische Gene zur Therapie der Lymphome eingesetzt werden, müssen die MLV/HIV Pseudotypen trotz ihrer Spezifität, lokal (intratumoral) appliziert werden, um die Transduktion "normaler" CD4 positiver T-Zellen zu vermeiden.

4.1 Abhängigkeit der Pseudotypisierung von der C-terminalen Verkürzung des HIV Env

Die Effizienz der Pseudotypisierung von MLV Kapsiden mit HIV Env ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. So ist die Pseudotypisierung von HIV-1 Env mit MLV Kapsiden nur möglich, wenn eine Verkürzung des C-Terminus vorgenommen wird. Am T-tropen HIV-1 Isolats BH10 wurde zuerst gezeigt, daß der Einbau in das Kapsid von MLV am effektivsten funktioniert, wenn der C-Terminus nur noch aus 7 Aminosäuren besteht (Schnierle et al., 1997).

Um zu überprüfen, ob eine Verkürzung des C-Terminus anderer HIV Env Proteine eine Pseudotypisierung mit MLV Kapsiden bewirkt, wurden unterschiedliche C-terminal verkürzte Varianten des T-tropen HIV-2 Subtyp A Isolats ISY (Francini et al., 1989) hergestellt. Es zeigte sich, daß wie im Falle des T-tropen HIV-1 Env, die effektivste Pseudotypisierung des HIV-2 Env durch eine Verkürzung des C-Terminus auf 7 Aminosäuren erreicht wird (Höhne et al., 1999).

Durch transiente Transfektionen mit einem auf 7 Aminosäuren C-terminal verkürzten SHIV-89.6P Env Expressionskonstrukt wurde gezeigt, daß auch mit diesem Subtyp eine effektive Pseudotypisierung mit MLV Kapsiden möglich ist.

Eine mögliche Ursache für die erhöhte Aufnahme der verkürzten Env Proteine in die Hüllmembran der Vektorkapside besteht darin, daß die verkürzten Envelopeproteine verstärkt an die Oberfläche der MLV/HIV exprimierenden Verpackungszellen transportiert werden. Außerdem ist es denkbar, daß unverkürzte Env Proteine aus sterischen Gründen eine Pseudotypisierung mit MLV Kapsiden nicht möglich macht.

4.2 Etablierung von Vektor-freien MLV/HIV Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszellen

Sämtliche bisher existierenden Verpackungszelllinien die MLV/HIV pseudotypisierten Vektoren produzieren, waren bereits mit einem LacZ Genhaltigen retroviralen Vektor ausgestattet. Daher war es nicht möglich diese Zellen nachfolgen mit anderen Reporter- oder therapeutischen Genen auszustatten. Um MLV/HIV Pseudotypvektoren für therapeutische Zwecke nutzen zu können, mußten zuerst Vektor-freie Verpackungszellen etabliert werden, die nachfolgend mit retroviralen Vektoren ausgestattet werden können, die therapeutische Gene enthalten.

In vorangegangenen Versuchen zur Herstellung der stabil MLV/HIV-1 Pseudotypartikel exprimierenden Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17, (Schnierle et al., 1997) wurden die Expression des HIV Env Proteins und des Selektionsmarkers von zwei getrennten Promotoren kontrolliert. Die Env Expression nahm bei dieser Zelllinie nach längerem Passagieren ab, was möglicherweise durch Methylierung des Promoters verursacht wurde. Um dies zu vermeiden, wurde versucht mit Hilfe bicistronischer HIV Env Expressionskonstrukte eine dauerhafte stabile Expression zu erreichen. Bei Gebrauch des bicistronischen eukaryontischen Expressionsvektors pEF-IRES-P (Hobbs et al., 1997) erfolgt die Expression des HIV *env* Gens und des Puromycinresistenzgens durch den selben Promoter. Beide Gene befinden sich auf der selben mRNA, was eine besonders effiziente Selektion ermöglicht, da alle puromycinresistenten Zellen auch das HIV Env Protein exprimieren müssen. Das Auftreten falsch positiver Klone wurde dadurch vermieden. Ein weiterer Vorteil des Vektors pEF-IRES-P ist der Gebrauch des Promoters für den humanen Elongationsfaktor 1 α (EF-1 α). Im Gegensatz zu viralen Promotoren, wird ein eukaryontischer Promoter in humanen Zellen nicht so häufig modifiziert, was eine lange Aufrechterhaltung der HIV-1 Env Expression ermöglicht.

Mit Hilfe des bicistronischen eukaryontischen Expressionsvektors pEF-IRES-P konnten die konstitutiv MLV/HIV-1 und MLV/SHIV-89.6P Pseudotyp-

vektoren exprimierende Verpackungszelllinien FLY-HIV-87 und FLY-SHIV-89.6P-152 etabliert werden.

Immunhistochemische Analysen der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87 (Thaler et al., 2001) und TELCeB6/Tr712-17 (Schnierle et al., 1997) ergaben eine einheitliche HIV-1 Env Expression in FLY-HIV-87 Zellen. Dies ist Beleg dafür, daß es sich bei der Zelllinie FLY-HIV-87 um einen Einzelklon handelt und beweist zusätzlich, daß die Env Expression auch nach 5 Wochen in Kultur in jeder einzelnen Zelle konstant geblieben war. In der Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17 dagegen wurde eine heterogene HIV-1 Env Expression beobachtet. Beide Gene wurden durch unterschiedliche Promotoren exprimiert. Möglicherweise wird die Expression des HIV-1 *env* Gens abgeschaltet, nicht jedoch die des Antibiotikaresistenzgens.

Die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 abgeleitete Zelllinie FLY-HIV-87 Klon 27-GFP zeigte nach 6 Monaten in Kultur jedoch ebenfalls einen Rückgang des Titers um ca. 25%. Western Blot Analysen zur Überprüfung der Env Expression zeigten in den lange passagierten FLY-HIV-87 Klon 27-GFP Zellen eine geringere HIV-1 Env Expression als in frisch aufgetauten Zellen. Dies beweist, daß der Rückgang des Titers auf die verringerte Env Expression zurückzuführen war. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß es auch bei Gebrauch von bicistronischen Expressionskonstrukten zu einer Verringerung der HIV-1 Env Expression kommt, die aber nicht so prägnant wie mit dem Vorläuferkonstrukt ist.

Im Gegensatz zu den HIV-1 BH10 Isolat und dem SHIV-89.6P Envelopeproteinen, war es nicht möglich konstitutiv HIV-2 Env exprimierende Verpackungszellen herzustellen. Bei dem Versuch mit Hilfe des bicistronischen HIV-2 Env Expressionskonstrukts pEF-IRES-P-Tr699 stabil MLV/HIV-2 exprimierende Verpackungszellen zum etablieren, wuchsen nach der Selektion keine Klone. Um ein vorzeitiges Absterben in Folge der HIV-2 Env Expression zu vermeiden, wurde eine tet induzierbare HIV-2 Env exprimierende Verpackungszelllinie FLY-HIV-2 i etabliert. Die Westernblot

Analyse der erhaltenen Klone zeigte nach Doxycyclingabe eine schwache Expression von HIV-2 Env im Vergleich zu Zellen, die transient mit dem Ausgangskonstrukt pCMV-HIV-2 Tr699 (Höhne et al., 1999) transfiziert worden waren (siehe Abb. 3.1.2.2-3). Offensichtlich überleben die Zellen nur, wenn die Env Expression sehr gering ist.

Vermutlich besteht die toxische Wirkung des HIV-2 Env darin, daß es ab einer bestimmten Mindestmenge zur Bildung von Proteinaggregaten in der Zelle kommt. In Westernblot Analysen von Proteinlysaten aus Zellen, war häufig zu beobachten, daß es zum Ausfallen des HIV-2 Env in den Geltaschen gekommen ist. Die intrazelluläre Bildung von Proteinaggregaten könnte die Ursache für die Toxizität des HIV-2 Env sein.

Wird nur eine geringe Menge an Env exprimiert, werden keine Aggregate gebildet. Dafür spricht, daß in Zelllysaten, in denen nur eine geringe Menge an HIV-2 Env gebildet wurde, kein Protein in den Geltaschen ausgefallen ist und das Protein nahe zu vollständig in das Gel gelaufen ist.

4.2.1 Abhängigkeit der Vektortiter vom HIV Env

Es wurden drei verschiedenen Vektor-freie Verpackungszelllinien FLY-HIV-87, FLY-SHIV-89.6P-152 und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10 etabliert, die eine flexible Ausstattung mit unterschiedlichen retroviralen Konstrukten ermöglichen.

Zur Durchführung von Titerbestimmungen wurden die Verpackungszelllinien mit dem EGFP Gen-haltigen retroviralen Vektor pMX-EGFP ausgestattet.

Es zeigte sich, daß außer der Länge des C-Terminus der HIV Envelopeproteine auch der HIV Subtyp aus dem das Env stammt, Einfluß auf die Menge an produzierten MLV/HIV Pseudotypvektoren hat.

Der Vergleich, der mit unterschiedlichen HIV Env ausgestatteten Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP, FLY-SHIV-89.6P-152-GFP und FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP ergab, daß die mit dem auf 7 Aminosäuren C-terminal verkürzten HIV-1 ENV aus dem T-trophen BH10 Isolat ausgestattete Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP die größte Anzahl an infektiösen Pseudotypvektoren produzierte (4×10^5 IU/ml). Die mit dem auf 7 Aminosäuren C-terminal verkürzten dualotrophen SHIV-89.6P Isolat ausgestattete Verpackungszelllinie FLY-SHIV-89.6P-152-GFP produzierte Anzahl an Pseudotypvektoren betrug ca. 1×10^5 IU/ml ($7,2 \times 10^4$ IU/ml auf NIH3T3 CD4/CXCR4; $9,8 \times 10^4$ IU/ml auf NIH3T3 CD4/CCR5). Die geringste Anzahl mit weniger als 10^3 IU/ml exprimierte, die mit dem auf 7 Aminosäuren verkürzten HIV-2 ISY Isolats ausgestattete tet induzierbare Verpackungszelllinie FLY-HIV-2 i-Env Klon 10-GFP.

Die Effizienz der Pseudotypisierung von HIV Env Proteinen mit MLV Kapsiden ist somit nicht nur von der Länge des C-Terminus abhängig, sondern auch von dem jeweiligen Subtyp, aus dem das Env Protein ursprünglich stammte.

MLV Kapside können auch mit Env Proteinen anderer Retroviren pseudotypisiert werden (Cosset et al., 1996). Ausgehend von der Zelllinie FLY wurden die Verpackungszelllinien FLYRD18 und FLYA13 etabliert (Cosset et al., 1995). Diese exprimieren MLV Kapside, die mit dem Env Proteinen aus endgenem Katzenvirus RD114 (FLYRD18) oder mit dem Env Protein aus dem amphotrophen Maus Leukämievirus (FLYA13) pseudotypisiert sind (Cosset et al., 1995). Die abgeleiteten Verpackungszelllinien FLYRD18LacZ und FLYA13LacZ produzierten Titer betragen 3×10^7 und 7×10^6 IU/ml. Die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ exprimierte Titer liegen zwischen 3×10^5 - 6×10^5 IU/ml und somit deutlich niedriger als von FLYRD18LacZ und FLYA13LacZ.

Ein absoluter Vergleich der Titer der Verpackungszellen FLYRD18LacZ und FLYA13LacZ mit den Titern der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ ist jedoch nicht möglich, da die Titerbestimmungen nicht unter identischen Bedingungen durchgeführt worden sind. So wurden z.B. die Transduktionen

auf unterschiedlichen Zielzellen und im Fall von FLYRD18LacZ und FLYA13LacZ in Anwesenheit von Polyprene durchgeführt. Außerdem sind FLYRD18LacZ und FLYA13LacZ optimierte Einzelzellklone, FLY-HIV-87-LacZ eine Mischpopulation.

Die auf NIH3T3 Zellen basierende Verpackungszelllinie PG13 (Miller et al., 1991) exprimiert MLV Kapside, die mit dem Gibbon Ape Leukemia Virus Envelopeprotein (GaLV) pseudotypisiert sind. Die davon abgeleitete Zelllinie PG-13-LHPLtr (Klebba et al., 2000) produziert Vektorpartikel mit einem Titer von $6,1 \times 10^5$ IU/ml (auf Jurkat Zellen), FLY-HIV-87-LHPLtr hingegen $2,3 \times 10^5$ IU/ml (auf Jurkat Zellen).

Die Titerbestimmungen wurde unter identischen Bedingungen durchgeführt. Beide Zelllinien sind Mischpopulationen, somit liegen die von PG13 Zellen exprimierten Titer ca. doppelt so hoch wie von FLY-HIV-87.

