

Sezernierte antivirale Eintrittsinhibitoren (iSAVE) zur Gentherapie der HIV-Infektion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Lisa Mareike Egerer
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2009
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Erstgutachter: Prof. Dr. Volker Dötsch

Zweitgutachter: Prof. Dr. Dorothee von Laer

Datum der Disputation: 18. Februar 2010

INHALTSVERZEICHNIS

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Das Humane Immundefizienzvirus.....	3
2.1.1	Aufbau von HIV-1.....	3
2.1.2	Replikation von HIV-1.....	5
2.1.3	Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle.....	6
2.2	Konventionelle Therapie der HIV-Infektion.....	8
2.2.1	Die „hoch aktive antiretrovirale Therapie“ – HAART	8
2.2.2	Inhibitoren des Viruseintritts	8
2.3	Gentherapie der HIV-Infektion	12
2.3.1	Antivirale Gene	13
2.3.2	Vektoren in der Gentherapie	14
2.3.3	HIV-Gentherapie mit membranständigen Fusionsinhibitoren	16
2.4	Sekretion von Proteinen und Peptiden.....	18
2.4.1	Translokation von Proteinen ins Endoplasmatische Retikulum	18
2.4.2	Modifikation und Faltung von Proteinen im ER	20
2.4.3	Reifung im Golgi-Apparat und Transport zur Plasmamembran	21
2.5	Fragestellung und Zielsetzung.....	23
3	Material	24
3.1	Laborchemikalien.....	24
3.2	Antikörper	26
3.3	Plasmide.....	26
3.4	Material für molekularbiologische Arbeiten	29
3.4.1	Lösungen, Puffer und Nährmedien	29
3.4.2	Bakterien.....	30
3.4.3	Oligonukleotide.....	30
3.4.4	Enzyme und Größenstandards	33
3.4.5	Kits in der Molekularbiologie	33

3.5	Material für Zellkultur- und virologische Arbeiten	34
3.5.1	Lösungen, Puffer und Kulturmedien	34
3.5.2	Zelllinien.....	37
3.5.3	HIV-Stämme	37
3.5.4	HIV-Fusionsinhibitoren	38
3.5.5	Kits in der Zellkultur	38
3.6	Material für proteinbiochemische Arbeiten.....	39
3.6.1	Lösungen und Puffer	39
3.6.2	Kits in der Proteinbiochemie	41
3.7	Verbrauchsmaterial	42
3.8	Geräte.....	43
3.9	Software	44
4	Methoden	45
4.1	Molekularbiologische Methoden	45
4.1.1	Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i>	45
4.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i>	45
4.1.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA.....	45
4.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	46
4.1.5	Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen.....	46
4.1.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
4.1.7	Erzeugung von cDNA mittels Oligonukleotid-Hybridisierung.....	49
4.1.8	Enzymatische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	50
4.1.9	Modifikation von DNA-Enden.....	51
4.1.10	Agarose-Gelelektrophorese von DNA	52
4.1.11	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	53
4.1.12	Ligation von DNA-Fragmenten.....	53
4.1.13	Sequenzierung von DNA	53
4.2	Klonierungsstrategien	54
4.3	Methoden der Zellkultur.....	60
4.3.1	Kultivierung und Konservierung von Zelllinien	60
4.3.2	Isolierung von PBMCs aus Blut.....	60
4.3.3	Immunomagnetische Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen.....	61
4.3.4	Stimulierung und Kultivierung von primären humanen T-Zellen.....	61
4.3.5	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	62
4.3.6	Konzentration lentiviraler Überstände	64
4.3.7	Transduktion von Zelllinien mit viralen Vektoren	65
4.3.8	Transduktion primärer humaner T-Lymphozyten	67
4.3.9	<i>Single-round infection assay</i> mit HIV-pseudotypisierten Viren	67
4.3.10	Durchflusszytometrie	68
4.3.11	Bestimmung von C-Peptidkonzentrationen in Überständen.....	69

4.4	Virologische Methoden	70
4.4.1	Vermehrung von HIV-1	70
4.4.2	HIV-Titerbestimmung.....	71
4.4.3	<i>In vitro</i> Infektionsversuche mit HIV-1	71
4.5	Proteinbiochemische Methoden	72
4.5.1	Lyse von Zellen	72
4.5.2	Deglykosylierung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen	72
4.5.3	Immunpräzipitation	73
4.5.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
4.5.5	Coomassie-Färbung von Proteinen	74
4.5.6	Elektro-Blotting (Western Blot)	75
4.5.7	Immundetektion durch Chemilumineszenz	75
4.5.8	Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen.....	76
4.5.9	p24-Antigen ELISA.....	76
4.6	Statistische Methoden	76
4.6.1	Analyse von Dosis-Wirkungskurven.....	76
4.6.2	Analyse von Infektionsverläufen.....	77
4.6.3	Analyse von Gruppenmittelwerten	77
5	Ergebnisse	78
5.1	Sequenzverlängerung verbessert die Sekretion von C-Peptiden	78
5.2	N-Glykane sind für die effiziente Sekretion verlängerter C-Peptide unerlässlich. 80	
5.2.1	Expression und Sekretion der N-Glykosylierungsvarianten	81
5.2.2	Antivirale Aktivität der N-Glykosylierungsvarianten	82
5.3	Multimerisierung steigert die Expression und Sekretion von C-Peptiden	83
5.3.1	Expression und Sekretion der multimeren Peptid-Variante.....	84
5.3.2	Antivirale Aktivität der multimeren Peptid-Variante	85
5.4	Concatemerisierung erhöht die Sekretion und bewahrt die antivirale Aktivität... 86	
5.4.1	Sekretion und Prozessierung der C46-Concatemere	88
5.4.2	Antivirale Aktivität der C46-Concatemere	89
5.4.3	Die Verfügbarkeit von Furin limitiert die Prozessierung der Concatemere	91
5.4.4	N-Glykane fördern die Prozessierung der Concatemere	92
5.5	Charakterisierung von GAFur₀GA	94
5.5.1	Spezifische Inhibition CXCR4- und CCR5-troper HIV-Pseudoviren.....	94
5.5.2	N-Glykane beeinträchtigen die antivirale Aktivität nur wenig	95
5.5.3	Die Halbwertszeit sezernierter GAFur ₀ GA-Peptide ist lang.....	97
5.5.4	Bystander-Inhibition des Viruseintritts in T-Zelllinien	98
5.5.5	Unterdrückung der HIV-Replikation in primären CD4 ⁺ T-Zellen.....	100

5.6	iSAVE-Peptide mit alternativen C-Peptiden	101
5.6.1	HIV-2 _{EHO} -basierte C-Peptide inhibieren HIV und SIV	101
5.6.2	Schwache Bystander-Inhibition durch sezerniertes C46-EHO	102
5.6.3	Ursachen für die schwache Bystander-Inhibition von sezerniertem C46-EHO	104
6	Diskussion	108
6.1	Biosynthese und Freisetzung	109
6.1.1	Der Einfluss von Peptidlänge und -sequenz auf die Sekretion	109
6.1.2	Der Einfluss von N-Glykanen auf die Sekretion	110
6.1.3	Proteolytische Prozessierung im Sekretionsweg	111
6.2	Absorption und Verteilung	115
6.3	Metabolisierung und Ausscheidung	116
6.4	Antiretrovirale Aktivität	117
6.4.1	Einfluss der Peptidlänge auf die antiretrovirale Aktivität	117
6.4.2	Einfluss von N-Glykanen auf die antiretrovirale Aktivität	118
6.5	Immunogenität	118
6.6	Ausblick	119
7	Literatur	121
8	Abkürzungen	131
9	Anhang	134
9.1	Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	134
9.2	Plasmidkarten	141
	Danksagung	144
	Lebenslauf	145
	Publikationen	146

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Gentherapie bietet eine interessante alternative Behandlungsoption bei der Therapie der HIV-Infektion und könnte langfristig die Standardmedikation mit antiretroviralen Substanzen ergänzen oder ersetzen. Antivirale Genprodukte, die frühe Schritte im HIV-Replikationszyklus hemmen, bevor sich das Virus in das Genom der Zielzelle integriert hat, sind dabei besonders vielversprechend (von Laer, Hasselmann & Hasselmann, 2006b). Hierzu zählen insbesondere die von der C-terminalen *heptad repeat* Region des HIV-Hüllglykoproteins gp41 abgeleiteten C-Peptide, die hochwirksame Inhibitoren des Viruseintritts sind (Wild, Greenwell & Matthews, 1993; Wild et al., 1994). Während des HIV-Eintrittsprozesses interagieren sie mit den viralen gp41 N-Helices und verhindern somit die Ausbildung des zur Fusion von viraler und zellulärer Membran erforderlichen Sechs-Helix-Bündels.

Die Sekretion antiretroviraler C-Peptide durch genmodifizierte T-Lymphozyten *in vivo* birgt großes therapeutisches Potential: Nach Freisetzung in den extrazellulären Raum können die Peptide nicht nur genmodifizierte sondern auch unbehandelte Nachbarzellen vor HIV-Infektion schützen (Bystander-Effekt). Somit könnte selbst mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden, mit denen lediglich ein Teil aller potentiellen HIV-Zielzellen modifiziert werden kann, die Virusreplikation effektiv unterdrückt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden daher C-Peptid-basierte *in vivo* sezernierte antivirale Eintrittsinhibitoren (iSAVE) für die HIV-Gentherapie entwickelt. Kurze Peptide, wie die antiviralen C-Peptide, werden von eukaryotischen Zellen aufgrund von Größenbeschränkungen beim Eintritt in den Sekretionsweg jedoch nur schlecht sezerniert. Um die effiziente Sekretion von iSAVE-Peptiden durch genmodifizierte humane Zellen zu erreichen, wurde das C-Peptid daher verlängert. Hierbei wurde das therapeutische Peptid einerseits um nicht antiviral aktive Gerüstelemente ergänzt. Andererseits wurden Concatemer-Konstrukte generiert, in denen zwei C-Peptide jeweils über einen flexiblen oder proteolytisch spaltbaren Linker verbunden sind.

Die unterschiedlichen iSAVE-Peptid-Varianten wurden *in vitro* in transfizierten und transduzierten Zelllinien und in primären humanen T-Lymphozyten charakterisiert. Hierbei wurden Sekretionseffizienz und Prozessierung sowie antivirale Aktivität und Bystander-Inhibition der sezernierten Peptide untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Effizienz der C-Peptidsekretion stark mit der Peptidlänge korreliert, so dass durch Sequenzverlängerungen die Sekretion deutlich gesteigert werden konnte. Darüber hinaus waren N-Glykane für die effiziente Sekretion der C-Peptide unerlässlich.

Die antiretrovirale Aktivität hingegen reduzierte sich mit zunehmender Peptidlänge dramatisch und wurde auch durch N-Glykane leicht beeinträchtigt, so dass weder die durch Gerüstelemente verlängerten C-Peptide, noch die ungespaltenen C-Peptid-Concatemere antiretrovirale Wirkung zeigten. Durch die Generierung proteolytisch spaltbarer C-Peptid-Concatemere konnten die strukturellen Erfordernisse für effiziente Sekretion mit hoher inhibitorischer Aktivität vereinbart werden. Die Prozessierung der Concatemere durch die Proprotein-Convertase Furin war allerdings nicht einfach zu erreichen. Nur das Einfügen eines flexiblen Linkers mit optimierter Furinerkennungssequenz zwischen den beiden C-Peptiden erlaubte die effiziente Spaltung in monomere Peptide mit hoher antiretroviraler Aktivität.

Therapeutisch wirksame Peptidkonzentrationen dieser optimierten iSAVE-Peptide wurden sowohl von transfizierten und transduzierten Zelllinien als auch von primären humanen T-Zellen sezerniert. Nach Freisetzung in den extrazellulären Raum konnten die Peptide nicht nur genmodifizierte sondern auch unbehandelte Nachbarzellen *in vitro* vor HIV-1 Eintritt und Infektion schützen.

Die generierten iSAVE-Peptide bilden damit eine hervorragende Grundlage für die weitere präklinische und klinische Entwicklung eines neuen Gentherapieansatzes zur Behandlung der HIV-Infektion.

2 EINLEITUNG

2.1 Das Humane Immundefizienzvirus

Das Humane Immundefizienzvirus (HIV) wurde 1983-1984 durch die Arbeitsgruppen von Luc Montagnier und Robert C. Gallo als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*) identifiziert (Barre Sinoussi et al., 1983; Popovic et al., 1984). AIDS war erstmals zwei Jahre zuvor von Medizinern in den USA beschrieben worden, die eine ungewöhnliche Häufung opportunistischer Infektionen sowie der seltenen Krebsform Karposi-Sarkom bei einer Gruppe zuvor gesunder homosexueller Männer beobachtet hatten (1981a; 1981b). Bei opportunistischen Infektionen handelt es sich um Infektionen, die bei Menschen mit normaler Immunreaktion leicht abgewehrt werden können, bei Immungeschwächten aber zu schweren Erkrankungen führen. Es wurde daher schnell klar, dass die AIDS-Erkrankung die Folge einer Störung der zellulären Immunabwehr ist, die durch die HIV-Infektion ausgelöst wird und sich durch eine stark verminderte Zahl von CD4⁺ T-Lymphozyten im Blut auszeichnet (Gottlieb et al., 1981; Masur et al., 1981).

Die HIV-Infektion breitete sich in den letzten zweieinhalb Jahrzehnten über den gesamten Globus aus, so dass heute über 30 Millionen Menschen weltweit mit dem Virus infiziert sind. Insbesondere in Entwicklungsländern, allen voran im Süden Afrikas, hat sich die Infektion zu einer Pandemie entwickelt (UNAIDS, 2008).

2.1.1 Aufbau von HIV-1

Bei den humanen Immundefizienzviren handelt es sich um Retroviren, wobei HIV-1 und HIV-2 zusammen mit den tierischen Immundefizienzviren wie SIV die Gattung der Lentiviren innerhalb der Familie der *Retroviridae* bilden.

Das Viruspartikel von HIV-1 ist kugelförmig und hat einen Durchmesser von etwa 100 nm (Hoglund et al., 1992), wobei das Viruscapsid von einer Hüllmembran umgeben ist, die sich von der zellulären Plasmamembran ableitet (Abbildung 2.1). In diese sind etwa 8-14 virale Hüllproteinkomplexe (Env) eingebettet, so genannte *spikes*, die sich aus Trimeren eines transmembranen Glykoproteins (TM, gp41) und eines nichtkovalent daran gebundenen externen Glykoproteins (SU, gp120) zusammensetzen (Zhu et al., 2003; Zhu et al., 2006). Die Innenseite der Hüllmembran wird ausgekleidet von einer netzartigen Schicht des Matrixproteins (MA, p17). Das Link-Protein (LI, p6) verbindet die Membran mit dem konisch geformten Viruscapsid, das sich im Zentrum des Viruspartikels befindet (Gelderblom et al., 1987). Dieses besteht aus den Capsidproteinen (CA, p24) und enthält zwei Kopien des viralen RNA-Genoms, die mit

den Nukleocapsidproteinen (NC, p7) komplexiert vorliegen. Des Weiteren befinden sich im Capsid die Enzyme Reverse Transkriptase (RT, p51/66), Integrase (IN, p32) und Protease (PR, p11) (Gelderblom et al., 1987).

Das Genom von HIV-1 besteht aus einzelsträngiger RNA, die alle Merkmale eukaryotischer mRNA aufweist (5'-Cap, 3'-Polyadenylierung), etwa 9.700 Nukleotide umfasst und 15 Proteine codiert (Frankel & Young, 1998) (Abbildung 2.1). Die für alle Retroviren typischen Polyproteine Gag (gruppenspezifische Antigene), Pol (enzymatische Aktivitäten) und Env (Glykoproteine) werden in drei offenen Leserahmen codiert und zu neun funktionellen Proteinen prozessiert. Darüber hinaus verfügt HIV-1 über zwei regulatorische und vier akzessorische Proteine, die jeweils in eigenen Leserahmen codiert werden.

Die Regulatorproteine Rev und Tat steuern die virale Genexpression (Dayton et al., 1986; Fisher et al., 1986; Pollard & Malim, 1998), während die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef auf vielfältige Weise die Virulenz des Virus *in vivo* erhöhen (Aiken et al., 1994; Cohen, Subbramanian & Gottlinger, 1996; Freed, 2001; Le Gall, Heard & Schwartz, 1997; Mangasarian & Trono, 1997; Strebel, Klimkait & Martin, 1988)

Die codierenden Bereiche der RNA werden von cis-aktiven Regulatorsequenzen, so genannten *long terminal repeats* (LTRs) flankiert, die für die Reverse Transkription sowie die Integration der viralen Erbinformation in die zelluläre DNA erforderlich sind. Darüber hinaus enthalten die LTRs den viralen Promotor für die Transkription der proviralen Sequenzen.

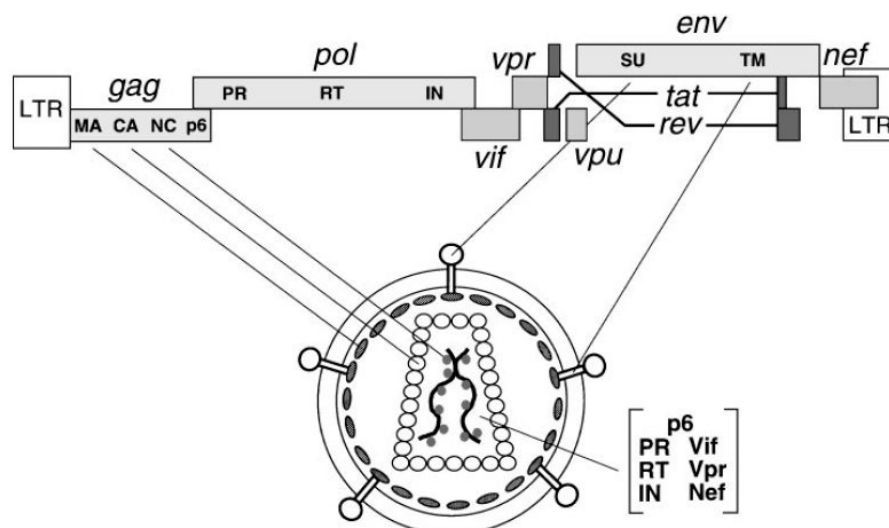


Abbildung 2.1 | Struktur von HIV-1 Genom und Virion.

Beschreibung der einzelnen Komponenten im Text (Frankel & Young, 1998).

2.1.2 Replikation von HIV-1

Der Replikationszyklus von HIV-1 beginnt mit der Bindung des viralen Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Plasmamembran einer Zielzelle (Dalgleish et al., 1984; Fisher et al., 1988; Klatzmann et al., 1984). Es können daher nur solche Zellen von HIV-1 infiziert werden, die CD4 auf der Oberfläche exprimieren, und zwar T-Lymphozyten und Makrophagen. Die Interaktion zwischen gp120 und CD4 allein ist jedoch für die Membranfusion und den Viruseintritt in die Zelle nicht ausreichend. Als Corezeptoren sind die Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 erforderlich (Berger, Murphy & Farber, 1999; D'Souza & Harden, 1996; Fauci, 1996). Durch die Wechselwirkung mit diesen Rezeptoren werden Konformationsänderungen in der gp41-Untereinheit ausgelöst, die die Fusion von viraler und zellulärer Membran ermöglichen, woraufhin der Inhalt des Viruspartikels in die Zelle freigesetzt wird (Chan & Kim, 1998; Eckert & Kim, 2001b).

Nach der Freisetzung des Viruscapsids in das Cytoplasma der Zielzelle erfolgt der bislang kaum verstandene Prozess des *uncoating*, woraufhin sich der Reverse Transkriptionskomplex ausbildet (Karageorgos, Li & Burrell, 1993). Die Reverse Transkriptase katalysiert nun die Synthese einer doppelsträngigen, zur HIV-RNA komplementären DNA (cDNA) (Jonckheere, Anne & De Clercq, 2000). Diese wird als Teil des aus viralen und zellulären Komponenten zusammengesetzten Präintegrationskomplexes in den Zellkern transportiert (Bukrinsky et al., 1993; Gallay et al., 1997; Miller, Farnet & Bushman, 1997).

Im Zellkern katalysiert das virale Enzym Integrase die Insertion der cDNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle (Brown, Chen & Engelman, 1999; Brown et al., 1989; Miller et al., 1997). Das auf diese Weise integrierte virale Erbgut wird als Provirus bezeichnet und verhält sich prinzipiell wie ein zelluläres Gen. Die Initiation der Transkription der viralen Gene erfolgt durch die Bindung zellulärer Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B an entsprechende Bindungsstellen im Bereich der LTRs, die sich beiderseits der proviralen DNA befinden (Jones & Peterlin, 1994). Die gebildeten mRNAs werden in das Cytoplasma transportiert, wo die viralen Vorläuferproteine translatiert werden.

An der Plasmamembran erfolgt daraufhin die Zusammenlagerung von Nachkommenviren. Dabei werden die viralen Vorläuferproteine und RNAs in neue Viruspartikel verpackt, die unter Mitnahme eines zellulären Membrananteils als unreife Virionen durch Knospung freigesetzt werden (Freed, 1998). Die Reifung zu infektiösen Partikeln erfolgt durch die virale Protease, die im Viruspartikel enthaltene Vorläuferproteine in Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine sowie die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase spaltet (Bukrinskaya, 2004).

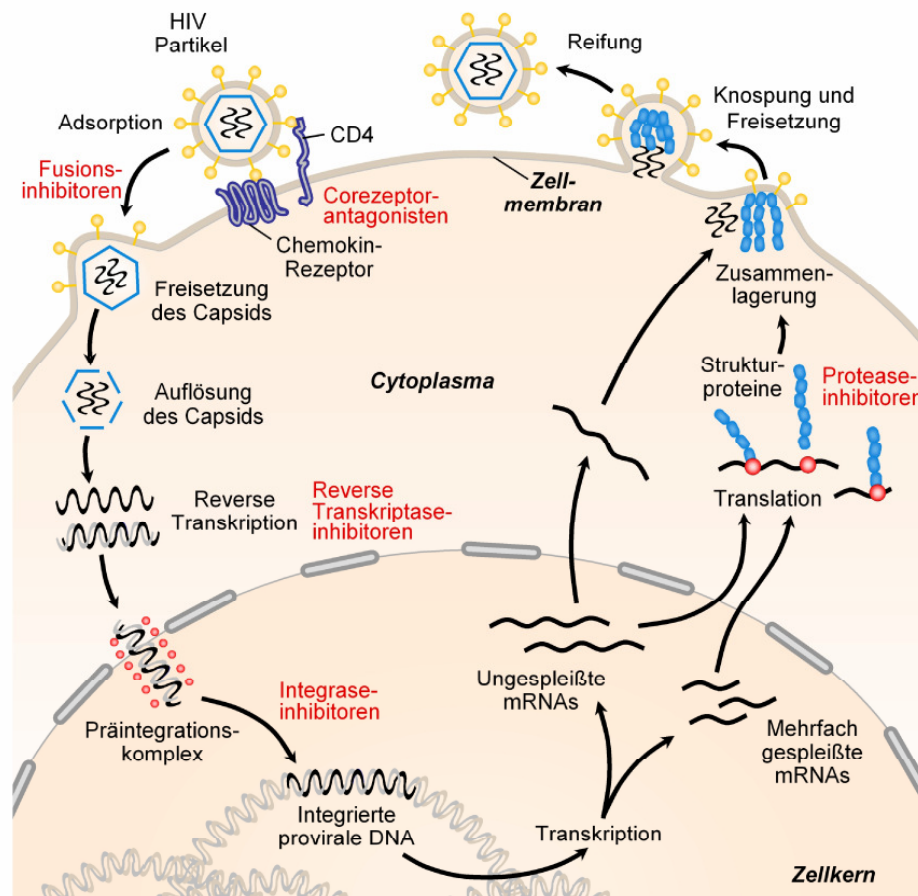


Abbildung 2.2 | Replikationszyklus von HIV-1

Inhibitoren der Virusreplikation sind in rot dargestellt. Verändert nach L.F. Chen et al., 2007 (Chen, Hoy & Lewin, 2007).

2.1.3 Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle

Der Eintritt von HIV-1 in eine Zielzelle wird durch die viralen Hüllproteine gp120 und gp41 vermittelt (Wyatt & Sodroski, 1998), die in Form von trimeren Komplexen über die Transmembrandomänen der gp41-Untereinheiten in der Virusmembran verankert sind. In der stark konservierten Ektodomäne von gp41 befinden sich vier für den Fusionsprozess erforderliche Regionen: ein hydrophobes, glycinreiches Fusionspeptid am N-terminalen Ende des Proteins, zwei Leucin-Zipper-ähnliche Wiederholungsdomänen, so genannte *heptad repeats* (HR1, N-terminal und HR2, C-terminal), die jeweils in Form von α -Helices vorliegen sowie eine zwischen den beiden *heptad repeats* befindliche Gelenkregion (*loop*) mit zwei Cysteinresten (Delwart, Mosialos & Gilmore, 1990; Gallaher et al., 1989) (siehe auch Abbildung 2.5). Die Bindung von gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche einer Zielzelle löst Konformationsänderungen in gp120 aus, die

Bindungsstellen für Chemokinrezeptoren, in der Regel CXCR4 oder CCR5, freilegen (Berger et al., 1999; Rizzuto & Sodroski, 2000). Die nachfolgende Wechselwirkung von gp120 mit einem solchen Corezeptor kann bei zellkulturadaptierten Viren zur Dissoziation der gp120-Untereinheit von gp41 führen. Gp41 wird nach der Corezeptorbindung durch gp120 in einen fusionsaktiven Zustand versetzt (Chan & Kim, 1998), woraufhin die Ausbildung einer transienten Prähaarnadel-Struktur induziert wird. Dabei inseriert das hydrophobe Fusionspeptid am N-Terminus des gp41 in die Plasmamembran der Zielzelle (Chan & Kim, 1998; Weissenhorn et al., 1997). Dies hat die Ausbildung eines Sechs-Helix-Bündels zur Folge, wobei die drei N-terminalen Helices (*heptad repeat 1*) im Innern der Struktur von den drei C-terminalen Helices (*heptad repeat 2*) in antiparalleler Weise umlagert werden (Chan et al., 1997; Lu, Blacklow & Kim, 1995). Die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels bringt virale und zelluläre Membran in räumliche Nähe, so dass die Energiebarriere für die Fusion beider Membranen überwunden werden kann (Lu et al., 2001; Melikyan et al., 2000). Die Ausbildung einer Fusionspore ermöglicht schließlich das Eindringen des Viruscapsids in die Zelle (Melikyan et al., 2000). Neuere Arbeiten legen nahe, dass dieser letzte Schritt des Eintrittsprozesses erst nach Endozytose des rezeptorgebundenen Virus in einem Dynamin-abhängigen Prozess in Endosomen erfolgt (Miyachi et al., 2009).

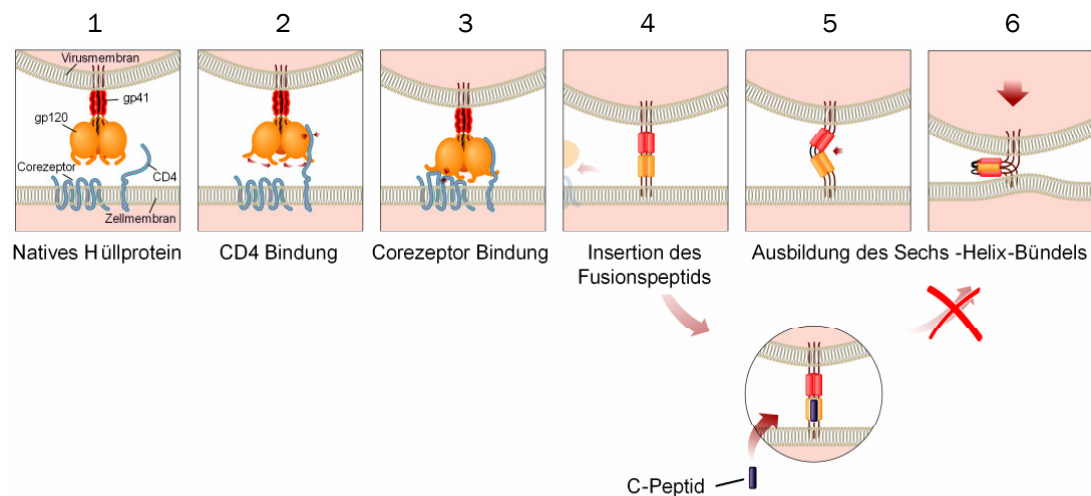


Abbildung 2.3 | Modell der HIV-1 Membranfusion und ihre Hemmung durch C-Peptide

Durch die Interaktion von gp120 mit CD4 (2) und einem Corezeptor (3) werden Konformationsänderungen in gp41 ausgelöst, wobei das Fusionspeptid exponiert wird und in die zelluläre Membran inseriert. Dieser Übergangszustand wird als Prähaarnadel-Struktur bezeichnet (4). Die Trimere der N- und C-Helices von gp41 (gelb bzw. rot) bilden nun das Sechs-Helix-Bündel (5, 6). Inhibitorische C-Peptide blockieren die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels durch Bindung an die N-Helices (Kreis).

2.2 Konventionelle Therapie der HIV-Infektion

2.2.1 Die „hoch aktive antiretrovirale Therapie“ – HAART

Seit 1995 wird die „hoch aktive antiretrovirale Therapie“ (HAART) zur Behandlung der HIV-Infektion eingesetzt. Es handelt sich hierbei um eine Kombinationstherapie, bei der mindestens drei antiretrovirale Substanzen gleichzeitig eingesetzt werden, so dass mehrere voneinander unabhängige Schritte im Replikationszyklus des Virus angegriffen werden. Für die HAART-Therapie stehen derzeit vor allem Inhibitoren der viralen Enzyme Reverse Transkriptase und Protease zur Verfügung (siehe auch Abbildung 2.2). Seit 2007 ist außerdem ein Integrase-Inhibitor zugelassen (Raltegravir, MK-0518, Isentress®, Merck Sharp & Dohme) (Hazuda et al., 2000). Eine weitere relativ neue Klasse von antiretroviralen Substanzen bilden die Eintrittsinhibitoren, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden.

Durch die HAART-Therapie kann bei den meisten Patienten die Viruslast im peripheren Blut unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden, was zu einer Erholung des Immunsystems sowie deutlich verringerter Mortalität führt (Ledergerber et al., 1999). Ein großes Problem ist jedoch die sehr schnelle Entstehung resistenter Virusvarianten durch die hohe Replikationsrate des Virus (ca. 10^9 Viren werden pro Tag gebildet) (Ho, 1997) in Verbindung mit einer großen Fehlerrate bei der Reversen Transkription (Roberts, Bebenek & Kunkel, 1988). Dabei wird häufig auch eine Kreuzresistenz zu anderen Wirkstoffen aus derselben Klasse beobachtet. Weiterhin ist die medikamentöse HAART-Therapie mit vielen Nebenwirkungen, z.B. Hepatotoxizität oder Lipodystrophie, verbunden, was die Lebensqualität der Patienten stark einschränkt (Lewis, Day & Copeland, 2003; Rajagopalan, Laitinen & Dietz, 2008).

2.2.2 Inhibitoren des Viruseintritts

Eintrittsinhibitoren stören den ersten Schritt des viralen Replikationszyklus, indem sie die Aufnahme von HI-Viruspartikeln in eine Zielzelle verhindern (Cammack, 2001). Sie bilden somit eine Substanzklasse, die sich aufgrund des anderen Wirkmechanismus stark von den herkömmlichen HIV-Therapeutika aus der Gruppe der Reverse Transkriptase- und Protease-Inhibitoren unterscheidet. Kreuzresistenzen zu den bestehenden Wirkstoffklassen sind nicht zu erwarten, so dass Inhibitoren des Viruseintritts insbesondere bei Patienten mit multiresistenten Virusvarianten eine attraktive alternative Behandlungsoption bieten.

Der Viruseintritt in die Zelle kann an drei Schlüsselstellen gehemmt werden, so dass sich die Eintrittsinhibitoren in Bindungsinhibitoren, Corezeptorantagonisten und Fusionsinhibitoren unterteilen lassen.

2.2.2.1 Bindungsinhibitoren und Corezeptorantagonisten

Bindungsinhibitoren verhindern die Wechselwirkung von gp120 und CD4-Rezeptor, indem sie die entsprechenden Bindungsstellen eines der beiden Proteine blockieren. Der Bindungsinhibitor PRO 542 (Progenics Pharmaceuticals) beispielsweise ist ein Fusionsprotein aus IgG2 und CD4 und verhindert durch Bindung an gp120 dessen Interaktion mit dem zellulären CD4-Rezeptor (Jacobson et al., 2004). In klinischen Studien der Phasen I und II wurde gezeigt, dass die Therapie mit PRO 542 sicher ist und antivirale Wirksamkeit zeigt (Fletcher et al., 2007; Shearer et al., 2000).

Corezeptorantagonisten inhibieren die Bindung des Virus an die Corezeptoren CXCR4 bzw. CCR5. Beispiele für CCR5-Rezeptor-Antagonisten sind Maraviroc (Celsentri®, Pfizer) (Dorr et al., 2005), das seit Herbst 2007 für die Behandlung von Patienten mit multiresistenten Virusvarianten zugelassen ist, und SCH-D (Vicriviroc, Schering-Plough) (Strizki et al., 2005), das sich derzeit in klinischen Phase III-Studien befindet. Der CXCR4-Rezeptor-Antagonist AMD 11070 (AnorMED) zeigte in zwei Pilotstudien Wirksamkeit bei HIV-infizierten Patienten mit dualtropen Viren (Moyle et al., 2007; Saag et al., 2007), wegen starker Hepatotoxizität wurde die Entwicklung aber vorerst gestoppt.

2.2.2.2 Fusionsinhibitoren

Fusionsinhibitoren hemmen die Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran und verhindern somit die Infektion der Zelle. Fast alle derzeit bekannten Fusionsinhibitoren hemmen dabei die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels aus den N- und C-terminalen Helices von gp41 durch Bindung an die Prähaarnadel-Zwischenstruktur (Abbildung 2.4). Diese so genannten N- und C-Peptide sind von den hochkonservierten N- bzw. C-terminalen *heptad repeats* (HR1 bzw. HR2) von gp41 abgeleitet.

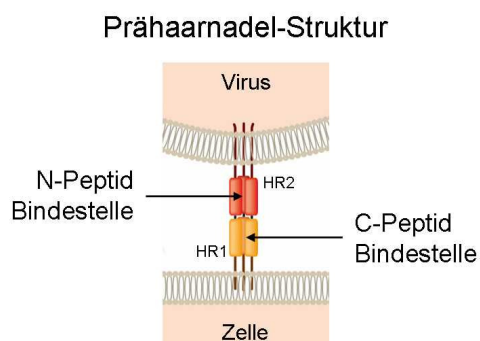


Abbildung 2.4 | Zielstrukturen für N- und C-Peptide in gp41

Antivirale N- und C-Peptide binden an die gp41-Prähaarnadel-Struktur und verhindern somit die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels. N-Peptide binden dabei an die HR2-Helices, C-Peptide interagieren mit den HR1-Helices.

Antivirale **C-Peptide** wurden erstmals 1992 von C. Wild und Kollegen beschrieben (Wild et al., 1992). Während des Fusionsprozesses interagieren sie mit der *coiled-coil*-Struktur aus den N-terminalen hydrophoben Helices (HR1) der Prähaarnadel-Struktur (Kliger & Shai, 2000). An die N-Helices gebundene C-Peptide blockieren dabei die Bindestellen für die viralen HR2-Helices. Die Ausbildung des zur Membranfusion erforderlichen Sechs-Helix-Bündels wird somit inhibiert (Lu et al., 1995) (siehe auch Abbildung 2.3, Kreis).

C-Peptide zeigen eine sehr starke und breite antivirale Aktivität. Verschiedene primäre und laboradaptierte HIV-Isolate werden mit einer IC_{50} (Wirkstoffkonzentration, bei der die Infektionsrate um 50% gesenkt wird) im nanomolaren Bereich gehemmt (Chinnadurai, Munch & Kirchhoff, 2005; Kilby et al., 1998; Wild et al., 1993) und auch C-Peptide mit Wirksamkeit gegen SIV wurden beschrieben (Gallo et al., 2004; Zahn et al., 2008). Besonders interessant sind dabei von HIV-2_{EH0} abgeleitete C-Peptide, die *in vitro* eine sehr gute antivirale Aktivität gegen HIV- und SIV-Isolate aufweisen (Gustchina et al., 2005).

Das bekannteste C-Peptid ist T-20 (auch C36, DP-178, Enfuvirtide oder Fuzeon®, Roche), das als erster Fusionsinhibitor im März 2003 für die HIV-Therapie zugelassen wurde (Cervia & Smith, 2003). T-20 ist ein 36 Aminosäuren langes, synthetisch hergestelltes, lösliches Peptid, das von der natürlichen gp41 HR2-Sequenz von HIV-1_{LAI} abgeleitet ist (entspricht den Aminosäuren 638-673 des HIV-1_{HXB2} Hüllproteins, Abbildung 2.5) (Wild et al., 1992). *In vitro* hemmt T-20 die Fusion von HIV-1 mit seinen Zielzellen sowohl bei primären als auch bei laboradaptierten Isolaten bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen (Wild et al., 1992; Wild et al., 1994). In klinischen Phase III-Studien wurde Patienten T-20 in verschiedenen Dosen verabreicht, wobei bei einer optimalen Dosis von 100 mg zweimal täglich eine deutliche Verringerung der Viruslast um zwei Größenordnungen (log-Stufen) sowie ein Anstieg der CD4-Zellzahl beobachtet werden konnten (Kilby et al., 1998; Lazzarin et al., 2003). Nachteile der Behandlung mit T-20 sind jedoch die fehlende orale Bioverfügbarkeit des Peptids, die subkutane Injektionen erforderlich macht sowie die sehr geringe Halbwertszeit von nur etwa zwei Stunden im Serum (Kilby et al., 1998). Dies macht die Verabreichung großer Mengen des Peptids erforderlich, wodurch sich hohe Therapiekosten von etwa 25.000 Euro pro Patient und Jahr ergeben (Hoffmann, Rockstroh & Kamps, 2008). Ein weiteres Hauptproblem der Behandlung ist die sehr schnelle Entstehung resistenter Virusvarianten (Rimsky, Shugars & Matthews, 1998).

Etlche neu entwickelte C-Peptide inhibieren auch Viren mit Resistenz gegen T-20. Diese Peptide sind aminoterminal verlängert und interagieren daher mit einer stark konservierten hydrophoben Tasche am C-Terminus der zentralen HR1 *coiled-coil*-Struktur. Die Wechselwirkung von gp41-HR1 und -HR2 an dieser Stelle ist für die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels von entscheidender Bedeutung, weshalb die verlängerten C-Peptide eine verbesserte inhibitorische Aktivität aufweisen (Chan, Chutkowski & Kim, 1998; Dwyer et al., 2003; Greenberg et al., 2002) und zudem die

Entstehung resistenter Virusvarianten stark erschwert ist (Lalezari et al., 2005; Lohrengel et al., 2005). Die hydrophoben Aminosäuren W628, W631 und I635 (Nummerierung entsprechend dem HIV-1_{HxB2} Hüllprotein) in den verlängerten C-Peptiden sind die Hauptdeterminanten für die Wechselwirkung mit der hochkonservierten Bindungstasche (Chan et al., 1997) und befinden sich beispielsweise in C34 (Liu et al., 2005), C46 oder dem C-Peptid der zweiten Generation T-1249, das von HIV-1, HIV-2 und SIV-Sequenzen abgeleitet ist (Schneider et al., 2005).

Weiterhin wurden mittels rationalen Designs C-Peptide entwickelt, die intramolekulare Salzbrücken zwischen positiv und negativ geladenen Aminosäuren enthalten, was zu einer Stabilisierung der Helixstruktur führt. Diese Peptide weisen eine sehr hohe Affinität zur HR1-Helix auf, was in deutlich verbesserter antiretroviraler Aktivität und Pharmakokinetik resultiert (Dwyer et al., 2007; Otaka et al., 2002).

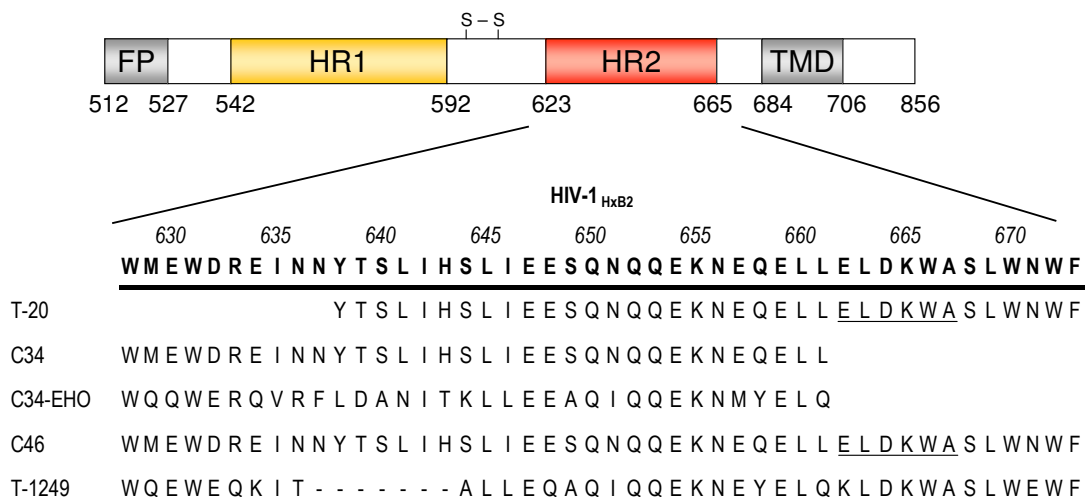


Abbildung 2.5 | Struktur von gp41 und der davon abgeleiteten C-Peptide

Die funktionellen Regionen des gp41 Moleküls sind ein N-terminales Fusionspeptid (FP), die beiden Leucin-Zipper-ähnlichen *heptad repeats* HR1 und HR2 und die Transmembrandomäne (TMD). Die Nummerierung der Aminosäurereste der einzelnen Regionen entspricht ihrer Position im HIV-1_{HxB2} Hüllprotein. Die inhibitorischen C-Peptide T-20, C34 und C46 sind vom C-terminalen *heptad repeat* (HR2) von HIV-1_{HxB2} abgeleitet. Bei T-1249 sind einige Aminosäuren gegenüber der HxB2-Sequenz verändert oder fehlen (-). C34-EHO ist von der HR2-Sequenz von HIV-2_{EHO} abgeleitet. T-20 und C46 enthalten das Epitop für den humanen monoklonalen Antikörper 2F5 (unterstrichen).

N-Peptide sind von der HR1-Sequenz von gp41 abgeleitet und sind im Gegensatz zu C-Peptiden nur schwache Inhibitoren des Viruseintritts mit IC_{50} -Werten im micromolaren Bereich (Wild et al., 1992), was möglicherweise mit ihrer starken Tendenz zur Aggregation zusammenhängt (Eckert & Kim, 2001a). N-Peptide verhindern die Membranfusion entweder durch Bindung an die HR2-Domänen der Prähaarnadel-Struktur analog zu C-Peptiden (Lu et al., 1995) oder sie intercalieren in das HR1 *coiled-coil* und zerstören somit diese Struktur (Bewley et al., 2002).

Ein weiterer potenter Fusionsinhibitor ist das **5-Helix-Protein** (Root, Kay & Kim, 2001), das einem Sechs-Helix-Bündel entspricht, dem eine der äußeren HR2-Helices fehlt. Durch die fehlende Helix entsteht eine Bindungstasche, mit der eine HR2-Domäne von gp41 gebunden werden kann, was die Ausbildung des Sechs-Helix-Bündels und die Membranfusion verhindert. Auf diese Weise hemmt das 5-Helix-Protein den Eintritt verschiedener HIV-1 Isolate im niedrigen nanomolaren Bereich (Root et al., 2001).

Der Fusionsinhibitor **VIRIP** (*virus-inhibitory peptide*) wurde 2007 aus humanem Hämofiltrat isoliert (Munch et al., 2007) und entspricht einer 20 Aminosäuren langen Sequenz des Serin-Protease-Inhibitors α 1-Antitrypsin. Synthetisches VIRIP-Peptid hemmt eine Reihe von HIV-1 Isolaten mit IC_{50} -Werten im micromolaren Bereich. Durch Optimierung der natürlichen Sequenz wurden Varianten mit bis zu 100-fach stärkerer inhibitorischer Aktivität entwickelt. VIRIP unterscheidet sich von den anderen bekannten Fusionsinhibitoren durch seinen Wirkmechanismus; es bindet das Fusionspeptid am N-Terminus von gp41 und verhindert dessen Integration in die Membran der Zielzelle.

2.3 Genterapie der HIV-Infektion

Der Zugang zu wirksamer antiretroviraler Therapie verringert die Morbidität und Mortalität durch HIV/AIDS zwar deutlich, Hoffnungen auf eine vollständige Heilung der Infektion haben sich jedoch nicht erfüllt. Auch bei effektiver Unterdrückung der Virusreplikation durch dauerhafte Behandlung persistiert das Virus in latent infizierten ruhenden CD4⁺ T-Zellen (Finzi et al., 1997). Um ein Fortschreiten der Krankheit zu verhindern ist daher eine lebenslange Therapie erforderlich. Toxizität und schnelle Resistenzbildung limitieren jedoch die langfristige Behandlung (Brinkman et al., 1999; Little et al., 2002; Vigouroux et al., 1999).

Alternative Wege zur Therapie der HIV-Infektion sind daher dringend erforderlich. Insbesondere genterapeutische Strategien haben dabei großes Potential langfristig die HAART-Therapie zu ergänzen oder zu ersetzen. Durch eine geeignete Genterapie kann im Gegensatz zu herkömmlichen HIV-Therapien theoretisch bereits nach einmaliger Anwendung ein lang anhaltender antiretroviraler Effekt hervorgerufen werden. Durch Auswahl geeigneter antiviraler Gene kann zudem die Toxizität reduziert und die Resistenzbildung stark erschwert werden.

2.3.1 Antivirale Gene

Bei der Gentherapie der HIV-Infektion werden vor allem zwei grundsätzliche Strategien verfolgt: Die erste Strategie stellt die spezifische Eliminierung HIV-infizierter Zellen dar. Die Abtötung der Zellen kann dabei beispielsweise durch HIV-Tat-abhängige Expression eines Suizidgens (z.B. Herpes Simplex Virus Thymidinkinase) (Caruso et al., 1995) oder durch eine HIV-Protease-abhängige Caspase ausgelöst werden, die spezifisch in infizierten Zellen Apoptose einleitet (Vocero-Akbani et al., 1999). Außerdem wurden Gene entwickelt, die die Immunantwort auf HIV-infizierte Zellen verstärken sollen. Ein Beispiel für diesen Ansatz ist die Expression des universalen T-Zell-Rezeptors CD4zeta auf autologen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. CD4zeta ist ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des CD4-Rezeptors und der zeta-Kette des T-Zell-Rezeptors. Es erkennt das HIV-Hüllglykoprotein auf infizierten Zellen und vermittelt deren spezifische Eliminierung durch cytotoxische T-Lymphozyten (Mitsuyasu et al., 2000).

Die zweite Strategie in der HIV-Gentherapie wird als „intrazelluläre Immunisierung“ bezeichnet (Baltimore, 1988). Hierbei werden in den Zielzellen von HIV und deren Vorläuferzellen therapeutische Genprodukte zur Expression gebracht, die in den viralen Replikationszyklus eingreifen, ohne dabei die Zelle zu schädigen. Gene, die zur intrazellulären Immunisierung verwendet werden, codieren entweder antivirale RNAs oder Proteine und lassen sich in drei Klassen unterteilen (von Laer, Hasselmann & Hasselmann, 2006a):

Gene der Klasse I hemmen die ersten Schritte im HIV-Replikationszyklus, vor der Integration der proviralen cDNA in das Genom der Wirtszelle und verhindern somit deren Infektion. Zur Klasse I gehören zum Beispiel die Gene für den HIV-neutralisierenden Antikörper 2F5 (Purtscher et al., 1994), für Fusionsinhibitoren wie T-20 (Kilby et al., 1998) oder für Hemmer der Reversen Transkriptase (Shaheen et al., 1996) oder Integrase (Levy-Mintz et al., 1996). Gene der Klasse II inhibieren dagegen die Produktion viraler RNA oder Proteine, während Klasse III-Gene die Zahl der freigesetzten infektiösen Partikel senken, indem der Zusammenbau der Viren gehemmt wird. Diese Gene verhindern demzufolge zwar die Produktion von Nachkommenviren und den cytopathischen Effekt des Virus, nicht aber die Integration des viralen Erbguts in das zelluläre Genom. Solche Zellen sind daher vergleichbar mit latent infizierten Zellen. Sie reichern sich an und können eine sehr lange Lebensdauer aufweisen, wobei sie toxische HIV-Genprodukte produzieren können (Kolson et al., 1994). Auch wird der Vorgang der Reversen Transkription, bei dem zahlreiche Resistenzmutationen im HIV-Genom entstehen können, durch Gene der Klassen II und III nicht unterbunden.

Das Hauptproblem bei intrazellulären Immunisierungsstrategien ist die große Anzahl von über 10^{11} potentiellen HIV-Zielzellen im menschlichen Körper. Eine derart große Zahl von Zellen kann mit den heutigen Technologien nicht genetisch modifiziert werden, so dass ein therapeutischer Effekt nur dann erzielt werden kann, wenn die modifizierten Zellen gegenüber nicht behandelten Zellen einen Selektionsvorteil haben und sich daher

im Körper anreichern (Lund et al., 1997; von Laer et al., 2006b). Mathematische Modelle und Computersimulationen sagen vorher, dass dies am ehesten durch Klasse I-Gene, die frühe Schritte im HIV-Replikationszyklus inhibieren, erreicht werden kann (von Laer, 2001; von Laer et al., 2006b), weshalb diese für gentherapeutische Anwendungen besonders interessant sind.

2.3.2 Vektoren in der Gentherapie

Bei der Gentherapie erfolgt das Einbringen therapeutischer Gene in die Zielzellen mit Hilfe von Gentransfer-Vehikeln, die als Vektoren bezeichnet werden. Für den Einsatz in der Gentherapie müssen solche Vektoren einen effizienten Gentransfer ermöglichen, und zwar idealerweise mit hoher Selektivität ausschließlich in die gewünschten Zielzellen. Für viele Anwendungen muss das Transgen dann dauerhaft exprimiert werden, ohne Nebenwirkungen in den Zellen zu verursachen. Viren haben im Verlauf der Evolution Mechanismen entwickelt, die einen effektiven Transfer ihres Erbguts in Zellen ermöglichen, und sind daher als Vektoren in der Gentherapie besonders geeignet. Virale Vektoren werden dabei insbesondere von Retroviren und Lentiviren abgeleitet.

Seit Ende der 1980er Jahre finden in gentherapeutischen Studien vor allem gammaretrovirale Vektoren Anwendung, die von murinen Leukämieviren (MLV) abgeleitet sind. In den Vektoren werden die codierenden Bereiche des viralen Genoms durch das therapeutische Transgen ersetzt. Lediglich das Verpackungssignal Psi (Ψ) und die *long terminal repeats* bleiben erhalten und ermöglichen die Verpackung des Vektorgenoms in Viruspartikel sowie seine Reverse Transkription, Insertion und Expression in den Zielzellen. Bei klassischen retroviralen Vektoren wird der Promotor in der LTR verwendet, um die Transkription des Transgens zu steuern. Bei Vektoren neuerer Generation ist der Promotor in der LTR deletiert und durch einen internen Promotor, der sich am 3'-Ende des Verpackungssignals befindet, ersetzt. Durch diese Veränderung können solche Vektoren nach Reverser Transkription und Insertion nur noch das Transkript des Transgens produzieren, jedoch keine vollständige genomische RNA, die auch das Verpackungssignal umfasst. Durch diese Veränderung wird eine Mobilisierung des Vektors verhindert. Solche Vektoren werden als *self-inactivating* (SIN) Vektoren bezeichnet (Kraunus et al., 2004).

Die Produktion retroviraler Vektoren erfolgt mittels eines „Drei-Plasmid-Systems“ in Verpackungszellen (Schweizer et al., 2001) (Abbildung 2.6). Diese werden mit dem retroviralen Vektorplasmid (Transgen) und zwei Helferplasmiden transient oder stabil transfiziert. Die Helferplasmide codieren dabei jeweils ein gag/pol- bzw. ein env-Gen und bringen diese in den Verpackungszellen zur Expression. Mit Hilfe der dabei erzeugten viralen Strukturproteine und Enzyme werden retrovirale Partikel produziert, die als Genom das von den LTRs flankierte Transgen tragen.

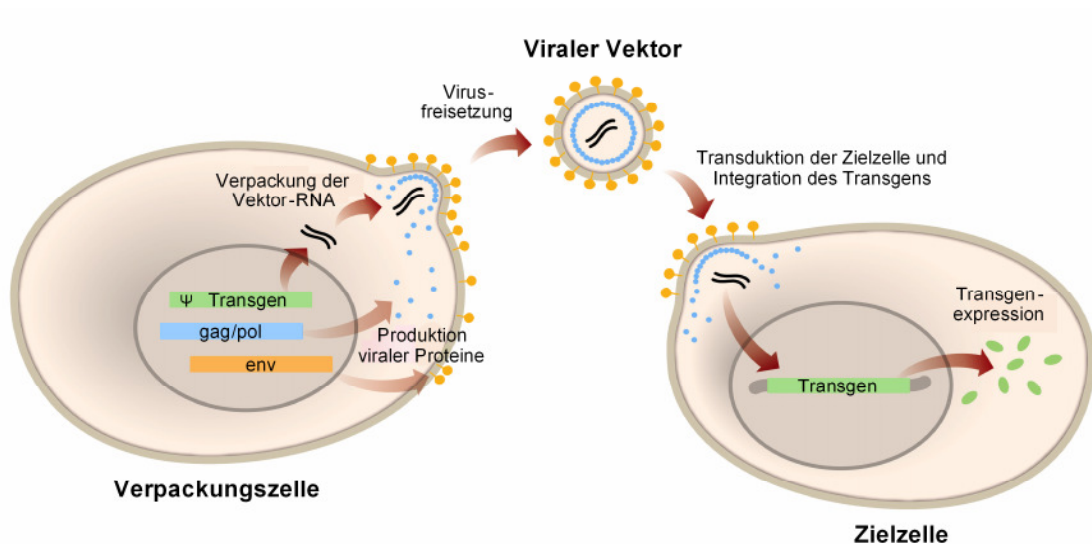


Abbildung 2.6 | Herstellung von retroviralen Vektoren mit dem Drei-Plasmid-System

Die Gene für die viralen Strukturproteine und Enzyme (*gag/pol*) und Hüllproteine (*env*) sowie für das Vektorgenom mit dem therapeutischen Transgen werden mit getrennten Plasmiden in die Verpackungszelle eingebracht, wobei nur das Transgen mit dem Verpackungssignal Ψ ausgestattet ist. Replikationsinkompetente retrovirale Partikel mit dem Vektorgenom (Transgen) schnüren sich von der Plasmamembran ab und können Zielzellen transduzieren. Daraufhin integriert das Transgen in die DNA der Zielzelle und wird exprimiert.

Die auf diese Weise hergestellten Viruspartikel besitzen keinerlei Erbinformation für Viruskomponenten, da den Helferplasmiden das für die Verpackung erforderliche Ψ -Element fehlt. Die entstehenden Viren sind folglich replikationsinkompetent, d.h., Zielzellen können nur einmalig „infiziert“ werden, was als Transduktion bezeichnet wird.

Durch Verwendung von Helferplasmiden mit Hüllproteingenen fremder Viren können retrovirale Partikel hergestellt werden, die mit heterologen Hüllproteinen ausgestattet sind, was als Pseudotypisierung bezeichnet wird. Die Spezifität der Viren für Zielzellen (Tropismus) kann dementsprechend verändert werden.

Der große Nachteil der gammaretroviralen Vektoren besteht darin, dass sie nur sich teilende Zellen transduzieren, da für die Integration des Transgens in das Zielzellgenom die Auflösung der Kernmembran erforderlich ist (Lewis & Emerman, 1994). Für das Einbringen therapeutischer Gene in ruhende Zellen oder solche mit geringer Teilungsaktivität sind daher lentivirale Vektoren erforderlich, die von HIV abgeleitet sind und nicht auf den Zerfall der Kernmembran während der Mitose angewiesen sind (Naldini et al., 1996). Problematisch bei lentiviralen Vektoren sind jedoch das Fehlen stabiler Verpackungszelllinien sowie die Gefahr der Entstehung potentiell hochpathogener replikationskompetenter Viren bei der Vektorproduktion.

2.3.3 HIV-Gentherapie mit membranständigen Fusionsinhibitoren

In der Arbeitsgruppe von Laer am Georg-Speyer-Haus werden innovative Strategien zur Gentherapie der HIV-Infektion entwickelt. Mittels retroviralen Gentransfers sollen dabei antivirale Klasse I-Gene in T-Lymphozyten von HIV-Patienten eingebracht und die Zellen somit vor HIV-Infektion geschützt werden. Als anti-HIV Transgene werden dabei C-Peptide verwendet, die mit Hilfe von Gerüstelementen membranständig auf HIV-Zielzellen exprimiert werden. Während des HIV-Eintrittsprozesses binden die C-Peptide an fusionsaktives gp41 und verhindern die Ausbildung des zur Verschmelzung von viraler und zellulärer Membran erforderlichen Sechs-Helix-Bündels.

Die hohe und stabile Expression solcher membranverankerter Fusionsinhibitoren unmittelbar auf der Oberfläche der Zielzellen des Virus hat gegenüber der Applikation von synthetisch hergestellten C-Peptiden wie T-20 etliche Vorteile. Probleme wie z.B. geringe Halbwertszeit und mangelnde orale Bioverfügbarkeit können hier durch fortwährende Produktion der Peptide an ihrem tatsächlichen Wirkort umgangen werden.

Der für die HIV-Gentherapie entwickelte gammaretrovirale Vektor M87o (Abbildung 2.7) codiert eine membranverankerte Variante des C-Peptids C46 (*membrane-anchored C46*, maC46). Dieses antivirale Peptid ist eine um zehn stark konservierte Aminosäuren N-terminal verlängerte Variante von T-20 (Abschnitt 2.2.2.2 und Abbildung 2.5), die auch gegen T-20-resistente Virusvarianten wirksam ist. Aufgrund einer vergrößerten Interaktionsfläche des membranverankerten Peptids mit dem viralen Hüllprotein ist auch die Resistenzbildung im Vergleich zu T-20 stark erschwert (Hermann et al., 2009a).

Für den Transport des C46 an die Zelloberfläche sorgt das Signalpeptid von dLNGFR. Die Verankerung in der Membran wird durch die Transmembrandomäne des humanen tCD34-Rezeptors bewerkstelligt, die sich über einen flexiblen Linker (abgeleitet vom humanen IgG2) an den C-Terminus des C46 anschließt. Zusätzlich enthält M87o alle für die Integration in das Genom der Zielzellen notwendigen Sequenzen der LTR-Regionen und das für die Verpackung in retrovirale Partikel verantwortliche Ψ -Element. Das cis-aktive RNA-Element wPRE (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*) in der 3'-untranslatierten Region erhöht Virustiter und Transgenexpression.

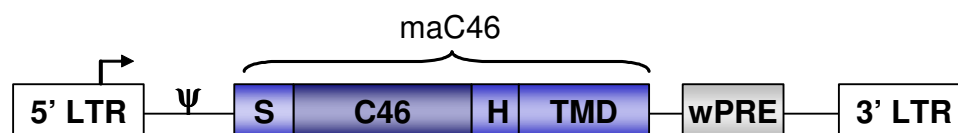


Abbildung 2.7 | Aufbau des gammaretroviralen Vektors M87o

Der gammaretrovirale Vektor M87o codiert als therapeutisches Transgen das membranverankerte C46-Peptid (maC46). Dieses besteht aus einem Signalpeptid (S), dem Fusionsinhibitor C46, einem flexiblen Linker (H) und einer Transmembrandomäne (TMD). Die Integration des Transgens wird über die flankierenden LTR-Regionen, die Verpackung in Viruspartikel über das Ψ -Element vermittelt. In der 3'-untranslatierten Region befindet sich ein *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element* (wPRE).

Die Transduktion von T-Lymphozyten mit dem Vektor M87o führt zur Expression von maC46 auf der Oberfläche der Zellen und schützt sie sehr effektiv vor dem Eintritt sowohl von laboradaptierten als auch von primären HIV-1-Stämmen (Egelhofer et al., 2004; Hildinger et al., 2001). Die antiretrovirale Wirksamkeit von maC46 ist dabei so hoch, dass M87o-transduzierte Zellen *in vitro* einen deutlichen Selektionsvorteil gegenüber nicht-transduzierten Zellen haben. Während maC46-exprimierende Zellen vor der HIV-Infektion geschützt sind, sterben nicht-transduzierte Zellen als Folge der Infektion ab. In infizierten Mischkulturen mit anfangs nur sehr geringen Anteilen M87o-transduzierter Zellen reichern sich diese innerhalb kurzer Zeit bis zu 100% an, was eine Eliminierung des Virus aus der Kultur zur Folge hat (Egelhofer et al., 2004).

Im Jahr 2004 wurde der retrovirale Vektor M87o daher in einer klinischen Phase I-Studie zur Gentherapie der HIV-Infektion eingesetzt. Bei zehn AIDS-Patienten wurden T-Lymphozyten aus dem Blut isoliert, *ex vivo* stimuliert und mit dem M87o-Vektor transduziert. Anschließend wurden die Zellen expandiert und den Patienten infundiert. Es wurde in der Folge untersucht, ob die behandelten Zellen (ca. 0,1-1% der CD4⁺ T-Zellen) sich auch in den Patienten aufgrund eines Selektionsvorteils anreichern können und ob ein Einfluss auf die Viruslast und CD4-Zellzahl festgestellt werden kann.

Im Verlauf der Studie wurde bei den Patienten zwar ein transients Anstieg der CD4-Zellzahlen beobachtet, eine Akkumulierung der genetisch modifizierten Zellen und eine Reduzierung der Viruslast waren jedoch nicht zu verzeichnen, so dass auch ein dauerhafter therapeutischer Erfolg nicht eingetreten ist (van Lunzen et al., 2007).

Für das Ausbleiben der Repopulierung des Immunsystems durch die genetisch modifizierten T-Zellen sind mehrere Gründe denkbar: Die *ex vivo*-Stimulation und Expansion kann generell einen negativen Einfluss auf das regenerative Potential und die Proliferation der genmodifizierten Zellen haben (Ferrand et al., 2000; Sauce et al., 2002). Zudem sind bei AIDS-Patienten die Lymphknoten stark geschädigt, so dass wichtige Überlebenssignale, die die T-Lymphozyten hier erhalten müssen, nicht mehr in ausreichendem Maße gegeben werden können (Dai & Lakkis, 2001; Racz et al., 1986; Racz et al., 1991). Weiterhin korreliert die antivirale Aktivität von maC46 stark mit der Menge des auf der Zelloberfläche exprimierten Proteins (Hermann et al., 2009b). Die Transgenexpression könnte jedoch *in vivo* herunterreguliert worden sein, was einen Verlust des antiviralen Effekts zur Folge hätte.

Entscheidend für die Anreicherung genmodifizierter Zellen im Patienten ist aber vor allem ein Selektionsvorteil der genetisch veränderten gegenüber unbehandelten Zellen. Da maC46-Expression die genmodifizierten Zellen vor HIV-Infektion schützt, besteht ein Selektionsvorteil nur dann, wenn der T-Zell-Verlust in HIV-Infizierten durch direkte Einflüsse des Virus verursacht ist, das heißt, wenn der Großteil der Zellen unmittelbar durch die Infektion (viraler cytopathischer Effekt) oder als Folge einer Infektion (Erkennung und Vernichtung infizierter Zellen durch das Immunsystem) zerstört wird (von Laer et al., 2006a). Die vor HIV-Infektion geschützten Zellen hätten in diesem Fall eine verlängerte Lebensdauer und somit einen Selektionsvorteil gegenüber unbehandelten Zellen.

Falls allerdings die überwiegende Zahl der T-Zellen nicht durch die HIV-Infektion selbst, sondern als nicht-infizierte Zellen in Folge indirekter Prozesse zerstört wird (z.B. durch Apoptose nach Bindung von freiem HIV-gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor), besteht für die genmodifizierten Zellen kein Selektionsvorteil. Gentherapeutische Strategien, die auf eine *in vivo*-Selektion der genmodifizierten Zellen angewiesen sind, sind in diesem Fall wirkungslos, da die antiviralen Gene auf solche indirekten Prozesse keinen Einfluss haben (von Laer et al., 2006a).

Um auch bei geringen Anteilen genmarkierter Zellen einen therapeutischen Effekt zu erzielen, könnte die Einführung eines sezernierbaren Prinzips von entscheidender Bedeutung sein. Sezernierte antivirale Genprodukte könnten einen Bystander-Effekt auf nicht-modifizierte Nachbarzellen haben und somit trotz geringer Genmarkierung den T-Zell-Pool schützen und einen therapeutischen Effekt bewirken. Bisher wurden jedoch nur wenige sezernierbare Genprodukte beschrieben, darunter trunkiertes lösliches CD4 (sCD4) (Morgan et al., 1994; Morgan et al., 1990), neutralisierende Antikörper (Sanhadji et al., 2000) und Cytokine (Gay et al., 2004).

Die Modifizierung von T-Lymphozyten mit sezernierbaren Genprodukten hat großes therapeutisches Potential, da ein *homing* der Zellen in den Lymphgeweben zu erwarten ist, wo der Großteil der HIV-Replikation stattfindet (Hufert et al., 1997). Die Erzeugung hoher lokaler Konzentrationen des sezernierten Genprodukts könnte daher einen deutlichen antiretroviralen Effekt hervorrufen.

2.4 Sekretion von Proteinen und Peptiden

Proteine und Peptide werden über zwei Hauptwege sezerniert: Die regulierte Sekretion von z.B. als Neurotransmittern aktiven Peptiden erfolgt als Antwort der Zelle auf extrazelluläre Stimuli, die beispielsweise mit der Ausschüttung von Calcium und der Depolarisation der Zellmembran einhergehen. Bei der konstitutiven Sekretion dagegen sind keine spezifischen Signale notwendig. Dieser Weg wird von der Zelle angewandt, um Membrankomponenten, Enzyme, Wachstumsfaktoren oder Moleküle der Extrazellulären Matrix zu sezernieren. Hierbei erfolgt eine von äußeren Signalen unabhängige, kontinuierliche Fusion von Golgi-abgeleiteten Transportvesikeln mit der Plasmamembran, wodurch die im Vesikel enthaltenen Komponenten in den extrazellulären Raum freigesetzt werden.

2.4.1 Translokation von Proteinen ins Endoplasmatische Retikulum

Proteine, die in den Sekretionsweg eingeschleust werden sollen, werden in der Regel als Vorläuferproteine mit einem abspaltbaren N-terminalen Signalpeptid synthetisiert (Blobel & Dobberstein, 1975). Dieses sorgt für den Eintritt des Proteins in das

Endoplasmatisches Retikulum (ER) und leitet somit den sekretorischen Weg ein. In der Regel erfolgt die Translokation in das ER cotranslational, in Ausnahmefällen kann der Transport kleiner Proteine aber auch posttranslational nach vollständiger Proteinsynthese im Cytosol erfolgen.

Bei der cotranslationalen Translokation wird das Signalpeptid, sobald es bei der Proteinsynthese am Ribosom erscheint, von einem Signalerkennungspartikel (SRP, *signal recognition particle*) erkannt und gebunden (Abbildung 2.8). Dies hat einen sofortigen Translationsarrest zur Folge und verhindert die Freisetzung des Proteins in das Cytosol (Walter & Blobel, 1981a; Walter & Blobel, 1981b; Walter, Ibrahimi & Blobel, 1981). Die Affinität von SRP zum SRP-Rezeptor auf der ER-Membran dirigiert den SRP-Ribosom-Komplex nun zur Oberfläche des rauen ER (Gilmore, Walter & Blobel, 1982). Hier bildet der SRP-Rezeptor zusammen mit dem zentralen Sec61-Komplex die Translokationsmaschinerie für den cotranslationalen Transport ins ER (Gorlich & Rapoport, 1993). Sec61-Translokon und Ribosom werden durch die Bindung von SRP an den SRP-Rezeptor in räumliche Nähe gebracht und bilden ihrerseits einen Komplex aus. Die folgende Freisetzung von SRP führt zur Wiederaufnahme der Elongation (Gilmore & Blobel, 1983; Walter & Blobel, 1981a; Walter & Lingappa, 1986), wobei die wachsende Polypeptidkette durch eine vom Sec61-Komplex gebildete Pore direkt ins ER-Lumen translatiert wird (Mothes, Prehn & Rapoport, 1994; Walter & Blobel, 1981a).

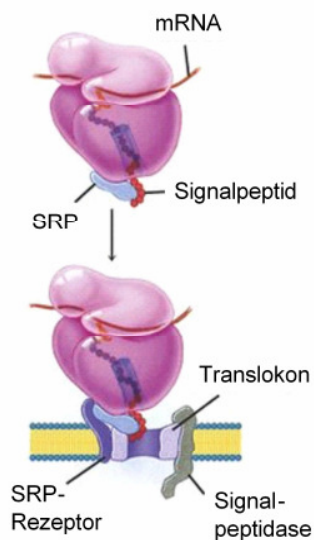


Abbildung 2.8 | Translokation in das Endoplasmatische Retikulum

Sobald bei der Proteinsynthese am Ribosom ein Signalpeptid für die Translokation ins ER erscheint, wird es vom Signalerkennungspartikel (SRP) gebunden und die Translation unterbrochen. Durch die Bindung von SRP an den SRP-Rezeptor auf der ER-Membran werden Ribosom und Translokon in räumliche Nähe gebracht, so dass die weitere Translation direkt ins ER-Lumen erfolgen kann. Verändert nach R. Horton et al., 2005 (Horton et al., 2005).

2.4.1.1 Größenbeschränkung für die Translokation

Der beschriebene Eintritt von Proteinen in den Sekretionsweg der Zelle durch Translokation ins ER ist einer Größenbeschränkung unterworfen. Damit eine am Ribosom synthetisierte Polypeptidkette mit einem N-terminalen Signalpeptid einen Translationsarrest durch das SRP und den folgenden Transport zum ER erfährt, muss sie eine bestimmte Mindestgröße aufweisen: Die wachsende Polypeptidkette muss so lang

sein, dass sie die große ribosomale Untereinheit komplett durchspannt (~40 Aminosäuren) (Blobel & Sabatini, 1970; Malkin & Rich, 1967) und zusätzlich ein genügend langer Abschnitt des etwa 20-30 Aminosäuren langen Signalpeptids aus dem Ribosom herausragt, so dass das SRP daran binden kann (Walter & Blobel, 1981a).

Demzufolge können keine beliebig kleinen Peptide in den sekretorischen Weg eingeschleust werden, die Mindestgröße beträgt etwa ~50-80 Aminosäuren (Eskridge & Shields, 1983; Lipp, Dobberstein & Haeuptle, 1987; Okun, Eskridge & Shields, 1990). Kürzere sekretorische Peptide sind zwar weit verbreitet, müssen aber immer von größeren Vorläuferproteinen abgeschnitten werden, um die Größenbeschränkung für die Translokation ins ER zu umgehen. Beispiele hierfür sind Peptidhormone, wie z.B. Insulin oder Glucagon, die in Form größerer Prohormone synthetisiert und ins ER transportiert werden und erst später durch die Wirkung spezifischer Proteasen prozessiert werden (Zhou et al., 1999).

2.4.2 Modifikation und Faltung von Proteinen im ER

Unmittelbar nach der Translokation ins ER wird das Signalpeptid durch eine membranverankerte Signalpeptidase von der wachsenden Polypeptidkette abgeschnitten (Blobel & Dobberstein, 1975; Jackson & Blobel, 1977). Die Polypeptidkette faltet sich nun mit Hilfe von Chaperonen in ihre native Konformation und wird posttranslational modifiziert, z.B. durch das Anhängen von Kohlenhydraten.

2.4.2.1 Glykosylierung und Glykan-Prozessierung im ER

N- und O-Glykosylierungen von Polypeptiden im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums sind die häufigsten und komplexesten posttranslationalen Modifikationen in eukaryotischen Zellen. Insbesondere N-Glykosylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und dem weiteren intrazellulären Transport sezernierbarer Proteine.

N-Glykosylierungen werden cotranslational über N-glykosidische Bindungen an die Asparaginreste (Asn) im Konsensusmotiv Asn-X-Ser/Thr (X = beliebige Aminosäure außer Prolin) angehängt. Dabei wird mit Hilfe des Enzyms Oligosaccharyltransferase das Kern-Oligosaccharid N-Acetylglukosamin₂-Mannose₉-Glukose₃ (Glc₃Man₉GlcNAc₂) von einem Lipidcarrier auf die Asparaginseitenkette übertragen. Anschließend werden die drei endständigen Glukosereste durch die Glukosidase I (äußerer Glukoserest) und Glukosidase II (beide inneren Glukosereste) abgeschnitten, was als Glukose-Trimming bezeichnet wird (Abbildung 2.9) (Hubbard & Ivatt, 1981; Kornfeld & Kornfeld, 1985). Weiterhin können im ER mehrere Mannosereste durch Mannosidasen von dem Zuckerbaum entfernt werden (Atkinson & Lee, 1984; Hebert, Foellmer & Helenius, 1995). Diese Reifung N-gebundener Oligosaccharide spielt für die Qualitätskontrolle im ER eine wichtige Rolle.

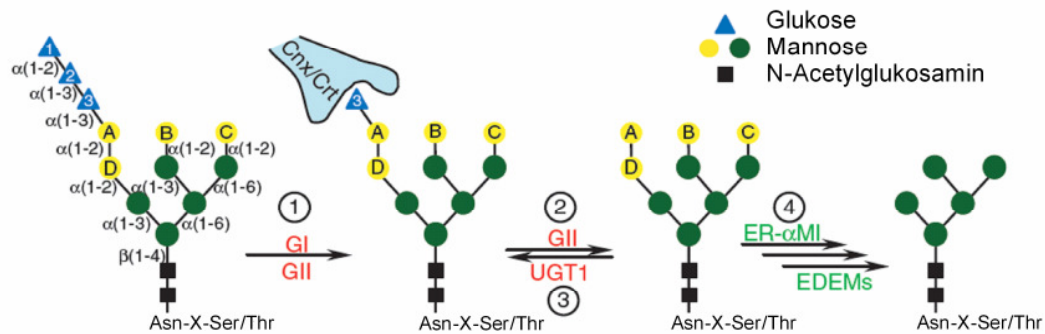


Abbildung 2.9 | N-Glykan Prozessierung

Ein Oligosaccharid ist kovalent an die Asparaginseitenkette (Asn) im Konsensusmotiv (Asn-X-Ser/Thr) einer Polypeptikette gebunden. Die Glukosidase I (GI) und Glukosidase II (GII) entfernen die Glukosereste 1 bzw. 2 (Schritt 1). Das monoglykosylierte Intermediat bindet an Calnexin (Cnx) oder Calreticulin (Crt). GII entfernt den Glukoserest 3, was die Interaktion mit den Chaperonen beendet (Schritt 2). UGT1 reglykosyliert den Mannoserest A (Schritt 3). Die α 1,2-gebundenen Mannosereste werden nach und nach durch Mannosidasen abgebaut (ER- α MI, EDEMs, Schritt 4). Verdändert nach M. Molinari, 2007 (Molinari, 2007).

2.4.2.2 Qualitätskontrolle im ER

Die ER-Qualitätskontrolle stellt sicher, dass nur korrekt gefaltete Proteine mit nativer Konformation das ER in Richtung ihres Bestimmungsorts innerhalb oder außerhalb der Zelle verlassen können. Chaperone und Faltungshelfer wie Calnexin, Calreticulin oder BiP unterstützen dabei einerseits die Faltung der Proteine im ER, sind aber andererseits auch dafür zuständig, dauerhaft fehlgefaltete Proteine für den Abbau im Cytosol zu kennzeichnen. Bei dieser primären Qualitätskontrolle werden die nicht-nativen Konformationen unter anderem anhand von exponierten hydrophoben Bereichen und ungepaarten Cysteinresten erkannt. Solche Merkmale ungefalteter Proteine führen dazu, dass diese zunächst für weitere Faltungsversuche im ER zurückgehalten oder letztlich für den proteasomalen Abbau zurück ins Cytosol transportiert werden (Ellgaard & Helenius, 2003).

2.4.3 Reifung im Golgi-Apparat und Transport zur Plasmamembran

Mit Hilfe von Transportvesikeln gelangen die korrekt gefalteten Proteine aus dem Lumen des ER zum Golgi-Apparat, den sie ebenfalls in Vesikeln durchwandern. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) werden die Proteine schließlich in sekretorische Vesikel verpackt, die den Transport an die Zelloberfläche vermitteln. Durch die Fusion der Transportvesikel mit der Plasmamembran werden die Proteine daraufhin in den extrazellulären Raum sezerniert.

2.4.3.1 Modifikation von Glykoproteinen im Golgi-Apparat

Im Golgi-Apparat werden Glykoproteine auf vielfältige Art modifiziert und vollendet. Erstens werden hier O-gebundene Zuckereinheiten an Serin- oder Threoninseitenketten angeknüpft (Roth et al., 1994; Schweizer et al., 1994). Ferner erfolgt die weitere Prozessierung der N-gebundenen Kohlenhydrateinheiten. Die Modifikation der N-Glykane findet in allen Kompartimenten des Golgi-Apparats statt. Die entstehenden N-verknüpften Zuckerbäume lassen sich in drei Klassen einteilen: komplexe, mannosereiche und hybride Oligosaccharide, die alle einen identischen Pentasaccharid-Kern aufweisen (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Die komplexen Oligosaccharide entstehen, wenn die ursprünglich im ER angehefteten Kern-Oligosaccharide weiter zurechtgeschnitten und andererseits um zusätzliche Zuckerreste ergänzt werden. Bei mannosereichen Oligosacchariden werden weitere Mannoseeinheiten an das Kern-Oligosaccharid angehängt. Hybride Oligosaccharide enthalten Komponenten sowohl von komplexen als auch von mannosereichen Zuckereinheiten (Kornfeld & Kornfeld, 1985). Das Molekulargewicht eines N-Glykans nach terminaler Glykosylierung kann bis zu mehreren kDa betragen (Sanders et al., 2002), so dass sich die Größe eines Proteins durch Glykosylierungen erheblich verändern kann.

2.4.3.2 Prozessierung von Proproteinen

Viele sezernierte Proteine werden von der Zelle als inaktive Vorläuferproteine (Proproteine) gebildet, aus denen die bioaktiven Produkte durch Proteolyse freigesetzt werden müssen. So wird beispielsweise durch spaltbare Prodomänen die Proteinfaltung kontrolliert oder die Aktivität von Proteinen reguliert (Shinde & Inouye, 2000).

Die Prozessierung von Vorläuferproteinen durch Endoproteasen beginnt im TGN und wird in den sekretorischen Vesikeln und zum Teil auch im extrazellulären Raum fortgesetzt. Die meisten Endoproteasen gehören dabei zu den Proprotein-Convertasen (PCs) (Nakayama, 1997) einer Familie von Calcium-abhängigen Serinendoproteasen, die Vorläuferproteine an einem Motiv aus mehreren basischen Aminosäuren erkennen und schneiden. Das bekannteste Mitglied der PC-Familie ist Furin (Fuller, Brake & Thorner, 1989), ein Membranprotein vom Typ I, das sich hauptsächlich im TGN, aber auch an der Zelloberfläche befindet (Bresnahan et al., 1990; Klimpel et al., 1992; Mayer, Boileau & Bendayan, 2003; Mayer, Boileau & Bendayan, 2004; Molloy et al., 1994). Furin ist an der Prozessierung von Proteinen im konstitutiven Sekretionsweg beteiligt und wird ubiquitär in nahezu allen Zelltypen exprimiert (Bergeron, Leduc & Day, 2000; Nakayama, 1997). Die Endoproteolyse von Proproteinen erfolgt dabei C-terminal der Konsensussequenz R-X-K/R-R (X = beliebige Aminosäure) (Hosaka et al., 1991; Watanabe et al., 1992). Substrate von Furin sind Wachstumsfaktoren, Serumproteine, wie z.B. Proteasen der Blutgerinnungskaskade und des Komplementsystems, Matrix-Metalloproteasen, Rezeptoren sowie virale Hüllglykoproteine und bakterielle Exotoxine (Nakayama, 1997).