4.2.2 Vergleich der konstitutiv MLV/HIV-1 und MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP und FLY-SHIV-89.6P-152-GFP

Zum Vergleich der beiden konstitutiv MLV/HIV-1 und MLV/SHIV-89.6P Pseudotypvektoren exprimierenden Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP und FLY-SHIV-89.6P-152-GFP wurden Titerbestimmungen auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen und NIH3T3 CD4/CCR5 durchgeführt. Der Titervergleich auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen ergab, daß die, von der dualtrophen Verpackungszelllinie FLY-SHIV-89.6P-152-GFP produzierte Anzahl an Vektorpartikeln ca. 5,5 - 14 fach niedriger war, als die der T-trophen Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP und FLY-HIV-87 Klon 27-GFP (siehe Tabelle **3.2.1**). Dieses Ergebnis ist überraschend, da in Western Blot Analysen, beim Auftragen gleicher Mengen an Proteinlysate beider Zelllinien, FLY-SHIV-89.6P-152 eine stärkere Expression an Env zeigte, als FLY-HIV-87 (siehe Abb. **3.1.1.2-1 b**). Daraus folgt die Annahme, daß die Menge an exprimierten Env nicht entscheidend für die von der Zelle produzierte Anzahl

an infektiösen Vektorpartikel ist. Möglicherweise wird, wie für HIV-2 Env angenommen, nur ein Teil des SHIV-89.6P Envelopeproteins an die Oberfläche der Verpackungszelle transportiert und somit eine geringere Anzahl an infektiösen Vektorpartikeln gebildet. Im Gegensatz zum HIV-2 Envelopeproteins scheint es jedoch, daß das SHIV-89.6P Envelopeprotein keinen oder nur einen geringen toxischen Effekt auf die Zellen hat. Trotz der starken Env Expression starben die Zellen nicht ab und zeigten auch keine verlangsamtes Wachstum im Vergleich zur Ausgangszelllinie FLY. Bei der Durchführung von Western Blot Analysen kam es trotz großer Mengen an SHIV-89.6P Env im Proteinlysate nicht zum Ausfallen des Proteinlysates in den Geltaschen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich keine Proteinaggregate in den Zellen bilden und trotz der starken Env Expression kein toxischer Effekt auf die Zellen beobachtet werden konnte.

Die Titerbestimmung von FLY-SHIV-89.6P-152-GFP wurde auf Grund des dualotropen Charakters des SHIV-89.6P Env sowohl auf NIH3T3 CD4/CXCR4 und CD4/CCR5 Zellen durchgeführt. Dabei zeigte sich reproduzierbar ein um ca. 25% höherer Titer auf CD4/CCR5 exprimierenden NIH3T3 Zellen (siehe Tabelle **3.2.1**).

Bei der Durchführung von Synzytienassays war nach Beginn der Kokultivierung von FLY-SHIV-89.6P-152 mit NIH3T3 Zellen einer schnellere Bildung von Synzytien auf den CD4/CCR5 als auf den CD4/CXCR4 exprimierenden Zellen zu beobachten. Sowohl die höhere Transduktionseffizienz als auch die schnellere Bildung von Synzytien auf CD4/CCR5 positiven Zellen könnte für einen schnelleren Übergang in die Fusionskonformation nach Bindung des SHIV-89.6P Envelopeproteins an den Korezeptor sprechen, wodurch der kooperative Prozeß, der nach Bindung des Envelopeproteins an den Korezeptor CCR5 zur Fusion der Virushülle und der Zellmembran führt schneller und effektiver verläuft (Xiao et al., 1999; Kwong et al., 1998; Farzan et al., 1998; Wang et al., 1998). Möglicherweise ist aber auch der höhere Titer und die schnellere Ausbildung von Synzytien auf NIH3T3 CD4/CCR5 Zellen auf eine höhere Dichte an CCR5 Rezeptor im Verhältnis zu CXCR4 auf den NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen zurückzuführen.

Ursprünglich stammt das SHIV-89.6P Envelopeprotein aus dem chimären Simian/Human Immundefizienzvirus (SHIV), daß aus dem Kapsid von SIV und dem Envelopeprotein von HIV besteht (Reimann et al., 1996). Dieses Virus ist replikationskompetent und wurde zum Infizieren von Rhesus Makakken in Challengeexperimenten verwandt (Mascola et al., 2000). Das SHIV-89.6P hat *in vivo* eine hohe Replikationsrate und ist für Rhesus Makkaken hoch pathogen. Die Affen zeigen wenige Wochen nach Infektion einen starken Verlust der CD4 positiven Zellen im Blut und in den Lymphknoten (Reimann et al., 1996; Karlsson et al., 1997). Das SHIV-89.6P Virus zeigt die Eigenschaften der, in späteren Stadien der AIDS Erkrankung auftretenden charakteristischen SI-Stämme. Diese replizieren schnell und vermitteln die Bildung einer Vielzahl von Synzytien mit einem dualotrophen Tropismus für Makrophagen und T-Helferzellen (Falke & Modrow). Die starke Ausbildung von Synzytien könnte durch eine erhöhte Affinität des Envelopeproteins zu den Rezeptoren der Zielzellen bedingt sein, wodurch eine erhöhte Infektiösität verursacht wird.

Trotz der starken Pathogenität des SHIV-89.6P Virus, besitzt das Envelopeprotein jedoch offensichtlich keine oder nur geringe toxische Effekte auf die stabil exprimierenden Verpackungszellen.

4.2.3 Abhängigkeit der Titer vom retroviralen Vektorkonstrukt

Die Ausstattung der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 mit verschiedenen retroviralen Vektorkonstrukten hat gezeigt, daß auch das Vektorkonstrukt Einfluß auf die Menge an produzierten Vektorpartikeln hat.

Die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 produzierten Titer variieren in Abhängigkeit vom Vektorkonstrukt (auf NIH3T3 CD4/CXCR4) zwischen $2,5 \times 10^4$ IU/ml (FLY-HIV-87-EGFP/Tkfus) und 4×10^5 IU/ml (FLY-HIV-87-GFP). (Der durch Vereinzeln von FLY-HIV-87-GFP erhaltene FLY-HIV-87 Klon 27-GFP produziert Titer von 1×10^6 IU/ml.)

Eine Ursache für den Einfluß des retroviralen Vektorkonstrukts auf die produzierte Virusmenge besteht möglicherweise darin, daß das kodierte Protein toxische Eigenschaften für die Verpackungszelllinie besitzt. Die Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-EGFPTkfus produzierte den geringsten Titer mit $2,5 \times 10^4$ IU/ml. Durch erneutes Vereinzeln der Zellen, gingen nur Einzelzellklone hervor, die maximal einen Titer von 1×10^5 IU/ml (FLY-HIV-87 Klon 85-EGFPTkfus) exprimierten. Das durch das retrovirale Vektorkonstrukt pEGFP/Tkfus kodierte Fusionsprotein besteht aus der Herpes Simplex Thymidinkinase (HSVTK) und EGFP (Paquin et al., 2001). HSV-TK besitzt eine Kernlokalisationssequenz, wodurch das HSV-Tk-EGFP Fusionsprotein (EGFPTkfus) überwiegend im Kern der Verpackungszelle lokalisiert ist (Degreve et al., 1998) (siehe Abb. 3.4.1-1 a) u. b)). Möglicherweise kommt es durch eine zu hohe Expression von EGFPTkfus zu einer Überladung des Zellkerns und zum Absterben der Zelle. Es überleben nur Zellen, die eine geringe Genexpression zeigen. Je geringer jedoch die Proteinexpression, desto geringer ist jedoch auch die Menge an mRNAs, die für die Inkorporation in Viruspartikel zur Verfügung stehen.

Ein zusätzlicher Grund für den niedrigen Titer könnte dadurch erklärt werden, daß das EGFPTkfus Fusionsprotein eine schwächere Fluoreszenzintensität besitzt als EGFP allein (Paquin et al., 2001). Transduzierte Zielzellen, die das

Konstrukt nur einfach in das Genom integriert haben, oder es nur schwach exprimieren, werden möglicherweise gar nicht detektiert.

Die höchsten Titer wurden von der, mit dem retroviralen Vektorkonstrukt pMX-EGFP ausgestatteten Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP produziert. FACS Analysen von FLY-HIV-87-GFP zeigten im Vergleich zu FLY-HIV-87-EGFP/TKfus einen größeren Shift nach FL-1 (Vergleiche Abb. **3.2.1 c**) und Abb. **3.4.1-2 b**). Dies bedeutet, daß EGFP eine wesentlich stärkere Fluoreszenzintensität besitzt als das EGFP/TKfus Fusionsprotein. Da das EGFP Protein offensichtlich weniger toxisch ist, kann davon mehr in der Zelle exprimiert werden. Dies hätte zur Folge, daß mehr mRNA Transkripte vorhanden sind, die für die Inkorporation in Vektorpartikel zur Verfügung stehen. Transduzierte Zielzellen, die das Konstrukt nach Integration in das Genom nur schwach exprimieren wurden, aufgrund der starken Fluoreszenzintensität trotzdem detektiert.

Die in vorhergehenden Experimenten etablierte stabil MLV/HIV-1 LacZ Pseudotypvektoren exprimierende Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17 (Schnierle et al., 1997) produzierten Titer betragen 4×10^5 IU/ml und waren somit ähnlich wie die Titer von FLY-HIV-87-LacZ.

Daraus folgt, daß die Titer MLV/HIV-1 exprimierender Verpackungszellen durch das Env Protein wahrscheinlich auf einen Bereich von $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ IU/ml limitiert sind.

4.3 Einfluß von Fibronektin und Polykationen auf die Transduktions-effizienz von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren

Die Transduktion der humanen T-Zelllinie Jurkat und humanen peripheren Blutlymphozyten mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren führte in Gegenwart von Fibronektin zu einem 60-fach höheren Gentransfer als ohne Fibronektin (siehe Tabelle **3.2.4**). Zusätzlich wurde beobachtet, daß die humane T-Zelllinie Jurkat sowie humane periphere Blutlymphozyten, die

normalerweise in Suspension wachsen, nach Aussähen auf Fibronectin beschichteten Zellkulturschalen adherieren (siehe Abb. **3.2.4 a)** u. **b)**). Ursache für die erhöhte Transduktionseffizienz in Anwesenheit von Fibronectin besteht darin, daß Zielzelle und Virusvektor auf dem selben Fibronectinmolekül gebunden werden (Hanenberg et al., 1996; Pollok et al., 1998).

Fibronectin enthält die drei Zellbindungsdomänen CELL (VLA-5 binding side), HEPARIN (Proteoglycan binding side) und CS-1 (VLA-4 binding site) (Hanenberg et al., 1996). Die Zellbindungsdomänen CELL und CS-1 vermitteln die Bindung der Integrine VLA-5 und VLA-4. HEPARIN vermittelt die Bindung von Proteoglykanen. Die erhöhte Transduktionseffizienz ist dadurch zu erklären, daß T-Lymphozyten die Integrine VLA-5 und VLA-4 exprimieren und über die Zellbindungsdomänen CELL und CS-1 an Fibronectinmoleküle gebunden werden. Das auf die Retronektinschalen™ (Takara, Japan) gebundene rekombinante Fibronectinfragment CH-296 (Kimizuka et al., 1991; Hanenberg et al., 1996) enthält alle drei Zellbindungsdomänen. Hanenberg et al., konnten zeigen, daß die HEPARIN Domäne die Bindung von amphotropen retroviralen Vektoren vermittelt (Hanenberg et al., 1996). Wahrscheinlich werden auch die MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren über die HEPARIN Domäne an Fibronectin gebunden. Durch die gleichzeitige Bindung von T-Zellen und Vektorpartikel auf dem gleichen Fibronectinmolekül werden Zielzelle und Vektor kolokalisiert, was das Aufeinandertreffen von Zelle und Virus wahrscheinlicher macht.

Außer CD4 positive Zellen werden auch die CD8 positiven T-Zellen an Fibronectin gebunden und somit mit den MLV/HIV-1 Vektoren kolokalisiert, trotzdem ist der Gentransfer nur in CD4 positiven Zellen zu beobachten (siehe Abb. **3.2.6-1 a)** u. **b)**). Fibronectin beeinflusst somit nicht die Spezifität des MLV/HIV-1 vermittelten Gentransfers in CD4 positive Zellen.

Die Transduktion von Jurkatzellen und NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen ergab in Gegenwart des Polykations Protaminsulfat keine gesteigerte

Transduktionseffizienz durch MLV/HIV-1 pseudotypisierte Vektoren. Wurde die Transduktion von Jurkat Zellen auf Fibronectin und gleichzeitig in Anwesenheit von Protaminsulfat durchgeführt, war sogar ein Rückgang der Transduktionseffizienz um 75 % im Verhältnis zum Transduktionsansatz mit Fibronectin ohne Protaminsulfat zu beobachten (siehe Tabelle **3.2.4**). Daraus folgt, daß Protaminsulfat den, durch Fibronectin vermittelten positiven Einfluß, auf die Transduktionseffizienz von MLV/HIV-1 Vektoren negativ beeinflusst.

Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, daß Protaminsulfat durch Wechselwirkung mit der HEPARIN Zellbindungsdomäne die Bindung der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren inhibiert. Offensichtlich beeinflusst Protaminsulfat nur die Bindung der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren an die Fibronectinmoleküle, da trotz Anwesenheit von Protaminsulfat die in Suspension wachsenden Jurkat Zellen adherierten. Vorherige Transduktionsexperimente mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren, die in Gegenwart von Polyprene durchgeführt wurden, zeigten ebenfalls einen negativen Einfluß auf die Transduktionseffizienz (Schnierle, nicht veröffentlichte Daten).

Transduktionsexperimente mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren zeigten in Abwesenheit von Fibronectin einen fast 45-fach höheren Gentransfer in murine NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen als in humane Jurkat Zellen. Wurde die Transduktion von NIH3T3 CD4/CXCR4 und Jurkat Zellen in Gegenwart von Fibronectin durchgeführt, war dagegen der Gentransfer in beide Zelllinien gleich effektiv (siehe Tabelle **3.2.4**).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich hohen Transduktionseffizienzen von NIH3T3 CD4/CXCR4 und Jurkat Zellen in Abwesenheit von Fibronectin könnte, darin bestehen, daß NIH3T3 Zellen adherent wachsende Zellen sind. MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren binden möglicherweise an Proteinkomplexe aus FCS ohne ihre Infektiösität zu verlieren. In Folge der Schwerkraft ist die Konzentration der an FCS gebundenen MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren am Boden der Zellkulturschale am höchsten. Dadurch kommt es zum Aufeinandertreffen der adherenten NIH3T3 CD4/CXCR4

Zellen und den Pseudotypvektoren, wodurch es zu einer höheren Transduktionseffizienz kommt, als bei Suspensionszellen.

4.4 Einfluß von humanem Serumkomplement auf MLV/HIV-1 Vektoren

Für den therapeutischen *in vivo* Einsatz retroviraler Vektoren im Menschen müssen diese Resistenz gegenüber humanem Serumkomplement besitzen. Im Gegensatz zu C-Typ Retroviren und retroviralen Vektoren, die von murinen Verpackungszellen (NIH3T3, PG13) exprimiert werden, sind Vektoren, die von humanen Verpackungszellen (FLY) produziert werden, resistent gegenüber humanem Serumkomplement (Takeuchi et al., 1994; Takeuchi et al., 1995; Cosset et al., 1995).

Ursächlich für die Inaktivierung von C-Typ Retroviren sind Antikörper gegen Galaktosyl(α 1-3)Galaktose (Gal(α 1-3)Gal) in humanem Serum (Takeuchi et al., 1995). Säugetiere besitzen mit Ausnahme des Menschen und einigen Affen eine funktionelle (α 1-3)Galaktosyltransferase (Larsen et al., 1990; Galili et al., 1991). Deshalb haben C-Typ Retroviren sowie retrovirale Vektoren, die nicht von humanen Zellen exprimiert werden, auf ihren Envelopeproteinen, durch Galaktosyl(α 1-3)Galaktose modifizierte Epitope. Nach Bindung der, im humanem Serum vorhandenen anti Gal(α 1-3) Gal Antikörper an die modifizierten Epitope, kommt es zur Aktivierung des klassischen Komplement Kaskade und zur Inaktivierung der retroviralen Vektoren. Menschen sowie einige Affenspezies verfügen nicht über eine funktionelle (α 1-3) Galaktosyltransferase, wodurch die von ihnen exprimierten Vektoren oder C-Typ Retroviren nicht in humanem Serum inaktiviert werden. Außer der Spezies von der sich die Verpackungszelle ableitet, ist auch die Herkunft des Envelopeproteins von Bedeutung für die Serumresistenz (Takeuchi et al., 1994; Cosset et al., 1995).

Da die Stärke der Serumresistenz, der von FLY Zellen exprimierten retroviralen Vektoren abhängig von der Herkunft des Envelopeproteins ist

(Cosset et al., 1995), wurde untersucht, wie stark die Serumresistenz der von FLY-HIV-87 exprimierten MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren ist. Es wurden zu gleichen Mengen an Vektoren der Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-LHPLtr und PG-13-LHPLtr je 10 % human Serum oder 10 % Hitze inaktiviertes FCS zugesetzt, die Ansätze für 15 min inkubiert und nachfolgend zur Transduktion eingesetzt.

Die Auswertung der Transduktionseffizienzen ergab, daß sowohl die, von FLY-HIV-87-LHPLtr produzierten MLV/HIV-1 LHPLtr Vektoren, als auch die, von der murinen Verpackungszelllinie PG-13-LHPLtr exprimierten MLV/GaLV LHPLtr Vektoren nach Inkubation mit humanem Serum zu fast gleichen Anteilen inaktiviert wurden. Der Verlust an MLV/HIV-1 LHPLtr Vektoren betrug 56,3 % im Vergleich zu 60,6 % bei den MLV/GaLV LHPLtr Vektoren (siehe Abb. 3.2.8). In einem weiteren Ansatz wurden MLV/HIV-1 GFP Vektoren der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-GFP entweder mit 10 % human Serum oder 10 % FCS inkubiert. In diesem Ansatz wurden die Zellen mit einer MOI von 2,5 transduziert, der Verlust an MLV/HIV-1 GFP Vektoren betrug in dem Ansatz mit humanem Serum 23,4 % im Vergleich zu dem FCS haltigen Ansatz.

Diese Ergebnisse waren unerwartet, da Vektorpartikel, die von der humanen Fibrosarkomazelllinie FLY exprimiert werden, resistent gegen humanes Serumkomplement sind (Cosset et al., 1995). Die Serumresistenz ist zusätzlich abhängig von der Herkunft des Envelopeproteins. Da das humane Immundefizienzvirus (HIV) resistent gegen humanes Serumkomplement ist (Bonapour et al., 1986), war zu erwarten, daß die von der Verpackungszelllinie FLY-HIV-87 produzierten MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren vollständig gegen die Inaktivierung durch humanes Serumkomplement resistent sein müßten. Unerwartet war auch, daß die MLV/GaLV pseudotypisierten Vektoren, die von der murinen Verpackungszelllinie PG13 (Miller et al., 1991) exprimiert wurden, nicht vollständig inaktiviert wurden, da laut Angaben in der Literatur normalerweise von NIH3T3 bzw. PG13 Zellen produzierte Virionen, unabhängig von der Herkunft des Env Proteins, innerhalb von 5 min Inkubation mit humanem

Serum vollständig inaktiviert werden (Takeuchi et al., 1994; Takeuchi et al., 1995; Cosset et al., 1995; Rother et al., 1995). Trotz 15 min Inkubation mit 10 % frischem humanem Serum wurden nur 60,6 % der MLV/GaLV inaktiviert.

Eine mögliche Erklärung für die Inaktivierung der MLV/HIV-1 LHPLtr Vektoren könnte darin bestehen, daß die Vektor produzierenden Verpackungszelllinien FLY-HIV-87-GFP, FLY-HIV-87-LHPLtr und PG-13-LHPLtr in 10 % FCS haltigem Medium kultiviert wurden. Für die Virusernte, wurde 12 - 16 h zuvor das FCS haltige Medium durch FCS freies ersetzt. Möglicherweise enthält FCS mit Gal(α 1-3)Gal modifizierte Proteine und Peptide, die an die Oberfläche von FLY-HIV-87 gebunden geblieben sind. Bei der Bildung von Retroviren kommt es oft zur Inkorporation von Proteinen aus der Zellmembran (Arthur et al., 1992). Denkbar wäre, daß analog Proteine und Peptide, die an der Membran der Verpackungszelle gebunden sind, bei der Bildung der Pseudotypvektoren mit in die Virushülle aufgenommen werden.

Eine andere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Transduktionseffizienzen zwischen FCS und HS haltigen Ansätzen könnte darin bestehen, daß die Zellen sich nur dann durch retrovirale Vektoren transduzieren lassen, wenn sie sich teilen. Eventuell teilen sich die Zellen in den Ansätzen mit dem humanen Serum langsamer, als in den Ansätzen mit FCS. Eine Lyse der Zielzellen durch das humane Serumkomplement als Ursache für die unterschiedlichen Versuchsergebnisse kann ausgeschlossen werden, da die peripheren Blutlymphozyten und das Serum aus dem gleichen Spender entnommen wurden.

Um die Frage zu klären, ob die Abnahme der Transduktionseffizienz in den HS haltigen Ansätzen wirklich auf Serumkomplement zurückzuführen ist, müssen in nachfolgenden Versuchen Ansätze mit Hitze inaktiviertem und nicht inaktiviertem humanem Serum miteinander verglichen werden. Da das Experiment nur einmal durchgeführt werden konnte, kann nicht definitive gesagt werden, ob die Ergebnisse repräsentativ sind.

4.5 *In vivo* Transduktion in der transgenen Maus [KO] CD4 [Tg] hCD4

Für die *in vivo* Applikation von Gentransfersystemen ist es wichtig, daß diese nur eine bestimmte Sorte von Zellen transduzieren. Der zielgerichtete Gentransfer erlaubt den Einsatz zytotoxischer Gene ohne gleichzeitig "normale" Nicht-Zielzellen zu schädigen. Außerdem werden auf diese Weise weniger Vektorpartikel benötigt, da diese nicht durch unspezifische Bindung an nicht Zielzellen verloren gehen.

Durch *in vitro* Transduktionsexperimenten an CD4 und verschiedenen Korezeptor exprimierenden NIH3T3 Zellen, sowie durch die Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten wurde gezeigt, daß MLV/HIV-1 T-trophe Pseudotypvektoren spezifisch nur CD4/CXCR4 exprimierende Zellen transduzieren (siehe Abb. 3.2.2-1 a)-d), Abb. 3.2.2-2 a)-d) und Abb. 3.2.6-1 a) u. b)).

Der zielgerichtete Gentransfer *in vivo* wurde an der transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Maus, die das humane CD4 Gen unter der Kontrolle des gleichen gewebespezifischen Promoters, wie das murine CD4 Gen exprimiert (Killeen et al., 1993) getestet. Ziel dieses Modells war zu überprüfen, ob eine systemische Applikation durch intravenöse Applikation der Vektorpartikel zu einer spezifischen Transduktion von CD4 positiven T-Zellen in der transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Maus führt und ob für eine *in vivo* Transduktion der humane CD4 Rezeptor allein mit dem murinen CXCR4 Korezeptor ausreichend ist.

Da retrovirale Vektoren nur sich teilende Zellen transduzieren, wurden die Mäuse vor Applikation der MLV/HIV-1 LacZ Pseudotypvektoren durch subkutane Injektion von Lektinol oder durch intravenöse Injektion von Staphylococccen Enterotoxin B (SEB) vorstimuliert. Das Superantigen SEB und das aus Mistelextrakten stammende Lektinmischung, Lektinol™, haben die Funktion T-Zellen zu aktivieren und sie zur Teilung anzuregen.

Zur Analyse der *in vivo* Transduktion wurden drei verschiedene Methoden verwandt.

1. LacZ-Färbung von Gewebeschnitten: Diese Methode diente zum Sichtbarmachen einzelner transduzierter Zellen. Die Methode sollte genutzt werden, um durch immunhistochemische Analyse der Schnitte mit einem anti-human CD4 Antikörper die Spezifität des Gentransfers in hCD4 positive Zellen nachzuweisen. Im Fall eines spezifischen Gentransfers sollte es zu einer Kolo-kalisation von hCD4 positiven Zellen und blau gefärbten transduzierten Zellen kommen.

2. β -Galaktosidase Assay: Diese Methode diente zum Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität in Proteinlysaten von Mausorganen. Eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität in den Proteinlysaten von transduzierten Mäusen im Vergleich zu Proteinlysaten untransduzierter negativ Kontroll-Mäuse läßt darauf schließen, daß es zum Gentransfer des LacZ Gens gekommen sein muß. Der β -Galaktosidase Assay ist die sensitivste der drei benutzten Nachweismethoden. Sie erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob der Gentransfer spezifisch nur in hCD4 positive Zellen stattgefunden hat, bzw., um eine durch β -Galaktosidase verursachte Pseudotransduktion von Gentransfer zu unterscheiden.