2.5 Fragestellung und Zielsetzung

In der in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen klinischen Studie zur Gentherapie der HIV-1-Infektion mit dem gammaretroviralen Vektor M87o wurde erwartet, dass sich die genetisch modifizierten T-Lymphozyten aufgrund eines Selektionsvorteils im Körper der behandelten Patienten anreichern und zu einer Verzögerung des Krankheitsverlaufs beitragen würden.

Trotz vielversprechender Ergebnisse aus Zellkultur-Experimenten (Egelhofer et al., 2004), konnte die angestrebte Akkumulation der genetisch modifizierten T-Lymphozyten jedoch *in vivo* nicht nachgewiesen werden. Im Verlauf der Studie wurde bei den Patienten zwar ein transienter Anstieg der CD4-Zellzahlen beobachtet, aufgrund des niedrigen Anteils genmarkierter Zellen war eine Reduzierung der Viruslast allerdings nicht zu verzeichnen, so dass auch ein dauerhafter therapeutischer Erfolg nicht eingetreten ist (van Lunzen et al., 2007).

Es müssen daher neue Strategien getestet werden, durch die auch bei der beobachteten niedrigen Genmarkierung antivirale Wirksamkeit hervorgerufen werden kann. Dies könnte durch die Entwicklung einer M87o-Variante, die ein sezerniertes antivirales C-Peptid codiert, erreicht werden. Die Sekretion therapeutischer Peptidkonzentrationen durch genmodifizierte T-Zellen könnte nicht nur die behandelten Zellen, sondern auch deren Nachbarzellen, vor einer HIV-Infektion schützen (Bystander-Effekt). Somit könnte auch bei geringem Anteil genmodifizierter Zellen ein deutlicher antiretroviraler Effekt erzielt werden.

Durch einen solchen Gentransferansatz, der die *in vivo*-Sekretion therapeutischer Peptide an ihrem eigentlichen Wirkort im Patienten ermöglicht, können darüber hinaus auch viele Nachteile, die die klinische Anwendung synthetischer C-Peptide wie T-20 limitieren, umgangen werden, z.B. mangelnde orale Bioverfügbarkeit oder kurze Halbwertszeit.

Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Entwicklung und *in vitro* Charakterisierung *in vivo* sezernierter antiviraler Eintrittsinhibitoren (iSAVE) für die HIV-Gentherapie. Dies umfasste die Klonierung und Optimierung sezernierter antiretroviraler C-Peptide sowie die Analyse der Sekretionseffizienz, der antiretroviralen Aktivität und des Bystander-Effekts gegen verschiedene HIV-1 Stämme.

3 MATERIAL

3.1 Laborchemikalien

Tabelle 3.1 | Laborchemikalien

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Aceton	Merck (Darmstadt)	1.00013
30% Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (37,5 : 1)	Bio-Rad (München)	161-0158
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)	1201
Ampicillin Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)	K029
Aprotinin	Sigma (Deisenhofen)	A6279
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)	A9647
Bromphenolblau Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)	A512
Calciumchlorid	Sigma (Deisenhofen)	C-7902
Chloroquin Diphosphatsalz	Sigma (Deisenhofen)	C-6628
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)	20385
di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Roth (Karlsruhe)	P030
Essigsäure	Merck (Darmstadt)	1.00056
Ethanol	Roth (Karlsruhe)	9065
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Bio-Rad (München)	161-0433
Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)	E-6758
Ficoll Typ 400	Sigma (Deisenhofen)	F4375
Formaldehyd (37%)	MP Biomedicals (Heidelberg)	194947
Glycerin	Merck (Darmstadt)	1.04092
Glycin	Roth (Karlsruhe)	3908
Hepes (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure)	Sigma (Deisenhofen)	H4034
Kalium-Ferricyanat ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Sigma (Deisenhofen)	P-8131
Kalium-Ferrocyanat ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)	Sigma (Deisenhofen)	P-9387
Kanamycinsulfat	Roth (Karlsruhe)	T832
LB Agar (Lennox L Agar)	Invitrogen (Karlsruhe)	22700-041
LB Broth Base (Lennox L Broth Base)	Invitrogen (Karlsruhe)	12780-029
LE Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)	840004
Magermilchpulver	Reformhaus	-

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt)	8.14733
2-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)	4227
Methanol	Roth (Karlsruhe)	4627
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)	3957
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)	4360
Natriumfluorid	Roth (Karlsruhe)	S7929
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)	6771
Natriumpyrophosphat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$)	Merck (Darmstadt)	6591
Natriumvanadat (Na_3VO_4)	Sigma (Deisenhofen)	S-6508
Natriumazid (NaN_3)	Roth (Karlsruhe)	K305
NP40 (Igepal® CA-630)	MP Biomedicals (Heidelberg)	198596
PageBlue™ Protein Staining Solution	Fermentas (St. Leon-Rot)	R0579
Pefabloc® SC	Biomol (Hamburg)	50985
Phenylmethansulphonylfluorid (PMSF)	Sigma (Deisenhofen)	P7626
Ponceau S Lösung	Sigma (Deisenhofen)	P-7170
2-Propanol (Isopropanol)	Roth (Karlsruhe)	6752
Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete	Roche Diagnostics (Mannheim)	11 873 580 001
D(+)-Saccharose	Roth (Karlsruhe)	4621
Salzsäure (HCl, ≥ 32%)	Roth (Karlsruhe)	P074
TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethyldiamin)	Merck (Darmstadt)	1.10732
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (Karlsruhe)	5429
Triton X-100	Roth (Karlsruhe)	3051
Tween®-20	Merck (Darmstadt)	8.22184
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Roth (Karlsruhe)	2315
Xylencyanol	Roth (Karlsruhe)	A513

3.2 Antikörper

Tabelle 3.2 | Primäre Antikörper

Name	Spezies	Spezifität	Hersteller / Referenz	Applikation / Verdünnung
2F5	human IgG1 (κ) monoklonal	HIV-1 gp41 (lineares Epitop „ELDKWA“ im HR2)	Polymun (Wien), # ABO01	Western Blot, 1:10.000 FACS, 0,1 µg / 1x10 ⁵ Zellen
2F5-PE	human IgG1 (κ) monoklonal	HIV-1 gp41 (lineares Epitop „ELDKWA“ im HR2)	Auftragsarbeit: PE-Konjugation durch Beckman Coulter (Fullerton, CA, USA)	FACS, 0,2 µl / 1x10 ⁵ Zellen intra- zellulär
anti-Actin (I-19)	Kaninchen IgG polyklonal	Actin (u.a. human, murin)	Santa Cruz Bio- technology (Heidelberg), # SC-1616-R	Western Blot, 1:1.000
TriTEST	-	hum. CD4 (FITC) hum. CD8 (PE) hum. CD3 (PerCP)	Becton Dickinson (Heidelberg) # 342414	FACS, 5 µl / 5x10 ⁵ Zellen

Tabelle 3.3 | Sekundäre Antikörper

Name	Spezifität	Konjugation	Hersteller / Referenz	Applikation / Verdünnung
Ziege-anti-human (polyklonal)	humanes IgG (H+L)	Meerrettich- peroxidase (HRPO)	Jackson Immuno Res. / Dianova (Hamburg), # 109-035-088	Western Blot, 1:10.000
Ziege-anti-human (polyklonal)	humanes IgG (H+L)	Phycoerythrin (PE)	Jackson Immuno Res. / Dianova (Hamburg), # 109-116-088	FACS, 1:50
Ziege-anti- Kaninchen (polyklonal)	Kaninchen IgG (H+L)	Meerrettich- peroxidase (HRPO)	Jackson Immuno Res. / Dianova (Hamburg), # 111-035-045	Western Blot, 1:40.000

3.3 Plasmide

Tabelle 3.4 | Klonierungsplasmide (Plasmidkarten im Anhang)

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz / Hersteller
M23	pBluescript	Klonierungsplasmid mit <i>multiple cloning site</i> (MCS). Für Umklonierungen.	Stratagene (Heidelberg)
-	pCR®-Blunt II-TOPO®	Klonierungsplasmid mit <i>multiple cloning site</i> (MCS). Für Umklonierungen von PCR-Produkten.	Invitrogen (Karlsruhe)

Tabelle 3.5 | Expressionsplasmide (Plasmidkarten im Anhang)

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz / Hersteller
M421	HIV HxB2 Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein von HIV-1 _{HxB2} unter Kontrolle einer HIV-1 LTR.	G. Melikyan (Chicago, IL, USA)
M191	HIV HxB2-SIM Env	Expressionsplasmid für ein T-20-resistentes Hüllprotein von HIV-1 _{HxB2} unter Kontrolle einer HIV-1 LTR. Mutation von GIV zu SIM an Position 37-39 von gp41. (Publizierte Bezeichnung: HxB2resl-Env)	(Egelhofer et al., 2004)
M118	HIV JRFL Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein von HIV-1 _{JRFL} unter Kontrolle einer HIV-1 LTR.	M. Dittmar (Heidelberg)
M749	HIV BaL Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein von HIV-1 _{BaL} mit humanem CMV Promotor und β -Globulintron.	(Hermann et al., 2009a)
M640	SIV Env	Expressionsplasmid für das Hüllprotein von SIV _{MM251} mit humanem CMV Promotor und β -Globulintron.	(Zahn et al., 2008)
M5	VSV-G	Expressionsplasmid für VSV-G mit humanem CMV Promotor und β -Globulintron. (Publizierte Bezeichnung: pHCMV G)	(Yee et al., 1994)
M620	GaLV Env	Expressionsplasmid für das GaLV CM Hüllprotein mit humanem CMV Promotor und β -Globulintron. (GaLV CM = Oberflächenhüllprotein von GaLV mit chimärem Transmembranprotein von GaLV und MLV; aus pALF-GaLV CM (Stitz et al., 2000)).	Roland Zahn, AG von Laer
M334	Lenti gag/pol	Expressionsplasmid für HIV-1 gag-pro-pol-tat-rev-RRE mit humanem CMV Promotor und Leader. (Publizierte Bezeichnung: pCMV-dR8.91)	(Zufferey et al., 1997)
M579	Retro gag/pol	Expressionsplasmid für das gag/pol Polyprotein von MLV mit SV40 Promotor. (Publizierte Bezeichnung: M57-DAW)	(Schambach et al., 2006)
M858	pTN7_Delta Env	HIV-1 _{NL4-3} -Genom mit deletiertem Env. Enthält Renilla Luziferase anstelle von Nef. Als Positivkontrolle für RCL-Test.	M. Dittmar (Heidelberg)

Tabelle 3.6 | Virale Vektoren (Plasmidkarten im Anhang)

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz / Hersteller
M420	pHR'SIN cPPT SEW	Lentiviraler SIN-Transfervektor mit internem Friend Spleen Focus Forming Virus (SFFV) Promotor und dem Markergen GFP. (publizierte Bezeichnung: pHR'SIN cPPT SEW)	(Demaison et al., 2002)
M377	leerer Vektor	Gammaretroviraler Vektor mit optimiertem MP91-Leader (MPSV-LTRs und MESV-Leader) (Schambach et al., 2000) mit zusätzlicher <i>multiple cloning site</i> (MCS) und wPRE.	Dorothee von Laer
M851	C46	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen C46.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M788	C46-H-GAR	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen C46-H-GAR.	Lisa Egerer / diese Arbeit

Laufende Nummer	Name	Beschreibung	Referenz / Hersteller
M699	L-C46-H-GAr	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L-C46-H-GAr.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M771	L1mut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L1mut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M768	L2mut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L2mut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M746	L3mut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L3mut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M747	C46mut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen C46mut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M748	Hmut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Hmut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M734	L1-2mut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L1-2mut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M766	5xmut	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen 5xmut.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M683	L-C46-H-ohne Linker	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L-C46-H-ohne Linker.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M769	L-C46-H-IgC	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L-C46-H-IgC.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M784	L-C46-H-IgS	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen L-C46-H-IgS.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M818	Fur	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M869	Fur _o	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _o .	Lisa Egerer / diese Arbeit
M902	Fur _o GA	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _o GA.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M903	GAFur _o	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen GAFur _o .	Lisa Egerer / diese Arbeit
M918	GAFur _o GA	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen GAFur _o GA.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M845	Fur _m	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _m .	Lisa Egerer / diese Arbeit
M863	GS	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen GS.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M974	N33Q	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _o GA-N33Q.	Jörg Kahle, AG von Laer
M967	N95Q	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _o GA-N95Q.	Jörg Kahle, AG von Laer
M968	N33Q/N95Q	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Fur _o GA-N33Q/N95Q.	Jörg Kahle, AG von Laer
M951	EHO-GAFur _o GA	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen EHO-GAFur _o GA.	Lisa Egerer / diese Arbeit
M901	Furin	Auf M377 basierender gammaretroviraler Vektor mit dem Transgen Furin-HA sowie Puromycinresistenzgen.	Lisa Egerer / diese Arbeit

3.4 Material für molekularbiologische Arbeiten

3.4.1 Lösungen, Puffer und Nährmedien

Lösungen, Puffer und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Filtration durch eine Millipore-Anlage von Millipore Water Systems, Schwalbach). Lagerung bei Raumtemperatur, soweit nicht anders angegeben.

Tabelle 3.7 | Lösungen, Puffer und Nährmedien in der Molekularbiologie

Name	Zusammensetzung
Ampicillin-Stocklösung (1000x)	100 mg/ml Ampicillin Natriumsalz in Wasser (Lagerung bei -20 °C)
dATP, 2 mM	20 µl dATP (100 mM) ad 1 ml Wasser (Lagerung bei -20 °C)
dATP, 10 mM	100 µl dATP (100 mM) ad 1 ml Wasser (Lagerung bei -20 °C)
DMSO, 7%	7% (v/v) DMSO in Wasser
DNA-Ladepuffer, 6x	0.05% (w/v) Bromphenolblau Natriumsalz 0.05% (w/v) Xylencyanol 15% (w/v) Ficoll Typ 400 in Wasser
DNA-Marker-Lösung (100 bp oder 1 kb)	100 µl DNA Ladder (100 bp oder 1 kb) 500 µl 6x DNA-Ladepuffer ad 1,5 ml Wasser (Lagerung bei -20 °C)
EDTA, 10 mM, pH 8,0	0,372 g EDTA, pH 8,0 mit 5 M NaOH einstellen, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4 °C)
Ethidiumbromid-Stocklösung (0,25 mg/ml)	125 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) ad 5 ml Wasser
Kanamycin-Stocklösung (1000x)	60 mg/ml Kanamycinsulfat in Wasser (Lagerung bei -20 °C)
LB-Agar mit Ampicillin für Platten	32 g LB-Agar (Lennox L Agar) ad 1 l Wasser und autoklavieren; Hinzufügen von 50 µg/ml Ampicillin kurz vor Gießen der Platten (Lagerung der Platten bei 4 °C)
LB-Agar mit Kanamycin für Platten	32 g LB-Agar (Lennox L Agar) ad 1 l Wasser und autoklavieren; Hinzufügen von 50 µg/ml Kanamycin kurz vor Gießen der Platten (Lagerung der Platten bei 4 °C)
LB-Medium	20 g LB Broth Base (Lennox L Broth Base) ad 1 l Wasser und autoklavieren
LB-Medium mit Ampicillin, 100 µg/ml	1 ml Ampicillin-Stocklösung ad 1 l LB-Medium (Lagerung bei 4 °C)

Name	Zusammensetzung
LB-Medium mit Kanamycin, 60 µg/ml	1 ml Kanamycin-Stocklösung ad 1 l LB-Medium (Lagerung bei 4 °C)
TAE, 1x	40 mM TRIS 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0, in Wasser

3.4.2 Bakterien

Als Wirtstamm für molekularbiologische Arbeiten wurde der *Escherichia coli*-Stamm TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) verwendet (Genotyp F-*mcrA* Δ (*mmr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*).*

3.4.3 Oligonukleotide

Tabelle 3.8 | PCR-Oligonukleotide

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
818-FurinMutF	GGT TCC GCG CCA AGG TGG ATT GGA TGG AGT GG
818-FurinMutR	CCA CTC CAT CCA ATC CAC CTT GGC GCG GAA CC
818-RAKRSV-F	CTG GTT CCG CGC CAA GAG GAG CGT GTG GAT GGA GTG GGA CCG CG
818-RAKRSV-R	CGC GGT CCC ACT CCA TCC ACA CGC TCC TCT TGG CGC GGA ACC AG
818-RSRAKR-F	CCA GCC TGT GGA ACT GGT TCA GGA GCC GCG CCA AGA GGA GCG TGT G
818-RSRAKR-R	CAC ACG CTC CTC TTG GCG CGG CTC CTG AAC CAG TTC CAC AGG CTG G
Actin_F	GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC
Actin_R	CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C
C46-BspEI-C46-F	CCA GCC TGT GGA ACT GGT TCT CCG GAT GGA TGG AGT GGG ACC GCG
C46-BspEI-C46-R	CGC GGT CCC ACT CCA TCC ATC CGG AGA ACC AGT TCC ACA GGC TGG
C46for	TGG ATG GAG TGG GAC CGC G
C46ForL	GCA GAT CTG GAA CCA CAC CAC CTG GAT GGA GTG GGA CCG CGA GAT C
C46-Furin-for	CCT GTG GAA CTG GTT CCG CGC CAA GAG GGA TTG GAT GGA GTG G
C46-Furin-rev	CCA CTC CAT CCA ATC CCT CTT GGC GCG GAA CCA GTT CCA CAG G
C46-GA8_R	TCC AGC GCC GGC ACC TGC ACC TCC GAA CCA GTT CCA CAG GCT GG
C46mutFor	AGA TCA ACA ACT ACG CCA GCC TGA TCC ACA GCC TG
C46mutRev	CAG GCT GTG GAT CAG GCT GGC GTA GTT GTT GAT CT
C46-RRL-rev	CTA CTA GAT ATC CAG CAG GCG GCG GAA CCA GTT CCA CAG GCT GG

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
C46-StopSalR	TCA TCA GTC GAC TCA TCA GAA CCA GTT CCA CAG GCT GG
FurHA_AgeI_R	ACC GGT TCA TCA AGC GTA ATC TGG AAC ATC GTA TGG GTA GAG GGC GCT CTG GTC TTT GA
Furopt-GA8_R	TCC AGC GCC GGC ACC TGC ACC TCC CAC GCT CCT CTT GGC GCG GC
G4S2-BspEI-F	CCG GTG GAG GTG GAT CTG GAG GTG GAG GAT
G4S2-BspEI-R	CCG GAT CCT CCA CCT CCA GAT CCA CCT CCA
GA8-C46_F	GGA GGT GCA GGT GCC GGC GCT GGA TGG ATG GAG TGG GAC CGC G
GA8-Furopt_F	GGA GGT GCA GGT GCC GGC GCT GGA AGG AGC CGC GCC AAG AGG AGC
GAfor	AAT TAG GAG CCG GGG GTG CGG GTG GCG CGG GTG CGG GGG GTG CTG GGG CTG GGG CCG GAG
Gag Palu F	CTT CCT AGA GAG ACT TAA GG
Gag Palu R	GTT GGG ACC TCC TTC GTT CTC
GaLV 5' II	ACC ACA GGC GAC AGA CTT TTT
GaLV 3' II	TGA GAC AGC CTC TCT TTT AGT CCT
GArev	AAT TCT CCG GCC CCA GCC CCA GCA CCC CCC GCA CCC GCG CCA CCC GCA CCC CCG GCT CCT
GrecF1	CAG GAC TCG GCT TGC TGA A
GrecR1	GGT GAT ATG GCC TGA TGT ACC A
HingemutFor	GGT TCA GAT CTA ACA TCG CCA ATT GGC TGT GGT AC
HingemutRev	GTA CCA CAG CCA ATT GGC GAT GTT AGA TCT GAA CC
HIVlinkRev	CTA TTA CTG CAG GAA TTC GAA CAG CTT GAT GTA CCA CAG C
IgG2-Linker-for	AAT TAG AGC GCA AGT GCT GCG TGG AGT GCC CTC CCT GCC CCG CCC CTC CCG TGG CCG GCC CCG
IgG2-Linkermut-for	AAT TAG AGC GCA AGA GCA GCG TGG AGA GCC CTC CCA GCC CCG CCC CTC CCG TGG CCG GCC CCG
IgG2-Linker-rev	AAT TCG GGG CCG GCC ACG GGA GGG GCG GGG CAG GGA GGG CAC TCC ACG CAG CAC TTG CGC TCT
IgG2-Linkermut-rev	AAT TCG GGG CCG GCC ACG GGA GGG GCG GGG CTG GGA GGG CTC TCC ACG CTG CTC TTG CGC TCT
LoopFor	TAG GGA TCC GCG ATC GCA CCA CTG CCG TGC CCT GGA ACG CCA GCT GGA GCA ACA AGA
LoopRev	GGT GGT GTG GTT CCA GAT CTG CTC CAG GCT CTT GTT GCT CCA GCT GGC G
M699-out-for	GCC CCC GTC TGA ATT TTT GC
M699-out-rev	CGA ATT CGA TCG ATG ACC GG
MycFor	AGA ACA GAA ATT AAT TTC AGA AGA GGA CTT GCT GCA
MycFor2	AAT TAG AAC AGA AAT TAA TTT CAG AAG AGG ACT TAG
MycRev	GCA AGT CCT CTT CTG AAA TTA ATT TCT GTT CTT GCA
MycRev2	AAT TCT AAG TCC TCT TCT GAA ATT AAT TTC TGT TCT
NotI_Fur_F	GCG GCC GCA TGG AGC TGA GGC CCT GGT TGC
OGSH7	ACC GCG AGA TTA ACC AGT ACA CCA GCC TGA T

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
OGSH8	ATC AGG CTG GTG TAC TGG TTA ATC TCG CGG T
OGSH11	ACC GCG AGA TCA ACC AGT ACA CCA GCC TGA T
OGSH12	ATC AGG CTG GTG TAC TGG TTG ATC TCG CGG T
QCGlycoFor	CGT GCC CTG GAA CGC CGC TTG GAG CAA CAA GGC TCT GGA GCA GAT CTG GAA CC
QCGlycoForI-neu	GCC CTG GAA CGC CGC CTG GAG CAA CAA GAG C
QCGlycoForII	CAG CTG GAG CAA CAA GGC TCT GGA GCA GAT CTG GAA CC
QCGlycoForIII	GCA GAT CTG GAA CCA CGC CAC CTG GAT GGA GT
QCGlycoRev	GGT TCC AGA TCT GCT CCA GAG CCT TGT TGC TCC AAG CGG CGT TCC AGG GCA CG
QCGlycoRevI-neu	GCT CTT GTT GCT CCA GGC GGC GTT CCA GGG C
QCGlycoRevII	GGT TCC AGA TCT GCT CCA GAG CCT TGT TGC TCC AGC TG
QCGlycoRevIII	ACT CCA TCC AGG TGG CGT GGT TCC AGA TCT GC
SPtPA-C46-rev	CGC GGT CCC ACT CCA TCC AGC TGG GCG AAA CGA AGA CTG C
SPtPAFor	TAG GGA TCC ATG GAT GCA ATG AAG AGA GGG CTC TGC TGT GTG CTG CTG CTG TGT GG
SPtPARev	GTC TGC GCG ATC GCG GCT GGG CGA AAC GAA GAC TGC TCC ACA CAG CAG CAG CAC AC

Tabelle 3.9 | Sequenzierprimer

Name	Sequenz in 5' → 3'-Richtung
M377-1705-R	AAA TGT AAA TGA TTG CCC CAC C
M377-1627-Rev	AAT TGA CGA ATT CGA TCG
M699-out-for	GCC CCC GTC TGA ATT TTT GC
M699-out-rev	CGA ATT CGA TCG ATG ACC GG
M894_645_F	GCA GGG CTA CAC AGG G
M894_1156_F	AAC AGT ATC TAC ACG C
M894_1663_F	AAC CAC ATC ACT CGG C
M894_2166_F	CTC ATG TGC CAC ATG C
M894_855_R	ACC GTT GTT GGC CAC C
M894_1369_R	TGA GAG CAA TGA TGC C
M894_1884_R	TTC AAT CTC TAG GAC C
M894_2400_R	GAA GGC GCA GCT GAG G

3.4.4 Enzyme und Größenstandards

Tabelle 3.10 | Enzyme und Zusätze

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs (Schwalbach)	M0290 S
DNA Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Schwalbach)	-
Klenow-Fragment von <i>E.coli</i> DNA-Polymerase I	New England Biolabs (Schwalbach)	M0210 S
Quick-Ligase	New England Biolabs (Schwalbach)	M2200 S
N-Glykosidase F (PNGase F)	New England Biolabs (Schwalbach)	P0704 S
Platinum Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)	11708-013
T4 DNA-Polymerase	New England Biolabs (Schwalbach)	M0203 S
T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK)	New England Biolabs (Schwalbach)	M0236 S
Taq DNA-Polymerase	NatuTec (Frankfurt)	TP-0200-G1
dNTPs (je 10 mM)	Fermentas (St. Leon-Rot)	R0192
dATP (100 mM)	New England Biolabs (Schwalbach)	N0440 S

Tabelle 3.11 | Marker für DNA-Gele

Substanz	Hersteller	Katalognummer
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)	N3231S
1 kb DNA Ladder	New England Biolabs (Schwalbach)	N3232S

3.4.5 Kits in der Molekularbiologie

Tabelle 3.12 | Kits in der Molekularbiologie

Substanz	Hersteller	Katalognummer
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)	69504
peqGOLD Cycle-Pure Kit	peQLab (Erlangen)	12-6493-02
JETquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed (Löhne)	420250
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit	peQLab (Erlangen)	12-6942-02
Nucleobond PC500 Maxiprep Kit	Machery&Nagel (Düren)	740 574.25
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)	K2800-20
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)	200516
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (Heidelberg)	200514

3.5 Material für Zellkultur- und virologische Arbeiten

3.5.1 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Tabelle 3.13 | Medien und Zusätze in der Zellkultur

Name	Hersteller	Katalognummer
L-Cystein	Sigma (Deisenhofen)	C7352
DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium)	Lonza (Verviers, Belgien)	BE12-614F
DMEM, Methionin- und Cystein-frei	Invitrogen (Karlsruhe)	21013
FCS (Fötales Kälberserum)	PAN Biotech (Aidenbach, Österreich)	3302-P250302
Flebogamma (5% Infusionslösung)	Grifols (Langen) über Apotheke	PZN: 866030
HBSS (1x)	Invitrogen (Karlsruhe)	14025
HEPES, 1 M	Invitrogen (Karlsruhe)	15630-056
Humanes Interleukin-2, (Proleukin® S, Aldesleukin)	Novartis (Nürnberg) über Apotheke	PZN: 2238131
Humanes AB-Serum	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)	C15-021
L-Glutamin-Lösung (100x), 200 mM	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)	M11-004
³⁵ S L-Methionin (5 mCi; 10 mCi/ml)	PerkinElmer (Waltham, MA, USA)	NEG009A005MC
Mycoplasma Removal Agent (10 µl/ml zum Medium zugeben)	MP Biomedicals (Heidelberg)	30-500-44
Natriumpyruvat (100x), MEM 100mM	Invitrogen (Karlsruhe)	11360-039
Pancoll, human	PAN Biotech (Aidenbach, Österreich)	P04-60500
PBS, 1x (Dulbecco's Phosphate buffered saline)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)	H15-002
Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x), 10000 U / 10 mg/ml	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)	P11-010
RetroNectin	TaKaRa (über MoBiTec, Göttingen)	T100B
RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640)	Lonza (Verviers, Belgien)	BE12-167F
Trypanblau Färbelösung, 0,004% (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)	15250-061
Trypsin, 0,25% / EDTA 1 mM	Invitrogen (Karlsruhe)	25300
X-Vivo 15 (w/o Gentamycin, w/o Phenolrot)	Lonza (Verviers, Belgien)	BE04-744Q

Lösungen, Puffer und Kulturmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Filtration durch eine Millipore-Anlage von Millipore Water Systems, Schwalbach). Zur Sterilisation wurden sie für 20 Minuten bei 121 °C und 2 bar autoklaviert, bei Hitzeinstabilität steril filtriert oder bereits steril bezogen. Lagerung bei Raumtemperatur, soweit nicht anders angegeben.

Tabelle 3.14 | Lösungen, Puffer und Kulturmedien in der Zellkultur

Name	Zusammensetzung
AB Serum, 2%	2% (v/v) AB Serum in PBS (Lagerung bei 4 °C)
CaCl ₂ , 2,5 M Transfektionsreagenz	36,8 g CaCl ₂ ·2H ₂ O ad 100 ml Wasser, sterilfiltriert mit 0,22 µm-Filter (Lagerung bei 4 °C)
Chloroquin, 25 mM	1,29 g Chloroquin Diphosphatsalz ad 100 ml Wasser, sterilfiltriert mit 0,22 µm-Filter (Lagerung bei 4 °C)
DMEM-standard	10% (v/v) FCS 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (100x) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x) in DMEM (Lagerung bei 4 °C)
EDTA, 200 mM, pH 7,5	7,44 g EDTA, pH 7,5 mit 5 M NaOH einstellen, ad 100 ml PBS (Lagerung bei 4 °C)
FACS-Fixierungslösung	2% (v/v) Formaldehyd 0,05% (w/v) Natriumazid in PBS (Lagerung bei 4 °C)
FACS-Puffer	2% (v/v) FCS 0,05% (w/v) Natriumazid in PBS (Lagerung bei 4 °C)
HBS-Puffer (2x) Transfektionsreagenz	100 mM HEPES 281 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,1 mit NaOH einstellen, in Wasser, sterilfiltriert mit 0,22 µm-Filter (Lagerung bei 4 °C)
Humanes Interleukin-2 (IL-2) Stammlösung und Arbeitslösung	<i>Stammlösung</i> : (1.000.000 U/ml): 18.000.000 Units Proleukin®S in 18 ml eiskaltem 1% BSA/PBS (steril) rekonstituieren. (Lagerung in Aliquots à 1 ml bei -20 °C) <i>Arbeitslösung</i> (10.000 U/ml): 1 ml Stammlösung ad 100 ml eiskaltes 1% BSA/PBS (steril) (Lagerung in Aliquots bei -20 °C, einige Tage bei 4 °C)
Kryo-Konservierungsmedium	10% (v/v) DMSO in FCS (Lagerung bei 4 °C)

Name	Zusammensetzung
MACS-Puffer	2 mM EDTA, pH 7,5 1% BSA in PBS (Lagerung bei 4 °C)
NP40-Lösung	5% (w/v) NP40 in Wasser
<i>pulse</i> -Medium	200 µCi ³⁵ S L-Methionin in 6 ml <i>starvation</i> -Medium (Vor Verwendung immer frisch ansetzen)
RetroNectin, 50 µg/ml	2,5 mg RetroNectin 2,5 ml Wasser ad 50 ml PBS (steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C, einige Wochen bei 4 °C)
RPMI-standard	5% (v/v) FCS 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (100x) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x) in RPMI 1640 (Lagerung bei 4 °C)
Saccharoselösung, 20%	20% (w/v) D(+)-Saccharose in PBS sterilfiltriert mit 0,22 µm-Filter (Lagerung bei 4 °C)
<i>starvation</i> -Medium	5% (v/v) dialysiertes FCS 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (100x) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x) 1 mM Natriumpyruvat 0,4 mM L-Cystein 25 mM HEPES-NaOH, pH 7.4 in Methionin- und Cystein-freiem DMEM (Lagerung bei 4 °C)
X-Gal-Färbereagenz	3 mM Kalium-Ferrocyanat 3 mM Kalium-Ferricyanat 0,5 mM X-Gal 1 mM MgCl ₂ in Wasser
X-Vivo 15-standard	5% (v/v) humanes AB-Serum 2% (v/v) L-Glutamin-Lösung (100x) 1% (v/v) Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x) 20 mM Hepes in X-Vivo 15 (Lagerung bei 4 °C) Vor Verwendung frisch zugeben: 100 U/ml IL-2

3.5.2 Zelllinien

Tabelle 3.15 | Zelllinien

Name	Beschreibung	Referenz	Kulturmedium
293T	Humane embryonale Nierenepithelzelle. Abgeleitet von der Zelllinie HEK293, enthält das large T-Antigen von SV40	ATCC: # CRL-11268, (Pear et al., 1993)	DMEM-standard
Jurkat Klon E6-1	Humane T-Zelle (akute T-Zell-Leukämie; Klon der Zelllinie Jurkat FHCRC).	ATCC: # TIB-152, (Weiss, Wiskocil & Stobo, 1984)	RPMI-standard
PM-1	Humane T-Zelle (T-Zell-Lymphom; Klon der Zelllinie HUT 78), die CXCR4 und CCR5 exprimiert.	NIH AIDS Research & Reference Reagent Programm, Division of AIDS, NIAID, NIH: # 3038 (Lusso et al., 1995)	RPMI-standard
PM-1-M218	PM-1 Zellen, die stabil maC46 auf der Oberfläche exprimieren (ca. 1×10^5 Moleküle pro Zelle)	AG von Laer	RPMI-standard
Raji	Humane B-Zelle (Burkitt's Lymphom)	ATCC: # CCL-86	RPMI-standard
Te671	Humane Fibroblastenzelle (Medullablastom)	ATCC: # CRL-8805, (McAllister et al., 1977)	DMEM-standard
TZM-bl	Humane Fibroblastenzelle (abgeleitet von der Zelllinie HeLa), die CD4, CXCR4 und CCR5 exprimiert. Luziferase- und β -Galaktosidasegen unter Kontrolle einer HIV-1 LTR.	NIH AIDS Research & Reference Reagent Programm, Division of AIDS, NIAID, NIH: 8129 (Derdeyn et al., 2000; Platt et al., 1998; Wei et al., 2002)	DMEM-standard

3.5.3 HIV-Stämme

Tabelle 3.16 | HIV-1 Stämme

Name	Beschreibung	Tropismus	Referenz
BaL	Gruppe M, Subtyp B Propagation auf normalen peripheren Monozyten/Makrophagen und CD4 ⁺ T-Zellen, keine Synzytienbildung (Gartner et al., 1986)	CCR5	M. Dittmar (Heidelberg)
JR-CSF	Gruppe M, Subtyp B, keine Synzytienbildung (Simmons et al., 1996; Trkola et al., 1998; Zhang et al., 1996)	CCR5	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: PBMC/HIV-1 _{JR-CSF} von Dr. Irvin Chen, # 1790
NL4-3	Gruppe M, Subtyp B, T-Zell-adaptiertes Virus, Synzytienbildung (Trkola et al., 1998; Zhang et al., 1996)	CXCR4	NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH: pNL4-3 von Dr. Malcom Martin, # 114

3.5.4 HIV-Fusionsinhibitoren

Tabelle 3.17 | HIV-Fusionsinhibitoren

Name	Beschreibung / Sequenz	Hersteller
C46	46 AS langes Peptid abgeleitet von HIV-1 _{HXB2} gp41 HR2 (Egelhofer et al., 2004); WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	Synthese: ThermoFisher Scientific (Ulm)
C46-EHO	46 AS langes Peptid; N-terminal 34 AS abgeleitet von HIV-2 _{EHO} gp41 HR2 (Gustchina et al., 2005) sowie C-terminal 12 AS von C46 (HIV-1 _{HXB2} gp41 HR2); WQQWERQVRFLDANITKLEEAQIQQEKNNMYELQELDKWASLWNWF	Synthese: Genecust (Dudelange, Luxemburg)
C46-Fur _o	52 AS langes Peptid; C46 C-terminal verlängert um 6 Aminosäuren der optimierten Furinschnittstelle Fur _o ; WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF RSRAKR	Synthese: Genecust (Dudelange, Luxemburg)
T-20 (Fuzeon® / Enfuvirtid)	36 AS langes Peptid abgeleitet von HIV-1 _{LAI} gp41 HR2 (Wild et al., 1992); YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWNWF	Roche Pharma (Grenzach- Wyhlen)

3.5.5 Kits in der Zellkultur

Tabelle 3.18 | Kits in der Zellkultur

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Fix&Perm Cell Permeabilization Kit	Invitrogen (Karslsruhe)	GAS-004

3.6 Material für proteinbiochemische Arbeiten

3.6.1 Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Filtration durch eine Millipore-Anlage von Millipore Water Systems, Schwalbach). Lagerung bei Raumtemperatur, soweit nicht anders angegeben.

Tabelle 3.19 | Lösungen und Puffer in der Proteinbiochemie

Name	Zusammensetzung
Ammoniumperoxidisulfat (APS), 10%	10 g APS, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei -20°C)
EDTA, 250 mM, pH 8,0	9,306 g EDTA, pH 8,0 mit 5 M NaOH einstellen, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4°C)
Glycerol, 40%	40 ml Glycerol, ad 100 ml Wasser
HEPES, 200 mM, pH 7,5	4,766 g HEPES, pH 7,5 mit 5 M NaOH einstellen, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4°C)
MPBST, 5%	g Magermilchpulver, ad 100 ml PBST (Lagerung für kurze Zeit bei 4°C)
Natriumchlorid (NaCl), 5 M	29,224 g NaCl, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4°C)
Natriumfluorid (NaF), 500 mM	2,922 g NaF, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4°C)
Natriumpyrophosphat, 100 mM	4,46 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, ad 100 ml Wasser (Lagerung bei 4°C)
Natriumvanadat, 10 mM	0,184 g Na_3VO_4 , ad 100 ml Wasser (Lagerung bei -20°C)
Neufeld-Puffer	10 mM TRIS-HCl, pH 8.5 600 mM NaCl 0.1% SDS 0.05% NP40 in Wasser
NP40-Puffer	150 mM NaCl 1% NP40 50 mM TRIS-HCl, pH 8.0 in Wasser (Lagerung bei 4°C) Vor Verwendung frisch zugeben: 1 mM PMSF und 1x Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete

Name	Zusammensetzung
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 10x	BioWhittaker®, Lonza, Katalognummer: BE 17-515Q
PBST, 0,1%	100 ml PBS (10x) 1 ml Tween®-20 ad 1000 ml Wasser
Pefabloc® SC, 100 mM	0,12 g Pefabloc® SC ad 5 ml Wasser (Lagerung bei -20 °C)
PMSF, 200 mM	0,35 g PMSF ad 10 ml 2-Propanol
Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete, 25x	1 Tablette Proteaseinhibitor-Cocktail cOmplete ad 2 ml Wasser (Lagerung für einige Wochen bei 4 °C)
SDS (Natriumdodecylsulfat), 10%	10% (w/v) SDS, in Wasser
SDS-Ladepuffer, 3x (Laemli-Puffer)	187,5 mM TRIS 15% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 0,02% (w/v) Bromphenolblau-Na-Salz in Wasser, pH 6,8 mit HCl einstellen Vor Verwendung frisch zugeben: 15% (v/v) 2-Mercaptoethanol
SDS-PAGE-Laufpuffer	100 ml SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) 10 ml 10% SDS-Lösung ad 1 l Wasser
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30,2 g TRIS, 144 g Glycin pH 8,8 mit HCl einstellen, ad 1 l Wasser (Lagerung bei 4 °C)
SDS-Sammelgelpuffer: 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8	30,25 g TRIS, pH 6,8 mit HCl einstellen, ad 500 ml Wasser (Lagerung bei 4 °C)
SDS-Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS-HCl, pH8,8	91 g TRIS, pH 8,8 mit HCl einstellen, ad 500 ml Wasser (Lagerung bei 4 °C)
Stripping-Puffer	12,5 ml 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8 20 ml 10% SDS-Lösung 700 µl 2-Mercaptoethanol ad 100 ml Wasser
TRIS-HCl-Puffer (für Immunpräzipitation)	50 mM TRIS pH 8,0 mit HCl einstellen (Lagerung bei 4 °C)
Triton X-100, 20%	20% (v/v) Triton X-100, in Wasser
Western Blot-Transferpuffer	200 ml Methanol 100 ml SDS-PAGE-Laufpuffer (10x) ad 1 l Wasser

Name	Zusammensetzung		
	Endkonzentration	Stockkonzentration	Volumen
Zell-Lysepuffer	50 mM HEPES, pH 7,5	200 mM	2,5 ml
	150 mM NaCl	5 M	0,3 ml
	1% (v/v) Triton X-100	20%	0,5 ml
	2% (v/v) Aprotinin	100%	0,2 ml
	2 mM EDTA, pH 8,0	250 mM	0,08 ml
	50 mM Natriumfluorid	500 mM	1 ml
	10 mM Natriumpyrophosphat	100 mM	1 ml
	10% (v/v) Glycerol	40%	2,5 ml
	1 mM Natriumvanadat	10 mM	1 ml
	2 mM Pefabloc® SC	100 mM	0,2 ml
	in Wasser (Lagerung bei -20 °C)		ad 10 ml

Tabelle 3.20 | Material für Western Blotting

Name	Hersteller	Katalognummer
Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (München)	RPN2109
Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare (München)	RPN2132
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare (München)	28-9068-37
Nitrozellulosemembran "Optitran BA-S83, Reinforced NC, 0,2 µm"	Schleicher & Schüll	10439394
Nitrozellulosemembran „Trans-Blot® Transfer Medium, Pure Nitrocellulose Membrane, 0,45 µm“	Bio-Rad (München)	162-0115
Whatman GB005 Blocking Sheets (1.2 mm dick)	Roth (Karlsruhe)	A126.1
Prestained Protein Marker, Broad Range (6-175 kDa)	New England Biolabs (Schwalbach)	P7708S

3.6.2 Kits in der Proteinbiochemie

Tabelle 3.21 | Kits in der Proteinbiochemie

Substanz	Hersteller	Katalognummer
Innotest HIV Antigen mAB (p24 Antigen ELISA)	Innogenetics (Gent, Belgien)	80563 (96)

3.7 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.22 | Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Blutentnahme-Röhrchen Microvette® CB300 Hämatologie / Kalium-EDTA	Sarstedt (Nürnberg)
CASYcups, CASYclean, CASYton	Innovatis (Reutlingen)
CD8 Microbeads, human (# 130-054-201)	Milteniy Biotech (Bergisch Gladbach)
Dispenser-Tips	Ratiolab (Dreieich)
Dynabeads® CD3/CD28 (# 111.41D)	Invitrogen (Karslsruhe)
FACS-Röhrchen, 5 ml, unsteril	Sarstedt (Nürnberg)
FACS-Röhrchen, 5 ml, steril	Becton Dickinson (Heidelberg)
Kryoröhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen)
MACS-Separationssäulen „LD Column“	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, WI, USA)
Pipetten, 2 / 5 / 10 / 25 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Pipetten, 2 / 5 / 10 / 25 ml, einzeln verpackt	Corning (Schiphol-Rijkund, Niederlande)
Pipettenspitzen 10 / 200 / 1000 µl	Sarstedt (Nürnberg)
Pipettenspitzen mit Filter 10 / 20 / 200 / 1000 µl	Ratiolab (Dreieich)
Petrischalen für Bakterienkultur	Sarstedt (Nürnberg)
Protein A-Agarose, 25%, 2 ml (# sc-2001)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
Reaktionsgefäße 0,2 / 1,5 / 2 ml	Sarstedt (Nürnberg)
Reaktionsröhrchen 15 / 50 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Reaktionsröhrchen 14 ml für Bakterienkulturen	Becton Dickinson (Heidelberg)
Skalpelle	Swann Morton (Sheffield, Großbritannien)
Slide-A-Lyzer® Dialysekassette 2,000 MWCO und Spritze mit 18 Gauge Kanüle zur Beladung	Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)
Spritzen	Codan Medical (Rødby, Dänemark)
Sterilfilter Millex 0,22 µm / 0,45 µm	Millipore (Schwalbach)
Sterilfiltersystem 250 / 500 / 1000 ml	Corning (Schiphol-Rijkund, Niederlande)
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer 25x89 mm)	Beckman Coulter (Krefeld)
Zellkulturflaschen, 25 / 75 / 175 cm ²	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellkulturplatten, 6 / 24 / 96-Well	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkulturplatten, 6 / 24-Well, unbeschichtet	Becton Dickinson (Heidelberg)
Zellkulturschalen Ø 10 cm	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellschaber	Corning (Schiphol-Rijkund, Niederlande)
Zentrifugenröhrchen 250 ml	Corning (Schiphol-Rijkund, Niederlande)

3.8 Geräte

Tabelle 3.23 | Geräte

Name	Hersteller
Analysenwaage R160P	Sartorius (Göttingen)
Autoklav FNR 1700 E	Fedegari (Albuzzano, Italien)
Autoradiographie: Typhoon™ 9400 Variable Mode Imager	GE Healthcare (München)
Brutschrank für Molekularbiologie	Heraeus Instruments (Hanau)
Brutschrank für Zellkulturen: Cellstar	Queue Systems (Asheville, NC, USA)
Dispenser	Eppendorf (Hamburg)
DNA-Elektrophoreseapparatur: Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad (München)
DNA-Sequenzierung: ABIPRISM 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Durchflusszytometer: FACSCalibur™ / FACScan™ mit Analyse-Software CellQuestPro 5	Becton Dickinson (Heidelberg)
Dynal MPC®-1 Magnetic Particle Concentrator	Dynal A.S. (Oslo, Norwegen)
Einfrierbehälter für Zellen: Cryo 1 °C Freezing Container	Nalgene (Rochester, NY, USA)
ELISA-Reader SPECRAmax 340 mit Software SOFTmax Pro 2.02	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)
ELISA-Washer PW40	Bio-Rad (München)
Fluoreszenzmikroskop Eclipse TS100	Nikon (Düsseldorf)
Geltrockner Model 543 mit Vakuumpumpe MZ 2C	Bio-Rad (München) Vacuubrand (Wertheim)
Heizblock Dri-Block DB 2D	Techne (Duxford, England)
Hypercassette™	GE Healthcare (München)
MACS Midi Magnet mit Multi MACS Stand	Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach)
Magnetrührer RTC basic	IKA®-Werke (Staufen)
Mikroskop DM IL	Leica (Wetzlar)
PCR Cycler: Biometra T Personal	Biometra (Göttingen)
pH-Meter Mettler Toledo MP220	Mettler (Gießen)
Pipetten Pipetman P	Gilson (Middleton, USA)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
Röntgenfilmentwickler Optimax Typ TR	PROTEC Medizintechnik (Oberstenfeld)
Schüttelinkubator TH30 für Bakterien	Edmund Bühler (Hechingen)
SDS-PAGE Apparatur für Proteingele: Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad (München)
Semi Dry Blot Apparatur für Western Blot: Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad (München)
Spannungsquellen für Western Blot: Power Pac 200 und Power Pac 300	Bio-Rad (München)

Name	Hersteller
Spektrophotometer NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific (Wilmington, DE, USA)
Sterilbänke: HERAsafe HS12 Kojair Biowizard	Heraeus Instruments (Hanau) KojairTech (Vilppula, Finnland)
Taumel-Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments (Schwabach)
UV-Transilluminator GelDoc 2000	Bio-Rad (München)
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger (Freiburg)
Vortex Genie-2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waage Kern 440-45	Kern & Sohn (Balingen)
Wasserbad für Molekularbiologie	GFL (Burgwedel)
Wasserbad für Zellkultur	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Zellzahlbestimmung: Casy TT	Schärfe System (Reutlingen)
Zentrifugen: BioFuge 15R Megafuge 1.0R Rotana 460R Rotina 48R Tischzentrifuge Mikro 20 Avanti J20 mit Rotor JA-12 Ultrazentrifuge L8-60M mit Rotor Sw32Ti	Heraeus Instruments (Hanau) Heraeus Instruments (Hanau) Hettich (Tuttlingen) Hettich (Tuttlingen) Hettich (Tuttlingen) Beckman Coulter (Krefeld) Beckman Coulter (Krefeld)

3.9 Software

Tabelle 3.24 | Software

Name	Hersteller
CellQuestPro 5	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
GraphPad Prism 5.00 für Windows	GraphPad Software, (San Diego, CA, USA)
ImageQuant®	GE Healthcare (München)
IrfanView 4.23	Irfan Skiljan (Wien, Österreich)
Lasergene 6	DNASTAR (Madison, WI, USA)
Microsoft Office 2003	Mircosoft (Redmond, WA, USA)
ProP	Peter Duckert, Søren Brunak and Nikolaj Blom (Technical University of Denmark, Lyngby, Dänemark) http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP
SOFTmax Pro 2.02	Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA)

4 METHODEN

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von plasmidtragenden *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien erfolgte in antibiotikumhaltigem LB-Selektivmedium (100 µg/ml Ampicillin bzw. 60 µg/ml Kanamycin). Durch Ausstreichen von Bakterien auf antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platten (50 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin) und Inkubation bei 37 °C wurden Einzelkolonien erzeugt. Die Agar-Platten wurden zur Konservierung bei 4 °C gelagert und waren mehrere Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendbar. Flüssigkulturen wurden zur dauerhaften Konservierung über Nacht geschüttelt und jeweils 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl 7% DMSO/H₂O gemischt und bei -80 °C aufbewahrt.

4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *Escherichia coli*

Zur Transformation von Ligationsprodukten oder Plasmiden in *Escherichia coli* wurden kompetente Bakterien wie folgt hergestellt. In einem 1 l-Erlenmeyerkolben wurden 200 ml LB-Medium mit 2 ml einer *E. coli* TOP10-Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in 50 ml-Röhrchen überführt, 10 Minuten lang auf Eis inkubiert und die Bakterien durch Zentrifugation (10 Minuten, 2890xg, 4 °C) geerntet. Die Bakterienpellets wurden mit der Pipette vorsichtig in jeweils 20 ml eiskalter 0,1 M MgCl₂-Lösung resuspendiert und anschließend weitere 20 ml eiskalte 0,1 M MgCl₂-Lösung zugegeben. Die Bakterien wurden wie zuvor abzentrifugiert, in jeweils 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden danach erneut abzentrifugiert und in jeweils 2 ml 50 mM CaCl₂-Lösung mit 15% Glycerin resuspendiert. 200 µl-Aliquots der so behandelten Bakterien wurden in Eppendorf-Gefäßen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Kompetenz der Bakterien betrug jeweils etwa 1x10⁶ Kolonien pro µg Plasmid-DNA.

4.1.3 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Ligationsprodukte oder Plasmide wurden in kompetente *Escherichia coli*-Bakterien transformiert. 50 µl kompetente *E. coli* TOP10 wurden auf Eis aufgetaut und mit 20 µl eines Ligationsansatzes bzw. 0,5-1 µg Plasmid-DNA vermischt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend im Wasserbad bei 42 °C zwei Minuten lang erhitzt. Im Anschluss an diesen Hitzeschock, der die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Bakterien

bewirkte, wurden diese kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 500 µl vorgewärmtem LB-Medium wurden die Bakterien 45 Minuten lang bei 37 °C geschüttelt. Bei Transformation von Ligationsprodukten wurden die Bakterien danach 5 Minuten lang bei 8000 rpm abzentrifugiert und 450 µl Überstand verworfen. Im Restvolumen wurde das Bakterienpellet vorsichtig resuspendiert und auf einer antibiotikumhaltigen LB-Agar-Platte ausgestrichen. Bei Transformation von Plasmiden wurden direkt 50 µl der geschüttelten Bakterien ausgestrichen. Nach 12-14-stündigem Wachstum bei 37 °C wurden Bakterienkolonien sichtbar. Diese wurden für das Animpfen von 3 ml-Minikulturen verwendet.

4.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Identifizierung neuer Transformanden wurde Plasmid-DNA im analytischen Maßstab aus 3 ml-Minikulturen mit Hilfe des peqGOLD Plasmid Miniprep Kit von Peqlab isoliert. Dabei ergaben sich in der Regel Ausbeuten von je 5-10 µg Plasmid-DNA. Für die Isolierung im präparativen Maßstab wurde eine 250 ml Übernachtkultur angesetzt und die Plasmid-DNA daraus mit dem Nucleobond AX Maxiprep Kit von Macherey & Nagel isoliert. Mit dem Maxi Kit konnten bis zu etwa 2 mg Plasmid-DNA aufgereinigt werden. Die Plasmid-DNA Lösungen wurden zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

4.1.5 Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung von genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte mit dem DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen gemäß Herstellerangaben. In der Regel wurden 1-5x10⁶ Zellen für die Extraktion verwendet.

4.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Saiki et al., 1988) ist eine einfache und schnelle Methode zur Vervielfältigung von DNA *in vitro*. Mit Hilfe der PCR wurden Gene oder Genbereiche amplifiziert und/oder Punktmutationen in DNA-Sequenzen eingefügt.

4.1.6.1 Amplifikation von Genen oder Genbereichen zur Klonierung

Die Amplifikation von Genen oder Genbereichen für Klonierungen erfolgte mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR). Dabei wurden jeweils zwei gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge bindende Primer von mindestens 18 Nukleotiden Länge eingesetzt. Diese wurden im Überschuss unter Hybridisierungsbedingungen (ca. 58 °C) zu der DNA-Präparation zugegeben (*annealing*). Die Synthese der neuen DNA-Stränge erfolgte durch die Pfx DNA-Polymerase bei 68 °C. Dieses Enzym bildet glatte Enden; aufgrund einer *proofreading*-Aktivität ist die Fehlerrate bei der Synthese sehr gering. Die Elongationszeit wurde abhängig von der Produktgröße gewählt und betrug 1 Minute pro Kilobase. Die Denaturierung der entstandenen DNA-Syntheseprodukte erfolgte bei 94 °C. Im Allgemeinen

wurden bei einer PCR-Reaktion 30 Zyklen aus Annealing, Elongation und Denaturierung in einem Thermocycler (Biometra) durchgeführt.

Die folgenden Komponenten wurden für eine PCR-Reaktion in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

5 µl	10x Pfx Amplifikationspuffer
1 µl	MgSO ₄ (50 mM)
1,5 µl	dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
1,5 µl	Forward-Primer (10 µM)
1,5 µl	Reverse-Primer (10 µM)
0,5 µl	Pfx DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
34 µl	Wasser
5 µl	DNA-Matrize (10 ng)
<hr/>	
50 µl	

Standardprogramm für präparative PCR mit Pfx DNA-Polymerase:

94 °C	3 Min	Denaturierung	
94 °C	30 s	Denaturierung	
58 °C	30 s	Annealing	
68 °C	1 Min	Elongation	
68 °C	3 Min	Vervollständigung	

Die Annealing-Temperatur wurde für jede PCR in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer zwischen 53 °C und 65 °C gewählt. Dabei wurde die Schmelztemperatur T_m für jeden verwendeten Primer nach folgender Formel berechnet, wobei G, C, A und T die Häufigkeit der entsprechenden Nukleotide im Primer angibt: $T_m = 4 \times (G \text{ und } C) + 2 \times (A \text{ und } T)$

4.1.6.2 Gerichtete Mutagenese

Zum Einfügen einer oder mehrerer Punktmutationen in Plasmid-DNA wurden das „QuikChange XL site directed mutagenesis Kit“ bzw. das „QuikChange multi-site directed mutagenesis Kit“ von Stratagene nach den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Dabei werden durch eine PCR-basierte Methode einzelne Nukleotide im Plasmid ausgetauscht. Hierfür werden zwei Oligonukleotide als Primer für die PCR-Reaktion verwendet, die bis auf die gewünschten Basenänderungen komplementär zu den beiden Strängen der Zielsequenz sind. Bei der PCR-Reaktion wird die Elongationszeit so gewählt, dass ausgehend von den Primern sowohl der Plus- als auch der Minusstrang vollständig amplifiziert werden können. Nach der PCR-Reaktion liegt also eine Mischung vor aus Plasmid-DNA, die die gewünschte Mutation enthält (PCR-Produkt), und solcher, die noch die Ursprungssequenz trägt (Matrize). Durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease DpnI kann die Matrizen-DNA spezifisch zerstört werden, denn nur diese trägt Methylierungen an

der Zielsequenz des Enzyms. Solche Methylierungen werden von *E. coli*-Bakterien an Plasmid-DNA angefügt und finden sich daher nicht an der mittels PCR-Reaktion erzeugten DNA. Das verdaut PCR-Produkt kann anschließend für die Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt werden.

Die folgenden Komponenten wurden gemäß den Herstellerangaben für eine QuikChange PCR-Reaktion in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

5 µl	PCR QuikChange-Puffer (10x)
3 µl	QuikSolution
1 µl	dNTP Mix
1 µl	Forward-Primer (125 ng/µl)
1 µl	Reverse-Primer (125 ng/µl)
1 µl	Pfu Turbo (2,5 U/µl)
28 µl	Wasser
10 µl	DNA-Matrize (20 ng)
<hr/>	
50 µl	

Standardprogramm für QuikChange PCR mit Pfu Turbo DNA-Polymerase:

94 °C	1 Min	Denaturierung	
<hr/>			
94 °C	50 s	Denaturierung	18x
60 °C	50 s	Annealing	
68 °C	1 Min / kb	Elongation	
<hr/>			
68 °C	7 Min	Vervollständigung	

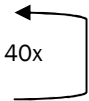
4.1.6.3 PCR mit Taq DNA-Polymerase

Die Taq DNA-Polymerase besitzt keine *proofreading*-Aktivität und baut daher mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit Fehler in neu synthetisierte DNA-Stränge ein. Die Taq DNA-Polymerase wurde daher lediglich bei analytischen PCR-Reaktionen im Rahmen von RCR- und RCL-Tests (Abschnitt 4.3.7.2) eingesetzt. Hierbei wurde mittels PCR überprüft, ob bei der Produktion retroviraler bzw. lentiviraler Vektoren Rekombinationsereignisse stattgefunden haben, die zur Entstehung replikationskompetenter Retro- bzw. Lentiviren führten. Aus Zellen, die wie in Abschnitt 4.3.7.2 beschrieben transduziert worden waren, wurde hierfür genomische DNA isoliert (Abschnitt 4.1.5) und als Matrize für die folgenden PCR-Reaktionen verwendet. Die Primer für die PCR wurden dabei jeweils so gewählt, dass nur dann ein PCR-Produkt entsteht, wenn Rekombinationen stattgefunden haben.

Die folgenden Komponenten wurden für die **RCR-Test** PCRs (Gag- bzw. GaLV-Env-PCR) in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Als Positivkontrolle für die Gag-PCR diente Plasmid-DNA von Retro gag/pol (M579). Die Größe des erwarteten PCR-Produkts beträgt 394 bp. Als Positivkontrolle für die Env-PCR wurde Plasmid-DNA von GaLV-Env (M620) verwendet. Die Größe des erwarteten PCR-Produkts beträgt dabei 500 bp.


Bei den Positivkontrollen wurde je 5 ng Plasmid-DNA in 500 ng DNA aus unmanipulierten Kontrollzellen gemischt und in der PCR-Reaktion eingesetzt.

5 µl	Taq DNA Pol. Buffer G1	PCR-Programm:	
1 µl	dNTPs (je 10 mM)		
1 µl	Gag-Palu-F bzw. GaLV 5' II (10 µM)	94 °C	3 Min
1 µl	Gag-Palu-R bzw. GaLV 3' II (10 µM)	94 °C	30 s
0,7 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	53 °C	30 s
31,3 µl	Wasser	72 °C	45 s
10 µl	DNA-Matrize (500 ng)	72 °C	4 Min
<hr/>			
50 µl			



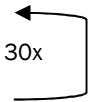
Die folgenden Komponenten wurden für die **RCL-Test** PCR in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Als Positivkontrolle diente Plasmid-DNA eines lentiviralen 2-Plasmid-System-Transfervektors (M858, 5 ng Plasmid-DNA in 500 ng DNA aus unmanipulierten Kontrollzellen). Die Größe des erwarteten PCR-Produkts beträgt 579 bp.

5 µl	Taq DNA Pol. Buffer G1	PCR-Programm:	
1 µl	dNTPs (je 10 mM)		
1 µl	GrecF1 (10 µM)	94 °C	3 Min
1 µl	GrecR1 (10 µM)	94 °C	20 s
0,7 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	53 °C	30 s
31,3 µl	Wasser	72 °C	60 s
10 µl	DNA-Matrize (500 ng)	72 °C	4 Min
<hr/>			
50 µl			



Die folgenden Komponenten wurden für die **Actin-PCR** in ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. Als Kontrolle diente DNA, die aus unmanipulierten Zellen isoliert worden war. Die Größe des erwarteten PCR-Produkts beträgt 300-400 bp.

5 µl	Taq DNA Pol. Buffer G1	PCR-Programm:	
1 µl	dNTPs (je 10 mM)		
1 µl	Actin-F (10 µM)	94 °C	3 Min
1 µl	Actin-R (10 µM)	94 °C	30 s
0,7 µl	Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	56 °C	30 s
31,3 µl	Wasser	72 °C	30 s
10 µl	DNA-Matrize (200 ng)	72 °C	4 Min
<hr/>			
50 µl			



4.1.7 Erzeugung von cDNA mittels Oligonukleotid-Hybridisierung

Zur Erzeugung kleiner cDNA-Fragmente wurden Oligonukleotide von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Dabei wurde je ein *forward*- und *reverse*-Oligonukleotid so ausgewählt, dass diese in der Mitte in einem Bereich von mindestens 20 Nukleotiden Länge

überlappten. Die Oligonukleotide konnten daher hybridisiert und anschließend zu doppelsträngiger DNA aufgefüllt werden.

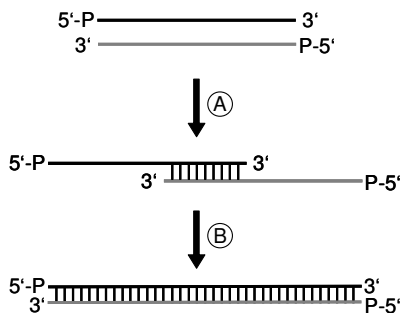


Abbildung 4.1 | Hybridisierung und Auffüllen von überlappenden Oligonukleotiden

Überlappende Oligonukleotide, die zuvor am 5'-Ende phosphoryliert wurden (5'-P), werden zunächst hybridisiert (A), wobei es zur Basenpaarung in komplementären Sequenzbereichen kommt. Anschließend füllt eine DNA-Polymerase die einzelsträngigen Bereiche zu doppelsträngiger DNA auf (B).

4.1.7.1 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Für die Hybridisierung zweier überlappender Oligonukleotide wurden je 10 µl (10 pmol/µl) zuvor 5'-phosphorylierter Oligonukleotide (siehe Abschnitt 4.1.9.4) gemischt und mit 3 µl „10x Taq DNA Pol. Buffer G1“ versetzt. Die Mischung wurde im Heizblock 3 Minuten lang bei 95 °C inkubiert und anschließend im Heizblock langsam auf Raumtemperatur abgekühlt.

4.1.7.2 Auffüllen von hybridisierten Oligonukleotiden

Zum Auffüllen hybridisierter Oligonukleotide zu doppelsträngiger DNA wurde die Pfx DNA-Polymerase verwendet, die aufgrund ihrer *proofreading*-Aktivität eine geringe Fehlerrate aufweist und doppelsträngige DNA mit glatten Enden erzeugt. In ein 200 µl PCR-Reaktionsgefäß wurde folgende Mischung pipettiert und für 1 Stunde auf 68 °C erhitzt:

5 µl	hybridisierte Oligonukleotide
1 µl	dNTPs (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5 µl	10x Pfx Amplifikationspuffer
1 µl	MgSO ₄ (50 mM)
1 µl	Pfx DNA-Polymerase (2,5 U/µl)
37 µl	Wasser
<hr/>	
50 µl	

15 µl der aufgefüllten Oligonukleotide wurden bei nachfolgenden präparativen Restriktionsverdau eingesetzt.

4.1.8 Enzymatische DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Bei der Klonierung von Plasmiden und bei Restriktionsanalysen, wurde Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurden Enzyme der Firma New England Biolabs in den vom Hersteller mitgelieferten 10x-Puffern verwendet.

Zum präparativen Verdau wurden etwa 3-6 µg Plasmid-DNA eingesetzt und in einem Gesamtvolumen von 35 µl mit 5-20 Units Restriktionsendonuklease inkubiert. Die Inkubationszeit betrug je nach Enzymkombination und Verwendungszweck zwischen zwei und zwölf Stunden. Der Erfolg der Reaktion wurde durch das Auftragen von 5 µl des Restriktionsverdau auf ein Agarose-Gel anhand des bei der Elektrophorese entstehenden Bandenmusters überprüft. Falls erforderlich wurden die generierten DNA-Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert.

Bei Restriktionsanalysen wurde etwa 0,5-1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit 5-10 Units Enzym 1-2 Stunden lang verdaut und die generierten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

4.1.9 Modifikation von DNA-Enden

4.1.9.1 Auffüllen von 5'-Einzelstrangenden mit Klenow-Polymerase

5'-Überhängende Einzelstrangenden, die beim Schneiden mit Restriktionsendonukleasen entstanden waren, wurden bei Bedarf mit Hilfe des Klenow-Fragments der *E. coli* DNA-Polymerase I in glatte Enden umgewandelt. Dazu wurde 1 µl (5 Units) des Enzyms zum Restriktionsverdau (35 µl) zugegeben, mit 1,5 µl 2 mM dNTP-Mix (je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1 µl Neb2-Puffer und Wasser auf 40 µl aufgefüllt und 30 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Klenow-Fragments erfolgte durch 10 Minuten lange Inkubation bei 70 °C. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des peqGOLD Cycle-Pure Kits von peQLab aufgereinigt.

4.1.9.2 Abbau von 3'-Einzelstrangenden mit T4 DNA-Polymerase

3'-Überhängende Einzelstrangenden, die beim Schneiden mit Restriktionsendonukleasen entstanden waren, wurden bei Bedarf mit Hilfe der 3'-5'-Exonukleaseaktivität der T4 DNA-Polymerase in glatte Enden umgewandelt. Dazu wurde 1,5 µl (4,5 Units) des Enzyms zum Restriktionsverdau (35 µl) zugegeben, mit 5 µl 10 mM dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und Wasser auf 50 µl aufgefüllt und 15 Minuten lang bei 12 °C inkubiert. Die Inaktivierung der T4 DNA-Polymerase erfolgte durch Zugabe von 5,5 µl 10 mM EDTA (pH 8,0) und Erhitzen auf 75 °C für 20 Minuten. Die DNA wurde anschließend mit Hilfe des peqGOLD Cycle-Pure Kits von peQLab aufgereinigt.

4.1.9.3 Eliminierung von 5'-Phosphatgruppen an DNA-Enden

Um bei der späteren Ligation von geschnittenen Vektoren und Inserts die Religation der Vektoren (ohne Einbau des Inserts) zu verhindern, wurden Vektoren mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (CIP) behandelt, das die Hydrolyse von 5'-Phosphatgruppen katalysiert. Da Ligasen 5'-Phosphatgruppen für die Verknüpfung zweier Nukleinsäureenden benötigen, wird durch deren Entfernen eine Religation von linearisierten Vektoren inhibiert.

Die Ligation eines Inserts in einen Vektor wird dadurch ermöglicht, dass das 5'-Phosphat vom Insert geliefert wird.

Zur Eliminierung der 5'-Phosphatgruppen von geschnittenen Vektoren wurde 1 µl (10 Units) CIP zum Restriktionsverdau zugegeben und 45-60 Minuten lang bei 37 °C inkubiert. Die so behandelte DNA wurde vor dem Einsatz in Ligationsreaktionen in einem Agarose-Gel aufgetrennt und aus dem Gel aufgereinigt oder mittels des peqGOLD Cycle-Pure Kits von peQLab gereinigt.

4.1.9.4 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Die synthetisierten Oligonukleotide und Primer, die für Hybridisierungen und PCR-Reaktionen verwendet wurden, tragen keine 5'-Phosphatgruppen und mussten daher zunächst am 5'-Ende phosphoryliert werden, um eine spätere Ligation der DNA-Fragmente in dephosphorylierte Vektoren zu ermöglichen. Dazu wurde die folgende Mischung in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert und 1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert:

2 µl	Oligonukleotid (100 pmol/µl)
1,8 µl	T4 PNK (T4 Polynukleotidkinase, 10 U/µl)
2 µl	10x PNK-Puffer
2 µl	dATP (10 mM)
12,2 µl	Wasser
<hr/>	
20 µl	

4.1.10 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen mit 1x TAE als Laufpuffer. Im Allgemeinen wurden dabei 1%ige Agarose-Gele verwendet, die Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (kleiner als 500 bp) erfolgte in 2%igen Agarose-Gelen.

Die erforderliche Menge Agarosepulver wurde in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und anschließend 1/10.000 Volumen Ethidiumbromidstocklösung (1% v/v in Wasser) zugegeben. Die Lösung wurde in eine Gelkammer eingefüllt und zur Ausbildung von Geltaschen wurde ein Kamm eingesetzt. Dieser wurde nach dem Erstarren des Gels entfernt und das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde 12-15 µl 100 bp- oder 1 kb-Marker aufgetragen.

Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 15-30 Minuten. Das Gel wurde im Anschluss an die Elektrophorese mit UV-Licht bestrahlt, um das in die DNA intercalierte Ethidiumbromid und damit die DNA-Banden sichtbar zu machen. Das Gel wurde fotografiert und falls erforderlich Banden mit gewünschten DNA-Fragmenten ausgeschnitten und die DNA daraus isoliert (Abschnitt 4.1.11).

4.1.11 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem JETquick Gel Extraction Spin Kit von Genomed.

4.1.12 Ligation von DNA-Fragmenten

4.1.12.1 Ligation mittels Quick-Ligase

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe der Quick-Ligase durchgeführt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit etwa 200 ng geschnittener und dephosphorylierter Plasmid-DNA und einem etwa dreifachen molaren Überschuss des entsprechend geschnittenen Inserts durch 5-10 Minuten lange Inkubation bei Raumtemperatur. Es wurde dabei 1 µl (10 Units) des Enzyms Quick-Ligase verwendet, als Puffer wurden 10 µl des vom Hersteller mitgelieferten 2x Quick-Ligase-Puffers eingesetzt. Der Ligationsansatz sowie ein entsprechender Kontrollansatz ohne Insert wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien verwendet.

4.1.12.2 Ligation von PCR-Produkten in TOPO-Vektoren

PCR-Produkte mit glatten Enden wurden bei Bedarf in den pCR®-Blunt II-TOPO®-Vektor (Invitrogen) ligiert. Dieser wird vom Hersteller als linearisiertes Plasmid geliefert, welches an beiden Enden das Enzym Topoisomerase trägt. Dies erlaubt eine schnelle und effiziente Insertion des PCR-Produkts in den Vektor. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz sowie ein entsprechender Kontrollansatz ohne Insert wurden zur Transformation von kompetenten *E. coli*-Bakterien verwendet.

4.1.13 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden von der Service-Abteilung des Georg-Speyer-Hauses (Margot Landersz, Ursula Dietrich) auf einem ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (Sanger, Nicklen & Coulson, 1977) durchgeführt. Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 10 µl DNA-Lösung (Wasser ad 15 µl) verwendet und mit 1 µl 10 µM Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0,5 µg Plasmid-DNA in der Sequenzierreaktion eingesetzt (Wasser ad 15 µl).

4.2 Klonierungsstrategien

Alle klonierten Vektoren basieren auf dem gammaretroviralen Vektor MP91 (Schambach et al., 2000). Dieser enthält die LTRs des Myeloproliferativen Sarkomvirus (MPSV) und eine modifizierte 5' untranslatierte Leader-Region (UTR), die vom murinen embryonalen Stammzellvirus (MESV) abgeleitet ist. In diesem Leader wurden alle gag-Sequenzen und alle potentiellen Startcodons (ATG), die sich vor der Transgenkassette befinden, entfernt. Stattdessen enthält die 5' UTR einen zusätzlichen viralen Splice Donor (SD) und einen Splice Akzeptor (SA).

Der Vektor M377 wurde ausgehend von MP91 generiert. Hierfür wurden in die NotI Schnittstelle von MP91 eine vergrößerte *multiple cloning site* (MCS) und in die 3' UTR ein *woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element* (wPRE) eingefügt.

Die Transgenkassetten, die iSAVE-Peptide kodieren, wurden jeweils in mehreren Klonierungsschnitten wie unten beschrieben zusammengebaut und anschließend in die *multiple cloning site* von M377 eingesetzt. Die Sequenzen aller klonierten Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Tabelle 4.1 | Die Module der iSAVE-Peptide

Name	Beschreibung	Aminosäuresequenz
S	Signalpeptid von humanem <i>tissue-type plasminogen activator</i>	MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSPS
C46	HIV-Fusionsinhibitor, abgeleitet von HR2 von gp41 (AS 628-673 von HIV-1 _{HXB2} gp41)	WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQ _{NQ} QEKNEQELLELDKWASLWNWF
L	Loop N-terminal von HR2 von gp41 (AS 605-627 von HIV-1 _{HXB2} gp41)	TTAVPWNASWSNKSLEQIWNHTT
H	Hinge, membranproximale Region C-terminal von HR2 von gp41 (AS 674-685 von HIV-1 _{HXB2} gp41)	NITNWLWYIKLF
M	c-Myc-Tag	EQKLISEEDL
GA _r	Flexibler Glycin-Alanin Repeat	GAGGAGGAGAGGAGAGAG
IgC	Linker von humanem IgG2 (AS 99-117; Accession No. P01859.2)	ERKCCVECPCPAPPVAGP
IgS	Mutierter IgG2 Linker	ERKSSVESPPSPAPPVAGP
Fur	Minimale Furinschnittstelle	RAKRD
Fur _m	Mutierte Furinschnittstelle	RAKVD
Fur _o	Optimierte Furinschnittstelle	RSRAKRSV
GA	Flexibler Glycin-Alanin Repeat	GGAGAGAG
GS	Flexibler Glycin-Serin Linker	GSGGGGSGGGGSG

4.2.1 C46 (interne Nummer M851)

Das Konstrukt C46 wurde ausgehend von dem unten beschriebenen C46-H-GAr per PCR generiert. Mit Hilfe der Primer M699-out-for und C46-StopSalR wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das lediglich das Signalpeptid und das C46-Peptid umfasste. Gleichzeitig wurde ein Stoppcodon am 3'-Ende des C46-Peptids angefügt. Verdau des PCR-Produkts mit NotI und SalI und anschließende Ligation in den Vektor M377 resultierte im Konstrukt C46.

4.2.2 C46-H-GAr (M788)

Das Konstrukt C46-H-GAr wurde ausgehend von dem unten beschriebenen L-C46-H-GAr generiert, indem der *loop* (L) in einer 3-Stufen-PCR-Reaktion entfernt wurde. In einer ersten PCR-Reaktion mit den Primern M699-out-for und SPtPA-C46-rev wurden ein Fragment des Vektorbackbones am 5'-Ende der Transgenkassette sowie die Signalpeptid-Sequenz amplifiziert. Gleichzeitig wurden durch den Primer SPtPA-C46-rev mehrere Nukleotide die mit der C46-Sequenz überlappten an das 3'-Ende des PCR-Produkts angefügt. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde ein DNA-Fragment, das C46, H, GAr und M enthielt mit Hilfe der Primer C46for und M699-out-rev aus dem Konstrukt L-C46-H-GAr amplifiziert. In einer dritten PCR-Reaktion wurden die Produkte der beiden ersten PCR-Reaktionen kombiniert und mit Hilfe der Oligonukleotide M699-out-for und M699-out-rev zusammengefügt. Dieses finale PCR-Produkt wurde mit NotI und SalI geschnitten und in den Vektor M377 ligiert, was in dem Konstrukt C46-H-GAr resultierte.

4.2.3 L-C46-H-GAr (M699)

Für die Generierung von L-C46-H-GAr wurde zunächst das Fragment L-C46-H in mehreren Schritten mittels PCR erzeugt und in das Klonierungsplasmid pBluescript (Stratagene) eingefügt. Die *loop*-Sequenz (L) wurde durch Annealing und Auffüllen der überlappenden Oligonukleotide LoopFor und LoopRev hergestellt, wobei eine BamHI und eine AsiSI Schnittstelle an das 5'-Ende der *loop*-Sequenz angefügt wurden. Das Segment C46-H wurde mittels PCR mit den Primern C46ForL und HIVlinkRev aus dem Plasmid M87o-HIV-Ineo (Hermann et al., 2009b) amplifiziert. Der Primer C46ForL fügte dabei mit der *loop*-Sequenz überlappende Nukleotide an das 5'-Ende des PCR-Produkts an, während HIVlinkRev das 3'-Ende der C46-H-Sequenz um eine EcoRI und eine PstI Schnittstelle sowie zwei Stoppcodons ergänzte. In einem dritten Schritt wurden das *loop*- und das C46-H-Fragment per PCR miteinander verbunden (Primer LoopFor und HIVLinkRev). Das PCR-Produkt L-C46-H wurde anschließend mit BamHI geschnitten und über BamHI und EcoRV (erzeugt glatte Enden) in pBluescript ligiert. Das Signalpeptid (S) von humanem *tissue-type plasminogen activator* (*tPA*) wurde durch Annealing und Auffüllen der überlappenden Oligonukleotide SPtPAFor und SPtPARev generiert, wobei eine 5' BamHI und eine 3' AsiSI Schnittstelle an die Sequenz des Signalpeptids angefügt wurden. Über diese beiden Schnittstellen wurde das Signalpeptid anschließend in die 5' Region der L-C46-H Sequenz im pBluescript Plasmid

eingefügt, wobei das Zwischenkonstrukt pBlue-S-L-C46-H erzeugt wurde. In die EcoRI-Schnittstelle dieses Plasmids wurde ein Glycin-Alanin Repeat (GAR) ligiert. Hierzu wurde das Annealing-Produkt der Oligonukleotide GAfor und GArev verwendet, das klebrige Enden aufweist, so wie sie beim Schneiden mit EcoRI entstehen. Dabei waren die Oligonukleotide so beschaffen, dass beim Einfügen des Annealing-Produkts in die EcoRI-Schnittstelle von pBlue-S-L-C46-H nur die 3' EcoRI Schnittstelle erhalten blieb, während die 5' EcoRI-Schnittstelle zerstört wurde. Dies resultierte im Zwischenkonstrukt pBlue-S-L-C46-H-GAR. Die verbleibende EcoRI-Schnittstelle wurde genutzt, um einen c-Myc-Tag einzufügen, der durch Annealing der Oligonukleotide MycFor2 und MycRev2 generiert worden war. Die Transgenkassette, die Signalpeptid, *loop*, C46, HIV-Linker, GAR und c-Myc-Tag umfasste, wurde über NotI und Sall in M377 kloniert, wobei das Konstrukt L-C46-H-GAR entstand.

4.2.4 L-C46-H-GAR Mutanten mit mutierten N-Glykosylierungsstellen L1mut (M771), L2mut (M768), L3mut (M746), C46mut (M747), Hmut (M748), L1-2mut (M734) und 5xmut (M766)

Die N-Glykosylierungsstellen in L-C46-H-GAR wurden durch gerichtete Mutagenese mit dem Site-directed mutagenesis Kit von Stratagene mutiert. Dabei wurden jeweils Primerpaare für den sense- und antisense-Strang verwendet, die Alaninreste (A) anstatt der Serin- (S) oder Threoninreste (T) in den Konsensussequenzen der betreffenden N-Glykosylierungsstellen einfügten. Die folgenden Oligonukleotide wurden hierbei verwendet: QCGlycoForI-neu (sense) und QCGlycoRevI-neu (antisense) für L1mut (S35A); QCGlycoForII (sense) und QCGlycoRevII (antisense) für L2mut (S40A); QCGlycoForIII (sense) und QCGlycoRevIII (antisense) für L3mut (T48A); C46mutFor (sense) und C46mutRev (antisense) für C46mut (T61A); HingemutFor (sense) und HingemutRev (antisense) für Hmut (T100A); sowie QCGlycoFor (sense) und QCGlycoRev (antisense) für L1-2mut (S35A/S40A). Das Konstrukt 5xmut (S35A/S40A/T48A/T61A/ T100A) wurde mittels des Multi site-directed mutagenesis Kits (Stratagene) generiert, wobei die Primer QCGlycoForIII, C46mutFor und HingemutFor, und als DNA-Matrize das Konstrukt L1-2mut verwendet wurden.

4.2.5 L-C46-H-ohne Linker (M683)

Das Konstrukt L-C46-H-ohne Linker basiert auf dem oben beschriebenen pBlue-S-L-C46-H. In dessen PstI Schnittstelle wurde ein c-Myc-Tag eingefügt, der durch Annealing der Oligonukleotide MycFor und MycRev generiert worden war. Die Transgenkassette aus Signalpeptid, *loop*, C46, HIV-Linker und c-Myc-Tag wurde über NotI und Sall in M377 ligiert, und somit das Konstrukt L-C46-H generiert.