3. PCR: Diese Methode dient dazu die Integration des LacZ Gens in die genomische DNA nachzuweisen. Auf diese Weise kann der Beweis erbracht werden, daß es wirklich *in vivo* zu einer Transduktion der Zellen gekommen ist und die Färbung der Zellen sowie die gesteigerte β -Galaktosidase Aktivität in den Proteinlysaten durch die Expression von β -Galaktosidase in den transduzierten Zellen verursacht wird und nicht durch angereichertes β -Galaktosidase Protein (Pseudotransduktion).

Die X-Gal Färbung von Schnitten der Mausorganen zeigte blau gefärbten Zellen in den Lymphknoten aller, mit Vektoren behandelte Tiere, nicht jedoch in der als Negativkontrolle dienenden unbehandelten Maus (siehe Abb. **3.3.4.2 a-f**). Somit müßte die Färbung der Zellen in den transduzierten

Tieren folge der Vektorbehandlung sein. Zellen, die das LacZ Gen (*lacZnl3*) exprimieren, sollten bedingt durch die Kernlokalisationssequenz nur blau gefärbte Kerne aufweisen. Die in den Gefrierschnitten zu beobachtenden blauen Flecken sind nicht eindeutig als Kerne zu identifizieren. Da bei Lymphozyten die Kerne fast vollständig das Volumen der Zelle ausfüllen, ist es nicht möglich eine eindeutige Aussage darüber zu machen, ob in den Zellen nur die Kerne oder die gesamte Zelle gefärbt worden ist. Da in dem Lymphknoten der nicht transduzierten Maus keine blau gefärbten Zellen zu beobachten waren, muß die Blaufärbung durch die Vektorbehandlung verursacht worden sein.

Um die Frage zu klären, ob der Transfer des LacZ Gens durch die MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren nur in CD4 positive Zellen der Mäuse stattgefunden hat, wurde versucht, zum Nachweis des spezifischen Gentransfers, die X-Gal gefärbten Schnitte mit einem Antikörper gegen humanen CD4 Rezeptor zu färben. Alle Versuche, die Schnitte zu färben scheiterten jedoch, da der anti-human CD4 Antikörper eine zu starke Kreuzreaktion mit dem Mausgewebe verursachte. Somit ist eine eindeutige Beurteilung über die Spezifität des MLV/HIV-1 vermittelten Gentransfers in der transgenen hCD4 Maus nach systemischer Applikation nicht möglich.

Die Messung der β -Galaktosidase Aktivität in den Proteinlysaten der Mausorgane korrelierte mit den Ergebnissen der X-Gal Färbung. Die höchste β -Galaktosidase Aktivität konnte in den Lymphknoten der Mäuse Lektinol 2 u. 3 sowie SEB 3 gemessen werden. Neben den Lymphknoten konnten auch im Thymus der transduzierten Tiere und in der Lunge einer Maus erhöhte β -Gal Aktivität festgestellt werden, sowie einige wenige blaue Zellen in den Schnitten.

Lymphknoten und der Thymus sind lymphoide Organe, in denen sich eine Vielzahl von CD4 positiven T-Zellen befinden. Die erhöhte β -Gal Aktivität in Thymus und Lymphknoten könnte für eine spezifische Transduktion CD4+ Zellen sprechen. Es konnten jedoch weder in den Gefrierschnitten gefärbte Zellen noch, in den β -Galaktosidase Messungen eine erhöhte Aktivität in den

Milzen festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist verwunderlich, da die Milz als lymphoides Organ ebenfalls eine Vielzahl von T-Zellen enthält. Eine mögliche Erklärung für den Mangel an transduzierten Zellen in der Milz könnte darin bestehen, daß die transgene [KO] CD4 [Tg] hCD4 Maus zwar den humanen CD4 Rezeptor exprimiert, aber nur murinen CXCR4 Korezeptor. Schabath et al., zeigten, daß die Expression des murinen CXCR4 Rezeptors anders reguliert wird, als der humane CXCR4 Rezeptor, was darauf hinweist, daß der CXCR4 Rezeptor unterschiedliche Funktionen im menschlichen und murinen Organismus besitzt (Schabath et al., 1999). Die Aktivierung von Maus T-Zellen durch intraperitoneale Injektion von "T-cell dependent antigen TNP-KLH" ergab im Vergleich zu unbehandelten Mäusen keine gesteigerte Expression von CXCR4 Rezeptor auf CD4+ T-Helferzellen in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten, jedoch einen sehr starken Anstieg in der Expression von CXCR4 Rezeptor auf CD8+ zytotoxischen T-Zellen (Schabath et al., 1999).

Im Fall der transgenen [KO] CD4 [Tg] hCD4 Maus wurden entweder subkutan Lektinol oder systemisch SEB zur Stimulation der T-Zellen injiziert. Möglicherweise kommt es bei Gabe anderer T-Zell aktivierender Substanzen und einem anderen Applikationsmodus zu einer Hochregulation der CXCR4 Expression auf den CD4+ T-Helferzellen in den peripheren Lymphknoten und zu einer Hochregulation des CXCR4 Rezeptors auf den CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der Milz, was eine Verteilung von transduzierten Zellen vermehrt in den Lymphknoten erklären könnte.

Schabath et al. zeigten außerdem, daß im Gegensatz zu menschlichen Thymozyten in der Maus der CXCR4 Rezeptor während der T-Zellreifung im Thymus nur auf CD4+/CD8+ T-Vorläuferzellen exprimiert wird (Schabath et al., 1999). In vorhergehenden und den nachfolgenden Stadien gibt es keine weitere CXCR4 Expression. Eine Transduktion von T-Zellen im Thymus kann somit nur in den, im intermediären Stadium während der T-Zellreife bestehenden Zellen statt gefunden haben. Unklar ist warum außer in Lymphknoten und Milz eine gesteigerte β -Gal Aktivität in der Lunge einer

transduzierten Maus gefunden wurde. In allen bisher publizierten *in vivo* Transduktionsexperimenten mit untargetierten Vektoren wurde kein gesteigerter Gentransfer in die Lunge beobachtet.

Da die Lunge stark durchblutet ist, wäre es möglich, daß die erhöhte β -Gal Aktivität in der Lunge der Maus durch transduzierte CD4⁺ T-Helferzellen in den, in der Lunge verbliebenen Blutresten verursacht wird. Im peripheren Blut von BALB/c Mäusen exprimieren 5-10% der CD4 positiven und der CD8 positiven Zellen CXCR4 Rezeptor (Schabath et al., 1999). Sollte die erhöhte β -Gal Aktivität in der Lunge durch transduzierte CD4⁺ T-Helferzellen aus dem peripheren Blut verursacht worden sein, hätte ein Teil der 5-10% CD4/CXCR4 positiven Zellen transduziert worden sein. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da dann auch mit einer gesteigerten β -Gal Aktivität in anderen stark durchbluteten Organen wie Lebern und in den Lungen der anderen Tiere hätte beobachtet werden müssen.

Da die Auswertung der gefärbten Schnitte und der β -Gal Messungen Fragen aufwerfen, die durch die Annahme einer unterschiedlichen Verteilung von CD4⁺ Zellen in den stimulierten Mäusen nicht alleine geklärt werden konnten, wurden weitere mögliche Erklärungen gesucht.

Eine Überlegung war, daß die hohen β -Gal Werte durch Pseudotransduktion entstanden sein könnten. Liu et al. zeigten, daß die Anreicherung von MLV/VSV-G pseudotypisierten retroviralen Vektoren gleichzeitig zur Konzentrierung von β -Galaktosidase führt, die entweder in die Viruskapside aufgenommen wird oder frei im Medium vorhanden ist, nachdem sie aus degradierten Vektorpartikeln frei gesetzt wurde (Liu et al., 1996). Um zu überprüfen, ob β -Galaktosidase in MLV/HIV-1 Vektorpartikel inkorporiert wird, wurden die β -Galaktosidase Aktivität der angereicherten MLV/HIV-1 LacZ und MLV/HIV-1 GFP Vektoren gemessen. Die MLV/HIV-1 LacZ Vektoren hatten im Vergleich zu den MLV/HIV-1 GFP Vektoren eine 20-fach höhere β -Galaktosidase Aktivität. Die für die Transduktion der Tiere eingesetzten Virusvektoren waren über Spin-Filtration konzentriert worden. Die für die Anreicherung verwendeten Spin Filter hatten einen Cut off von 100 000 kD.

Da β -Galaktosidase ein Molekulargewicht von 120 000 kD besitzt, folgt, daß es durch die Spin Filtration nicht nur zu einer Konzentrierung der Viruspartikel sondern zusätzlich zur Anreicherung von β -Galaktosidase aus bereits degradierten Vektorpartikeln gekommen sein muß.

Daraus folgt, daß bei der intravenösen Applikation außer den Vektorpartikeln zusätzlich β -Galaktosidase in den Blutkreislauf der Tiere gekommen ist, die möglicherweise die Färbung der Organe und die erhöhten β -Gal Aktivitäten verursacht haben könnte (Pseudotransduktion).

Die Organe für die Anfertigung der Gefrierschnitte und der β -Gal Assays wurden jedoch erst 28 Tage nach Applikation der Vektoren entnommen. Sollte es wirklich zu einer Aufnahme der β -Galaktosidase in Zellen *in vivo* gekommen sein, ist es fragwürdig, ob das Protein über einen Zeitraum von 28 Tagen in den Zellen überdauert hat und nicht abgebaut wurde.

Um zu Überprüfen, ob es *in vivo* wirklich zu einer Transduktion von Zellen durch MLV/HIV-1 Partikel gekommen ist, wurde genomische DNA aus den Resten der Mausorgane präpariert und zur Durchführung von PCRs mit LacZ spezifischen Primern eingesetzt. Sollte es zur Transduktion von Zellen gekommen sein, muß das LacZ Gen in das Genom der Tiere integriert worden sein. Im Lymphknoten der mit Vektorpartikeln behandelten SEB 3 Maus konnte das LacZ Gen nachgewiesen werden (siehe Abb. **3.3.4.3 b**). Somit mußte es *in vivo* zu einer Transduktion von Mauszellen gekommen sein.

An Hand der PCR konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob der Gentransfer spezifisch in CD4 positive Zellen stattgefunden hat. Für einen spezifischen Gentransfer in T-Helferzellen spricht jedoch, daß in den Lymphknoten und im Thymus der Mäuse die höchste β -Gal Aktivität gemessen werden konnte. In *in vivo* Experimenten, in denen nicht targetierte, mit amphiotrophen MLV Env pseudotypisierte retrovirale oder lentivirale Vektoren systemisch appliziert wurden, war zu beobachten, daß es bevorzugt zu Gentransfer in Leber und Milz kommt (Peng et al., 2001; Martin et al., 2002). Im Fall der MLV/HIV-1

transduzierten Tiere war weder in der Leber noch in der Milz eine erhöhte β -Gal Aktivität zu beobachten, was ebenfalls für einen zielgerichteten Gentransfer in die lymphoiden Organe (periphere Lymphknoten und Thymus) spricht.

Unklar bleibt jedoch, warum die Milz, die als lymphoides Organ ebenfalls eine große Menge an T-Helferzellen enthält, keine erhöhte β -Gal Aktivität besitzt. Da nur in den lymphoiden Organen blaue Zellen gefunden wurden, spricht dies auch dafür, daß es innerhalb der Mäuse nicht zur Bildung replikationskompetenter Viren gekommen ist. Wäre es, infolge von Rekombinationsprozessen zwischen Mäusevirussequenzen (z.B. endogene retrovirale Sequenzen) und den im MLV/HIV-1 Vektoren enthaltenen retroviralen Sequenzen zur Bildung von replikationskompetenten Viren gekommen, hätte es vermutlich auch zum Gentransfer in andere Organe geführt.

4.6 Nacktmausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome

Mycosis Fungoides und das Sezary Syndrom sind die am häufigsten vorkommenden humanen kutanen Lymphome (CTCL). Im Verlauf dieser Erkrankungen kommt es zunächst durch das Einwandern CD4 positiver Lymphomzellen in die Haut. Durch klonale Expansion der Zellen kommt es bei Mycosis Fungoides (MF) zur Ausbildung von Plaques und in späteren Stadien zur Bildung von Haut assoziierten Tumoren und beim Sezary Syndrom (SS) zu Rötungen der Haut (Erythrodermie). Zusätzlich findet man beim Sezary Syndrom und späteren Stadien von Mycosis Fungoides im Blut zirkulierende Lymphomzellen. Im weiteren Verlauf der Erkrankungen kommt es zum Auswandern der Tumorzellen aus der Haut über den Blutstrom in den gesamten Organismus und zum Befall von Organen, hauptsächlich in die Organe Lymphknoten Lunge und Leber (Edelson et al., 1980; Diamandidou et al., 1996).