4.2.6 L-C46-H-IgC (M769)

Das Konstrukt L-C46-H-IgC wurde auf die gleiche Weise generiert wie L-C46-H-GAR jedoch wurde anstatt von GAR ein Linker von humanem IgG2 in das Zwischenkonstrukt pBlue-S-L-

C46-H eingefügt. Hierfür wurde das Annealing-Produkt der Oligonukleotide IgG2-Linker-for und IgG2-Linker-rev in die EcoRI Schnittstelle von pBlue-S-L-C46-H ligiert. Der c-Myc-Tag, der aus den Oligonukleotiden MycFor2 und MycRev2 generiert worden war, wurde dann wie oben beschrieben eingefügt und die Transgenkassette über NotI und Sall in M377 umklont, wobei das Konstrukt L-C46-H-IgC entstand.

4.2.7 L-C46-H-IgS (M784)

Das Konstrukt L-C46-H-IgS wurde auf die gleiche Weise generiert wie L-C46-H-GAr. Anstatt von GAr wurde jedoch ein mutierter Linker von humanem IgG2 in das Zwischenkonstrukt pBlue-S-L-C46-H eingefügt, in dem alle Cysteinreste durch Serinreste ersetzt waren. Hierfür wurde das Annealing-Produkt der Oligonukleotide IgG2-Linkermut-for und IgG2-Linkermut-rev in die EcoRI Schnittstelle von pBlue-S-L-C46-H ligiert. Der c-Myc-Tag, der aus den Oligonukleotiden MycFor2 und MycRev2 generiert worden war, wurde dann wie oben beschrieben eingefügt und die Transgenkassette über NotI und Sall in M377 umklont, woraus das Konstrukt L-C46-H-IgS resultierte.

4.2.8 Fur (M818)

Das Konstrukt Fur wurde mit Hilfe mehrerer PCR-Schritte zusammengesetzt. Zunächst wurde ein Fragment, das das Signalpeptid und C46 umfasste mit Hilfe der Primer M699-out-for und C46-RRLL-rev aus C46-H-GAr amplifiziert. Dabei wurden die Codons für die Aminosäuren RRLL sowie eine EcoRV Schnittstelle und zwei Stoppcodons an das 3'-Ende von C46 angefügt. Das resultierende PCR-Produkt wurde mit NotI und EcoRV geschnitten und über diese Schnittstellen in das pBluescript Plasmid ligiert, wobei das Zwischenkonstrukt pBlue-S-C46 entstand. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde die C46-Sequenz mittels der Primer C46for und C46-RRLL-rev aus C46-H-GAr amplifiziert und das Produkt in die EcoRV Schnittstelle von pBlue-S-C46 ligiert. Die gesamte Transgenkassette wurde anschließend über NotI und Sall in M377 umklont, wobei das Zwischenkonstrukt M377-S-C46-C46 entstand. Die Furinschnittstelle Fur zwischen den beiden C46-Einheiten wurde durch gerichtete Mutagenese mit Hilfe der Primer C46-Furin-for und C46-Furin-rev generiert, wobei das finale Konstrukt Fur entstand.

4.2.9 Fur₀ (M869)

Das Konstrukt Fur₀, das die optimierte Furinschnittstelle Fur₀ enthält, wurde aus dem Konstrukt Fur über gerichtete Mutagenese generiert. Zunächst wurde die Fur Schnittstelle C-terminal um die Aminosäuren SV verlängert, wobei die Primer 818-RAKRSV-F (sense) und 818-RAKRSV-R (antisense) verwendet wurden. Anschließend wurden die Aminosäuren RS mit Hilfe der Primer 818-RSRAKR-F (sense) und 818-RSRAKR-R (antisense) an den N-Terminus der Schnittstelle angefügt. Zusätzlich wurde ein neues Stoppcodon unmittelbar an das 3'-Ende der C-terminalen C46-Sequenz angefügt, wobei die Primer M699-out-for und

C46-StopSalR für die Mutagenese-Reaktion verwendet wurden. Das finale PCR-Produkt wurde über NotI und SalI in M377 ligiert, wobei das Konstrukt Fur_o generiert wurde.

4.2.10 Fur_oGA (M902)

Das Konstrukt Fur_oGA wurde in einer 3-Stufen-PCR-Reaktion generiert, wobei Fur_o als Matrize verwendet wurde. In der ersten PCR-Reaktion wurde ein DNA-Fragment mit Hilfe der Primer M699-out-for und Furopt-GA8_R amplifiziert, so dass die Sequenz des Glycin-Alanin Repeats an das 3'-Ende der Fur_o Schnittstelle angefügt wurde. In einer zweiten PCR-Reaktion mit dem Konstrukt Fur_o als Matrize wurde ein DNA-Fragment generiert, in dem die Sequenz des GA-Repeats an das 5'-Ende des C-terminalen C46 angehängt wurde. Hierfür wurden die Primer GA8-C46_F und M699-out-rev verwendet. In der dritten PCR-Reaktion wurden die beiden Produkte der vorigen PCR-Reaktionen anhand der überlappenden Sequenzen im Bereich der GA-Repeats und mit Hilfe der Primer M699-out-for und M699-out-rev kombiniert. Das finale PCR-Produkt wurde mit NotI und SalI verdaut und in M377 ligiert, wobei das Konstrukt Fur_oGA generiert wurde.

4.2.11 GAFur_o (M903)

Das Konstrukt GAFur_o wurde mittels 3-Stufen-PCR mit Fur_o als Matrize generiert. In einer ersten PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der Primer M699-out-for und C46-GA8_R ein DNA-Fragment aus Fur_o amplifiziert und gleichzeitig die Sequenz für den GA-Repeat an das 3'-Ende der N-terminalen C46-Einheit angefügt. In der zweiten PCR wurde ein GA-Repeat an das 5'-Ende der Fur_o Schnittstelle angefügt, wobei die Primer GA8-Furopt_F und M699-out-rev verwendet wurden. In der dritten PCR-Reaktion wurden die beiden ersten PCR-Produkte anhand der überlappenden GA-Repeat-Sequenzen mit Hilfe der Primer M699-out-for und M699-out-rev kombiniert. Das finale PCR-Produkt wurde über NotI und SalI in M377 ligiert, wobei das Konstrukt GAFur_o generiert wurde.

4.2.12 GAFur_oGA (M918)

Das Konstrukt GAFur_oGA wurde genauso kloniert wie oben für Fur_oGA beschrieben, allerdings wurde als Matrize für die PCR-Reaktion GAFur_o verwendet.

4.2.13 Fur_m (M845)

Zur Generierung des Konstrukts Fur_m wurde die Furinschnittstelle RAKRD im Konstrukt Fur zu RAKVD mutiert und somit zerstört. Dies wurde mittels gerichteter Mutagenese mit den Primern 818-FurinMutF (sense) und 818-FurinMutR (antisense) und dem Konstrukt Fur als Matrize bewerkstelligt.

4.2.14 GS (M863)

Das Konstrukt GS basiert auf Fur_o. Zunächst wurde mittels gerichteter Mutagenese mit dem Primerpaar C46-BspEI-C46-F (sense) und C46-BspEI-C46-R (antisense) und Fur_o als Matrize eine BspEI Schnittstelle anstatt der Fur_o Sequenz eingebaut, so dass das Konstrukt M859 entstand. Ein Glycin-Serin (GS)-Linker, das Annealingprodukt der Oligonukleotide G4S2-BspEI-F und G4S2-BspEI-R, wurde in die neue BspEI Schnittstelle eingesetzt, wobei das Konstrukt GS generiert wurde.

4.2.15 Fur_oGA Mutanten mit mutierten N-Glykosylierungsstellen N33Q (M974), N95Q (M967) und N33Q/N95Q (M968)

Die N-Glykosylierungsstellen in Fur_oGA wurden durch gerichtete Mutagenese mit dem Site-directed mutagenesis Kit von Stratagene mutiert. Dabei wurden jeweils Primerpaare für den sense- und antisense-Strang verwendet, die Glutaminreste (Q) anstelle der Asparaginreste (N) in den Konsensussequenzen der betreffenden N-Glykosylierungsstellen einfügten. Die folgenden Oligonukleotide wurden hierbei verwendet: OGS11 (sense) und OGS12 (antisense) für N33Q; OGS7 (sense) und OGS8 (antisense) für N95Q; sowie beide Primerpaare für das Konstrukt N33Q/N95Q.

4.2.16 EHO-GAFur_oGA (M951)

Die cDNA für das Konstrukt EHO-GAFur_oGA wurde von der Firma GeneArt (Regensburg) synthetisiert und über die Schnittstellen NotI und Sall in M377 ligiert.

4.2.17 Furin (M901)

Das Konstrukt Furin codiert humanes Furin mit einem C-terminalen HA-Tag. Die cDNA für das vollständige humane Furingen wurde von imaGenes GmbH (Berlin) erworben. Die Sequenz, die Furin codiert wurde daraus per PCR mit den Primern NotI_Fur_F und FurHA_AgeI_R amplifiziert. Dabei wurde am 5'-Ende eine NotI Schnittstelle angefügt, während am 3'-Ende ein HA-Tag und eine AgeI Schnittstelle angefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] zwischenkloniert. In die EcoRI Schnittstelle des leeren Vektors M377 wurde eine IRES-Puro^r Kasette eingefügt und anschließend über NotI und AgeI die Furin-HA-Kasette aus dem Zwischenkonstrukt in diesen Vektor ligiert, wobei das Konstrukt Furin generiert wurde.

4.3 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Zellkultur-Werkbänken durchgeführt. Benötigte Materialien und Lösungen wurden entweder original-sterilverpackt verwendet oder durch Autoklavieren bzw. Filtration sterilisiert. Zusätzlich wurden alle Verpackungen, Medienflaschen, Plastikmaterialien usw. sowie die Handschuhe vor Einsatz unter der Sterilbank durch Absprühen mit 70%igem Ethanol desinfiziert.

4.3.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank bei 37 °C, 5-7% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit mit den in Tabelle 3.15 angegebenen Medien kultiviert. Ein Mediumwechsel bei Suspensionszellen bzw. das Passagieren von adhärennten Zellen erfolgte alle 2-4 Tage. Die Bestimmung von Zellzahlen erfolgte hierbei mit Hilfe eines Casy TT-Zellzählgeräts (Schärfe System, Reutlingen) gemäß Herstellerangaben.

Adhärennte Zellen wurden bei Subkonfluenz (70-80% konfluenter Zellrasen) im Verhältnis 1:3 bis 1:10 gesplittet. Dazu wurde das Kulturmedium von den Zellen abgenommen, diese vorsichtig mit vorgewärmtem 1x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in frischem vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert, falls notwendig die Zellzahl bestimmt und ein Teil der Zellen in eine oder mehrere neue Kulturflaschen überführt.

Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen pro ml gehalten. Alle 2-4 Tage wurde ein Teil der Zellsuspension entnommen, mit frischem Kulturmedium verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt.

Zur dauerhaften Lagerung von Zellen wurden diese nach dem Trypsinieren abzentrifugiert (5 Minuten bei 400-500xg), mit 1x PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Je 1×10^7 Zellen wurden in 1 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert, in ein 2 ml-Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80 °C in einem Einfrierbehälter eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Zellen zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Zum Auftauen von in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellkulturen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C schnell aufgetaut, in 10 ml vorgewärmtem Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (10 Minuten bei 300xg), um das für die Zellen schädliche DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde danach in frischem vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen in eine neue Kulturflasche ausgesät.

4.3.2 Isolierung von PBMCs aus Blut

Die Isolierung von primären humanen PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) erfolgte aus Buffy-Coat Blut oder frischem Blut. Das Blut wurde zunächst 8 Minuten lang bei 400xg abzentrifugiert und das Plasma zur späteren Verwendung als autologes Serum gesammelt. Das Blut wurde anschließend im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt und mit Hilfe eines Ficoll-

Gradienten aufgetrennt. Hierfür wurden in 50 ml Röhrchen zunächst 20 ml Pancoll vorgelegt und dann vorsichtig mit 20 ml verdünntem Blut überschichtet. Nach 30-minütiger Zentrifugation (800xg, Raumtemperatur, ohne Bremse) wurde die Interphase mit den darin enthaltenen mononukleären Zellen vorsichtig abgesaugt und diese zweimal mit je 30 ml PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils 8 Minuten bei 400xg). Aus 20 ml frischem Blut konnten dabei etwa $5-7 \times 10^7$ Zellen isoliert werden.

4.3.3 Immunomagnetische Depletion von CD8⁺ T-Zellen

Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen (ca. 30-40% der Zellen) aus frisch isolierten PBMCs erfolgte mit Hilfe der MACS®-Technologie von Miltenyi Biotech. Hierbei werden die CD8⁺ Zellen mit paramagnetischen CD8 Microbeads markiert und daher beim anschließenden Fluss durch eine Säule in einem Magnetfeld zurückgehalten. CD8⁻ Zellen dagegen können die Säule passieren und so von den CD8⁺ Zellen getrennt werden.

PBMCs wurden abzentrifugiert und auf 4 °C gekühlt. Das Zellpellet wurde in 80 µl kaltem MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendiert und 20 µl CD8 Microbeads pro 1×10^7 Zellen zugegeben. Nach Inkubation bei 4 °C für 30 Minuten wurden 4 ml kalter MACS-Puffer zugegeben und die Zellen 8 Minuten lang bei 400xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl kaltem MACS-Puffer vorsichtig resuspendiert.

Eine mindestens zwei Stunden lang bei -20 °C vorgekühlte MACS®-Säule wurde in einen Multi-MACS-Stand mit MACS-Midi-Magnet eingespannt und mit 2 ml kaltem MACS-Puffer equilibriert. Anschließend wurde die mit den Microbeads behandelte Zellsuspension auf den Filter der Säule geladen. Das Eluat wurde in einem 15 ml Röhrchen gesammelt. Die Säule wurde zweimal mit jeweils 2 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen und das Eluat ebenfalls in das Röhrchen gesammelt.

Um den Erfolg der CD8-Depletion zu überprüfen, wurde je eine Probe à 5×10^5 Zellen vor und nach der CD8-Depletion mit 5 µl Tritest-Antikörpermischung gefärbt und am FACS analysiert.

4.3.4 Stimulierung und Kultivierung von primären humanen T-Zellen

Zur Stimulierung von primären humanen T-Lymphozyten wurden CD3/CD28 Dynalbeads (im Verhältnis 3 Beads pro 1 Zelle) verwendet. Die Beads wurden zunächst zweimal mit 2% AB Serum in PBS mit Hilfe eines Dynal MPC Magneten gewaschen und anschließend $1,5 \times 10^7$ Beads pro ml in X-Vivo 15-standard Medium resuspendiert.

Die gewaschenen Beads wurden im Verhältnis 3:1 mit den Zellen gemischt und diese in 6-Well-Platten ausgesät. Dabei wurden pro Well 5×10^6 Zellen mit $1,5 \times 10^7$ Beads in 5 ml X-Vivo 15-standard Medium ausgesät und mit 100 U/ml Interleukin-2 supplementiert (50 µl IL-2 Arbeitslösung, 500 Units).

Beim Arbeiten mit Zellen aus frischen Blutproben (nicht bei Buffy-Coats) konnte autologes Serum anstelle des AB-Serums im Kulturmedium verwendet werden. Dafür musste das während der PBMC-Isolation gesammelte Plasma durch 30-minütige Inkubation

bei 56 °C inaktiviert, anschließend abzentrifugiert (10 Minuten, 1000xg) und der Überstand nochmals filtriert werden.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter normalen Zellkulturbedingungen. Die Zelldichte wurde alle 2-3 Tage auf 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt und 100 U/ml IL-2 zum Medium frisch zugegeben. Dabei wurde sofern möglich stets eine Mischung aus frischem und konditioniertem Medium für die Kultivierung verwendet.

Nach Stimulierung der Zellen über mehrere Tage konnten die CD3/CD28 Beads aus den Zellkulturen entfernt werden. Hierfür wurden die Zellen und Beads zunächst durch heftiges Pipettieren voneinander gelöst und die Suspension anschließend in ein steriles FACS-Röhrchen überführt. Dieses wurde im Magnetfeld eines Dynal MPC Magneten platziert, wobei sich die Beads an einer Seite des Röhrchens sammelten, so dass die gereinigte Zellsuspension wieder aus dem Röhrchen entfernt werden konnte. Die Zellen wurden anschließend in frische Kulturschalen ausgesät.

4.3.5 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Durch Transfektion mit der Calciumphosphat-Methode (Graham & van der Eb, 1973; Wigler et al., 1978) wurde Plasmid-DNA zur transienten Genexpression in Zellen eingebracht. Bei dieser Methode wird die DNA zusammen mit Calciumphosphat-Kristallen komplexiert und von den Zellen mittels Endozytose aufgenommen.

4.3.5.1 Transfektion zur Produktion sezernierter Peptide

Retrovirale Vektoren, die für iSAVE-Peptide codierten, wurden durch transiente Calciumphosphat-Transfektion in 293T-Zellen eingebracht, in welchen daraufhin die Expression der Proteine sowie deren Sekretion in den Zellkulturüberstand erfolgte.

Für jeden Transfektionsansatz wurden einen Tag vor der Transfektion $6-7 \times 10^6$ 293T-Zellen in 8 ml DMEM-standard in 10 cm Kulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gegen 8 ml DMEM-standard mit Chloroquin (Endkonzentration 25 µM) ausgetauscht, um die Zellen für die Transfektion kompetent zu machen.

Der folgende DNA-Mix wurde für jeden Transfektionsansatz hergestellt:

Retroviraler Vektor	10 µg
Leerer Vektor / Furin Expressionsplasmid	10 µg
H ₂ O	ad 450 µl
2,5 M CaCl ₂	50 µl

Unter heftigem Vortexen wurde die DNA / CaCl₂-Lösung tropfenweise zu 500 µl 2x HBS-Puffer in einem 15 ml Röhrchen zugegeben und anschließend zur Präzipitatbildung 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mischung auf die Zellen

getropft und diese bei 37 °C mit dem DNA-Präzipitat kultiviert. Nach 6-8 Stunden wurde das Medium gegen 6 ml frisches DMEM-standard ohne Chloroquin ausgetauscht.

24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium erneut gegen je 6 ml frisches DMEM-standard Medium ausgetauscht. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die proteinhaltigen Zellkulturüberstände gesammelt, durch 0,22 µm Filter filtriert und bei -80 °C eingefroren, falls keine zeitnahe Weiterverwendung erfolgte.

Die transfizierten Zellen wurden nach dem Sammeln der Überstände, wie in Abschnitt 4.5.1 beschrieben, lysiert, um die Expression der Proteine innerhalb der Zellen mittels Western Blot zu untersuchen.

4.3.5.2 *Pulse-chase-Experimente*

Pulse-chase-Experimente wurden von Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle aus der Arbeitsgruppe von Laer durchgeführt. 24 Stunden nach der Transfektion von 293T-Zellen mit gammaretroviralen Vektoren, die für iSAVE-Peptide codierten, wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro 10 cm Kulturschale gewaschen und 30 Minuten lang bei 37 °C in Methionin-freiem *starvation*-Medium inkubiert. Anschließend wurde das Medium gegen *pulse*-Medium mit 200 µCi ³⁵S-L-Methionin pro 10 cm Kulturschale ausgetauscht. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde das *pulse*-Medium abgenommen und die Zellen mit 10 ml vorgewärmtem PBS pro Kulturschale gewaschen, um die metabolische Markierung zu unterbrechen. Danach wurden pro Kulturschale 6 ml DMEM-standard Medium (enthält 4 mM L-Methionin) zugegeben. Zu den angegebenen *chase*-Zeitpunkten wurde das Medium gesammelt, filtriert (0,22 µm) und bei -20 °C gelagert. Der Zellrasen wurde mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen, 1 ml NP40-Puffer zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber mechanisch geerntet. Die abgeschabten Zellen wurden eine Stunde lang in NP40-Puffer auf Eis lysiert und bei -20 °C eingefroren. Zelllysate und Zellkulturüberstände wurden anschließend immunpräzipitiert (Abschnitt 4.5.3).

4.3.5.3 *Herstellung gammaretroviraler und lentiviraler Vektoren*

Replikationsinkompetente MLV-basierte gammaretrovirale Vektoren oder lentivirale Vektoren wurden mit Hilfe des so genannten Drei-Plasmid-Systems hergestellt. Die genetische Information des Virus ist hierbei auf ein gamma- oder lentivirales Transfektorplasmid und zwei Hilfsplasmide verteilt. Das Transfektorplasmid enthält das Transgen, zwei virale LTRs und das Verpackungssignal Ψ, jedoch keinerlei genetische Information zur Generierung viraler Proteine. Die für die Verpackung in Viruspartikel erforderlichen viralen Strukturproteine (*gag/pol*) und Hüllproteine (*env*) werden in *trans* von den beiden Hilfsplasmiden zur Verfügung gestellt. Die räumliche Trennung zwischen den die viralen Proteine codierenden Sequenzen und dem Transfektor mit dem Verpackungssignal soll die Aufnahme der viralen Sequenzen in die Viruspartikel und damit die Entstehung replikationskompetenter Viren verhindern. Die so generierten Viren tragen als

einzigste genetische Information den Transfektor und sind daher auf einen einzigen Infektionszyklus beschränkt.

Die Plasmide des Drei-Plasmid-Systems wurden durch transiente Calciumphosphat-Transfektion in 293T-Zellen eingebracht, in welchen daraufhin die Expression der Proteine und die Herstellung viraler Partikel erfolgten. Für jeden Transfektionsansatz wurden einen Tag vor der Transfektion $6-7 \times 10^6$ 293T-Zellen in 8 ml DMEM-standard in 10 cm Kulturschalen ausgesät und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gegen 8 ml DMEM-standard mit Chloroquin (Endkonzentration 25 µM) ausgetauscht, um die Zellen für die Transfektion kompetent zu machen. Für die Herstellung lentiviraler Vektoren wurde dabei FCS-freies Medium verwendet.

Der folgende DNA-Mix wurde für jeden Transfektionsansatz hergestellt:

	Lentivirale Vektoren	Retrovirale Vektoren	Menge
gag/pol-Expressionsplasmid	Lenti-gag/pol	Retro-gag/pol	12,5 µg
Env-Expressionsplasmid	HIV-Env / VSV-G*	GaLV-Env	1 µg
Transfektor-Plasmid	pHR'SIN cPPT SEW	C-Peptid-Vektoren*	7,5 µg
H ₂ O			ad 450 µl
2,5 M CaCl ₂			50 µl

* Das jeweils verwendete Plasmid ist im Ergebnisteil beschrieben.

Unter heftigem Vortexen wurde die DNA / CaCl₂-Lösung tropfenweise zu 500 µl 2x HBS-Puffer in einem 15 ml Röhrchen zugegeben und anschließend zur Präzipitatbildung 20 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Mischung auf die Zellen getropft und diese bei 37 °C mit dem DNA-Präzipitat kultiviert. Nach 6-8 Stunden wurde das Medium gegen 6 ml frisches DMEM-standard ohne Chloroquin ausgetauscht.

30 Stunden und 54 Stunden nach der Transfektion wurden die virushaltigen Zellkulturüberstände gesammelt und durch 0,45 µm Filter filtriert, um Zelltrümmer abzutrennen. Die Überstände wurden entweder direkt aliquotiert und bei -80 °C eingefroren oder zuvor durch Zentrifugation aufkonzentriert.

4.3.6 Konzentration lentiviraler Überstände

Lentivirale Überstände wurden entweder mittels Ultrazentrifugation durch ein Sukrosekissen oder durch Zentrifugation bei niedrigerer Geschwindigkeit über Nacht (*low speed*-Zentrifugation) aufkonzentriert. Bei der Ultrazentrifugation wurden die Viruspartikel durch das Sukrosekissen zusätzlich aufgereinigt, bei der *low speed*-Zentrifugation wurden dafür teilweise höhere Ausbeuten erzielt.

4.3.6.1 Ultrazentrifugation

Zur Konzentrierung lentiviraler Partikel durch Ultrazentrifugation wurden je 30 ml filtrierter Virusüberstand pro Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und anschließend vorsichtig mit 5 ml einer 20%igen Saccharose/PBS-Lösung unterschichtet. Danach wurden die Röhrchen vorsichtig bis zum Rand mit Virusüberstand befüllt und austariert. Die Zentrifugation erfolgte bei 25.000 rpm und 4°C für zwei Stunden in einer L3 60M-Ultrazentrifuge (Beckman Coulter) mit Sw32Ti Rotor. Der Überstand wurde verworfen, das Vektorsediment in 200 µl PBS aufgenommen und anschließend mindestens 4 Stunden lang auf einem Taumelschüttler resuspendiert. Danach wurden die Viruspartikel aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.6.2 Low-speed-Zentrifugation

Für die *low speed*-Konzentration lentiviraler Überstände wurde je 40 ml Überstand in 50 ml Röhrchen gefüllt und der obere Teil des Röhrchens mit Parafilm umwickelt. Die Zentrifugation erfolgte für 16 Stunden bei 4°C und 4000xg in einer Avanti J-20 Zentrifuge (Beckman Coulter) mit JA-12 Rotor. Der Überstand wurde verworfen, das Vektorsediment in 200 µl PBS aufgenommen und anschließend mindestens 4 Stunden lang auf einem Taumelschüttler resuspendiert. Danach wurden die Viruspartikel aliquotiert und bei -80°C gelagert.

4.3.7 Transduktion von Zelllinien mit viralen Vektoren

Für die Transduktion von Suspensionszellen mit gammaretroviralen Vektoren wurden $1-2 \times 10^5$ Zellen pro Well in 24-Well-Platten in 500 µl RPMI-standard Medium ausgesät. Bei der Transduktion mit lentiviralen Vektoren wurden $1-2 \times 10^4$ Zellen pro Well in 96-Well-Platten in 50 µl RPMI-standard Medium ausgesät. Anschließend wurde der Vektorüberstand zugegeben und die Platten zentrifugiert (1 Stunde, 31°C, 1000xg), um eine bessere Transduktionseffizienz zu erreichen. Die Zellen wurden dann mehrere Tage unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert und der Erfolg der Transduktion mittels Durchflusszytometrie überprüft.

4.3.7.1 Titration viraler Vektoren

Für die Bestimmung von Virustitern in gammaretroviralen oder lentiviralen Überständen wurden Zellen wie oben beschrieben transduziert. Dabei wurden für eine Titrationsreihe verschiedene Mengen Überstand jeweils in Duplikaten zu den Zellen zugegeben. Bei lentiviralen Vektoren wurden hierfür etwa 0,01-100 µl Überstand verwendet, bei gammaretroviralen Überständen etwa 5 µl bis 2 ml. Die Bestimmung der Transduktionsraten erfolgte nach 4-7 Tagen mittels Durchflusszytometrie.

Für die Berechnung des Titers an infektiösen Partikeln wurden nur solche Ansätze herangezogen, in denen die Transduktionsrate unter 20% lag, da hier von nur einer

Vektorintegration pro Zelle ausgegangen werden kann (Fehse et al., 2004). Bei höheren Transduktionsraten wird ein Teil der Zellen von mehr als einem Vektor transduziert, so dass der Titer unterschätzt würde. Die Titerberechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Infektiöse Partikel}}{\text{ml}} = \frac{1}{\text{Virusmenge in ml}} \times \text{Anzahl der ausgesäten Zellen} \times \left(\frac{\% \text{ positive Zellen}}{100} \right)$$

4.3.7.2 RCR- und RCL-Test

Bei der Herstellung gammaretroviraler oder lentiviraler Vektoren mit dem Drei-Plasmid-System ist die Gefahr der Entstehung replikationskompetenter Viren zwar sehr gering, dennoch ist sind Rekombinationsereignisse zwischen den verwendeten Plasmiden nicht vollständig auszuschließen. Theoretisch könnten daher gag/pol- und env-Gene in die Vektoren verpackt werden und diese somit nicht auf einen einzigen Replikationszyklus beschränkt sein.

Virale Vektorüberstände wurden deshalb mit einem PCR-basierten Test auf das Vorhandensein replikationskompetenter Retroviren (RCR) bzw. Lentiviren (RCL) überprüft. Hierbei wurden Zelllinien mit viralen Vektoren transduziert und deren Überstände erneut zur Transduktion von Zielzellen verwendet. Die genomische DNA dieser Zellen wurde isoliert und mittels PCR auf das Vorhandensein von gag/pol und env-Sequenzen überprüft. Falls die Vektorüberstände frei von replikationskompetenten Viren waren, sollten dabei in den transduzierten Zellen keine viralen Sequenzen nachweisbar sein.

Gammaretrovirale Überstände wurden auf Te671-Fibroblastenzellen wie folgt analysiert:

Tag 0	Aussäen von 8×10^5 Te671-Zellen in 5 ml DMEM-standard Medium pro Well in 6-Well-Platten.
Tag 1	Transduktion mit je 2-4 ml filtriertem gammaretroviralen Überstand pro Well.
Tag 2	Ersetzen des Mediums durch frisches DMEM-standard Medium.
Tag 3	Trypsinieren der transduzierten Zellen und erneutes Aussäen in frischen 6-Well-Platten (8×10^5 Zellen pro Well). Pelletieren von 1×10^6 Zellen für die DNA-Isolierung.
Tag 5	Wie Tag 3.
Tag 7	Aussäen von 8×10^5 frischen Te671-Zellen in 5 ml DMEM-standard Medium pro Well in 6-Well-Platten.
Tag 8	Transduktion der frisch ausgesäten Zellen mit je 2 ml pro Well filtriertem Überstand der Zellen der ersten Transduktion.
Tag 9	Ersetzen des Mediums durch frisches DMEM-standard Medium.
Tag 10, 12, 14	Wie Tag 3.
Tag 16	Wie Tag 3; Pelletieren von 1×10^6 unmanipulierten Kontrollzellen für die DNA-Isolierung.

Die Überprüfung von lentiviralen Überständen wurde auf PM-1-Zellen nach folgendem Transduktionsschema durchgeführt:

Tag 0	Aussäen von 5×10^6 PM-1-Zellen in 5 ml RPMI-standard Medium pro Well in 6-Well-Platten. Transduktion mit 200 μ l konzentriertem lentiviralem Überstand.
Tag 2	Austausch von 2 ml Medium durch frisches RPMI-standard Medium.
Tag 5	Aussäen von 5×10^6 frischen PM-1-Zellen in 1 ml RPMI-standard Medium pro Well in 6-Well-Platten. Transduktion mit 4 ml filtriertem Medium von den Zellen der ersten Transduktion. Pelletieren von 5×10^6 Zellen der ersten Transduktion.
Tag 7	Austausch von 2 ml Medium durch frisches RPMI-standard Medium.
Tag 10	Pelletieren von 5×10^6 Zellen der zweiten Transduktion sowie von unmanipulierten Kontrollzellen.

Aus allen gesammelten Zellpellets wurde genomische DNA isoliert (Abschnitt 4.1.5) und mittels PCR auf das Vorhandensein viraler Sequenzen überprüft (Abschnitt 4.1.6.3).

4.3.8 Transduktion primärer humaner T-Lymphozyten

Die Transduktion primärer humaner T-Lymphozyten mit gammaretroviralen Vektoren erfolgte an den Tagen 3 und 4 nach Isolation in RetroNectin-beschichteten Platten (Isolierung und Stimulierung der Zellen mit CD3/CD28-Beads an Tag 0). Die Aktivierungsbeads wurden vor der Transduktion aus den Zellkulturen entfernt.

Unbeschichtete 6-Well-Zellkulturplatten wurden mit RetroNectin beschichtet. Dafür wurde 1 ml sterile RetroNectin-Lösung (50 μ g/ml) pro Well verwendet und die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die RetroNectin-Lösung wurde abgenommen und konnte weitere dreimal zur Beschichtung eingesetzt werden (Lagerung bei 4 °C). Die Platten wurden anschließend mit 1,5 ml sterilem 2%igem BSA/PBS pro Well für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Die BSA-Lösung wurde verworfen und die Platten mit 3 ml HBSS pro Well gewaschen.

Die so vorbereiteten Platten wurden mit gammaretroviralen Vektoren beschichtet. Dafür wurden 3 ml Vektorüberstand pro Well zugegeben und 30 Minuten lang bei 1200xg und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Beschichtung zweimal mit neuem Überstand wiederholt. Der Überstand wurde verworfen, $3-6 \times 10^6$ aktivierte primäre humane T-Zellen pro Well ausgesät und unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Bei Bedarf erfolgte nach 12 oder 24 Stunden eine weitere Transduktion. Dafür wurden die Zellen auf eine zweite RetroNectin-beschichtete und mit Vektorüberstand beladene Platte überführt.

4.3.9 *Single-round infection assay* mit HIV-pseudotypisierten Viren

Die antivirale Wirksamkeit von sezernierten C-Peptiden wurde in einem *single-round infection assay* mit einem replikationsinkompetenten mit HIV-Hüllglykoproteinen pseudotypisierten lentiviralen Vektor (pHR'SIN cPPT SEW (Demaison et al., 2002)) untersucht. Dieser codierte für das Grün Fluoreszierende Protein (GFP).

Zur Überprüfung der anti-HIV-Aktivität von C-Peptiden, die von transfizierten 293T-Zellen sezerniert worden waren, wurden in 96-Well-Platten pro Vertiefung je 2×10^4 PM-1-Zellen in 50 μl RPMI-standard-Medium ausgesät. Unterschiedliche Verdünnungen von peptidhaltigen 293T-Zellkulturüberständen wurden in Duplikaten zu den Zellen gegeben (100 μl pro Well). Lentiviraler Vektor wurde danach in der Menge zugegeben, die in einer Transduktions-effizienz von ca. 10-20% resultieren sollte und mit RPMI-standard-Medium ein Gesamtvolumen von 200 μl pro Well eingestellt. Als Positivkontrolle wurden in einigen Wells anstelle des Zellkulturüberstands synthetische C-Peptide mit Endkonzentrationen von 0,5 nM bis 100 nM zu den Zellen zugegeben. Als Negativkontrolle wurden Zellkulturüberstände von nicht transfizierten oder mit Kontrollplasmiden transfizierten 293T-Zellen in unterschiedlichen Verdünnungen zu den PM-1-Zellen zugegeben.

Um die antivirale Aktivität von C-Peptiden, die von T-Zelllinien nach gammaretroviraler Transduktion sezerniert wurden, zu analysieren, wurden in 96-Well-Platten pro Well je 2×10^4 transduzierte Zellen in 100 μl konditioniertem Medium ausgesät. Als Negativkontrolle dienten native untransduzierte Zellen. Der lentivirale Vektor wurde in einem Volumen von 10 μl pro Well verdünnt und zugegeben.

Die so vorbereiteten Platten wurden jeweils 5 Tage lang bei 37°C in einer Feuchtekammer im Brutschrank inkubiert (ohne Zentrifugationsschritt). Für die Analyse am FACS wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, einmal mit FACS-Puffer gewaschen, durch Zentrifugation pelletiert und in FACS-Fixierungslösung aufgenommen. Bei der Messung am FACS-Gerät wurde das Markergen GFP detektiert und der Anteil positiv transduzierter Zellen bestimmt.

4.3.10 Durchflusszytometrie

Beim FACS (*fluorescence activated cell sorter*) oder Durchflusszytometer handelt es sich um ein Gerät, mit dem Zellen gezählt und verschiedene Parameter, wie relative Größe, Komplexität oder Fluoreszenzintensität, bestimmt werden können. Die Zellen werden im Zytometer mittels eines Flüssigkeitssystems in eine Messküvette geleitet, wo sie mit einem Laser bestrahlt werden. Anhand des Vorwärtstreulichts (FSC), das durch Beugung des Lichts an einer Zelle entsteht, kann auf die Zellgröße geschlossen werden; das Seitwärtstreulicht (SSC; durch Lichtbrechung und Reflexion) lässt Rückschlüsse auf Zellkomplexität oder -granularität zu.

Nach Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern oder durch Expression fluoreszierender Proteine wie GFP, können die Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Die relative Fluoreszenzintensität kann durch Detektion des emittierten Fluoreszenzlichts gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur vorhandenen Zahl der Moleküle des Fluorochroms oder der Bindungsstellen für den fluoreszenzmarkierten Antikörper.

Die FACS-Messungen wurden jeweils an einem FACScan™ oder FACSCalibur™ (Becton Dickinson) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro 5.

4.3.10.1 Detektion verschiedener zellulärer Marker

Für die Detektion intrazellulärer Fluorophore wie GFP oder die Antikörperfärbung von Oberflächenantigenen wurden für jede Probe 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen in FACS-Röhrchen überführt und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Falls lediglich die Fluoreszenz von GFP bestimmt werden sollte, wurden die pelletierten Zellen in 100-500 μl FACS-Fixierungslösung resuspendiert und am Durchflusszytometer analysiert.

Für die Immunfärbung wurden die Zellpellets in 20-50 μl Primärantikörperlösung aufgenommen und 30 Minuten bei 4°C inkubiert (Verdünnung der Antikörper wie in Tabelle 3.2 angegeben). Um ungebundenen überschüssigen Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und anschließend, falls notwendig, in 20-50 μl Sekundärantikörperlösung resuspendiert (Verdünnung der Antikörper: Tabelle 3.3). Die Zellen wurden erneut 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert und danach zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Analyse am Durchflusszytometer wurden die pelletierten Zellen in 100-500 μl FACS-Fixierungslösung resuspendiert.

4.3.10.2 Intrazelluläre Detektion sezernierbarer C-Peptide

Die Immunfärbung sezernierbarer C-Peptide in Zellen erfolgte mit Hilfe des Fix&Perm Cell Permeabilization Kits. Hierbei werden die Zellen zunächst fixiert und dann permeabilisiert, so dass intrazelluläre (also noch nicht sezernierte) Antigene gefärbt werden können.

1×10^5 Zellen, die sezernierbare C-Peptide exprimierten, wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und einmal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in 50 μl Fix&Perm Fixierungslösung resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen einmal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und in der Antikörperlösung aufgenommen (50 μl Fix&Perm Permeabilisierungslösung, 5 μl Flebogamma und 0,2 μl 2F5-PE). Die Zellen wurden eine Stunde lang bei 4°C inkubiert, danach zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und zur Analyse mit dem Durchflusszytometer in 150 μl FACS-Puffer resuspendiert.

4.3.11 Bestimmung von C-Peptidkonzentrationen in Überständen

Die Bestimmung von C-Peptidkonzentrationen in Zellkulturüberständen erfolgte mittels eines FACS-basierten Assays. Hierfür wurde Überstand, der sezernierte C-Peptide enthielt, zunächst mit einer definierten Menge des 2F5-Antikörpers vorinkubiert. Während dieser Zeit konnte der Antikörper alle vorhandenen Peptide binden, wodurch sich die Menge freien, ungebundenen Antikörpers entsprechend reduzierte. Anschließend wurden PM-1-M218 Zellen zugegeben, die maC46 auf der Oberfläche exprimieren. Freier, ungebundener Antikörper konnte nun an das membranverankerte C-Peptid binden. Die Zellen wurden danach gewaschen, mit einem PE-gekoppelten anti-humanen Sekundärantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Durch die Vorinkubation des 2F5-Antikörpers mit verschiedenen Konzentrationen eines synthetisch hergestellten C-Peptids konnte eine Eichkurve erstellt werden, wobei höhere C-Peptidkonzentrationen in weniger starker Färbung

der Zellen und entsprechend geringerem Fluoreszenzsignal resultierten. Anhand der Eichkurve konnten die C-Peptid-Konzentrationen in den zu untersuchenden Überständen bestimmt werden.

Zur Analyse von Zellkulturüberständen transfizierter 293T-Zellen wurden diese zunächst 1:2 bis 1:5 in DMEM-standard Medium verdünnt. Überstände von transduzierten Zelllinien wurden unverdünnt eingesetzt. Je 60 µl (verdünnter) Überstand wurden in Triplikatansätzen in FACS-Röhrchen pipettiert, als Negativkontrolle wurden Proben mit je 60 µl DMEM-standard Medium vorbereitet. Für die Generierung der Eichkurve wurden je 60 µl verschiedener Verdünnungen des synthetischen C-Peptids C46-Fur_o mit Konzentrationen von 40-400 nM in Triplikatansätzen in FACS-Röhrchen vorgelegt.

Zu jedem Röhrchen wurden 10 µl 2F5-Verdünnung zugegeben (0,01 µg/µl) und 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 50 µl PM-1-M218 Zell-suspension (4×10^6 Zellen/ml, d.h. 2×10^5 Zellen pro Probe) zugegeben und die Proben erneut 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden nun einmal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen, die pelletierten Zellen in 50 µl Sekundärantikörperlösung (1:50 anti-human-PE) resuspendiert und 30 Minuten lang bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und schließlich für die FACS-Analyse in 200 µl FACS-Fixierungslösung aufgenommen.

Die FACS-Daten wurden in Histogramm-Blots ausgewertet und die „Y Geo Mean“-Werte der gefärbten Zellpopulation als Maß für die Konzentrationsbestimmung herangezogen. Anhand der Eichkurve mit bekannten C46-Fur_o-Peptidkonzentrationen wurden die Konzentrationen der Zellkulturüberstände berechnet.

4.4 Virologische Methoden

4.4.1 Vermehrung von HIV-1

Die Vermehrung von HIV-1-Stämmen erfolgte auf der T-Zelllinie PM-1. 6×10^6 Zellen wurden in 1-2 ml RPMI-standard Medium aufgenommen und mit 1 ml Virussuspension inokuliert. Die Zellen wurden vier Stunden lang bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde weiteres Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 40 ml zugegeben. Die Zellen wurden nun bis zu zwei Wochen lang unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Dabei wurde die Virusvermehrung regelmäßig mikroskopisch (Synzytienbildung) und durch p24-Antigen ELISA überprüft. Der Kultur wurde möglichst wenig frisches Medium zugesetzt, um eine hohe Viruskonzentration beizubehalten. Innerhalb der Kultivierungsphase wurde das Medium ein- bis zweimal mal vollständig gesammelt, filtriert (Ausschlussgröße 0,45 µm) und zur Lagerung bei -80 °C aliquotiert.

4.4.2 HIV-Titerbestimmung

Die Titration von HIV-Suspensionen erfolgte mit Hilfe der Indikator-Zelllinie TZM-bl. Diese Zellen exprimieren CD4, CCR5 und CXCR4 auf der Oberfläche und können daher von HIV infiziert werden. Weiterhin tragen sie ein β -Galaktosidasegen unter Kontrolle eines HIV-Tat abhängigen Promotors (HIV-LTR), so dass das Enzym in HIV-infizierten Zellen exprimiert wird. Nach Zugabe von β -Galaktosidase-Substraten kann die Aktivität des Enzyms in einzelnen Zellen bestimmt und daraus der Virustiter berechnet werden.

5×10^3 TZM-bl Zellen wurden in 100 μ l DMEM-standard Medium pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurden je 100 μ l unterschiedlicher Verdünnungen der HIV-Suspension in Triplikatansätzen zu den Zellen zugegeben und diese unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert. Die eingesetzten Volumina der HIV-Suspension reichten dabei von 0,1 μ l bis 100 μ l pro Well. 48 Stunden nach der Infektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 200 μ l PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 200 μ l -20°C kaltem Methanol/Aceton-Gemisch (1:1) für 2 bis 3 Minuten fixiert, und erneut mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgenommen, je 100 μ l X-Gal-Färbelösung pro Well zugegeben und bei 37°C inkubiert. Nach etwa 1 bis 3 Stunden wurden die blau gefärbten Zellen (= β -Galaktosidaseaktivität = HIV-infiziert) am Mikroskop ausgezählt (nur in Vertiefungen mit maximal 100 gefärbten Zellen). Der Virustiter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Infektiöse Partikel}}{\text{ml}} = \frac{\text{Anzahl der blauen Zellen pro Vertiefung}}{\text{Virusmenge in ml}}$$

4.4.3 *In vitro* Infektionsversuche mit HIV-1

T-Zelllinien oder primäre humane CD4⁺ T-Lymphozyten wurden mit verschiedenen HIV-1-Stämmen infiziert. Je nach Corezeptorexpression konnten dafür CXCR4-trope, CCR5-trope oder dualtrope Viren verwendet werden. Wenn mehrere Virusisolate verglichen werden sollten, wurde die eingesetzte Virusmenge zuvor so titriert, dass bei allen Isolaten eine vergleichbare Replikationsgeschwindigkeit (d.h. vergleichbare p24-Produktion in der Kultur) festzustellen war.

Für die Infektion wurden jeweils C-Peptid sezernierende Zellen sowie native Kontrollzellen eingesetzt, die in der Regel in vorkonditioniertem Medium ausgesät wurden. Der Verlauf der Infektion wurde mikroskopisch (Synzytienbildung) sowie anhand der p24-Produktion verfolgt.

Je $1-3 \times 10^6$ Zellen wurden in 500 μ l vorkonditioniertem Medium pro Vertiefung in 48-Well-Platten ausgesät und das Virus zugegeben. Nach Inkubation für mindestens vier Stunden oder über Nacht wurden die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführt und viermal mit je 8 ml PBS gewaschen. Beim letzten Waschschrift wurden 180 μ l Überstand abgenommen,

um eine Nullwertsbestimmung der p24-Konzentration vorzunehmen. Die pelletierten Zellen wurden in vorkonditioniertem Medium von entsprechenden nicht-infizierten Zellen aufgenommen und als Triplikatansätze in 48-Well-Platten ausgesät.

Die Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert und dabei jeweils möglichst wenig frisches Medium zugesetzt, um die sezernierten Peptide nicht zu verdünnen. Alle drei Tage wurde bei jeder Probe 180 µl Zellkulturüberstand abgenommen und zur Bestimmung der p24-Konzentration mit 20 µl 5%iger NP40-Lösung gemischt. Bei primären Zellen wurde das Medium regelmäßig mit frischem IL-2 supplementiert.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Lyse von Zellen

Zur Untersuchung der Proteinexpression in Zellen wurden diese lysiert und die Zelllysate mittels Western Blot analysiert.

Adhärente Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen, trypsiniert und erneut mit PBS gewaschen. $0,5-1 \times 10^7$ Zellen wurden in 200 µl eiskaltem Lysepuffer resuspendiert, 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei alle 5 Minuten gevortext. Durch das im Lysepuffer enthaltene Detergenz Triton X-100 wurde dabei die Lyse der Zellen hervorgerufen, wobei die Proteine in Lösung gelangten. Durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (10 Minuten, 13.000 rpm) wurden Zelltrümmer, Membranbestandteile und Zellorganelle abgetrennt und die proteinhaltigen Überstände bis zur Weiterverwendung bei -20°C eingefroren.

Zur Untersuchung im Western Blot wurden die Zelllysate mit 3x Ladungspuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung der Proteine 5 Minuten lang auf 95°C erhitzt.

4.5.2 Deglykosylierung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen

Die Deglykosylierung von Proteinen in Zellkulturüberständen und Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des Enzyms PNGaseF (New England Biolabs, Schwalbach). Dieses schneidet alle Klassen von Asparagin (N)-gebundenen Oligosacchariden zwischen der Asparagin-Seitenkette und dem ersten N-Acetylglukosamin-Rest des Zuckerbaums.

Zur Deglykosylierung wurden 50 µl Zelllysate oder 50 µl Zellkulturüberstand mit 0,3 µl PNGaseF (2 U/µl) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur nachfolgenden Untersuchung im Western Blot wurden die Verdauungen mit 3x Ladungspuffer versetzt und 5 Minuten lang auf 95°C erhitzt.

4.5.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation wurden Zellysate zunächst mit 0,03% Protaminsulfat versetzt, 15 Minuten lang auf Eis inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 15.000 rpm zentrifugiert, um chromosomale DNA und Zelltrümmer zu präzipitieren. 166 µl des Überstands wurden abgenommen und mit NP40-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Für die Immunpräzipitation von Zellkulturüberständen wurde 1 ml Überstand verwendet.

Die so vorbereiteten Proben wurden zur Immunpräzipitation mit 1 µg des monoklonalen humanen Antikörpers 2F5 gemischt und 6 Stunden lang bei 4°C auf einem Rotator inkubiert. Protein A Agarose wurde durch dreimaliges Waschen mit je 1 ml NP40-Puffer equilibriert und je 10 µl pro Probe zu den Immunkomplexen zugegeben. Durch Inkubation über Nacht bei 4°C auf einem Rotator wurden diese präzipitiert. Die Protein A Agarose Beads mit den daran gebundenen Proteinen wurden durch Zentrifugation pelletiert (5 Minuten, 500xg) und eine Probe des Zellysat-Überstands für die Actin-Quantifizierung mittels Western Blot zurückgehalten. Die Beads wurden zunächst mit 1 ml NP40-Puffer, danach mit 1 ml Neufeld-Puffer und schließlich mit 1 ml TRIS-HCl-Puffer gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Zu den matrixgebundenen Proteinen wurde 1 µl NEB-Denaturierungspuffer (10x) zugegeben und diese durch 10 Minuten langes Aufkochen bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde ein Deglykosylierungs-Mix (2 µl 10x G7-Puffer, 2 µl 10% NP40-Lösung, 0,2 µl PNGase F (2 U/µl)) zu den Proteinen zugegeben und diese 2 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Die deglykosylierten Proben wurden für die weitere Analyse per SDS-PAGE mit 3x Ladungspuffer versetzt und 10 Minuten lang bei 95°C aufgeköcht.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurden die Gele getrocknet und mittels Autoradiographie (Typhoon 9400, GE Healthcare) analysiert. Die Quantifizierung der Daten erfolgte mit der Software ImageQuant® (GE Healthcare).

4.5.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden Proteine in einem elektrischen Spannungsfeld in einer Polyacrylamid-Gelmatrix gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Diese Auftrennung nach Masse wird durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) erreicht. Dieses komplexiert mit Proteinen, wobei die Zahl der SDS-Moleküle im Komplex proportional zur Masse des Proteins ist (ca. 1,4 g SDS / 1 g Protein). Die SDS-Moleküle verleihen dem Protein eine stark negative Ladung, wogegen die Eigenladungen der Proteine vernachlässigbar klein sind. Die Stärke der negativen Gesamtladung des Komplexes ist somit lediglich von der Zahl der gebundenen SDS-Moleküle abhängig und daher proportional zur Proteinmasse. Im elektrischen Feld erfolgt demzufolge die Auftrennung der Proteine gemäß Molekulargewicht, wobei sich die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine logarithmisch zur deren Masse verhält.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (Laemmli, Beguin & Gujer-Kellenberger, 1970). Hierbei werden die Proteinlösungen

zunächst in einem weitmaschigen Sammelgel konzentriert und auf ein einheitliches Startniveau gebracht, bevor im engmaschigen Trenngel die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht erfolgt.

Es wurden je nach Größe der aufzutrennenden Proteine 12-16%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet. Diese wurden wie folgt hergestellt (jeweils für zwei Gele):

Percent Gel	30% Degassed			
	DDI H ₂ O (ml)	Acrylamide/Bis (ml)	*Gel Buffer (ml)	10% w/v SDS (ml)
4%	6.1	1.3	2.5	0.1
5%	5.7	1.7	2.5	0.1
6%	5.4	2.0	2.5	0.1
7%	5.1	2.3	2.5	0.1
8%	4.7	2.7	2.5	0.1
9%	4.4	3.0	2.5	0.1
10%	4.1	3.3	2.5	0.1
11%	3.7	3.7	2.5	0.1
12%	3.4	4.0	2.5	0.1
13%	3.1	4.3	2.5	0.1
14%	2.7	4.7	2.5	0.1
15%	2.4	5.0	2.5	0.1
16%	2.1	5.3	2.5	0.1
17%	1.7	5.7	2.5	0.1

Trenngel-Puffer: 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8; Sammelgel-Puffer: 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8

Die Polymerisation wurde jeweils durch Zugabe von 50 µl 10%iger APS-Lösung und 5 µl TEMED (beim Sammelgel 10 µl TEMED) ausgelöst. Anschließend wurde die Trenngel-Lösung zwischen die beiden Glasplatten der Gießapparatur (Bio-Rad) eingefüllt und mit Isopropanol beschichtet, um eine glatte Geloberfläche zu erzeugen. Nach der vollständigen Polymerisation des Gels (nach etwa 45 Minuten) wurde das Isopropanol entfernt, die Geloberfläche mit Wasser gewaschen und verbliebene Feuchtigkeit mit einem Filterpapier entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel mit APS und TEMED versetzt, eingegossen und zur Ausformung von Geltaschen ein Kamm eingesetzt. Nach etwa 30 Minuten wurde das vollständig auspolymerisierte Gel in eine Elektrophorese-Apparatur eingesetzt und diese bis über die Oberkante des Gels mit Laufpuffer befüllt.

Der Kamm wurde entfernt, die Taschen mit Laufpuffer gespült und mit den vorbereiteten Proteinlösungen (mit 3x Ladungspuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht) befüllt. Zusätzlich wurden in eine Geltasche 6-10 µl eines Größenmarkers eingefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von zunächst 150 V für 15-30 Minuten und anschließend bei 180 V für weitere 45-60 Minuten.

4.5.5 Coomassie-Färbung von Proteinen

Die Coomassie-Färbung von zuvor per SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen erfolgte mit der PageBlue™ Protein Staining Solution (Fermentas) gemäß Herstellerangaben.

4.5.6 Elektro-Blotting (Western Blot)

Beim Elektro-Blotting werden Proteine, die zuvor in einer SDS-PAGE nach Masse aufgetrennt wurden, durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wobei ein originalgetreues Abbild des Gels auf der Membran entsteht.

Die Membran wurde hierfür in der Größe des Gels zurechtgeschnitten, durch kurzes Einweichen in Wasser aktiviert und anschließend zweimal mit jeweils 10 ml Transferpuffer 5 Minuten lang gewaschen. Die benötigten Filterpapiere wurden etwa 5 Minuten lang in Transferpuffer getränkt. Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten der Gelapparatur gelöst, das Sammelgel verworfen und das Trenngel ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht.

Auf der Anode der Semi Dry-Blot Apparatur (Bio-Rad) wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt: 1. Filterpapier, 2. Membran, 3. Gel, 4. Filterpapier. Das Gel und die Membran wurden dabei luftblasenfrei aufgelegt, um einen vollständigen Blot aller Proteine auf die Membran zu erreichen. Die Kathode wurde aufgesetzt und die Blot-Apparatur mit dem Deckel geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte 30 Minuten lang bei einer konstanten Spannung von 15 V. Die Effizienz des Proteintransfers wurde durch etwa 2 Minuten lange Inkubation der Membran in Ponceau S Lösung überprüft. Die Färbelösung wurde anschließend mit PBST ausgewaschen.

4.5.7 Immundetektion durch Chemilumineszenz

Die Detektion der auf eine Membran transferierten Proteine kann durch Inkubation mit spezifischen primären und Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern erfolgen. Die Peroxidase wird dabei mit einem geeigneten Substrat inkubiert, z.B. mit Luminol. Dieses wird von der Peroxidase in alkalischer Lösung und in Gegenwart von molekularem Sauerstoff in ein instabiles energiereiches Intermediat oxidiert. Das Intermediat geht unter Lichtemission spontan in den Grundzustand über, wobei die Lichtsignale durch Auflegen eines Films detektiert werden können.

Nach dem Blotten von Proteinen auf eine Membran wurde diese zwei Stunden lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C unter Schwenken mit 50 ml 5% MPBST inkubiert, um proteinfreie Stellen der Membran mit Milchproteinen abzusättigen und somit die unspezifische Bindung von Primärantikörpern zu verhindern. Der Primärantikörper wurde in 10 ml 5% MPBST verdünnt, wie in Tabelle 3.2 angegeben, und die Membran darin zwei Stunden lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal 7 bis 8 Minuten lang mit jeweils 20 ml PBST gewaschen und danach mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in 10 ml 5% MPBST wie in Tabelle 3.3 angegeben) eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde danach sechsmal 5 Minuten lang mit jeweils 20 ml PBST gewaschen.

Zur Entwicklung der Chemilumineszenz wurde die Membran 5 Minuten lang mit der Substrat-Lösung der Peroxidase inkubiert („ECL™ Western Blot Detection Kit“, je 750 µl Reagenz A und B oder „ECL Plus™ Western Blot Detection Kit“, 1,5 ml Lösung 1 und 37,5 µl Lösung 2). Die ECL-Lösung wurde anschließend vorsichtig von der Membran abgetupft und

die Membran in einer Plastikhülle in eine „Hypercassette™“-Filmkassette (GE Healthcare) eingelegt. Unter Rotlicht wurden im Fotolabor „Hyperfilm™ ECL“-Filme (GE Healthcare) mit unterschiedlichen Expositionszeiten auf die Membran aufgelegt und entwickelt.

4.5.8 Stripping und erneute Antikörperfärbung von Membranen

Das vollständige Entfernen gebundener Antikörper von einer Western Blot-Membran wird als Stripping bezeichnet und ermöglicht das mehrmalige Detektieren von Proteinen mit unterschiedlichen Antikörpern. Durch 30-minütige Inkubation mit Stripping-Puffer bei 50 °C wurden gebundene Antikörper von Membranen entfernt und die Membranen anschließend dreimal 10 Minuten lang mit jeweils 15 ml PBST und dreimal 5 Minuten lang mit PBS gewaschen. Nach erneutem Blockieren der Membran mit 5% MPBST konnte eine weitere Antikörperfärbung, wie in Abschnitt 4.5.7 beschrieben, durchgeführt werden.

4.5.9 p24-Antigen ELISA

Zur Bestimmung der p24-Antigenkonzentration in Zellkulturüberständen wurden zunächst 180 µl des entsprechenden Überstands mit 20 µl 5%iger NP40-Lösung gemischt, um HIV zu inaktivieren. Anschließend wurde der p24-Antigen-ELISA von Innogenetics nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

4.6 Statistische Methoden

Alle statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 5.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) durchgeführt.

4.6.1 Analyse von Dosis-Wirkungskurven

Sigmoidale Dosis-Wirkungskurven wurden nach logarithmischer Transformation der Daten durch nicht-lineare Regression errechnet. Dabei wurden folgende Einstellungen bei GraphPad Prism vorgenommen:

- (1) Dose-Response – Inhibition
- (2) log(inhibitor) vs. normalized response – Variable slope

Die IC₅₀-Werte von Dosis-Wirkungs-Regressionskurven wurden anhand von „Akaike’s Information Criteria“ (AICc) miteinander verglichen und auf signifikante Unterschiede überprüft. Dabei wurde eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% für Unterschiede in den IC₅₀-Werten als statistisch signifikant angesehen.

4.6.2 Analyse von Infektionsverläufen

Die Infektionsverläufe (p24-Produktion) in HIV-infizierten Zellkulturen, die zuvor mit einem iSAVE-codierten gammaretroviralen Vektor transduziert oder mock-transduziert worden waren, wurden wie folgt auf statistisch signifikante Unterschiede analysiert.

Der Infektionsverlauf jedes Replikats wurde zunächst als Kurve dargestellt und die Fläche unter der Kurve (AUC, *area under the curve*) berechnet. Die AUC-Werte der Replikate einer jeden Gruppe wurden anschließend mittels Mann-Whitney-U-Test miteinander auf statistisch signifikante Abweichungen überprüft. Alle Fragestellungen waren dabei einseitig, denn in Vorversuchen wurde gezeigt, dass sich bei den mit iSAVE-codierenden Vektoren transduzierten Zellen die p24-Werte gegenüber den mock-transduzierten Zellen verringern. Bei Fehlerwahrscheinlichkeiten $P < 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

4.6.3 Analyse von Gruppenmittelwerten

Gruppenmittelwerte wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße mittels des parameterfreien Mann-Whitney-U-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Fragestellungen waren dabei entweder einseitig oder zweiseitig. Bei Fehlerwahrscheinlichkeiten $P < 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Sequenzverlängerung verbessert die Sekretion von C-Peptiden

Peptide, die kürzer als ~50-80 Aminosäuren sind, wie die antiretroviralen C-Peptide, werden von eukaryotischen Zellen äußerst schlecht sezerniert (Eskridge & Shields, 1983; Lipp et al., 1987; Okun et al., 1990). Für den effizienten Export *in vivo* sezernierter antiviraler Eintrittsinhibitoren (iSAVE), die auf dem C-Peptid C46 basieren, ist es demzufolge erforderlich, die Größenbeschränkung bei den ersten Schritten des Sekretionswegs zu umgehen. Es sollte daher zunächst die minimale Peptidlänge ermittelt werden, die eine effiziente Sekretion erlaubt, indem unterschiedlich lange iSAVE-Peptid-Varianten generiert und hinsichtlich Sekretionseffizienz analysiert wurden. Den Kernbereich aller iSAVE-Peptid-Konstrukte bildet das C46-Peptid. Dieses wurde in einigen Konstrukten um flankierende Bereiche aus dem HIV-Genom und weitere Linker verlängert. Zur Expression der iSAVE-Peptide dienen jeweils gammaretrovirale Vektoren, die vom murinen Leukämievirus (MLV) abgeleitet sind (Abbildung 5.1).^a

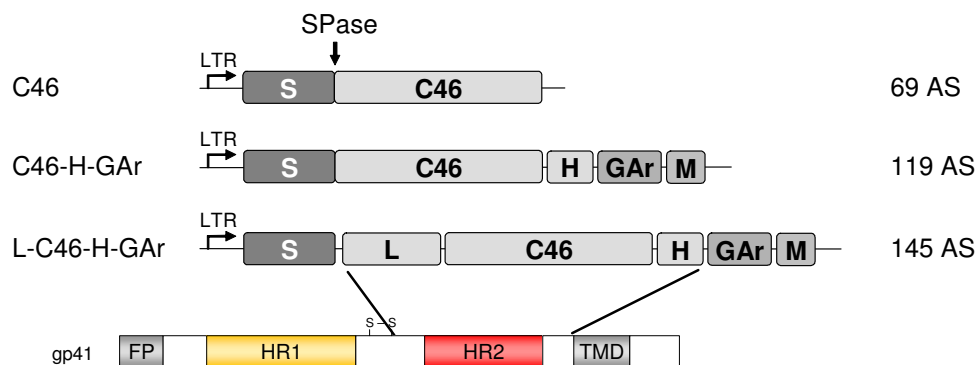


Abbildung 5.1 | Aufbau der verlängerten iSAVE-Peptide

Schematischer Aufbau der verlängerten iSAVE-Peptide, die jeweils von gammaretroviralen Vektoren codiert werden. Die Länge aller Konstrukte in Aminosäuren (AS) ist angegeben. SPase: Schnittstelle für die Signalpeptidase, LTR: *long terminal repeat*, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*, H: *hinge* / membranproximale Region von HIV-1 gp41, GAr: Glycin-Alanin Repeat, M: c-Myc-Tag, L: *loop* von HIV-1 gp41. FP: Fusionspeptid, HR1/HR2: N- bzw. C-terminale *heptad repeat* Region, TMD: Transmembrandomäne.

^a Die Klonierungsstrategien zur Generierung der Vektoren sind im Abschnitt 4.2 beschrieben. Die Sequenzen der offenen Leserahmen sind im Anhang aufgeführt. Eine Übersicht des Aufbaus aller klonierten iSAVE-Konstrukte findet sich zur besseren Orientierung während des Lesens in einer ausklappbaren Karte auf der letzten Seite dieser Arbeit.

Es wurden zunächst drei unterschiedlich lange iSAVE-Peptid-Varianten kloniert. Das erste Konstrukt, welches in nachfolgenden Sekretionsversuchen als Negativkontrolle diente, bestand lediglich aus C46 und einem aminoterminalen Signalpeptid (S; abgeleitet vom humanen *tissue-type plasminogen activator*) (Konstrukt C46). Dieses Peptid umfasst 67 Aminosäuren und ist somit voraussichtlich zu kurz, um effizient in den Sekretionsweg eingeschleust zu werden. Für die Generierung des zweiten Konstrukts C46-H-GAR wurde die C46-Sequenz am Carboxylterminus um 12 Aminosäuren aus der membranproximalen Region von gp41 (hier bezeichnet als *hinge*, H; Aminosäuren 674-685 von HIV-1_{HXB2} Env) verlängert. Zusätzlich wurden ein Glycin-Alanin Repeat (GAR; 18 AS) und ein c-Myc-Tag (M; 10 AS) angefügt, wodurch das Peptid insgesamt 119 Aminosäuren umfasste. Das dritte Konstrukt L-C46-H-GAR enthält weitere 23 Aminosäuren aus gp41 (*loop*, L; Aminosäuren 605-627 von HIV-1_{HXB2} Env) am N-terminus von C46, was die Gesamtlänge des Proteins auf 145 Aminosäuren erhöht.

Der Glycin-Alanin Repeat der Konstrukte C46-H-GAR und L-C46-H-GAR ist vom Epstein-Barr-Virus Nukleus Antigen 1 abgeleitet und verhindert die Präsentation von Peptidfragmenten auf dem Klasse I MHC-Komplex (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997; Tellam et al., 2001). Die Präsentation potentiell immunogener Peptide, die aus dem verlängerten iSAVE-Peptid stammen, sollte somit unterbunden werden, so dass die genmodifizierten Zellen der Zerstörung durch das Immunsystem entgehen könnten.

Expression und Sekretion der iSAVE-Peptid-Konstrukte wurden durch Transfektion von 293T-Zellen mit den entsprechenden gammaretroviralen Vektoren und anschließende Analyse von Zelllysaten und Zellkulturüberständen mittels Western Blot überprüft (Abbildung 5.2). Zur Detektion wurde der monoklonale humane Antikörper 2F5 verwendet, welcher ein Epitop innerhalb der C46-Sequenz erkennt (siehe Abbildung 2.5).

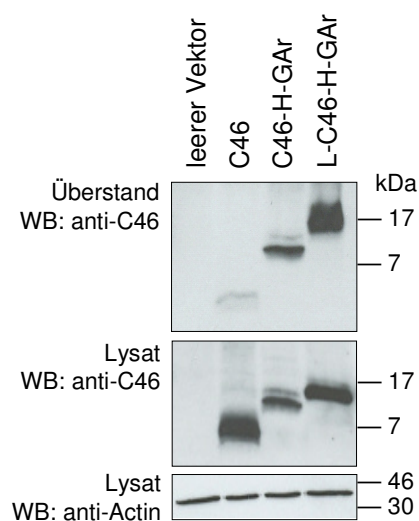


Abbildung 5.2 | Verlängerung von C46 steigert die Sekretionseffizienz

293T-Zellen wurden mit gammaretroviralen Vektoren transfiziert, die die angegebenen iSAVE-Peptid-Varianten codieren. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert. Deglykosylierte Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden im Western Blot (WB) analysiert. Die Detektion der C-Peptid-Konstrukte erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 2F5. Um sicherzustellen, dass für jede Probe vergleichbare Zellzahlen verwendet wurden, wurde der Lysat-Blot gestrippt und nochmals mit einem anti-Actin-Antikörper gefärbt.

Durch Untersuchung der Lysate der transfizierten Zellen konnte eine einheitliche Expression aller iSAVE-Peptid-Varianten nachgewiesen werden. Im Zellkulturüberstand dagegen waren nur die beiden verlängerten C-Peptid-Varianten detektierbar, nicht jedoch das Basiskonstrukt C46. Das kurze C46-Peptid konnte offenbar nicht in den zellulären Sekretionsweg eingeschleust werden und wurde stattdessen vermutlich direkt in das Cytosol freigesetzt, so dass es nur intrazellulär nachweisbar war. Es lässt sich somit feststellen, dass die schrittweise Verlängerung des C46-Peptids mit einer deutlichen Verbesserung der Sekretionseffizienz einhergeht.

5.2 N-Glykane sind für die effiziente Sekretion verlängerter C-Peptide unerlässlich

N-Glykosylierungen spielen eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung und unterstützen im Allgemeinen die Sekretion von Polypeptiden und Proteinen (Gahmberg & Tolvanen, 1996; Kadowaki et al., 2000; Ray et al., 1998; Zhou et al., 2004). Im Fall sezernierter C-Peptide könnten umfangreiche N-Glykosylierungen jedoch die antivirale Aktivität beeinträchtigen, indem sie die Anlagerung der Peptide an die Zielstruktur in gp41 sterisch blockieren.

Der Einfluss von N-Glykanen auf Sekretion und antivirale Aktivität der iSAVE-Peptide wurde daher anhand des am besten sezernierten Konstrukts L-C46-H-GAr näher untersucht. Dieses enthält fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, davon drei in der *loop*-Sequenz (L1, L2 und L3) sowie jeweils eine weitere in C46 und in der *hinge*-Region (H) (Abbildung 5.3).

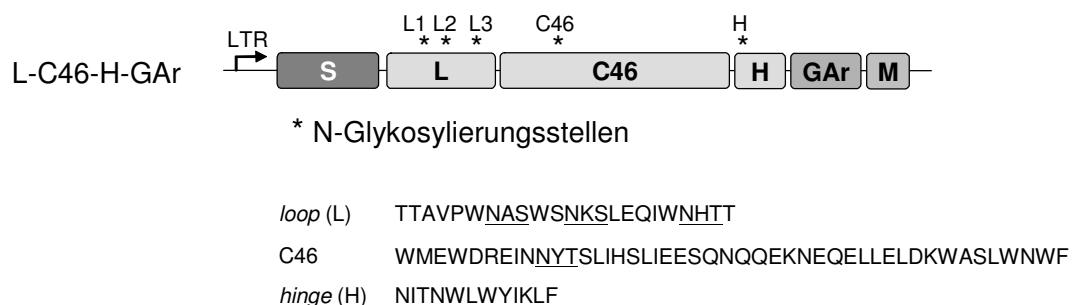


Abbildung 5.3 | Potentielle N-Glykosylierungsstellen in L-C46-H-GAr

In der iSAVE-Peptid-Variante L-C46-H-GAr befinden sich fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen (*); L1, L2, L3, C46 und H. Die Signalsequenzen für die Anheftung der N-Glykane (Konsensussequenz N-X-S/T) sind in den Sequenzen der jeweiligen Module des verlängerten iSAVE-Peptids durch Unterstreichung hervorgehoben. LTR: *long terminal repeat*, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*, L: *loop* von HIV-1 gp41, H: *hinge* / membranproximale Region von HIV-1 gp41, GAr: Glycin-Alanin Repeat, M: c-Myc-Tag.

Durch Einfügen von Punktmutationen in der Konsensussequenz N-X-S/T wurden einzelne N-Glykosylierungsstellen in L-C46-H-GAR mittels gerichteter Mutagenese zerstört. In den Konstrukten L1mut, L2mut, L3mut, C46mut bzw. Hmut wurde jeweils eine N-Glykosylierungsstelle mutiert. In L1-2mut wurden sowohl L1 als auch L2 zerstört, im Konstrukt 5xmut wurden schließlich alle fünf potentiellen N-Glykosylierungsstellen entfernt.

5.2.1 Expression und Sekretion der N-Glykosylierungsvarianten

Die Expression und Sekretion der mutierten L-C46-H-GAR-Glykosylierungsvarianten wurden durch Transfektion von 293T-Zellen mit den entsprechenden gammaretroviralen Vektoren und anschließende Analyse von Zelllysaten und Zellkulturüberständen mittels Western Blot untersucht. Zur Abschätzung der Peptidkonzentration in den Überständen wurden gleiche Volumina unterschiedlich konzentrierter Lösungen des synthetischen C46-Peptids parallel im Western Blot analysiert. Die 293T-Lysate und Überstände wurden zuvor mit Hilfe des Enzyms PNGase F deglykosyliert, um eine einheitliche Detektion aller Konstrukte mit dem 2F5-Antikörper zu gewährleisten (Abbildung 5.4).

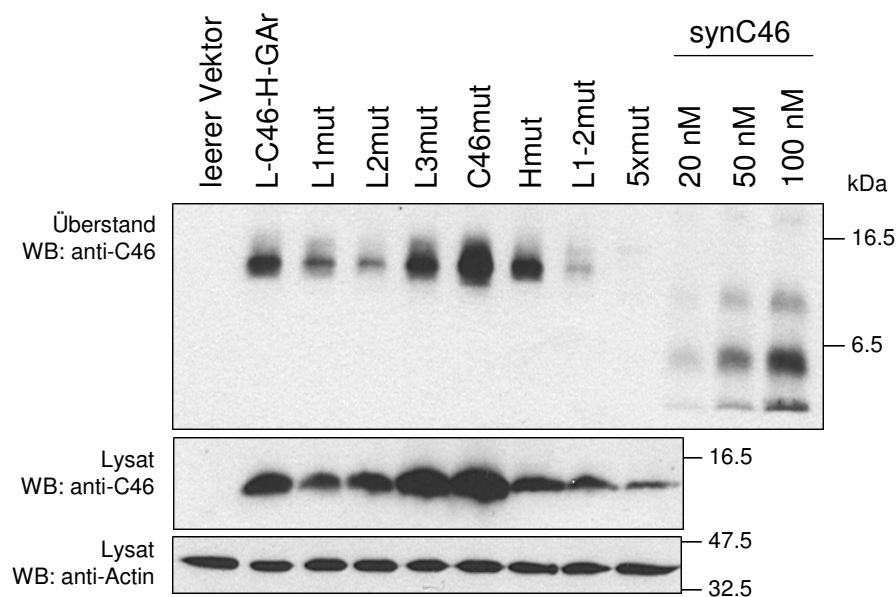


Abbildung 5.4 | N-Glykosylierungen sind für effiziente C-Peptidsekretion unabdingbar

293T-Zellen wurden mit gammaretroviralen Vektoren transfiziert, die mutierte Varianten des verlängerten iSAVE-Peptids L-C46-H-GAR codieren. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit dem leeren Vektor transfiziert. Deglykosylierte Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden im Western Blot (WB) analysiert. Zur Abschätzung der Peptidkonzentrationen in Überständen wurden gleiche Volumina von unterschiedlich konzentrierten Lösungen des synthetischen C46-Peptids (synC46) parallel analysiert. C-Peptid-Konstrukte wurden mit dem Antikörper 2F5 detektiert. Um sicherzustellen, dass für jede Probe vergleichbare Zellzahlen verwendet wurden, wurde der Lysat-Blot gestrippt und nochmals mit einem anti-Actin-Antikörper gefärbt.

Die Punktmutation einer einzelnen N-Glykosylierungsstelle in L-C46-H-GAr hatte nur geringe Auswirkungen auf Expression und Sekretion der entsprechenden Peptide. Die Konzentration im Überstand betrug sowohl für das L-C46-H-GAr-Konstrukt als auch für die Einzelmutanten jeweils etwa 100 nM und war lediglich bei der Variante L2mut niedriger (ca. 50 nM). Für das Konstrukt L1-2mut dagegen, dem zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen fehlen, war im Vergleich mit dem Ausgangskonstrukt L-C46-H-GAr ein deutlicher Rückgang der Sekretion zu beobachten (Konzentration ca. 20 nM). Bei Mutation aller N-Glykosylierungsstellen in der Variante 5xmut war die Peptidmenge im Zellysate reduziert und es war keine Sekretion in den Überstand mehr nachweisbar.

5.2.2 Antivirale Aktivität der N-Glykosylierungsvarianten

Die Fähigkeit der mutierten iSAVE-Peptide, den HIV-Eintritt zu inhibieren, wurde in einem funktionellen Assay (*single-round infection assay*) mit replikationsinkompetentem HIV-1 untersucht. Dazu wurden lentivirale Vektoren, die als Markergen eGFP codierten, in Viruspartikel mit dem HIV-1_{HXB2} Hüllprotein verpackt. Die Produktion der iSAVE-Peptide erfolgte in transfizierten 293T-Zellen, wobei zwei Tage nach der Transfektion die Überstände gesammelt und die darin enthaltenen Peptidkonzentrationen per Western Blot abgeschätzt wurden (siehe Abbildung 5.4).

Die T-Zelllinie PM-1 wurde in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen der iSAVE-Peptide mit dem replikationsinkompetenten eGFP-codierende HI-Virus transduziert. Als Positivkontrolle wurde das synthetisch hergestellte C46-Peptid zur Inhibition des Viruseintritts verwendet. Fünf Tage nach der Transduktion wurde der Prozentsatz eGFP-positiver Zellen in jeder Probe mittels FACS bestimmt. Funktionale iSAVE-Peptide sollten durch ihre fusionsinhibierende Wirkung den Eintritt der Viruspartikel in die Zellen hemmen, und somit die Transduktionsrate konzentrationsabhängig reduzieren (Abbildung 5.5).

Das Ausgangskonstrukt L-C46-H-GAr zeigte keine inhibitorische Aktivität. Auch führte die Deletion von N-Glykosylierungsstellen zu keiner Steigerung der antiviralen Wirksamkeit, obwohl die mittels Western Blot bestimmten Peptidkonzentrationen in den verwendeten 293T-Überständen deutlich über der IC₅₀-Konzentration für die Hemmung des Viruseintritts durch das synthetische C46-Peptid (4-5 nM) lagen.

Eine Steigerung der antiviralen Aktivität der iSAVE-Peptide konnte durch Entfernen von N-Glykanen nicht erreicht werden. Die Architektur der verlängerten iSAVE-Peptide scheint also in den im Zellkulturüberstand vorliegenden Konzentrationen eine Hemmung des Viruseintritts nicht zuzulassen.

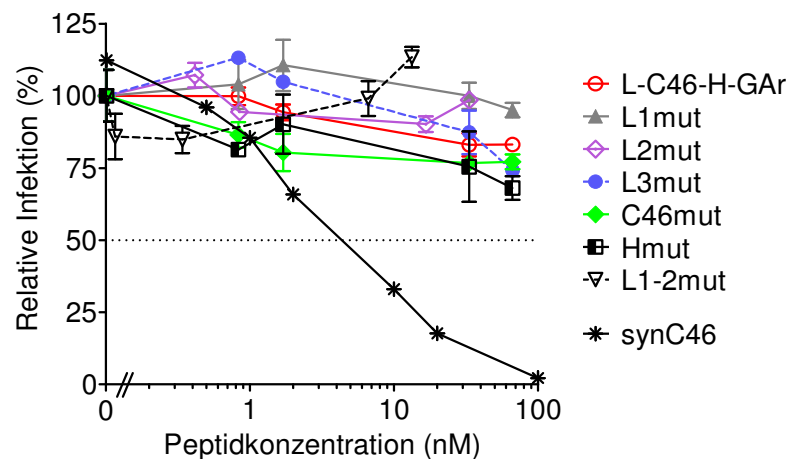


Abbildung 5.5 | Die antivirale Aktivität der verlängerten iSAVE-Peptide ist gering

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren, transduziert. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen der iSAVE-Peptide oder als Positivkontrolle synthetisches C46-Peptid (synC46) zugegeben. Der Anteil eGFP-positiver Zellen in jeder Probe wurden durchflusszytometrisch bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionsrate von 11% entspricht.

5.3 Multimerisierung steigert die Expression und Sekretion von C-Peptiden

Die zuvor beschriebenen verlängerten iSAVE-Peptid-Varianten zeigten kaum eine Hemmung des HIV-Eintritts, wurden jedoch gut sezerniert, so dass sie eine gute Grundlage für die Entwicklung potenterer C-Peptid-Varianten darstellen. Nimmt man an, dass das Konstrukt L-C46-H-GAr eine basale minimale inhibitorische Wirkung hat, so könnte diese eventuell durch weitere Steigerung der Sekretion zum Vorschein gebracht werden.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von C46 durch Bindung an die Multimerisierungsdomäne des humanen Plasma-Glykoproteins C4bp deutlich gesteigert wird (Dervillez et al., 2006). Es wurde daher versucht durch den Einbau eines multimerisierenden Linkers die Sekretion der verlängerten iSAVE-Peptide so weit zu erhöhen, dass auch bei geringer antiviraler Aktivität der sezernierten Peptide der HIV-Eintritt sichtbar gehemmt werden kann.

Hierfür wurde ein von humanem IgG2 abgeleiteter Linker (IgC, 19 AS), der vier Cysteinreste enthält, verwendet. Dieser wurde anstelle von GAR in das Konstrukt L-C46-H-GAr eingesetzt, wodurch das Konstrukt L-C46-H-IgC generiert wurde (Abbildung 5.6). Weiterhin wurde als Kontrolle eine zusätzliche Peptid-Variante kloniert, in der die für die Multimerisierung erforderlichen Cysteine im IgC-Linker durch Serine substituiert waren (L-C46-H-IgS).

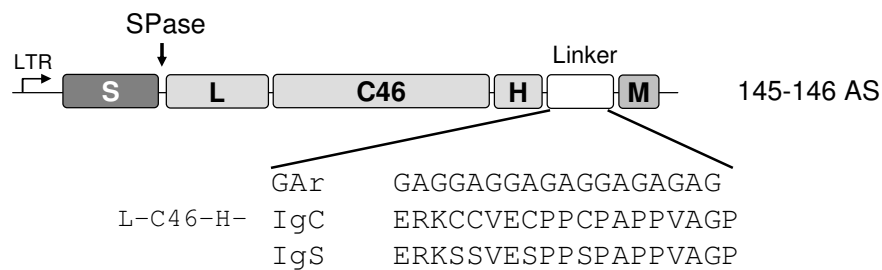


Abbildung 5.6 | Aufbau der C-Peptide mit verschiedenen Linkern

Schematischer Aufbau der iSAVE-Peptid-Varianten mit verschiedenen Linkern. Die Länge der Konstrukte in Aminosäuren (AS) ist angegeben. Zu Serinen (S) mutierte Cysteine (C) in der IgS-Linkersequenz sind hervorgehoben. SPase: Schnittstelle für die Signalpeptidase, LTR: *long terminal repeat*, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*, L: *loop* von HIV-1 gp41, H: *hinge* von HIV-1 gp41, GAr: Glycin-Alanin Repeat, M: c-Myc-Tag.