Um zu testen, ob ein zielgerichteter Gentransfer *in vivo* nach lokaler (intratumoraler) Applikation von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren in Tumorzellen möglich ist, wurde als zweites Tiermodell in dieser Arbeit ein Nacktmausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome etabliert.

Nach subkutaner Injektion von MyLa Zellen, kam es in 81 % der Tiere zur Bildung von subkutanen Tumoren. Gewebeschnitte aus Plaques von Mycosis Fungoides Patienten sind durch bandförmige Infiltrate von atypischen Lymphozyten in der oberen Dermis aus einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Zellen charakterisiert (Diamandidou et al., 1996). Von den Tumoren aus den Tumor-tragenden Nacktmäusen wurden Gewebeschnitte angefertigt und mit menschlichen Tumoren verglichen. Die humanen MyLa Zellen wurden durch Färbung der Tumorschnitte mit einem anti-human CD3 Antikörper sichtbar gemacht. In den Tumorschnitten waren CD3 positive MyLa Zellen zu erkennen. Viele dieser Zellen befanden sich in Mitose (siehe Abb. **3.4.3-1 c**)). Unterhalb der Bindegewebsschicht kommt es, zwischen Bindegewebe und der oberen Hautschicht zur Ansammlung von gefärbten Zellen (siehe Abb. **3.4.3-1 b**)). Dies könnte bedeuten, daß die MyLa Zellen, wie für Mycosis Fungoides üblich aufwärts in die Oberhautschichten wandern. Das Bindegewebe stellt für die Zellen eine Barriere dar, die offensichtlich nur wenige Zellen passieren. Somit scheint es, daß die MyLa Zellen im Gewebe wandern, aber nicht oder nur vereinzelt die Fähigkeit besitzen, die Bindegewebsschicht zu durchbrechen. Von den Organen aus Tumor-tragenden Nacktmäusen wurden Gewebeschnitte angefertigt und MyLa Zellen durch Färbung mit einem anti-human CD3 Antikörper sichtbar gemacht. In den Organen Lymphknoten, Leber und Lunge der Tumor-tragenden Nacktmäuse waren einzelne CD3 positive Zellen zu erkennen (siehe Abb. **3.4.3-2 a-h**)). Zusätzlich konnten in den Blutresten im Herzen der Tiere MyLa Zellen gefunden werden. Dies bedeutet jedoch, daß es zum Auswandern von humanen MyLa Zellen in den gesamten Organismus der Mäuse gekommen sein muß.

Charley et al. etablierten ein SCID Mausmodell für humane kutane T-Zell Lymphome, in dem sie ein Stück aus dem Plaque eines Sezary Patienten in

die Haut von SCID Mäusen implantierten (Charley et al., 1990). Auch in diesem Modell kam es zur Ausbildung eines lokalen Tumors. Die humanen Tumorzellen überlebten jedoch nur innerhalb der menschlichen Haut. Es konnte kein Auswandern der Tumorzellen in die umliegende Mäusehaut beobachtet werden (Charley et al., 1990). Offensichtlich benötigten die Sezary Zellen besondere Integrine oder Zytokine, die nur in menschlicher Haut gebildet werden und die für das Migrieren und das Überleben der Tumorzellen wichtig sind. Selbst nach intravenöser Injektion der Sezary Zellen konnten keine humanen Sequenzen in den Organen der SCID Mäuse beobachtet werden (Charley et al., 1990).

MyLa Zellen wachsen Zytokin-unabhängig und haben somit die Fähigkeit auch in Mäusehaut zu wachsen und in Organe aus zu wandern. Dies unterscheidet sie von den primären Sezary Zellen aus dem von Charley et al., etablierten SCID Mausmodell.

Die Tumore aus den Nacktmäusen zeigen in den Gewebeschnitten eine ähnliche Morphologie wie die Plaques aus Mycosis Fungoides. Zusätzlich kommt es zum Auswandern der MyLa Zellen im Organismus, wie es für spätere Stadien von Sezary Syndrom und Mycosis Fungoides üblich ist. Dies bedeutet, daß sich die Tumornacktmäuse als Modell für human kutane T-Zell Lymphome eignen.

4.6.1 Genterapie humaner kutaner T-Zell Lymphome

Die genterapeutische Behandlung von Tumoren kann durch zwei unterschiedliche Strategien erfolgen. Bei der sogenannten korrektiven Genterapie ist die genetische Korrektur der Tumorzellen durch Einbringen von therapeutischen Genen Ziel der Behandlung. Bei der zytotoxischen Genterapie ist die Zerstörung der Tumorzellen durch das Einbringen zytotoxischer Gene Ziel der Therapie.

Die Identifizierung von Genen, die zur Tumorentstehung beitragen, ergibt die Möglichkeit, an diesen Genen oder ihren Genprodukten therapeutisch einzugreifen. Zu den Genen, die an der Entstehung von Tumoren beteiligt sind, gehören Onkogene und Tumorsuppressorgene (Bishop et al., 1991). Konstitutiv aktivem STAT3 wird eine besondere Rolle bei der Entstehung von humanen kutanen T-Zell Lymphomen zugeschrieben. In einigen Leukämien und kutanen T-Zell Lymphomen konnte konstitutiv aktives STAT3 gefunden werden (Buettner et al., 2002). In einigen Fällen von humanen kutanen T-Zell Lymphomen konnte ein kausaler Zusammenhang mit konstitutiv aktivem STAT3 nachgewiesen werden. Durch Behandlung von Mycosis Fungoides mit dem JAK Kinase Inhibitor AG410 konnte eine Inhibition der STAT3 Aktivierung erreicht werden, die mit einer Verlangsamung des Zellwachstums verbunden war (Nielson et al., 1997). Daraus folgt, daß die Inhibition von STAT3 zur Therapie genutzt werden könnte. Zur Inaktivierung von STAT3 könnte als therapeutisches Gen, die dominant negative Mutante STAT3 β (Caldenhoven et al., 1996) dienen. Die STAT3 β Moleküle können zwar nach Phosphorylierung mit Wildtyp STAT3 Molekülen Dimere bilden, durch das Fehlen der Transaktivator-domäne wird jedoch verhindert, daß nach Bindung der STAT3 Dimere an die DNA eine Transkription der STAT3 Zielgene stattfindet.

Ein weiteres therapeutisches Gen zur Inaktivierung von konstitutiv aktivem STAT3 könnten "antisense"-Oligonukleotide sein, deren RNA komplementär zur STAT3 RNA-Sequenz ist. Durch die Hybridisierung beider Stränge kommt es zum Abbau der mRNA. Infolge dessen wird die Translation der STAT3 Moleküle verhindert.

Die Nachteile eines solchen, korrektiven gentherapeutischen Ansatzes zur Behandlung kutaner T-Zell Lymphome sind jedoch, daß möglichst alle der Tumorzellen transduziert werden müßten und daß das dominant negative STAT3 in ausreichen hohen Mengen exprimiert werden müßten, so daß eine bestimmtes stöchiometrisches Verhältnis zwischen dominant negativen und konstitutiv aktiven STAT3 Molekülen vorliegt. Um einen therapeutischen

Effekt zu erreichen müßten daher genügend STAT3 Moleküle in den Tumorzellen exprimiert werden. Außerdem ist es unwahrscheinlich, daß eine Mutation im STAT3 Gen die alleinige Ursache für die Entstehung eines Tumors ist. Ein weiterer Nachteil bei der korrektiven Gentherapie mit STAT3 Mutanten ist, daß nicht alle humanen kutanen T-Zell Lymphome durch das Auftreten von konstitutiv aktivem STAT3 gekennzeichnet sind. Somit hätte ein solcher korrektiver Gentherapieansatz vermutlich wenig Aussicht auf breiten Erfolg.

Die zur Etablierung des Nacktmausmodells verwandten MyLa besitzen kein konstitutiv aktives STAT3 d.h. konnten STAT3 inhibitorische Gene an Hand dieses Modells nicht auf ihre therapeutische Wirksamkeit getestet werden.

Da zytotoxische Gene zum Absterben der Tumorzellen, unabhängig von ihrem genetischen Defekt führen, hat ein zytotoxischer Gentherapieansatz einen größeren Vorteil gegenüber korrektiven Gentherapieansätzen.

Um zu untersuchen, ob die Therapie humaner kutaner T-Zell Lymphome durch MLV/HIV-1 Vektoren möglich ist, wurden mit dem Gen für Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-EGFP Fusionsprotein (EGFP/Tkfus) ausgestattete MLV/HIV-1 Vektoren intratumoral in die Tumornacktmäuse injiziert. Nach Gabe von Ganciclovir zeigte sich eine verlangsamte Zunahme des Tumolvolumens, jedoch kein Rückgang des Tumors (siehe Abb. **3.4.4-2 a), b) u. c)**).

Der geringe therapeutische Effekt ist auf unterschiedliche Ursachen zurück zu führen. Es wurden insgesamt nur $2,1 \times 10^5$ Vektorpartikel in einen Tumor injiziert. Das Volumen der Tumore betrug zu diesem Zeitpunkt im Durchschnitt 480 mm^3 . Die Anzahl der Zellen im Tumor muß somit um ein vielfaches größer gewesen sein, als die Anzahl an Vektorpartikeln. Somit kann nur ein kleiner Teil der Tumorzellen transduziert worden sein.

Die Injektion von $2,1 \times 10^5$ MLV/HIV-1 GFP Vektoren ergab in einem Kontrollexperiment eine Transduktionseffizienz von 4,6 %.

Die Anwendung der HSVTk als therapeutisches Werkzeug, erwies sich in anderen Tumormodellen jedoch als wesentlich wirkungsvoller. Es konnte gezeigt werden, daß es genügte 10 % der Tumorzellen zu transduzieren, um eine komplette Regression des Tumors zu erreichen (Culver et al., 1992). Die Ursache für einen solchen, starken therapeutischen Effekt beruht darauf, daß das, von der HSVTk gebildete toxische Ganciclovir-triphosphat durch Diffusion über gap-junctions auch in benachbarte, nicht transduzierte Zellen gelangt und diese getötet werden (Roth et al., 1997). Dieser "Bystander"-Effekt tritt jedoch nur dann auf, wenn die transduzierten Zellen über gap-junctions mit benachbarten Zellen verbunden sind. Die Ursache für den geringen therapeutischen Effekt in dem humanen kutanen T-Zell Lymphom Modell besteht darin, daß T-Zellen nicht über gap-junctions miteinander verbunden sind und dadurch nur die transduzierten Zellen getötet werden. Um eine vollständige Regression der Tumore in den Nacktmäusen zu erreichen, müßten somit alle Tumorzellen mit dem EGFPTkfus Gen transduziert werden. Dies ist jedoch auf Grund der geringen Titer an MLV/HIV-1 EGFPTkfus nicht realisierbar.

Für die effektive Therapie der humanen kutanen T-Zell Lymphome bräuchte man ein therapeutisches Gen, daß nicht nur die transduzierten, sondern zusätzlich benachbarte Zellen abtötet. Als ein solches therapeutisches Gen könnte das HIV-1 *env* Gen in Frage kommen. Die Expression von HIV-1 Envelopeproteinen auf der Oberfläche der CD4 positiven T-Zell Lymphomzellen führt zu Fusion der transduzierten Zelle mit den benachbaten CD4 positiven Zellen. In Folge dieser Synzytienbildung kommt es zu Absterben von nicht transduzierten Zellen. Dieser "Bystander"-Effekt macht das HIV-1 *env* Gen zu einem aussichtsreichen Kandidaten für einen zytotoxischen Gentherapieansatz zur Therapie humaner kutaner T-Zell Lymphome.

4.7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnten mehrere Vektor-freie stabil MLV/HIV Pseudotypvektoren exprimierende Verpackungszelllinien etabliert werden. Es wurde gezeigt, daß MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren Gene spezifisch in CD4/CXCR4 exprimierende Zellen transferieren.

Mit Hilfe zweier Tiermodelle konnte gezeigt werden, daß eine *in vivo* Applikation von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren möglich ist.

An dem für humane kutane T-Zell Lymphome etablierten Nacktmausmodell wurde eine Therapiestudie mit Herpes Simplex Virus Thymidinkinase Gen ausgestatteten MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren durchgeführt. Nach Ganciclovir-Gabe konnte ein verlangsamtes Tumorwachstum festgestellt werden.

Daraus folgt, daß MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren geeignete Gentransfervehikle für den *in vivo* Gentransfer in CD4 positive Zellen sind. Dies macht sie zu aussichtsreiche Kandidaten für die gentherapeutische Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen und potentiell von AIDS.

In nachfolgenden Experimenten sollen effektivere therapeutische Gene zur Behandlung humaner kutaner T-Zell Lymphome und therapeutische Gene zur Behandlung der HIV-Infektion zunächst in Tumor-tragenden Nacktmäusen und durch Infektionsexperimente in Zellkultur getestet werden. MLV/HIV-1 Partikel, deren Vektorgenom für effektive therapeutische Gene kodieren, sollen anschließend zur Therapie humaner kutaner T-Zell Lymphome und der HIV-Infektion eingesetzt werden.

5. Literaturverzeichnis

- Anderson W.F. (1998). Human gene therapy. *Nature* **392**: 25-30
- Akhatib G., Combadiere C., Broder C.C., Feng Y., Kennedy P.E., Murphy P.M. und Berger E.A. (1996). CC CKR5: A RANTES MIP-1 α , MIP-1 β receptor as a fusion coreceptor for macrophagetropic HIV-1. *Science* **272**: 1955-1958
- Arthur L., Bess J.W., Sowder R.C., Benveniste R.E., Mann D.L., Chermann J.C. und Henderson L.E. (1992). Cellular proteins bound to immunodeficiency virus. *Science* **258**: 1935-1939
- Bachmann B.J. (1990). Linkage map of *Escherischia coli* K-12, edition 8 [published erratum appears in *Microbiol Rev* 1991 Mar;55(1):191]. *Microbiol Rev* **54**: 130-97
- Baron U., Schnappinger D., Helbl V., Gossen M., Hillen W. und Bujard H. (1999). Generation of conditional mutants in higher eukaryotes by switching between the expression of two genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1013-18
- Baron U., Freundlieb S., Gossen M. und Bujard H. (1995). Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. *Nucleic Acids Res* **23**: 3605-06
- Beuth J. (1997). Clinical relevance of immunoreactive mistletoe lectin-I. *Anticancer Drugs* **8** Suppl. 1: 53-55
- Bevec D., Dobrovnik M., Hauber J. und Bohnlein E. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 9870-9874
- Bishop J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* **64**: 235-48
- Bittner A., Mitnacht-Kraus R. und Schnierle B.S. (2002). Specific transduction of HIV-1 envelope expressing cells by retroviral vectors pseudotyped with hybrid CD4/CXCR4 receptors. *J Virol Methods* **104**: 83-92
- Bonini C., Ferrari G., Verzeletti S., Servida P., Zappone E., Ruggieri L., Ponzoni M., Rossini S., Mavilio F., Traversari C. und Bordignon C. (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**: 1719-24
- Bonapour B., Sernatinger J. und Levy J.A. (1986). The AIDS-associated retrovirus is not sensitive to lysis or inactivation by human serum. *Virology* **152**: 268-271
- Bonyhadi M.L., Moss K., Voytovich A., Auten J., Kalfoglou C., Plavec I., Forestell S., Su L., Bohnlein E. und Kaneshima H. (1997). RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J Virol* **71**: 4707-4716
- BouHamdan M., Duan L.X., Pomerantz R.J. und Strayer D.S. (1999). Inhibition of HIV-1 by anti-integrase single-chain variable fragment (SFv): delivery by SV40 provides durable protection against HIV-1 and does not require selection. *Gene Ther* **6**: 660-666
- Bromberg J.F., Wrzeszczynska M.H., Devgan G., Zhao Y., Pestell R.G., Albanese C. und Darnell J.E. Jr. (1999). Stat3 as an Oncogene. *Cell* **98**: 295-303
- Buettner R., Mora L.B. und Jove R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* **8**: 945-954
- Cai D.W., Mukhopadhyay T., Liu Y., Fujiwara T. und Roth J.A. (1993). Stable expression of the wildtype p53 gene in human lung cancer cells after retrovirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* **4**: 617-24

- Caldenhoven E., van Dijk T.B., Solari R., Armstrong J., Raaijmakers J.A., Lammers J.W., Koenderman L. und de Groot R.P. (1996). STAT3 β , a splice variant of transcription factor STAT3, is a dominant negative regulator of transcription. *J Biol Chem* **271**: 13221-13227
- 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., Le Deist F. und Fischer A. (2000). Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science* **288**: 669-672
- Charley M.R., Tharp M., Locker J., Deng J.S., Goslen J.B., Mauro T., McCoy P., Abell E. und Jegasothy B. (1990). Establishment of a human cutaneous T-cell lymphoma in C.B-17 SCID mice. *J Invest Dermatol* **94**: 381-384
- Charley M.R., Chan L.J. und Legsothy B.V. (1990). Cytokine effect on cutaneous T-cell leukemia (CTCL) cells: Specific proliferative response to IL-4 and IL-2. *J Invest Dermatol* **94**: 513
- Choe H., Farzan M., Sun Y., Sullivan N., Rollins B., Ponath D., Wu L., Mackay C.R., LaRosa G., Newman W., Gerard N., Gerard C. und Sodroski J. (1996). The β -chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* **85**: 1135-1148
- Cooper D.A., Tindall B., Wilson E.J., Imrie A.A. und Penny R. (1988). Characterization of T lymphocyte responses during primary infection with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **157**: 889-896
- Cosset F.L., Tackeuchi Y., Bettini J.L., Weiss R.A. und Collins M.K.L. (1995). High titer packaging cells producing recombinant resistant to human serum. *J Virol* **62**: 7430-36
- Cosset F.L. und Russell S.J. (1996). Targeting retrovirus entry. *Gene Ther* **3**: 946-956
- Culver K.W., Ram Z., Wallbridge S., Ishii H., Oldfield E.H. und Blease R.M. (1992). In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors. *Science* **256**: 1550-2
- Dalloul A., Laroche L., Bagot M., Mossalayi M.D., Fourcade C., Thacker D.J., Hogge D.E., Merie-Beral H., Debre P. und Schmitt C. (1992). Interleukin-7 is a growth factor for Sezary lymphoma cells. *J Clin Invest* **90**: 1054
- Degreve B., Johansson M., de Clercq E., Karlsson A. und Balzarini J. (1998). Differential intracellular compartmentalization of herpetic thymidine kinases (TKs) in TK gene-transfected tumor cells: molecular characterization of the nuclear localization signal of herpes simplex virus type 1 TK. *J Virol* **72**: 9535-9543
- Deng H.K., Unutmaz D., KewalRamani V.N. und Littman D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**: 296-300
- Diamandidou E., Cohen P.R. und Kurzrock R. (1996). Mycosis Fungoides and Sezary Syndrome. *Blood* **88**: 2385-2409
- Doranz B.J., Rucker J., Yi Y., Smyth R.J., Samson M., Peiper S.C., Parmentier M., Collman R.G. und Doms R.W. (1996). A dualtropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the β -chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**: 1149-1158
- Duan D., Yan Z., Yue Y. und Engelhardt J.F. (1999). Structural analysis of adeno-associated virus transduction circular intermediates. *Virology* **26**: 8-14
- Döbbeling U., Dummer R., Laine E., Potoczna N., Zhong Qin J. und Burg G. (1998). Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell Lymphoma cells. *Blood* **92**: 252-258
- Dragic T., Litwin V., Allaway G.P., Martin S.R., Huang Y., Nagasha K.A., Cayanan C., Maddon P.J., Koup R.A., Moore J.P. und Paxton W.A. (1996). HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* **381**: 667-673

- Edelson R.L. (1980). Cutaneous T-cell lymphoma: Mycosis fungoides, Sezary Syndrome and other variants. *J Am Acad Dermatol* **2**: 89
- Endres M.J., Clapham P.R., Marsh M., Ahuja M., Turner J.D., McKnight A., Thomas J.F., Stoebenu-Haggarty B., Choe S., Vance P.J., Wells T.N.C., Doms R.W., Landau N.R. und Hoxie J.A. (1996). CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* **87**: 745-756
- Endres M.J., Jaffer S., Haggarty B., Turner J.D., Doranz B.J., O'Brien P.J., Kolson D.L. und Hoxie J.A. (1997). Targeting of HIV- and SIV-infected cells by CD4-chemokine receptor pseudotypes. *Science* **278**: 1462-64
- Epstein E.H., Levin D.L., Croft J.D. Jr. und Lutzner M.A. (1972). Mycosis fungoides: Survival, prognostic features, response to therapy and autopsy findings. *Medicine* **51**:61
- Escaich S., Kalfoglou C., Plavec I., Kaushal S., Mosca J.D. und Bohnlein E. (1995). RevM10-mediated inhibition of HIV-1 replication in chronically infected T cells. *Hum Gene Ther* **6**: 625-34
- Falke D., und Modrow S. (1998). Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin
- Farzan M., Choe H., Vaca L., Martin K., Sun Y., Desjardins E., Ruffing N., Wu L., Wyatt R., Gerard N., Gerard C. und Sodroski J. (1998). A Tyrosine-rich region in the N terminus of CCR5 is important for human immunodeficiency virus type 1 entry and mediates an association between gp120 and CCR5. *J Virol* **72**: 1160-1164
- Feng Y., Broder C.C., Kennedy P.E. und Berger E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembran, G protein coupled receptor. *Science* **272**: 872-877
- Ferry N., Duplessis O., Houssin D., Danos O. und Heard J.M. (1991). Retroviral-mediated gene transfer into hepatocytes *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci* **88**: 8377-81
- Fink D.J., DeLuca N.A., Yamada M., Wolfe D.P. und Glorioso J.C. (2000). Design and application of HSV vectors for neuroprotection. *Gene Ther* **7**: 115-119
- Fischmann A.B., Bunn P.A. Jr., Guccion J.G., Matthews M.J. und Minna J.D. (1979). Exposure to chemicals, physical agents and biologic agents in mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Cancer Treat Rep* **63**: 591.
- Francini G., Fagnoli K.A., Giombini F., Jagodzinski L., De Rossi A., Bosch M., Biberfeld G., Fenyo E.M., Albert J., Gallo R.C. et al. (1989). Molecular and biological characterization of a replication competent human immunodeficient type 2 (HIV-2) proviral clone. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2433-2437
- Fujiwara T., Cai D.W., Georges R.N., Mukhopadhyay T., Grimm E.A. und Roth J.A. (1994). Therapeutic effect of a retroviral wild-type p53 expression vector in an orthotopic lung cancer model. *J Natl Cancer Inst* **86**: 1458-1462
- Galderisi U., Cascino A. und Giordano A. (1999). Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J Cell Physiol* **18**: 251-257
- Galili U. und Swanson K. (1991). Gene sequences suggest inactivation of alpha-1,3-galactosyltransferase in catarrhines after the divergence of apes from monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7401-7404
- Gerstmeyer B., Groner B., Wels W. und Schnierle B.S. (1999). Stable expression of the ecotropic retrovirus receptor in amphotropic packaging cells facilitates the transfer of recombinant vectors and enhances the yield of retroviral particles. *J Virol Methods* **81**: 71-75
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W. und Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766-69

- Hajto T., Hostanska K. und Gabius H.J. (1989). Modulatory potency of the beta-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vivo in rabbits and patients. *Cancer Res* **49**: 4803-4808
- Hall W.W., Liu C.R., Schneewind O., Takahashi H., Kaplan M.H., Roupe G. und Vahlne A. (1991). Detected HTLV-1 provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science* **253**: 317
- Hanenberg H., Xiao X.L., Dilloo D., Hashino K., Kato I. und Williams D.A. (1996). Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nature Med* **2**: 876-882
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-80
- Heise C., und Kim D.H. (2000). Replication-selective adenoviruses as oncolytic agents. *J Clin Invest* **105**: 847-851
- Hildinger M., Dittmar M.T., Schult-Dietrich P., Fehse B., Schnierle B.S., Thaler S., Stiegler G., Welker R. und von Laer D. (2001). Membran-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**: 3038-42
- Hermann T., Maryanski J.L., Romero P., Fleischer B. und MacDonald H.R. (1990). Activation of MHC class I-restricted CD8⁺ CTL by microbial T cell mitogens. Dependence upon MHC class II expression of the target cells and V beta usage of the responder T cells. *J Immunol* **144**: 1181-1186
- Hobbs S., Jitrapakdee S. und Wallace J.C. (1998). Development of a bicistronic Vektor driven by the human polypeptide chain elongation factor 1 α promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **252**: 368-372
- Höhne M., Thaler S., Dudda J.C., Groner B. und Schnierle B.S. (1999). Truncation of the human immunodeficiency virus-type-2 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of murine leukemia virus retroviral vector particles. *Virology* **261**: 70-78
- James H.A. und Gibson I. (1998). The therapeutic potential of ribozymes. *Blood* **91**: 371-382
- Junker U., Kalfoglou C.S., Moon J.J., Beck M.K., Kaneshima H. und Bohnlein E. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells derived from retroviral vector-transduced peripheral blood progenitor cells. *Hum Gene Ther* **9**: 333-40
- Junker U., Baker J., Kalfoglou C.S., Veres G., Kaneshima H. und Bohnlein E. (1997). Antiviral potency of drug-gene therapy combinations against human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **13**: 1395-1402
- Jones G., Jhoppe R.T. und Glastein E. (1995). Electron beam treatment for cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **9**: 1057
- Karlsson G.B., Halloran M., Li J., Park I.W., Gomila R., Reimann K.A., Axthelm M.K., Iliff S.A., Letvin N.L. und Sodroski J. (1997). Characterisation of molecularly cloned simian-human immunodeficiency viruses causing rapid CD4⁺ lymphocyte depletion in rhesus monkeys. *J Virol* **71**: 4218-4225
- Kawabe Y. und Ochi A. (1990). Selective anergy of V beta 8⁺, CD4⁺ T cells in Staphylococcus enterotoxin B-primed mice. *J Exp Med* **172**: 1065-1070
- Kay M.A., Glorioso J.C. und Naldini L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nature Med* **7**: 33-40
- Kay M.A., Manno C.S., Ragni M.V., Larson P.J., Couto L.B., McClelland A., Glader B., Chew A.J., Tai S.J., Herzog R.W., Arruda V., Johnson F., Scallan C., Scarsgard E., Flake A.W. und High K.A. (2000). Evidence for gene transfer and expression of blood coagulation factor IX in patients with severe hemophilia B treated with an AAV vector. *Nature Genet* **24**: 257-261