5.3.1 Expression und Sekretion der multimeren Peptid-Variante

Zur Untersuchung von Expression und Sekretion der iSAVE-Peptid-Varianten mit unterschiedlichen Linkersequenzen wurden 293T-Zellen mit den entsprechenden gammaretroviralen Vektoren transfiziert. Zelllysate und Überstände wurden mittels Western Blot analysiert, wobei zur Abschätzung der Menge sezernierter Peptide parallel Verdünnungen des synthetischen C46-Peptids untersucht wurden (Abbildung 5.7).

Die Substitution von GAr mit dem IgC-Linker führte zu Multimerisierung des Peptids (Abbildung 5.7 b) und resultierte in einer etwa fünffach verstärkten Expression und Sekretion. Die L-C46-H-IgC-Peptidkonzentration im Überstand der transfizierten Zellen wurde mittels Western Blot auf etwa 250 nM geschätzt, während die Konzentration des Ausgangskonstrukts L-C46-H-GAr bei etwa 50 nM lag (Abbildung 5.7 a). Die Steigerung der Sekretion beruhte eindeutig auf der Multimerisierung des Peptids über die Cysteinreste innerhalb der IgC-Sequenz, denn deren Punktmutation zu Serin (L-C46-H-IgS) reduzierte die Sekretion wieder auf etwa 50 nM und somit auf die Konzentration, die mit dem Ausgangskonstrukt L-C46-H-GAr erreicht wurde.

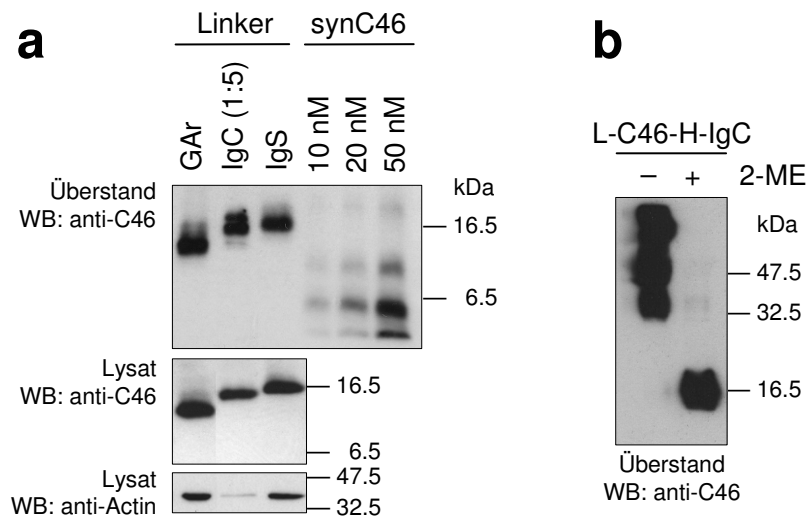


Abbildung 5.7 | Multimerisierung erhöht Expression und Sekretion von iSAVE-Peptiden

293T-Zellen wurden mit den angegebenen gammaretroviralen Vektoren transfiziert. Deglykosylierte Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden im Western Blot (WB) analysiert. C-Peptid-Konstrukte wurden dabei mit dem Antikörper 2F5 detektiert. (a) Die Proben wurden unter reduzierenden Bedingungen aufgetragen, wobei die L-C46-H-IgC Proben zuvor 1:5 verdünnt wurden. Zur Abschätzung der Peptidkonzentrationen in den Überständen wurden gleiche Volumina unterschiedlich konzentrierter Lösungen von synthetischem C46-Peptid (synC46) parallel analysiert. Um sicherzustellen, dass für jede Probe vergleichbare Zellzahlen verwendet wurden, wurde der Lysat-Blot gestrippt und mit einem anti-Actin-Antikörper gefärbt. (b) L-C46-H-IgC-Überstand wurde vor dem Auftragen auf das Gel durch Zugabe von 2-Mercaptoethanol (2-ME) reduziert (+) oder nativ (-) belassen.

5.3.2 Antivirale Aktivität der multimeren Peptid-Variante

Die antivirale Aktivität der iSAVE-Peptide mit verschiedenen Linkersequenzen wurde in einem funktionellen *single-round infection assay* wie oben beschrieben untersucht. PM-1 T-Zelllinien wurden dabei in Anwesenheit von peptidhaltigen 293T-Überständen oder synthetischem C46 mit replikationsinkompetenten lentiviralen Vektoren, die mit HIV-1_{HXB2} Hüllproteinen verpackten waren, transduziert. Der Anteil transduzierter Zellen wurde fünf Tage später durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 5.8).

Obwohl die eingesetzten Konzentrationen der rekombinanten C-Peptid-Konstrukte laut der Konzentrationsabschätzung (Western Blot) weit über der IC₅₀ des synthetischen C46 (4-5 nM) lagen, konnte keine der getesteten iSAVE-Peptid-Varianten die Transduktion der Zielzellen mit dem lentiviralen Vektor inhibieren. Auch die deutliche Erhöhung der Peptidkonzentration im L-C46-H-IgC-Überstand aufgrund der Multimerisierung beeinflusste den Viruseintritt nicht, so dass davon auszugehen ist, dass C46 im Kontext der verlängerten iSAVE-Peptide seine antivirale Aktivität weitgehend eingebüßt hat.

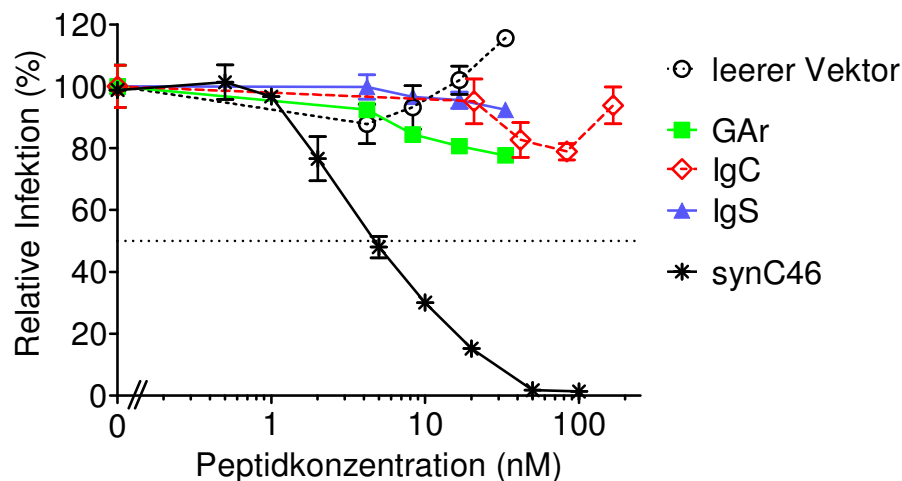


Abbildung 5.8 | Multimerisierung hat keinen Einfluss auf die antivirale Aktivität

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren, transduziert. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen der sezernierten C-Peptide zugesetzt. Als Positivkontrolle wurde das synthetische C46-Peptid (synC46) verwendet. Der Anteil eGFP-positiver Zellen in jeder Probe wurde durchflusszytometrisch bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionsrate von 6,5% entspricht.

Anhand der bislang gewonnenen Erkenntnisse konnten einige allgemeingültige Grundsätze für die erfolgreiche Expression und Sekretion kurzer Peptide bestätigt werden. Die Effizienz der Einschleusung von Peptiden in den Sekretionsweg ist klar mit der Peptidlänge verbunden, so dass durch Sequenzverlängerungen eine deutliche Verbesserung der Sekretion erreicht werden konnte. Darüber hinaus wurde durch Multimerisierung von Peptiden die Sekretionseffizienz deutlich gesteigert.

Auch konnte gezeigt werden, dass N-Glykane den effizienten Export von Proteinen maßgeblich unterstützen und dass die Mutation von N-Glykosylierungsstellen den weitgehenden Verlust der Sekretion zur Folge hat.

5.4 Concatemerisierung erhöht die Sekretion und bewahrt die antivirale Aktivität

Da alle zuvor beschriebenen Verlängerungen des C46-Peptids stets mit gesteigerter Sekretionseffizienz, aber auch mit dem Verlust der antiretroviralen Aktivität einhergegangen waren, wurde eine grundlegend veränderte Strategie zur Generierung inhibitorisch wirksamer iSAVE-Peptide entwickelt. Das C46-Peptid sollte dabei als Teil eines größeren Vorläuferproteins synthetisiert werden, um den effizienten Eintritt in den Sekretionsweg zu gewährleisten, anschließend jedoch wieder aus diesem Gerüst herausgelöst werden, um die antivirale Aktivität zu bewahren.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene C46-Concatemer-Varianten entwickelt. Alle Konstrukte bestehen aus einem N-terminalen Signalpeptid für die Einschleusung in den Sekretionsweg sowie zwei C46-Peptiden, die über einen proteolytisch spaltbaren Linker verbunden sind. Der Linker beinhaltet das Erkennungsmotiv R-X-K/R-R für die Spaltung durch die ubiquitär exprimierte Proprotein-Convertase Furin (Hosaka et al., 1991; Watanabe et al., 1992) (Abbildung 5.9).

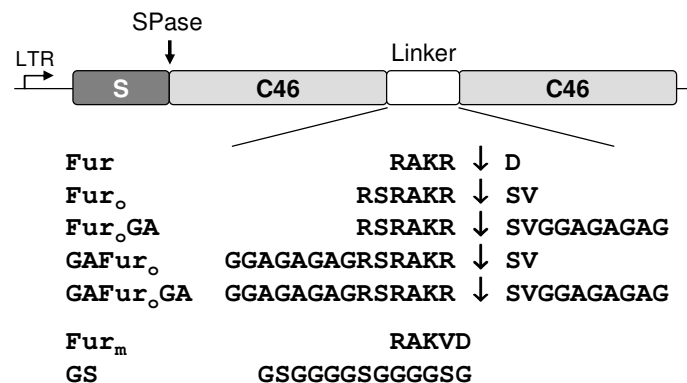


Abbildung 5.9 | Aufbau der C46-Concatemere

Schematischer Aufbau der C46-Concatemere, die jeweils von gammaretroviralen Vektoren codiert werden. Die einzelnen Konstrukte unterscheiden sich lediglich im Linker, die Aminosäuresequenzen für die verwendeten Linker sind jeweils angegeben. Linkersequenzen mit dem Konsensusmotiv RAKR können von Furin geschnitten werden (↓), die Linker Fur_m und GS werden dagegen nicht prozessiert. LTR: *long terminal repeat*, SPase: Schnittstelle für die Signalpeptidase, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*.

Das Konstrukt Fur enthält als Verbindung zwischen den beiden antiviralen C46-Peptiden lediglich eine minimale Furin-Konsensussequenz (RAKR ↓ D), während das Kontrollkonstrukt Fur_m eine mutierte Version dieser Schnittstelle enthält (RAKVD). Hierbei wurde das für die Proteolyse zwingend erforderliche Arginin N-terminal der Schnittstelle durch Valin ersetzt, so dass diese Sequenz von Furin nicht gespalten werden kann. In einem weiteren Kontrollkonstrukt (GS) wurden die beiden C46-Einheiten mit einem flexiblen, nicht spaltbaren, 13 Aminosäuren langen Glycin-Serin-Linker verbunden.

Da die Aminosäuresequenz, welche das minimale Furin-Konsensusmotiv direkt umgibt, die Erkennung und Prozessierung durch die Protease beeinflussen kann (Duckert, Brunak & Blom, 2004; Henrich et al., 2003; Hosaka et al., 1991; Jean et al., 1995; Krysan, Rockwell & Fuller, 1999; Liu et al., 1993), wurden weitere Linker-Varianten konstruiert. Zunächst wurde mit Hilfe der von P. Duckert und Kollegen entwickelten Software ProP zur Vorhersage von Furinschnittstellen (Duckert et al., 2004) die Schnittstelle zu RSRAKR ↓ SV optimiert (Konstrukt Fur_o).

Es ist außerdem bekannt, dass sich Furinschnittstellen gewöhnlich inmitten einer Helix-loop-Helix-Struktur befinden (Oliva et al., 2002; Tsuneoka et al., 1993). In den Arbeiten von Abrami, Chen und Sen, konnte zudem gezeigt werden, dass mehrere Furin-Substrate in einer flexiblen Schleife innerhalb des Vorläufermoleküls gespalten werden (Abrami et al., 1998; Chen et al., 1998; Sen et al., 2007). Die optimimierte Furinschnittstelle wurde daher zusätzlich verlängert, um die Ausbildung einer flexiblen Schleife zu ermöglichen und so die Zugänglichkeit der Schnittstelle für Furin zu erhöhen. Hierfür wurde an einer oder beiden Seiten der Fur_o-Schnittstelle jeweils ein acht Aminosäuren langer flexibler Glycin-Alanin Repeat (GA) angefügt und somit die Konstrukte Fur_oGA, GAFur_o und GAFur_oGA generiert.

5.4.1 Sekretion und Prozessierung der C46-Concatemere

Sekretion und Prozessierung der C46-Concatemere wurden in transfizierten 293T-Zellen analysiert. Hierfür wurden die Zellkulturüberstände mittels Western Blot untersucht (Abbildung 5.10).

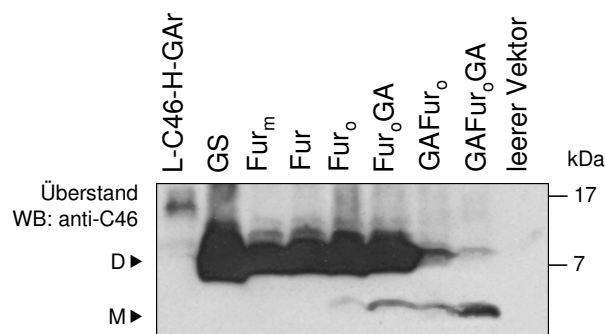


Abbildung 5.10 | Prozessierung in Monomere nach Optimierung des Furinlinkers

293T-Zellen wurden mit den angegebenen gammaretroviralen Vektoren transfiziert. Deglykosylierte Zellkulturüberstände wurden im Western Blot (WB) analysiert. C-Peptid-Konstrukte wurden dabei mit 2F5 detektiert. D: Dimer / unprozessiertes Concatemer, M: Monomer / geschnittenes Concatemer.

Sowohl für das Konstrukt Fur mit der minimalen Furin-Konsensussequenz als auch für die beiden Kontrollkonstrukte Fur_m und GS konnte eine ausgezeichnete Sekretionseffizienz nachgewiesen werden. Diese war höher, als für das verlängerte C46-Peptid L-C46-H-GAR, das als Kontrolle verwendet wurde. Es war jedoch keine Prozessierung des Fur-Concatemers in monomere C46-Einheiten nachweisbar.

Die Optimierung der Furinschnittstelle im Konstrukt Fur_o führte zu partieller Prozessierung des Concatemers in C46-Monomere. Durch die carboxyterminale (Fur_oGA) und insbesondere die aminoternale (GAFur_o) Verlängerung der Furinschnittstelle mit

Glycin-Alanin Repeats konnte die Spaltung in Monomere zusätzlich gesteigert werden. Durch die beidseitige Erweiterung der Proteaseschnittstelle (GAFur_oGA) wurde die Prozessierung sogar so weit verstärkt, dass ungeschnittenes Concatemer in den Zellkulturüberständen kaum noch detektierbar war. Die zunächst wenig effiziente Spaltung der Concatemere durch Furin beruhte also offensichtlich auf schlechter Zugänglichkeit der Schnittstelle, so dass durch die Einführung flexibler Linker die Spaltungseffizienz deutlich erhöht werden konnte.

Die verstärkte Prozessierung der Concatemere mit den verlängerten Furinlinkern ging scheinbar mit einer reduzierten Sekretion in den Überstand einher. In nachfolgenden Experimenten wurde jedoch gezeigt, dass der für die Detektion verwendete 2F5-Antikörper die ungeschnittenen Concatemere im Western Blot um ein vielfaches stärker bindet als C46-Monomere (Abschnitt 5.4.3). Die Menge unprozessierten Concatemers wird daher im Western Blot stets überbewertet. Nachfolgende Konzentrationsbestimmungen der Überstände mit einem FACS-basierten kompetitiven Bindungsassay zeigten, dass alle Concatemer-Konstrukte in vergleichbaren Mengen sezerniert werden (Abschnitt 5.4.2).

5.4.2 Antivirale Aktivität der C46-Concatemere

Die antivirale Aktivität der C46-Concatemer-Konstrukte wurde wie oben beschrieben in einem funktionellen *single-round infection assay* untersucht. PM1-Zellen wurden hierfür in Anwesenheit von peptidhaltigen 293T-Überständen oder synthetischem C46 mit replikationsinkompetentem HIV-1 mit HxB2-Hüllproteinen transduziert. Fünf Tage danach wurde der Anteil transduzierter Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 5.11).

Die Peptidkonzentrationen der 293T-Überstände wurden vor dem Einsatz im *single-round infection assay* anhand eines FACS-basierten kompetitiven Bindungsassays gemessen, der eine verlässlichere Konzentrationsbestimmung erlaubt, als die Abschätzung mittels Western Blot. Hierbei wurde der gegen C46 gerichtete monoklonale Antikörper 2F5 mit den peptidhaltigen Zellkulturüberständen vorinkubiert und anschließend zur Immunfärbung von PM-1-Zellen verwendet, die membranverankertes (ma) C46 exprimierten. Je höher die iSAVE-Peptid-Konzentration im Zellkulturüberstand war, desto mehr Antikörper wurde gebunden und stand nicht mehr für die Färbung von maC46 auf den Zellen zur Verfügung, was in entsprechend schwächerem Fluoreszenzsignal resultierte. Durch Vorinkubation von 2F5 mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen C46-Peptids konnte eine Standardkurve erstellt werden, die für die Konzentrationsbestimmung der Zellkulturüberstände herangezogen wurde. Bei diesem Assay wird jeweils die gesamte C-Peptidkonzentration in einer Probe bestimmt, es ist hierbei keine Unterscheidung zwischen unprozessierten Concatemeren und Monomeren möglich.

Die Konzentrationen in den 293T-Überständen betragen demnach 959 nM bei Fur_m, 1086 nM bei Fur, 987 nM bei Fur_o, 1162 nM bei GAFur_o und jeweils 1170 nM bei Fur_oGA und GAFur_oGA und lagen also für alle Konstrukte in einem ähnlichen Bereich.

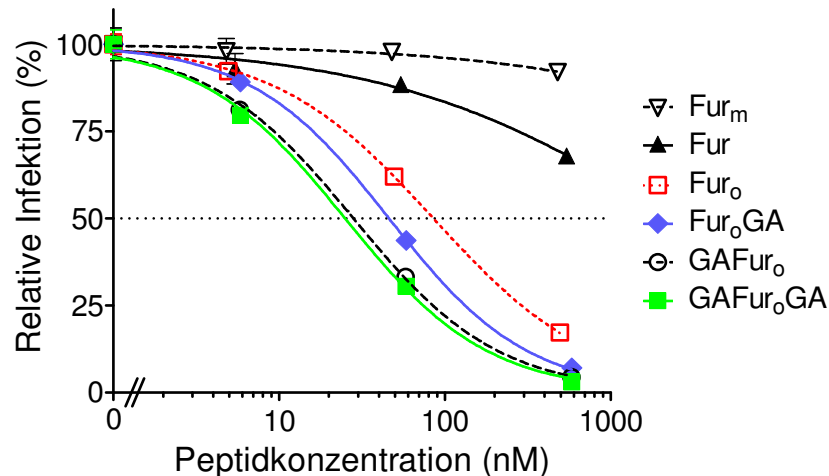


Abbildung 5.11 | Monomere C-Peptide zeigen hohe antivirale Aktivität

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren, transduziert. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen der peptidhaltigen 293T-Überstände zugegeben. eGFP-positive Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 12% entspricht. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt.

Die in ungeschnittener Form sezernierten Concatamere Fur und Fur_m zeigten im *single-round infection assay* nur geringe antivirale Aktivität. Wie schon für L-C46-H-GAR gezeigt (siehe Abbildung 5.5) führt die Verlängerung des C46-Peptids zu einem weitgehenden Verlust der inhibitorischen Wirksamkeit. Die Prozessierung in Monomere stellte jedoch die antivirale Aktivität der iSAVE-Peptide wieder her, wobei die Effizienz der Spaltung mit der inhibitorischen Wirksamkeit korrelierte. Für das Konstrukt GAFur_oGA, das beinahe vollständig in monomerer Form sezerniert wurde, lag die IC₅₀-Konzentration bei etwa 25 nM, für GAFur_o bei 28 nM, für Fur_oGA bei 46 nM und für Fur_o bei 85 nM. Diese Unterschiede in der IC₅₀ beruhen darauf, dass lediglich die monomeren Peptide antivirale Aktivität zeigen, bei der Konzentrationsbestimmung jedoch der Gesamtpeptidgehalt gemessen wurde. Demnach erhöht sich die IC₅₀-Konzentration bei einem geringeren Anteil prozessierter Peptide entsprechend.

5.4.3 Die Verfügbarkeit von Furin limitiert die Prozessierung der Concatemere

Die proteolytische Prozessierung der C46-Concatemere konnte durch die Optimierung und Verlängerung der Schnittstelle zwar stark verbessert werden, in transfizierten 293T-Zellen konnte aber dennoch keine vollständige Spaltung in Monomere beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob die Prozessierungseffizienz dabei durch die Menge des vorhandenen endogenen Furins limitiert wird, wurde ein Furin-Expressionsplasmid in die Zellen cotransfiziert und Überstände und Lysate im Western Blot analysiert (Abbildung 5.12).

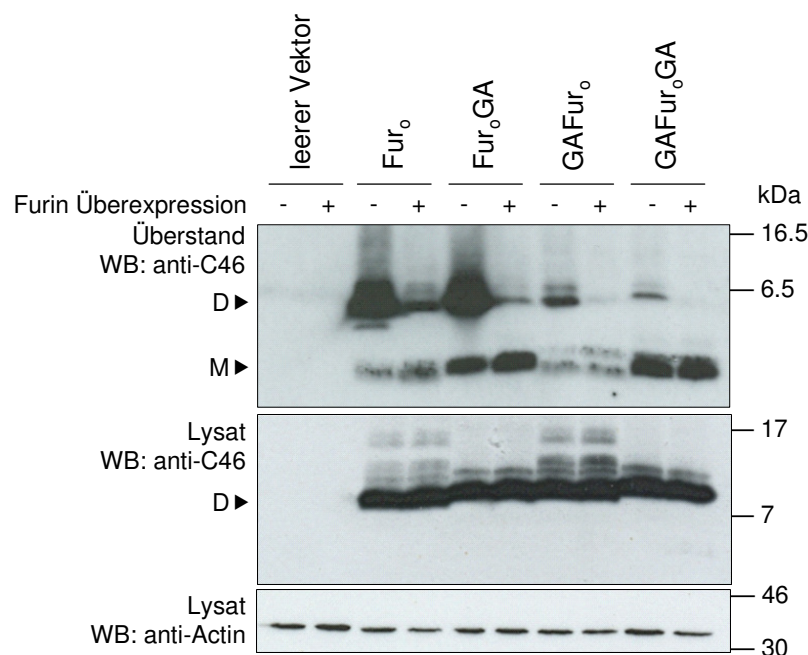


Abbildung 5.12 | Furinüberexpression verbessert die Prozessierung in Monomere

293T-Zellen wurden mit Concatemer-Konstrukten und einem Furin-Expressionsplasmid (+) oder nur mit den Concatemer-Konstrukten (-) transfiziert. Deglykosylierte Zellkulturüberstände und Zelllysate wurden im Western Blot (WB) analysiert, wobei die C-Peptid-Konstrukte mit dem Antikörper 2F5 detektiert wurden. Um sicherzustellen, dass für jede Probe vergleichbare Zellzahlen verwendet wurden, wurde der Lysat-Blot gestrippt und nochmals mit einem anti-Actin-Antikörper gefärbt. D: Dimer / unprozessiertes Concatemer, M: Monomer / geschnittenes Concatemer.

Bei Coexpression von rekombinantem Furin und den Concatemer-Konstrukten konnte eine deutliche Erhöhung des Anteils gespaltener Concatemere nachgewiesen werden, was auf eine Sättigung der Furin-abhängigen Prozessierung in transfizierten 293T-Zellen hinweist. Für das Konstrukt GAFur₀GA war bei Furinüberexpression kein ungeschnittenes Concatemer mehr im Zellkulturüberstand detektierbar und auch die GAFur₀-Concatemere wurden beinahe vollständig zu monomeren Peptiden prozessiert. Im Western Blot der Zellkulturüberstände wurde zudem deutlich, dass der für die

Detektion verwendete Antikörper 2F5 die ungeschnittenen Concatemere bedeutend stärker bindet als in Monomere prozessierte C-Peptide. Die Überexpression von Furin reduzierte die Intensität der Concatemer- / Dimer-Bande, insbesondere der Konstrukte Fur₀ und Fur₀GA, ohne dass es dabei zu einer vergleichbar starken Intensitätszunahme der Monomer-Bande kam.

Weiterhin wurde bei der Analyse der Zellysate deutlich, dass selbst bei Furin-Überexpression intrazellulär ausschließlich ungeschnittene Concatemere nachweisbar sind. Der Export der prozessierten Concatemere ist demnach sehr effizient und es findet keine detektierbare Akkumulierung von Monomeren innerhalb der Zellen statt.

5.4.4 N-Glykane fördern die Prozessierung der Concatemere

Die Experimente mit dem verlängerten C-Peptid L-C46-H-GAr hatten gezeigt, dass N-Glykosylierungen für die effiziente Sekretion zwingend erforderlich sind (Abschnitt 5.2). Im Falle der Concatemere ist es jedoch denkbar, dass N-Glykane die Zugänglichkeit der Furinschnittstelle einschränken und somit die Prozessierung inhibieren.

Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle aus der Arbeitsgruppe von Laer untersuchten dies anhand des Konstrukts Fur₀GA. Die beiden N-Glykosylierungsstellen in Fur₀GA, die Asparaginreste (N) an den Positionen 33 und 95, wurden hierfür als Einzelmutanten (N33Q bzw. N95Q) oder als Doppelmutante (N33Q/N95Q) zu Glutamin mutiert (Abbildung 5.13).



Abbildung 5.13 | Positionen der N-Glykosylierungsstellen in Fur₀GA

Positionen der N-Glykosylierungsstellen (*) an den Asparaginseitenketten N33 und N95 in Fur₀GA. LTR: *long terminal repeat*, SPase: Schnittstelle für die Signalpeptidase, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*.

Sekretion und Prozessierung dieser Konstrukte wurden in transfizierten 293T-Zellen in *pulse-chase*-Experimenten analysiert. Hierfür wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion zunächst in Methionin-freiem Medium inkubiert. Es folgten ein *pulse* mit ³⁵S-markiertem Methionin und danach ein *chase* mit einem Überschuss unmarkierten Methionins. Am Ende der *chase*-Periode wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und für eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Antikörper 2F5 verwendet. Die präzipitierten Peptide wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Autoradiographie untersucht. Die Effizienz der Prozessierung in Monomere wurde für jedes Konstrukt quantifiziert (Abbildung 5.14).

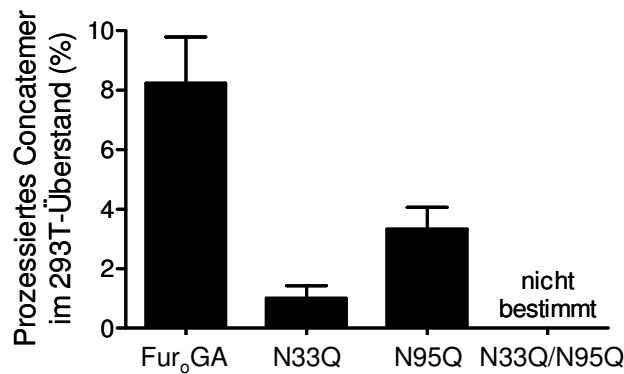


Abbildung 5.14 | N-Glykane fördern die Prozessierung in Monomere

Quantifizierung der Prozessierung von Concatemeren mit mutierten N-Glykosylierungsstellen. ³⁵S-markierte C-Peptide im Überstand transfizierter 293T-Zellen wurden mit dem Antikörper 2F5 immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Autoradiographie wurden die Anteile ungeschnittenen und geschnittenen Concatemers in jeder Probe quantifiziert (Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle, AG von Laer).

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass die beiden Konstrukte N33Q und N95Q, denen jeweils eine N-Glykosylierungsstelle fehlt, etwas schwächer als das Ausgangskonstrukt Fur_oGA sezerniert werden. Die Prozessierung der mutierten Concatemere in Monomere war dabei allerdings stark eingeschränkt. Während 8% des vollständig glykosylierten Konstrukts Fur_oGA von Furin in Monomere gespalten wurde, lagen die N95Q-Peptide nur zu 3% und die N33Q-Peptide nur zu 1% in monomerer Form vor. Die Doppelmutante N33Q/N95Q, der beide N-Glykosylierungsstellen fehlen, wurde so schwach sezerniert, dass eine Bestimmung des Anteils monomerer Peptide nicht möglich war. N-Glykane beeinträchtigen also die Zugänglichkeit der Furinschnittstelle nicht, sondern unterstützen sogar die effiziente Prozessierung von C46-Concatemeren in Monomere.

5.5 Charakterisierung von GAFur₀GA

Das iSAVE-Peptid-Konstrukt GAFur₀GA wurde von transfizierten 293T-Zellen hervorragend sezerniert ($> 1 \mu\text{M}$) und zeigte hohe antivirale Aktivität im *single-round infection* assay. Es ist daher ein erfolgversprechender Prototyp für die Entwicklung einer neuen HIV-Gentherapiestrategie und wurde in der Folge weiter funktionell charakterisiert.

5.5.1 Spezifische Inhibition CXCR4- und CCR5-troper HIV-Pseudoviren

In den vorangegangenen *single-round infection* assays war die antivirale Aktivität der sezernierten C-Peptide lediglich gegen Viruspartikel getestet worden, die das CXCR4-trope HIV-1_{HxB2}-Hüllprotein trugen. Daher wurde nun die inhibitorische Wirksamkeit der GAFur₀GA-Peptide gegenüber weiteren HIV-1-Hüllproteinen untersucht (Abbildung 5.15). Hierfür wurden die Hüllproteine des CCR5-tropen HIV-1-Stamms JRFL, sowie eine T-20-resistente Variante des HxB2-Hüllproteins (HxB2-SIM) zur Verpackung von eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren verwendet. Im HxB2-SIM-Hüllprotein ist die Aminosäuresequenz GIV an den Positionen 37-39 von gp41 zu SIM mutiert, was zu Resistenz gegenüber dem C-Peptid T-20 führt (Rimsky et al., 1998). Um die Spezifität der GAFur₀GA-Peptide zu testen, wurde außerdem der Einfluss auf den Eintritt von Viruspartikeln getestet, die mit dem G-Protein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G) pseudotypisiert waren. Da VSV-G keinerlei Homologie zum HIV-Hüllprotein aufweist, sollte es von C-Peptiden nicht inhibiert werden.

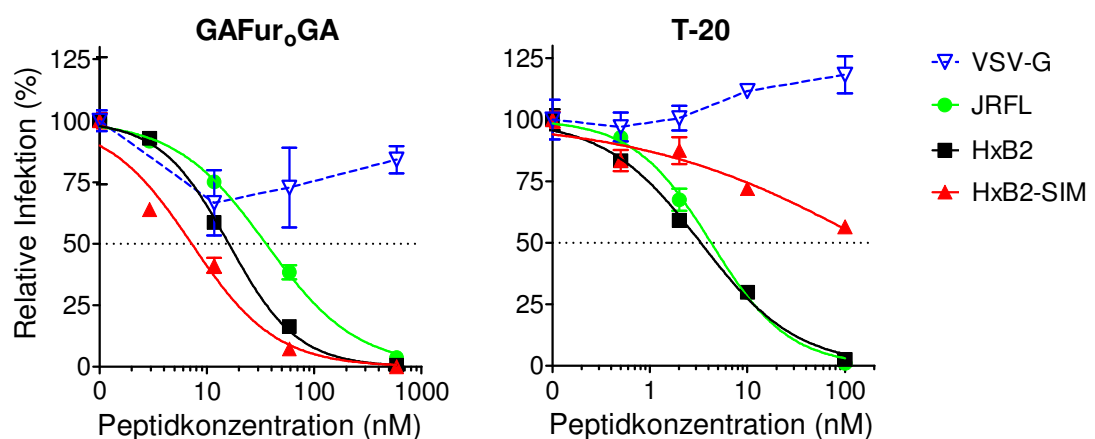


Abbildung 5.15 | Spezifische Inhibition von HIV-Pseudoviren durch GAFur₀GA-Peptide

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die mit HIV-1-Hüllproteinen (JRFL, HxB2 oder HxB2-SIM) oder VSV-G verpackt waren. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen des GAFur₀GA-Überstands oder als Kontrolle synthetisches T-20 zugegeben. eGFP-positive Zellen wurden per FACS bestimmt, wobei 100% relative Infektion bei den einzelnen Viren jeweils einer Transduktionseffizienz von etwa 10-20% entspricht. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt.

T-20 wurde in diesem *single-round infection assay* als Kontrolle für die Inhibition der einzelnen Viren verwendet. Als einziger zugelassener Fusionsinhibitor ist es der Gold-Standard für die HIV-Therapie mit C-Peptiden. Die hier entwickelten iSAVE-Peptide müssen sich mit T-20 messen lassen und vergleichbare antivirale Aktivität zeigen, um für eine klinische Anwendung in Frage zu kommen.

Die sezernierten GAFur_oGA-Peptide zeigten spezifische inhibitorische Wirkung gegenüber Vektorpartikeln mit unterschiedlichen HIV-1-Hüllproteinen. Die IC₅₀-Konzentrationen lagen jeweils im niedrigen nanomolaren Bereich, wobei sich das HxB2-Hüllprotein (16 nM) etwas besser hemmen ließ als das JRFL-Hüllprotein (36 nM). Die T-20-resistente Variante HxB2-SIM konnte von GAFur_oGA sogar mit einer IC₅₀ von 7,2 nM inhibiert werden. Die GAFur_oGA-Peptide sind also in der Lage, sowohl CXCR4-trope als auch CCR5-trope HIV-Stämme zu hemmen, wobei sie auch gegen T-20-resistente Viren hohe Wirksamkeit zeigen. Der Eintritt VSV-G-pseudotypisierter Viruspartikel wurde von den GAFur_oGA-Peptiden dagegen nicht beeinflusst, eine unspezifische Hemmung des Viruseintritts findet also nicht statt.

Das zur Kontrolle verwendete T-20 zeigte ebenfalls spezifische Hemmung der HIV-1-Hüllproteine, wobei die IC₅₀-Konzentrationen für JRFL und HxB2 etwas niedriger lagen als bei der Hemmung durch GAFur_oGA (4,2 nM bzw. 3,3 nM). Die HxB2-Variante HxB2-SIM zeigte dagegen erwartungsgemäß deutliche T-20-Resistenz mit einem stark erhöhten IC₅₀-Wert von etwa 180 nM.

5.5.2 N-Glykane beeinträchtigen die antivirale Aktivität nur wenig

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass die N-Glykosylierung der C-Peptid-Concatemere sowohl für die effiziente Sekretion als auch für die Prozessierung in Monomere erforderlich ist (siehe Abbildung 5.14). Als nächstes wurde daher der Einfluss der N-Glykane auf die inhibitorische Wirkung der GAFur_oGA-Peptide untersucht. Hierfür wurde ein Teil des Zellkulturüberstands transfizierter 293T-Zellen (Konzentrationsbestimmung mittels des oben beschriebenen FACS-basierten kompetitiven Bindungsassays) vor dem Einsatz im *single-round infection assay* mit Hilfe des Enzyms PNGase F deglykosyliert und mit nativem Überstand verglichen (Abbildung 5.16).

Mittels Western Blot wurde gezeigt, dass der für den Inhibitionsversuch verwendete GAFur_oGA-Überstand durch die Behandlung mit PNGase F vollständig deglykosyliert wurde. Die nativen Peptide waren aufgrund der N-Glykosylierungen deutlich größer als die deglykosylierten Peptide und bildeten auch keine distinkte Bande im Gel. Durch die Inkubation mit PNGase F wurden die N-Glykane entfernt, so dass eine einheitliche Bande bei geringerer Peptidgröße nachweisbar wurde (sowie eine schwache Bande mit ungeschnittenem Concatemer). Auffällig ist eine deutliche Signalverstärkung bei deglykosylierten Proben bei der Detektion mit dem 2F5-Antikörper.

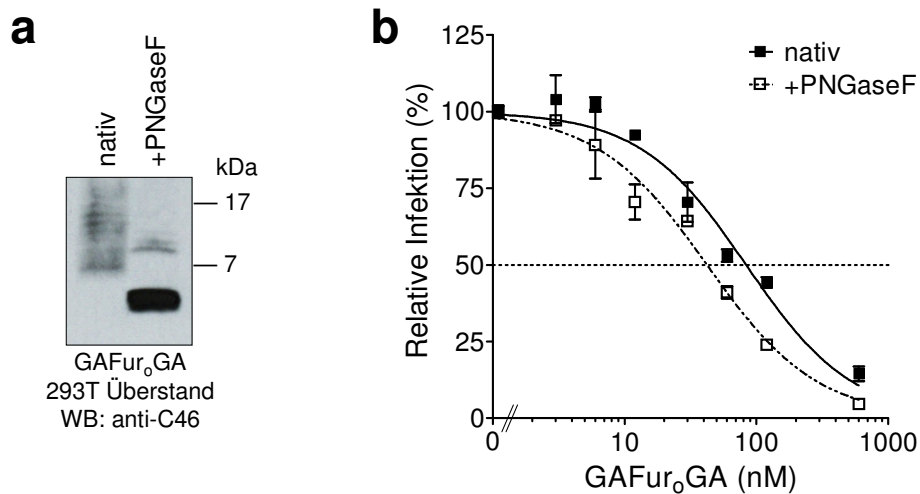


Abbildung 5.16 | N-Glykane beeinträchtigen die antivirale Aktivität von GAFur₀GA kaum

293T-Zellen wurden mit dem Konstrukt GAFur₀GA transfiziert. Der Zellkulturüberstand wurde nativ belassen oder mit PNGaseF deglykosyliert. **(a)** Die Überstände wurden im Western Blot (WB) analysiert, wobei die Detektion der C-Peptide mit dem Antikörper 2F5 erfolgte. **(b)** Untersuchung der Überstände im *single-round infection assay*. PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen des nativen oder PNGaseF-behandelten GAFur₀GA-Überstands zugegeben. eGFP-positive Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 4% entspricht. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt. Gemäß AICc-Test unterscheiden sich die IC₅₀-Werte beider Kurven mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,95%.

Im *single-round infection assay* zeigten die deglykosylierten Peptide verglichen mit nativen Peptiden eine Verdopplung der antiviralen Aktivität. Die IC₅₀ verringerte sich hierbei von 84 nM auf 42 nM. Der im Vergleich zu vorigen Versuchen erhöhte IC₅₀-Wert für die nativen GAFur₀GA-Peptide ist darauf zurückzuführen, dass zunächst die Konzentration der Überstände bestimmt wurde und diese anschließend etwa 18 Stunden lang bei 37 °C inkubiert wurden, wobei während dieser Zeit die Behandlung des zu deglykosylierenden Überstands mit PNGase F erfolgte. Es ist davon auszugehen, dass sich die Peptidkonzentration hierbei in Folge von Degradation etwas verringert hat, und daher die tatsächlichen Konzentrationen, die für die Inhibition eingesetzt wurden, und auch die entsprechenden IC₅₀-Werte niedriger sind.

Die leichte Erhöhung der antiviralen Aktivität der deglykosylierten GAFur₀GA-Peptide, weist auf eine etwas effizientere Bindung der C-Peptide an ihre Zielstruktur in gp41 hin. Große N-Glykan-Strukturen führen vermutlich zu sterischer Hinderung der Interaktion zwischen dem C-Peptid und der viralen HR1-Helix, so dass die Wechselwirkung dabei nicht optimal ist.