- Kilby J.M., Hopkins S., Venetta T.M., DiMassimo B., Cloud G.A., Lee J.Y., Alldredge L., Hunter E., Lambert D., Bolognesi D., Matthews T., Johnson M.R., Nowak M.A., Shaw G.M. und Saag M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Med* **4**: 1302-07
- Killeen N., Sawada S. und Littman D.R. (1993). Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO* **12**: 1547-53
- Kimizuka F., Taguchi Y., Ohdate Y., Kawase Y., Shimojo T., Hashino K., Kato I., Sekiguchi K. und Titani K. (1991). Production and characterisation of functional domains of human fibronectin expressed in *Escherischia coli*. *J Biochem* **110**: 284-291
- Klebba C., Ottmann O.G., Scherr M., Pape M., Engels J.W., Grez M., Hoelzer D. und Klein S.A. (2000). Retrovirally expressed anti-HIV ribozyme confer a selective survival advantage on CD4⁺ T cell in vitro. *Gene Ther* **7**: 408-416
- Klingenberg R. (1998). Gentherapie: Etablierung und Optimierung retroviraler Vektoren für den zellspezifischen Gentransfer. Dissertation, Universität Freiburg, Fakultät für Medizin
- Krisky D.M., Wolfe D., Goins W.F., Marconi P.C., Ramakrishnan R., Mata M., Rouse R.J., Fink D.J. und Glorioso J.C. (1998). Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy application. *Gene Ther* **5**: 1517-1530
- Kumar M. und Carmichael G.G. (1998). Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1415-1434
- Kuzel T., Foss F., LeMaistre C., Plataniias L., Ratain M., Rook A., Saleh M. Schwartz G. und Nichols J. (1995). Phase I trial of a diphtheria toxin (DT) fusion protein (DAB389IL-2) for the treatment of interleukin-2 receptor (IL-2R) expressing hematologic neoplasms. *Blood* **86**: 274
- Kwong P.D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J. und Hendrickson W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**: 648-659
- Lane D.P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-16
- Larsen R.D., Rivera-Marrero C.A, Ernst L.K., Cummings R.D. und Lowe J.B. (1990). Frameshift and nonsense mutations in a human genomic sequence homologous to a murine UDP-Gal:beta-D-Gal(1-4)-D-GlcNAc alpha(1-3)-galactosyltransferase cDNA. *J Biol Chem* **265**: 7055-7061
- Lawlor F., Smith N.P., Camp R.D.R., Bacon K.B., Black A.K., Greaves M.W. und Gearing A.J.H. (1990). Skin exudate levels of interleukin 6, interleukin 1 and other cytokines in mycosis fungoides. *Br J Dermatol* **123**: 297
- Lee N.S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M.J., Ehsani A., Salvaterra P. und Rossi J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotech* **20**: 500-505
- LeMaistre C.F., Meneghetti C., Rosenbaum M., Reuben J., Parker K., Shaw J., Deisseroth A., Woodworth T. und Parkinson D.R. (1992). Phase I trial of an interleukin-2 (IL-2) fusion toxin (DAB486IL-2) in hematologic malignancies expressing the IL-2 receptor. *Blood* **79**: 2547
- Levy J.A. (1993). Pathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *Microbiol Rev* **57**: 183-289
- Liu M.L., Winther B.L. und Kay M.A. (1996). 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**: 2497-2502
- Malim M.H. und Cullen B.R. (1990). HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. *Cell* **60**: 675-683

- Mammano F., Salvatori F., Indraccolo S., DeRossi A., Chiego-Bianchi L., und Göttlicher H.G. (1997). Truncation of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of Moloney murine leukemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells. *J Virol* **71**: 3341-3345
- Martin F., Chowdhury S., Neil S., Phillipps N. und Collins M.K. (2002). Envelope-targeted retrovirus vektors transduce melanoma xenografts but not spleen or liver. *Mol Ther* **5**: 269-274
- Mascola J.R., Stiegler G., VanCott T.C., Katinger H., Carpenter C.B., Hanson C.E., Beary H., Hayes D., Frankel S.S., Birx D.L. und Lewis M.G. (2000). Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies. *Nature Med* **6**: 207-210
- Maxwell I.H., Glode L.M. und Maxwell F. (1991). Expression of the diphtheria toxin A-chain coding sequence under the control of promoters and enhancers from immunoglobulins genes as a means of directing toxicity to B-lymphoid cells. *Cancer Res* **51**: 4299-304
- Miller W.H. und Miller R.L. (1980). Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J Biol Chem* **255**: 7204-7
- Miller D.G., Adam M.A. und Miller A.D. (1990). Gene Transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol Cell Biol* **10**: 4239-4242
- Mitnacht-Kraus R. und Schnierle B.S. (2002). Expression of the human CD4 Rezeptor is sufficient for the transduction of murine T-cells with MLV/HIV pseudotyped vectors. *Virus Res* **87**: 129
- Miyoshi H., Smith K.A., Mosier D.E., Verma I.M. und Torbett B.E. (1999). Transduction of human CD34⁺ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* **283**: 682-686
- Miao C.H., Nakai H., Thompson A.R., Storm T.A., Chiu W., Snyder R.O. und Kay M.A. (2000). Nonrandom transduction of recombinant adeno-associated virus vectors in mouse hepatocytes in vivo: cell cycling does not influence hepatocyte transduction. *J Virol* **74**: 3793-3803
- Mukhatar M., Duke H., BouHamdan M. und Pomerantz R.J. (2000). Anti-human immunodeficiency virus type 1 gene therapy in human central nervous system-based cells: an initial approach against a potential viral reservoir. *Human Gene Ther* **11**: 347-59
- Muzyczka N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **158**: 97-129
- Nabel G.J. (1998). From rhyme to reason. *Nature* **392** (supplement): 3-4
- Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M. und Trono D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-7
- Nielson M., Kaltoft K., Nordahl M., Röpke C., Geisler C., Mustelin T., Dobson P., Svejgaard A. und Odum N. (1997). Constitutive activation of a slowly migrating isoform of Stat3 in mycosis fungoides tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 6764-69
- Onishi M., Nosaka T., Misawa K., Mui A.L.F., Gorman D., McMahon M., Miyajima A. und Kitamura T. (1998). Identification and characterization of a constitutively active Stat5 mutant that promotes cell proliferation. *Mol Cell Biol* **18**: 3871-79
- Ory D., Neugeboren B.A. und Mulligan R.C. (1996). A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11400-11406
- Paquin A., Jaalouk D.E. und Galipeau J. (2001). Retrovector encoding a green fluorescent protein-Herpes Simplex Virus thymidine kinase fusion protein serves as a versatile suicide/reporter for cell and gene therapy application. **12**: 13-23

- Paul C.P., Good P.D., Winer I. und Engelke D.R. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotech* **20**: 505-508
- Peng K.W., Vile R., Cosset F.L. und Russell S.J. (1999). Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors. *Gene Ther* **6**: 1552-57
- Peng K.W., Pham L., Ye H., Zufferey R., Trono D., Cosset F.L. und Russell S.J. (2001). Organ distribution of gene expression after intravenous infusion of targeted and untargeted lentiviral vectors. *Gene Ther* **8**: 1456-63
- Pham L., Ye H., Cosset F.L., Russell S.J. und Peng K.W. (2001). Concentration of viral vectors by co-precipitation with calcium phosphate. *J Gene Med* **2**: 188-94
- Pollok K.E., Hanenberg H., Noblitt T.W., Schroeder W.L., Kato I., Emanuel D. und Williams D.A. (1998). High-efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J Virol* **72**: 4882-4892
- Reddy T.R., Xu W., Mau J.K., Goodwin C.D., Suhasini M., Tang H., Frimpong K., Rose D.W. und Wong-Staal F. (1999). Inhibition of HIV replication by dominant negativ mutants of Sam68, a functional homolog of HIV-1 Rev. *Nat Med* **6**: 635-42
- Reimann K.A., Li J.T., Voss G., Lekutis C., Tenner-Racz K., Racz P., Lin W., Montefiori D.C., Lee-Parritz D.E., Lu Y., Collman R.G., Sodroski J. und Letwin N.L. (1996). An *env* gene derived from a primary human immunodeficiency virus type 1 isolate confers high *in vivo* replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *J Virol* **70**: 3198-3206
- Reimann K.A., Li J.T., Veazey R., Halloran M., Park I.W., Karlsson G.B., Sodroski J. und Letwin N.L. (1996). A chimeric simian/human immunodeficiency virus in expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate *env* causes an AIDS-like disease after *in vivo* passage in rhesus monkeys. *J Virol* **70**: 6922-6928
- Rellahan B.L., Jones L.A., Kruisbeek A.M., Fry A.M. und Matis L.A. (1990). *In vivo* induction of anergy in peripheral V beta 8+ T cells by staphylococcal enterotoxin B. *J Exp Med* **172**: 1091-1100
- Rosengart T.K., Lee L.Y., Patel S.R., Bergman G.W., Hachamovitch R., Szule M., Kligfield P.D., Okin P.M., Hahn R.T., Devereux R.B., Post M.R., Hackett N.R., Foster T., Grosso T.M., Lesser M.L., Isom O.W. und Crystal R.G. (1999). Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenoviral vector expression VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* **100**: 468-474
- Roth J.A. und Cristiano R.J. (1997). Gene therapy of cancer: what have we done and where are we going? *J Natl Cancer Inst* **89**: 21-39
- Rother R.P., Squinto S.P., Mason J.M. und Rollins S.A. (1995). Protection of retroviral vector particles in human blood through complement inhibition. *Hum Gene Ther* **6**: 429-435
- Roux P., Jeanteur P. und Piechaczyk M. (1989). A versatile and potentially general approach to the targeting of specific cell types by retroviruses: application to the infection of human cells by means of major histocompatibility complex class I and class II antigens by mouse ecotropic murine leukemia virus-derived viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 9079-9083
- Sambrook J., Fritsch E.F. und Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition Edition (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Sandbank M. und Katzenellenbogen I. (1968). Mycosis fungoides of prolonged duration in siblings. *Arch Dermatol* **98**:620
- Schabath R., Müller G., Schubel A., Kremmer E. und Lipp M. (1999). The murine chemokine receptor CXCR4 is tightly regulated during T cell development and activation. *J Leukocyte Biol* **66**: 996-1004

- Schnierle B.S., Stitz J., Bosch V., Nocken F., Merget-Militzer H., Engelstädter M., Kurth R., Groner B. und Cichutek K. (1997). Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 8640-8645
- Schultze J.L., Stettin A. und Berg P.A. (1991). Demonstration of specifically sensitized lymphocytes in patients treated with an aqueous mistletoe extract (*Viscum album* L.). *Klin Wochenschr* **69**: 397-403
- Shaheen F., Duan L., Zhu M., Bagasra O. und Pomerantz R.J. (1996). Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J Virol* **70**: 3392-3400
- Simmons G., Wilkinson D., Reeves D.J., Dittmar M.T., Beddows S., Weber J., Carnegie G., Desselberger U., Gray P.W., Weiss R.A. und Clapham P.R. (1996). Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol* **70**: 8355-8360
- Spooner R.A., Deonarain M.P. und Epenetos A.A. (1995). DNA vaccination for cancer treatment. *Gene Ther* **2**: 173-80
- Stein G.M. und Berg P.A. (1997). Mistletoe extract-induced effects on immunocompetent cells: in vitro studies. *Anticancer Drugs* **8** Suppl. 1: 39-42
- Stein G.M. und Berg P.A. (1998). Modulation of cellular and humoral immune responses during exposure of healthy individuals to an aqueous mistletoe extract. *Eur J Med Res* **3**: 307-14
- Stern R.S., Parrish J.A. und Fitzpatrick T.B. (1985). Ocular findings in patients treated with PUVA. *J Invest Dermatol* **85**: 269
- Stern R.S., Laird N.L., Melski J., Parrish J.A., Fitzpatrick T.B. und Bleich H.L. (1984). Cutaneous squamous-cell carcinoma in patients treated with PUVA. *N Engl J Med* **310**: 1156
- Streyaer D.S., Branco F., Landre J., BouHamdan M., Shaheen F. und Pomerantz R.J. (2002). Combination genetic therapy to inhibit HIV-1. *Mol Ther* **5**: 33-41
- Sui G., Soohoo C., Affar el B., Gay F., Shi Y., Forrester W.C. und Shi Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5515-5520
- Takashashi T., Nau M.M., Chiba I., Birrer M.J., Rosenberg R.K., Vinocour M., Levitt M., Pass H., Gazdar A.F. und Minna J.D. (1989). p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science* **246**: 491-494
- Takeuchi Y., Cosset F.L., Lachmann P.J., Okada H., Weiss R.A. und Collins M.K.L. (1994). Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and producer cell. *J Virol* **68**: 8001-8007
- Takeuchi Y., Porter C.D., Strahan K.M., Preece A.F., Gustafsson K.M., Cosset F.L., Weiss R.A. und Collins M.K.L. (1996). Sensitization of cells and retroviruses to human serum by (α 1-3) galactosyltransferase. *Nature* **379**: 85-88
- Thaler S. und Schnierle B.S. (2001). A packaging cell line generating CD4-specific retroviral vectors for efficient gene transfer into primary human T-helper lymphocytes. *Mol Ther* **4**: 273-279
- Thomsen K., Hammar H., Molin L. und Volden G. (1989). Retinoids plus PUVA (RePUVA) and PUVA in mycosis fungoides, plaque stage. *Acta Derm Venereol* **69**: 536
- Tokura Y., Yagi H., Ohshima A., Kurokawa S., Wakita H., Yokote R., Shirahama S., Furukawa F. und Takigawa M. (1995). Cutaneous colonization with staphylococci influences the disease activity of Sezary syndrome: A potential role for bacterial superantigens. *Br J Dermatol* **133**: 6

- Uherek C. (1998). Modulare Fusionsproteine als nicht-virales System für zellspezifischen Gentransfer. Dissertation, Universität Konstanz, Fakultät für Biologie
- van den Tweel J. u.a. (1999). Immunologie Das menschliche Abwehrsystem Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin
- Veres G., Junker U., Baker J., Barske C., Kalfoglou C., Ilves H., Escaich S., Kaneshima H. und Bohnlein E. (1998). Comparative analyses of intracellularly expressed antisense RNAs as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* **72**: 1894-1901
- Verma I.M., und Somia N. (1997). Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature* **389**: 239-242
- Vile R., und Russel S.J. (1994). Gene transfer technologies for the gene therapy of cancer. *Gene Ther* **1**: 88-89
- Wang Z.X., Berson J.F., Zhang T.Y., Cen Y.H., Sun Y., Sharron M., Lu Z.H. und Peiper S.C. (1998). CXCR4 sequences involved in coreceptor determination of human immunodeficiency virus type-1 tropism. Unmasking of activity with M-tropic Env glycoproteins. *J Biol Chem* **273**: 15007-15015
- Weinberg R.A. (1991). Tumor suppressor genes. *Science* **254**: 1138-46
- Weinstock M.A. und Horn J.W. (1988). Mycosis fungoides in the United States – Increasing incidence and descriptive epidemiology. *JAMA* **260**: 42
- Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. und Felgner P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465-8
- Wong-Staal F., Poeschla E.M. und Looney D.J. (1998) A controlled, Phase I clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA.
- Xiao X., Wu L., Stantchev T.S., Feng Y.R., Ugolini S., Chen H., Shen Z., Riley J.L., Broder C.C., Sattentau Q.J. und Dimitrov D.S. (1999). Constitutive cell surface association between CD4 and CCR5. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 7496-7501
- Yamaizumi M., Mekada E., Uchida T. und Okada Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill a cell. *Cell* **15**: 245-50
- Yang N.S., Burkholder J., Roberts B., Martinell B. und McCabe D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9568-72
- Zachariae C., Larsen C.S., Kaltoft K., Deleuran B., Larsen G.C. und Thestrup-Pedersen K. (1991). Soluble IL-2 receptor serum levels and epidermal cytokines in mycosis fungoides and related disorders. *Acta Derm Venereol* **71**: 465
- Zucker-Franklin D. und Pancake B.A. (1994). The role of human T-cell lymphotropic viruses (HTLV-I/II) in cutaneous T-cell lymphomas. *Semin Dermatol* **13**:160

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACP	Acetatpuffer
ADA	Adenosin-Desaminase
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Amp	Ampicillin
ARC	AIDS-related complex
AS	Aminosäure
ATL	adulte T-Zell Leukemie
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
β -Gal	β -Galaktosidase
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	carboxyterminal
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CIP	calf intestinal phosphatase
CMV	Zytomegalusvirus
CTCL	cutaneous T cell lymphomas
d	Dichte
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ECL	enhanced chemoluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherischia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-1 α	Elongationsfaktor-1 α
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor

EGF-R	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFP/TKfus	Fusionsprotein aus EGFP und HSV-Tk
EGTA	Ethylenglycol- <i>bis</i> -[Aminoethylether]-Tetraacetat
Env	Envelopeprotein (Hüllglykoprotein)
<i>env</i>	für das Envelopeprotein kodierendes Gen
et al.	et alias; lateinisch-und andere
FACS	fluorescence activated cell sorting
Fab	antigenbindendes Fragment eines Antikörpers
FCS	fötales Kälberserum
FDG	Fluoresceszein-di- β -galaktosid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
Fv	variables Fragment eines Antikörpers
<i>g</i>	Gravitationskonstante
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GaLV	gibbon ape leukemia virus
GCV	Ganciclovir
GDP	Guanosin-Diphosphat
GFP	green fluorescent protein
gp	Glykoprotein
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	horseradish peroxidase
HSV-Tk	Herpes Simplex Virus Thymidinkinase
HS	humanes Serum
HTLV	human T-cell lymphotropic virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
IRES	internal ribosomal entry site
IU	infectious units

kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LB	Luria Bertani
LNGFR	low affinity nerval growth receptor
LTR	long terminal repeat
M	Mol
mA	Milliampere
MACS	magnetic antibody cell sorting
MCS	multiple cloning site
min	Minute
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MLV	murine leukemia virus
mM	Millimol
MOI	multiplicity of infection
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
NIH	National institute of health
NLS	nuclear location sequence
nM	Nanomol
NP40	Nonidet-P 40
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
Pol	Polymerase
RLU	relative light units
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RT	Raumtemperatur
scFv	single-chain Fv-Fragment
SCID	severe combine immunodeficiency disease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SHIV	simian-human immunodeficiency virus
siRNA	small interfering RNA
SSC	side scatter
SV40	Simian Virus 40
TEMED	Tetramethyl-Ethylendiamin
TMA	Trimethylamin
U	Unit, Enzymeinheit
V	Volt
VSV	vesicular stomatitis virus
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein G
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -Galaktopyranosid

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr Barbara Schnierle am Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold möchte ich für die freundliche und fachübergreifende Betreuung der vorliegenden Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé danke ich vielmals für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Barbara Schnierle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Vergabe des interessanten Themas sowie die vielen lebendigen Diskussionen und die fachliche Unterstützung.

Besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen sowie allen weiteren Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses, die mich durch ihre Hilfsbereitschaft und ihren Humor bei der Durchführung dieser Arbeit sehr unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die immer für mich da waren und mir mein Studium ermöglicht haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Thaler
Vorname	Sonja
Geburtsdatum	01.11.1972
Geburtsort	Reinbek bei Hamburg

Schulbildung

Aug. 1979 - Jun. 1983	Grundschule in Hamburg Lohbrügge
Aug. 1983 - Jun. 1985	Gymnasium in Hamburg Lohbrügge
Aug. 1985 - Jun. 1992	Gymnasium Karl-Rehbein-Schule in Hanau Abitur Jun. 1992

Studium

Okt. 1992 - Jul. 1994	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Studium der Biologie und Chemie Vordiplom in Biologie Sept. 1994 (Gesamtnote: sehr gut)
Okt. 1994 - Jul. 1996	Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main Studium der Biochemie Diplomprüfung Feb. 1997 (Gesamtnote: sehr gut)
Apr. 1997 - Nov. 1997	Diplomarbeit am Gustav Embden Zentrum Frankfurt am Main Thema: Molekularbiologische Charakterisierung der 75 kD Untereinheit aus Komplex I der Hefe <i>Yarrowia lipolytica</i> (Note: Sehr gut)

Promotion

Sept. 1998 - Jun. 2002	Promotionsarbeit am Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main Thema: Gentherapie: Etablierung und Optimierung retroviraler Vektoren für den T-Zell-spezifischen Gentransfer
------------------------	---

Posterpräsentationen

Jahrestagung 1999 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Bremen
Herstellung Retroviraler Pseudotyp-Vektoren aus Murinem Leukämie
Virus Kapsidpartikeln und dem HIV Typ2 Hüllprotein.
Sonja Thaler, Martin Höhne und Barbara Schnierle

Symposium of Gene Therapy for Skin Diseases 2000, Essen
Improved MLV/HIV Pseudotyped Vector Particles Producing Packaging Cells
Thaler, S.; Schnierle, B.

Jahrestagung 2000 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Wien
Improved MLV/HIV Pseudotyped Vector Particles Producing Packaging Cells
Thaler, S.; Schnierle, B.

Symposium of Pathogenesis of cutaneous lymphoma 2000, Essen
A packaging cell line generating CD4 specific retroviral vectors for
gene transfer into primary human T-helper lymphocytes
Thaler, S.; Schnierle, B.

Jahrestagung 2001 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Dresden
A packaging cell line generating CD4 specific retroviral vectors for
gene transfer into primary human T-helper lymphocytes
Thaler, S.; Schnierle, B.

Jahrestagung 2001 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Dresden
A Membrane-Anchored Peptide Inhibits HIV Entry
Nowock, J.; Martinius, H.; Egelhofer, M., Schult-Dietrich, P.; Schnierle, B.;
Thaler, S.; Dittmar, M.T.; von Lear D.

Jahrestagung 2002 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Erlangen
Applications of MLV/HIV-1 retroviral vectors in gene therapy
Thaler, S.; Burger, A., Brill, B.; Schnierle, B.

BIO-EUROPE 2002 Congress of Gene Therapy and Vaccines, Rom
Applications of MLV/HIV-1 retroviral vectors in gene therapy of cutaneous T cell
lymphomas
Thaler, S.; Burger, A.; Schnierle, B.

Vorträge

Jahrestagung 2002 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Erlangen
Applications of MLV/HIV-1 retroviral vectors in gene therapy

BIO-EUROPE 2002 Congress of Gene Therapy and Vaccines, Rom
Applications of MLV/HIV-1 retroviral vectors in gene therapy

Wissenschaftliche Publikationen

Martin Höhne, Sonja Thaler, Jan C. Dudda, Bernd Groner, and Barbara S. Schnierle (1999). Truncation of the Human Immunodeficiency Virus-Type-2 Envelope Glycoprotein Allows Efficient Pseudotyping of Murine Leukemia Virus Retroviral Vector Particles. *Virology* **261**: 70-78.

Markus Hildinger, Matthias T. Dittmar, Patricia Schult-Ditrich, Boris Fehse, Barbara S. Schnierle, Sonja Thaler, Gabriela Stiegler, Reinhold Welker, Dorothee von Laer A Membrane-Anchored Peptide Inhibits HIV Entry. *J. Virol.* (2001) **75**: 3038-42

Sonja Thaler and Barbara S. Schnierle A packaging cell line generating CD4 specific retroviral vectors for gene transfer into primary human T-helper lymphocytes. *Mol. Ther.* (2001) **4**: 273-9

Sonja Thaler, Angelika Burger and Barbara S. Schnierle Intratumoral administration of MLV/HIV pseudotyped vectors encoding thymidine kinase followed by systemic GCV treatment leads to a delay of cutaneous T cell lymphoma growth in a nude mouse model. *Blood*, eingereicht im Aug. 2002

Sonja Thaler, Angelika Burger, Alexandra Bittner, Reinhard Dummer and Barbara S. Schnierle Establishment of a mouse xenograft model for human cutaneous T cell lymphomas. In Vorbereitung