5.5.3 Die Halbwertszeit sezernierter GAFur₀GA-Peptide ist lang

Die Halbwertszeit der GAFur₀GA-Peptide wurde von Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle aus der Arbeitsgruppe von Laer bestimmt. Hierfür wurden 293T-Zellen transient mit dem Konstrukt GAFur₀GA transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen zunächst für 30 Minuten in Methionin-freiem Medium inkubiert. Es folgten ein *pulse* mit ³⁵S-markiertem Methionin und danach ein dreistündiger *chase* mit einem Überschuss unmarkierten Methionins. Vorangegangene Versuche hatten gezeigt, dass nach drei Stunden der überwiegende Teil der zuvor markierten Peptide sezerniert worden ist. Am Ende der *chase*-Periode wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und entweder in Gegenwart untransfizierter 293T-Zellen oder zellfrei für bis zu 50 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der Überstände abgenommen und daraus die C-Peptide immunpräzipitiert, deglykosyliert und mittels SDS-PAGE und nachfolgender Autoradiographie analysiert. Die Signalintensitäten der Monomere und ungeschnittenen Concatemere wurden für alle Zeitpunkte quantifiziert und in Relation zu den Intensitäten unmittelbar nach dem dreistündigen *chase* gesetzt (Abbildung 5.17).

Die sezernierten GAFur₀GA-Peptide waren im zellfreien System und auch in Anwesenheit von 293T-Zellen sehr stabil mit einer Halbwertszeit von jeweils über 30 Stunden. In Anwesenheit von 293T-Zellen war eine nachträgliche Prozessierung ungeschnittener Concatemere in Monomere zu beobachten, so dass sich der Anteil an Monomeren zunächst erhöhte und erst danach durch Degradation linear abfiel, wobei die Degradation hier etwas schneller war als im zellfreien System.

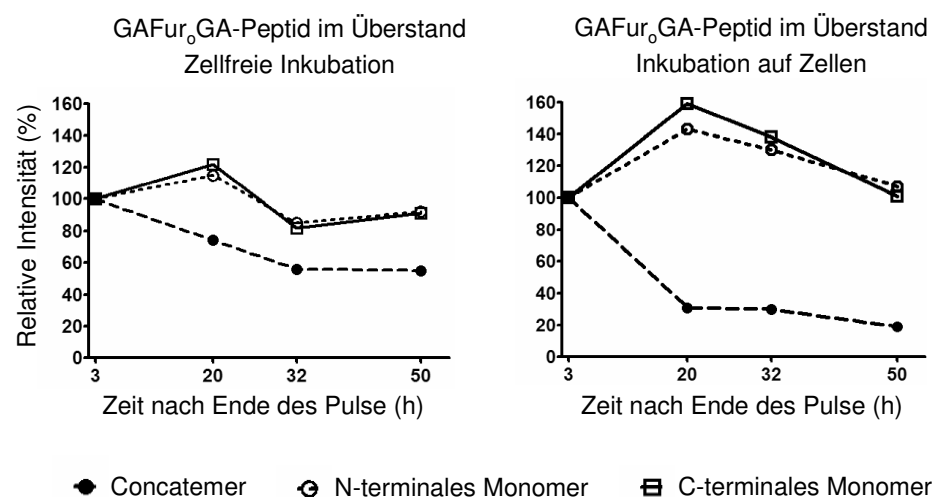


Abbildung 5.17 | Die Halbwertszeit sezernierter GAFur₀GA-Peptide ist lang

GAFur₀GA-Peptide im Überstand transfizierter 293T-Zellen wurden nach einem *pulse* mit ³⁵S-Methionin sowie dreistündigem *chase* entweder zellfrei oder auf Zellen bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Peptide mit dem Antikörper 2F5 immunpräzipitiert und im SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Autoradiographie wurden die in jeder Probe vorhandenen Peptide quantifiziert, wobei zwischen ungeschnittenem Concatemer und dem N- und C-terminalen Monomer unterschieden wurde (Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle, AG von Laer).

5.5.4 Bystander-Inhibition des Viruseintritts in T-Zelllinien

Nach der ausführlichen Charakterisierung der GAFur₀GA-Peptide in transfizierten 293T-Zellen wurde dieses iSAVE-Peptid-Konstrukt nun in einem für die HIV-Gentherapie relevanteren Zelltyp, den T-Zellen, untersucht. Hierfür wurde exemplarisch die T-Zelllinie Jurkat verwendet. Für die Transduktion der Jurkat-Zellen wurde der GAFur₀GA-Vektor in replikationsinkompetente mit dem GaLV-Hüllprotein pseudotypisierte Retroviren verpackt. Die T-Zellen wurden mit den Viruspartikeln zu 3% transduziert und anschließend die Prozessierung der GAFur₀GA-Peptide und ihre Sekretion in den Zellkulturüberstand mittels Western Blot untersucht (Abbildung 5.18).

Dabei konnte wie bereits in transfizierten 293T-Zellen eine nahezu vollständige Prozessierung der GAFur₀GA-Concatemere und eine gute Sekretionseffizienz festgestellt werden.

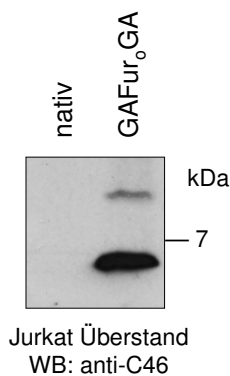


Abbildung 5.18 | Sekretion und Prozessierung von GAFur₀GA in transduzierten Jurkat T-Zellen

Jurkat-Zellen wurden zu 3% mit dem GAFur₀GA-Vektor transduziert oder nicht transduziert (nativ). Deglykosylierte Zellkulturüberstände wurden im Western Blot (WB) analysiert. Die Detektion der C-Peptide erfolgte mit dem Antikörper 2F5.

Im Folgenden wurde die antiretrovirale Wirksamkeit der sezernierten Peptide, also die Hemmung des HIV-Eintritts sowie der Bystander-Effekt auf Nachbarzellen, in diesen Mischkulturen aus C-Peptid-exprimierenden und nativen Zellen untersucht. Hierfür wurden die Jurkat-Mischkultur bzw. native Jurkat T-Zellen mit replikationsinkompetentem HIV-1 mit HxB2-Hüllproteinen und eGFP-Transgen infiziert. Einige Tage nach der Transduktion mit den HIV-Pseudotypen wurde die Transduktionsrate jeder Probe durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 5.19a). In der Jurkat-Mischkultur, die lediglich zu 3% GAFur₀GA exprimierte, war selbst bei sehr hoher Virusmenge (80% Transduktion auf nativen Zellen) eine fast vollständige Unterdrückung des Viruseintritts zu beobachten. Dies weist darauf hin, dass die von den wenigen GAFur₀GA-positiven Zellen sezernierten C-Peptide in der Lage waren, den überwiegenden Teil der unmodifizierten Zellen vor der Transduktion zu schützen.

In einem zweiten Versuch wurden die Jurkat-Mischkulturen oder native Jurkat T-Zellen mit replikationskompetentem HIV-1_{NL4-3} infiziert und der Verlauf der Infektion anhand der p24-Produktion in der Kultur untersucht (Abbildung 5.19b). Die Virusreplikation in den Jurkat-Mischkulturen wurde hierbei offenbar vollständig unterdrückt. In den Mischkulturen war keinerlei p24-Produktion nachweisbar, während der p24-ELISA für die nativen Jurkat-Kulturen eine massive Virusreplikation anzeigte.

In einer T-Zell-Mischkultur, die nur zu einem sehr geringen Anteil GAFur₀GA-Peptide exprimierte, konnte also eine starke Bystander-Inhibition des Viruseintritts sowohl von replikationsinkompetenten HIV-Pseudoviren als auch von replizierendem HIV-1 beobachtet werden.

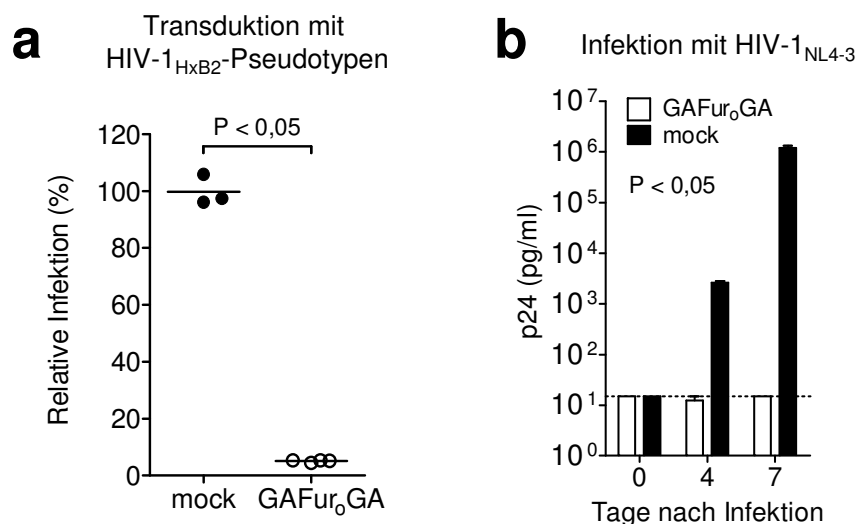


Abbildung 5.19 | Bystander-Inhibition in GAFur₀GA-transduzierten T-Zelllinien

Jurkat T-Zell-Mischkulturen, die zu 3% GAFur₀GA exprimierten, oder native Jurkat T-Zellen wurden im Hinblick auf die Bystander-Inhibition des Viruseintritts analysiert. **(a)** Nach Transduktion der Zellen mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren, wurde der Anteil eGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei entspricht 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 80%. Statistische Signifikanz wurde durch einseitigen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. **(b)** Nach Infektion mit HIV-1_{NL4-3} wurde der Infektionsverlauf in den Kulturen anhand der p24-Produktion mittels ELISA überprüft. Die Nachweisgrenze des ELISA ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Infektionsverläufen in beiden Kulturen wurden wie im Abschnitt Methoden beschrieben ermittelt.

5.5.5 Unterdrückung der HIV-Replikation in primären CD4⁺ T-Zellen

Da die GAFur₀GA-Peptide in transduzierten T-Zelllinien hervorragende antivirale Aktivität und einen starken Bystander-Effekt auf unmodifizierte Nachbarzellen gezeigt hatten, wurde die antivirale Wirksamkeit dieses iSAVE-Peptids nun in primären humanen CD4⁺ T-Zellen untersucht. Hierfür wurden die peripheren Blutlymphozyten aus humanem Blut isoliert, die CD8⁺ Zellen depletiert und die verbleibenden CD4⁺ T-Zellen anschließend vier Tage lang mit CD3/CD28-Beads und Interleukin-2 stimuliert.

Der GAFur₀GA-Vektor wurde in replikationsinkompetente mit dem GaLV-Hüllprotein pseudotypisierte Retroviren verpackt und diese zur Transduktion der prästimulierten T-Zellen verwendet, wobei eine Transduktionsrate von 37% erreicht wurde. Diese mit GAFur₀GA transduzierten oder mock-transduzierte primäre T-Zellkulturen wurden drei Tage später mit verschiedenen HIV-1-Stämmen infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde jeweils anhand der p24-Produktion in der Kultur untersucht (Abbildung 5.20).

In den zu 37% GAFur₀GA exprimierenden Mischkulturen, die mit den CCR5-tropen HIV-1-Stämmen BaL oder JR-CSF infiziert worden waren, war verglichen mit den mock-transduzierten Kulturen eine etwa 100-fach reduzierte p24-Produktion zu beobachten. Bei Infektion mit dem CXCR4-tropen HIV-1_{NL4-3} war die p24-Produktion in den transduzierten Kulturen etwa 10-fach niedriger als in mock-transduzierten Zellen.

Es konnte also auch in primären T-Zellkulturen eine Unterdrückung der Virusreplikation und eine Bystander-Inhibition des Viruseintritts durch die sezernierten iSAVE-Peptide festgestellt werden.

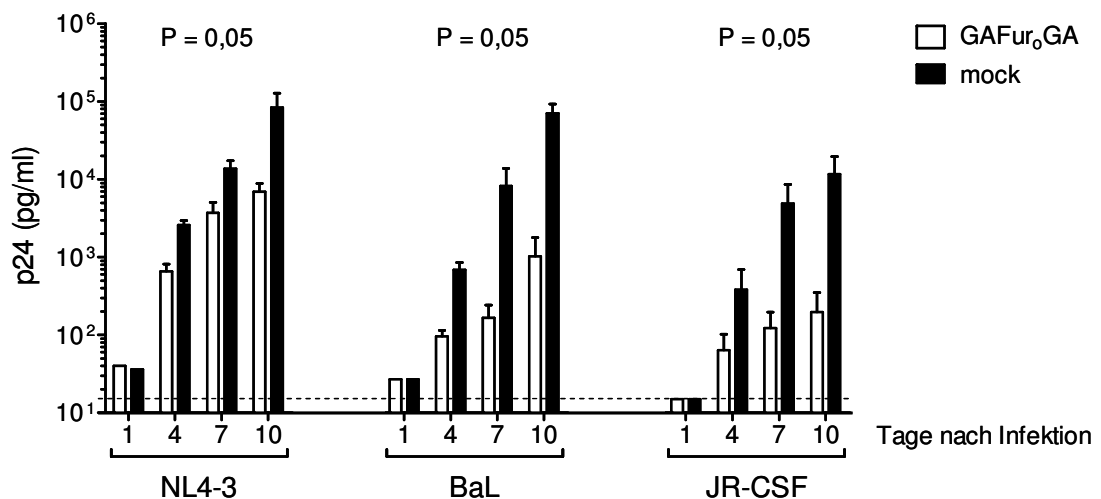


Abbildung 5.20 | Partielle Unterdrückung der HIV-Replikation in primären CD4⁺ T-Zellen

Primäre humane CD4⁺ T-Zellen wurden zu 37% mit GAFur₀GA transduziert oder mock-transduziert und drei Tage später entweder mit HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{BaL} oder HIV-1_{JR-CSF} infiziert. Der Infektionsverlauf in den Kulturen wurde jeweils anhand der p24-Produktion mittels ELISA überprüft. Die Nachweisgrenze des ELISA ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Unterschiede zwischen den Infektionsverläufen der mock- bzw. GAFur₀GA-transduzierten Kulturen wurden für jeden Virusstamm wie im Abschnitt Methoden beschrieben auf statistische Signifikanz überprüft.

5.6 iSAVE-Peptide mit alternativen C-Peptiden

5.6.1 HIV-2_{EHO}-basierte C-Peptide inhibieren HIV und SIV

Nachdem die effiziente Sekretion von antiviral aktivem C46-Peptid im Kontext des iSAVE-Konstrukts GAFur_oGA erreicht werden konnte, sollte das C-Peptid durch eine Variante mit verbesserten Eigenschaften ersetzt werden.

E. Gustchina und Kollegen zeigten, dass das vom HIV-2 Stamm EHO abgeleitete C34-Peptid *in vitro* eine sehr gute antivirale Aktivität sowohl gegen zahlreiche HIV-Isolate als auch gegen SIV aufweist (Gustchina et al., 2005). Solche C-Peptide, die HIV und SIV inhibieren können, sind auch bei der Entwicklung eines iSAVE-Peptids für die Gentherapie der HIV-Infektion sehr interessant. In der Arbeitsgruppe von Laer wurde daher das chimäre C-Peptid C46-EHO entwickelt, das aus HIV-1 und HIV-2_{EHO}-Sequenzen besteht. Die 34 aminoterminalen Aminosäuren (= C34) stammen dabei von HIV-2_{EHO}, die 12 carboxyterminalen Aminosäuren sind von HIV-1_{HXB2} abgeleitet und entsprechen somit der C46-Sequenz (Abbildung 5.21).

```

C46      WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKQWASLWNWF
C46-EHO  WQQWERQVRFLDANITKLLLEEAQIQQEKKNMYELQELDKQWASLWNWF
  
```

Abbildung 5.21 | Sequenzen der C-Peptide C46 und C46-EHO

Die C46-Sequenz ist von HIV-1_{HXB2} abgeleitet. Die 34 N-terminalen Aminosäuren des C46-EHO-Peptids stammen von HIV-2_{EHO}, während die 12 C-terminalen Aminosäuren (kursiv) mit der C46-Sequenz identisch sind. Beide C-Peptide enthalten das Epitop für den monoklonalen humanen Antikörper 2F5 (unterstrichen).

Die antivirale Aktivität des synthetisch hergestellten C46-EHO-Peptids wurde von Frances Brauer aus der Arbeitsgruppe von Laer im *single-round infection assay* mit replikationsinkompetenten Lentiviren analysiert. Diese waren mit verschiedenen HIV-1- oder SIV-Hüllproteinen pseudotypisiert und codierten eGFP als Markergen. PM-1-Zellen wurden damit in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von C46-EHO transduziert und einige Tage später der Anteil transduzierter Zellen in jeder Probe durchflusszytometrisch bestimmt. Als Kontrolle wurde das herkömmliche von HIV-1 abgeleitete C46-Peptid für die Inhibition verwendet (Abbildung 5.22).

C46-EHO hemmte dabei, genauso wie C46, den Eintritt verschiedener HIV-1-Pseudotypen mit IC₅₀-Werten im niedrigen nanomolaren Bereich. Allerdings konnten durch C46-EHO zusätzlich auch SIV-Pseudotypen inhibiert werden, auf deren Eintritt C46 keinen Einfluss hatte. Die Hemmung des Viruseintritts durch die C-Peptide war dabei spezifisch für HIV/SIV, da VSV-G-Pseudotypen nicht inhibiert wurden.

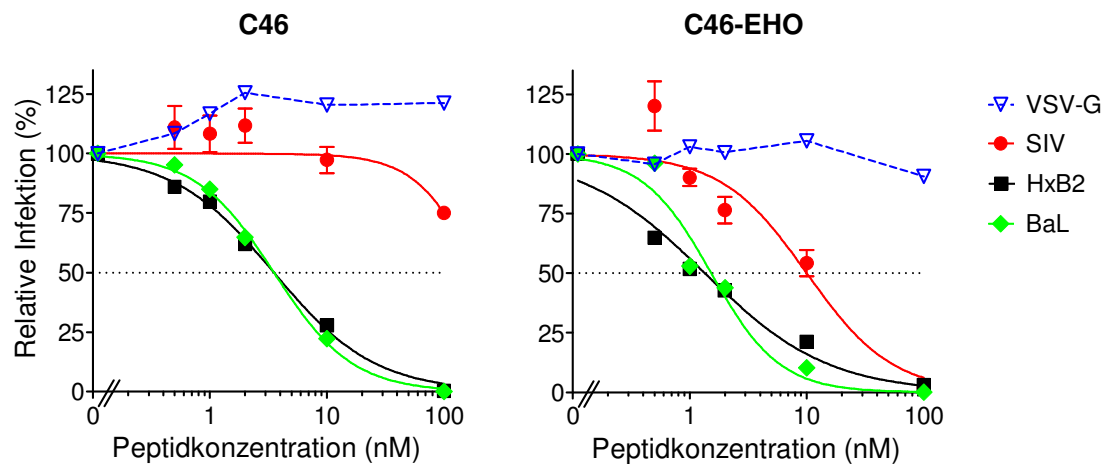


Abbildung 5.22 | Inhibitorische Aktivität von C46 und C46-EHO

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die entweder mit den HIV-1-Hüllproteinen der Stämme HxB2 oder BaL, mit SIV-Hüllproteinen oder mit VSV-G verpackt waren. Gleichzeitig wurden verschiedene Konzentrationen des synthetisch hergestellten C46- bzw. C46-EHO-Peptids zugegeben. Der Anteil eGFP-positiver Zellen in jeder Probe wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt (Frances Brauer, AG von Laer).

5.6.2 Schwache Bystander-Inhibition durch sezerniertes C46-EHO

Aufgrund der hervorragenden antiviralen Aktivität des synthetisch hergestellten C46-EHO-Peptids im *single-round infection assay* sollte die Wirksamkeit des Peptids im Kontext eines iSAVE-Peptids getestet werden. Hierfür wurde die C46-Sequenz im iSAVE-Peptid-Konstrukt GAFur₀GA durch die C46-EHO-Sequenz ersetzt, wobei das Konstrukt EHO-GAFur₀GA generiert wurde (Abbildung 5.23).

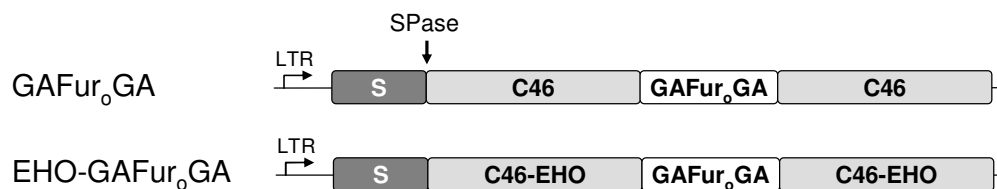


Abbildung 5.23 | Struktur von GAFur₀GA und EHO-GAFur₀GA

Schematischer Aufbau der Konstrukte GAFur₀GA und EHO-GAFur₀GA, die jeweils von gamma-retroviralen Vektoren codiert werden. LTR: *long terminal repeat*, SPase: Schnittstelle für die Signalpeptidase, S: Signalpeptid von humanem *tissue-type plasminogen activator*.

Zur Analyse der antiviralen Aktivität des EHO-Peptid-Konstrukts wurde der EHO-GAFur₀GA-Vektor zunächst in replikationsinkompetente mit dem GaLV-Hüllprotein pseudotypisierte Retroviren verpackt und diese zur Transduktion von Jurkat T-Zellen verwendet. Dabei wurde eine Transduktionsrate von 18% erreicht. Anschließend wurde die Bystander-Inhibition des Viruseintritts in diesen Mischkulturen aus EHO-Peptid-exprimierenden und nativen Jurkat T-Zellen untersucht. Hierfür wurde die Jurkat-Mischkultur bzw. native Jurkat T-Zellen zunächst mit replikationsinkompetentem HIV-1 mit HxB2-Hüllproteinen und eGFP-Transgen transduziert wie bereits beschrieben und einige Tage später die Transduktionsrate jeder Probe durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 5.24 a). Dabei war in den Jurkat-Mischkulturen nur eine leichte Reduktion des Viruseintritts um etwa 30% gegenüber den nativen Zellen zu beobachten.

In einem zweiten Experiment wurden die Jurkat-Mischkulturen oder native Jurkat-Zellen mit replikationskompetentem HIV-1_{NL4-3} infiziert und der Verlauf der Infektion anhand der p24-Produktion in den Kulturen untersucht (Abbildung 5.24 b). Die p24-Produktion war hierbei in den Jurkat-Mischkulturen etwa fünffach niedriger als in nativen Kulturen. Die Virusreplikation war in den EHO-exprimierenden Mischkulturen demnach nur geringfügig verringert. Obwohl die Jurkat T-Zellen in diesen Versuchen stärker mit dem EHO-Konstrukt transduziert waren als in vergleichbaren Experimenten mit GAFur₀GA-transduzierten Jurkat-Mischkulturen (siehe Abbildung 5.19), war der Effekt auf den Viruseintritt deutlich schwächer.

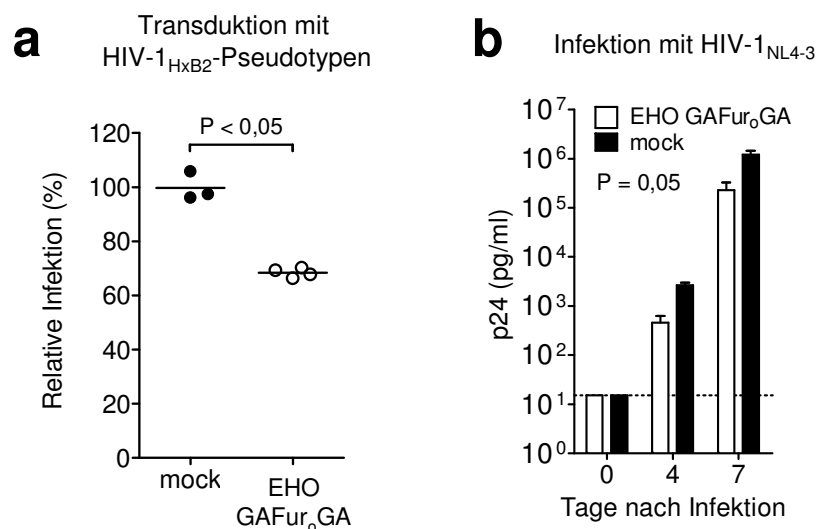


Abbildung 5.24 | Schwache Bystander-Inhibition durch sezerniertes C46-EHO

Jurkat T-Zell-Mischkulturen, die zu 18% EHO-GAFur₀GA exprimierten, oder native Jurkat T-Zellen wurden im Hinblick auf die Bystander-Inhibition des Viruseintritts analysiert. **(a)** Nach Transduktion der Zellen mit eGFP-codierenden Lentiviren mit HIV-1_{HxB2}-Hüllprotein, wurde der Anteil eGFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei entspricht 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 80%. Statistische Signifikanz wurde durch einseitigen Mann-Whitney-U-Test ermittelt. **(b)** Nach Infektion mit HIV-1_{NL4-3} wurde der Infektionsverlauf in den Kulturen anhand der p24-Produktion mittels ELISA überprüft. Die Nachweisgrenze des ELISA ist durch die gestrichelte Linie angezeigt. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Infektionsverläufen in beiden Kulturen wurden wie im Abschnitt Methoden beschrieben ermittelt.

5.6.3 Ursachen für die schwache Bystander-Inhibition von sezerniertem C46-EHO

Im Kontext des iSAVE-Peptids zeigte C46-EHO deutlich schlechtere Bystander-Inhibition als C46, obwohl die antivirale Aktivität des synthetisch hergestellten C46-EHO-Peptids sogar etwas besser war als die des C46-Peptids (siehe Abbildung 5.22). Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungen: Einerseits könnte die Sekretion des EHO-GAFur₀GA-Peptids schwächer sein als die Sekretion von GAFur₀GA-Peptiden. Andererseits könnte die Spaltung in Monomere durch die Furin-Protease, die für die antivirale Aktivität entscheidend ist, bei EHO-GAFur₀GA weniger effizient sein, so dass anteilig mehr antiviral inaktives Concatemer sezerniert wird als bei GAFur₀GA. Schließlich könnte die N-Glykosylierung des sezernierten C46-EHO-Peptids dessen antivirale Aktivität stärker beeinträchtigen, als dies beim C46-Peptid der Fall ist.

5.6.3.1 Probleme beim Nachweis des C46-EHO-Peptids

Obwohl das C46-EHO-Peptid das Epitop „ELDKWA“ für den humanen monoklonalen Antikörper 2F5 enthält (siehe Abbildung 5.21), war das sezernierte EHO-GAFur₀GA-Peptid im Western Blot nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Auch das synthetisch hergestellte C46-EHO-Peptid war im Western Blot deutlich schlechter nachzuweisen als synthetisch hergestelltes C46 (Abbildung 5.25).

Der kompetitive FACS-Assay, der zur Konzentrationsbestimmung von C46-basierten iSAVE-Peptiden in Zellkulturüberständen verwendet worden war, war zur Bestimmung von C46-EHO-Konzentrationen in Zellkulturüberständen ebenfalls nicht geeignet. Es konnte daher keine Aussage über die Menge sezernierten Peptids gemacht werden und es bleibt somit unklar, ob EHO-GAFur₀GA weniger effizient sezerniert wird als GAFur₀GA.

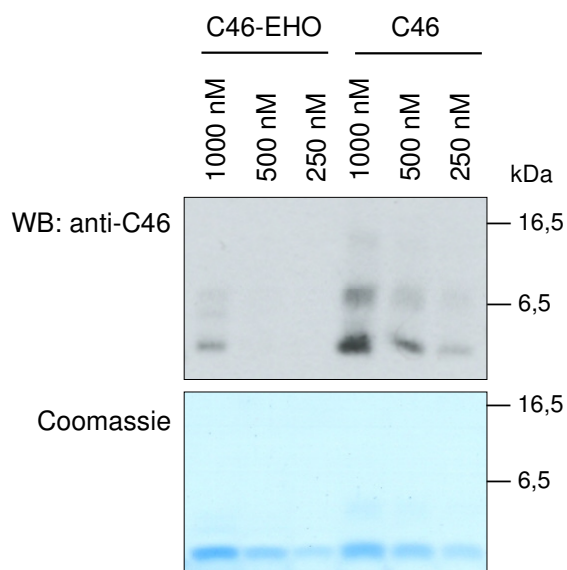


Abbildung 5.25 | C46-EHO ist mit 2F5 schlechter detektierbar als C46

Die synthetisch hergestellten Peptide C46 und C46-EHO wurden im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend entweder eine Coomassie-Färbung durchgeführt oder die Peptide im Western Blot (WB) mit dem Antikörper 2F5 detektiert.

5.6.3.2 Die Spaltung von EHO-GAFur₀GA durch Furin ist nicht beeinträchtigt

In den vorhergehenden Experimenten mit C46-Concatemeren wurde gezeigt, dass die direkte Umgebung der Protease-Schnittstelle für die Erkennung und Prozessierung durch Furin entscheidend ist. In diesem Bereich unterscheiden sich die beiden iSAVE-Konstrukte jedoch nicht, so dass eine im Vergleich zum C46-Concatemer weniger effiziente Spaltung des C46-EHO-Concatemers sehr unwahrscheinlich ist. Der Einfluss von Furin auf die Prozessierung von EHO-GAFur₀GA wurde dennoch analysiert. Hierfür wurden 293T-Zellen mit dem EHO-GAFur₀GA-Konstrukt oder dem GAFur₀GA-Konstrukt transfiziert und dabei rekombinantes Furin durch Cotransfektion in den Zellen überexprimiert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend im bereits beschriebenen *single-round infection assay* eingesetzt, wobei PM-1-Zellen in Anwesenheit unterschiedlicher Volumina der Überstände mit HIV-1_{HXB2}-Pseudoviren transduziert wurden (Abbildung 5.26).

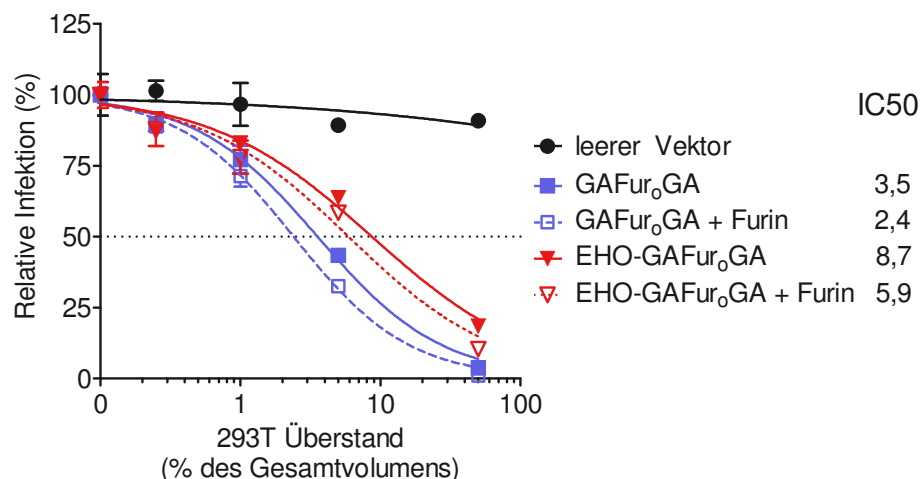


Abbildung 5.26 | Furinüberexpression verbessert die antiretrovirale Aktivität von sezerniertem C46 und C46-EHO gleichermaßen

PM-1-Zellen wurden mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die mit HIV-1_{HXB2}-Hüllproteinen verpackt waren. Gleichzeitig wurden verschiedene Volumina der Überstände von 293T-Zellen zugegeben, die mit den angegebenen Konstrukten transfiziert waren. eGFP-positive Zellen wurden nach einigen Tagen durchflusszytometrisch bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 15% entspricht. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt. Die IC₅₀ für die Hemmung des Viruseintritts ist für jeden Überstand angegeben (in % Überstand des Gesamtvolumens). Gemäß AICc-Test unterscheiden sich die IC₅₀-Werte der Kurven GAFur₀GA und GAFur₀GA + Furin mit einer Wahrscheinlichkeit von 95,27%, während die IC₅₀-Werte der Kurven EHO-GAFur₀GA und EHO-GAFur₀GA + Furin sich nicht signifikant unterscheiden.

Der EHO-GAFur₀GA-Überstand inhibierte den Viruseintritt dabei etwa 2,5-fach schlechter als GAFur₀GA-Überstand. Bei Furinüberexpression wurde bei beiden iSAVE-Konstrukten jeweils eine Verringerung der IC₅₀ um den Faktor 1,5 beobachtet. Diese Veränderung der IC₅₀ war jedoch nur bei GAFur₀GA statistisch signifikant.

Falls die Spaltung des EHO-Concatemers durch Furin nur mit geringer Effizienz durchgeführt würde, wäre bei Furinüberexpression eine deutliche Verbesserung der Spaltungseffizienz und somit eine stark verbesserte antivirale Aktivität zu erwarten. Da dies nicht der Fall ist, ist davon auszugehen, dass die Effizienz der Prozessierung durch Furin in den beiden Konstrukten GAFur₀GA und EHO-GAFur₀GA vergleichbar gut ist.

5.6.3.3 N-Glykane beeinflussen die antivirale Aktivität von EHO-GAFur₀GA nicht

Die N-Glykosylierungsstellen in C46 und C46-EHO befinden sich an unterschiedlichen Positionen innerhalb der C-Helix (Abbildung 5.27). Die N-Glykosylierungsstelle im C46-Peptid befindet sich an einer „c“-Position innerhalb der C-Helix und somit weit entfernt von der Interaktionsfläche mit den N-Helices. Demzufolge beeinträchtigen hier angefügte N-Glykane die Hemmung des Viruseintritts nur wenig (siehe Abbildung 5.16). Im C46-EHO-Peptid dagegen befindet sich die N-Glykosylierungsstelle an einer „g“-Position innerhalb der Helix und damit auf der den N-Helices zugewandten Seite der C-Helix. Eine große N-Glykan-Struktur an dieser Stelle könnte die Wechselwirkung der N- und C-Helices beeinträchtigen und damit die antivirale Aktivität des sezernierten C46-EHO-Peptids deutlich reduzieren.

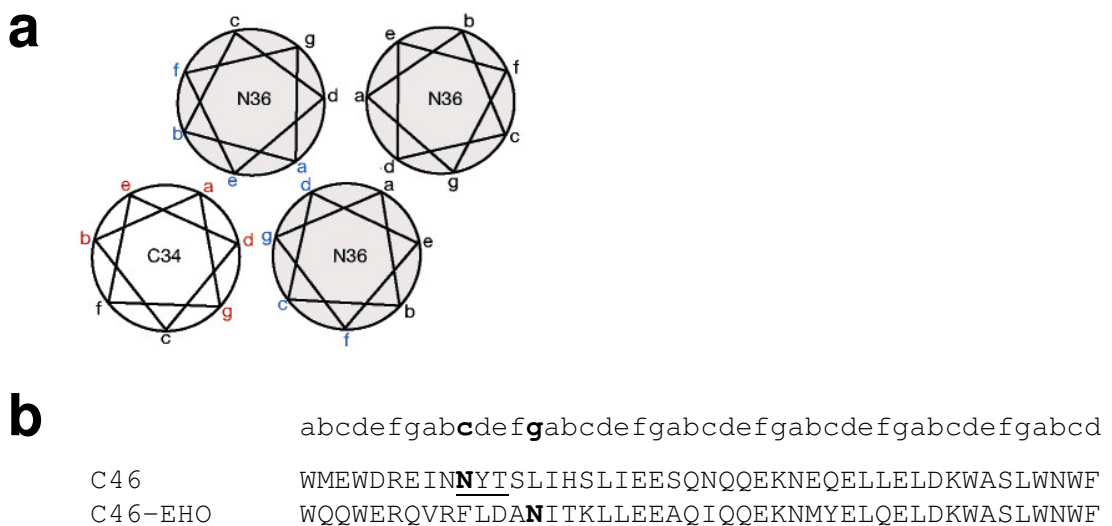


Abbildung 5.27 | Die N-Glykosylierungsstellen in C46 und C46-EHO befinden sich an unterschiedlichen Positionen

(a) Helix-Rad-Darstellung der N- und C-heptad repeats im Sechs-Helix-Bündel von gp41. Die blau markierten Positionen in N36 (Aminosäuren 546-581 von HIV-1_{HXB2} Env) und die rot markierten Positionen in C34 (Aminosäuren 628-661 von HIV-1_{HXB2} Env) entsprechen den Aminosäureresten, die am Kontakt der beiden heptad repeats beteiligt sind. Es ist nur eine C-Helix gezeigt. (b) Sequenzen der C-Peptide C46 und C46-EHO sowie die Positionen der einzelnen Aminosäurereste in der Helix. N-Glykosylierungsstellen in den C-Peptid-Sequenzen sind unterstrichen und ihre Positionen in der Helix fett hervorgehoben. Verändert nach E. Gustchina et al., 2005.

Der Einfluss von N-Glykanen auf die inhibitorische Wirkung der EHO-GAFur₀GA-Peptide wurde daher untersucht. Hierfür wurde der Zellkulturüberstand transfizierter 293T-Zellen vor dem Einsatz im zuvor beschriebenen *single-round infection assay* mit Hilfe des Enzyms PNGase F deglykosyliert und mit nativem Überstand verglichen (Abbildung 5.28).

Dabei zeigten die deglykosylierten und die nativen EHO-GAFur₀GA-Peptide vergleichbare antivirale Aktivität. Die N-Glykosylierung beeinträchtigt die inhibitorische Wirksamkeit der sezernierten EHO-GAFur₀GA-Peptide also nicht und ist demnach auch nicht für die schwache Bystander-Inhibition verantwortlich.

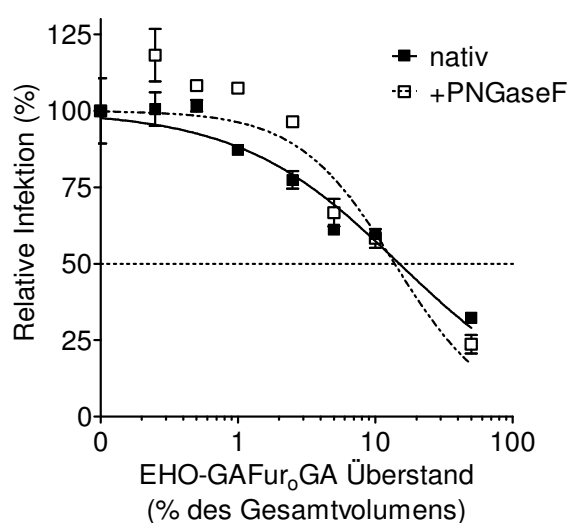


Abbildung 5.28 | N-Glykane beeinträchtigen die Aktivität von EHO-GAFur₀GA nicht

Zellkulturüberstand EHO-GAFur₀GA-transfizierter 293T-Zellen wurde nativ belassen oder mit PNGaseF deglykosyliert und anschließend im *single-round infection assay* analysiert. PM-1-Zellen wurden hierbei mit eGFP-codierenden lentiviralen Vektoren transduziert, die mit dem HIV-1_{HXB2}-Hüllprotein verpackt waren. Gleichzeitig wurden verschiedene Volumina des nativen oder PNGaseF-behandelten Überstands zugegeben. eGFP-positive Zellen wurden mittels FACS bestimmt, wobei 100% relative Infektion einer Transduktionseffizienz von 4% entspricht. Nicht-lineare Regressionskurven wurden mit GraphPad Prism erstellt. Gemäß AICc-Test gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den IC₅₀-Werten beider Kurven.

Zusammenfassend scheinen weder die Effizienz der Concatemer-Spaltung durch Furin noch die N-Glykosylierung die inhibitorische Aktivität sezernierter C46-EHO-Peptide zu beeinträchtigen. Somit ist eine schlechtere Sekretion des EHO-GAFur₀GA-Peptids im Vergleich mit GAFur₀GA sehr wahrscheinlich der Hauptgrund für den beobachteten schwachen Bystander-Effekt des sezernierten C46-EHO-Peptids.

In zukünftigen Experimenten sollten die Ursachen der schlechten Sekretion ermittelt werden, um C46-EHO-Varianten zu generieren, die besser sezernierbar und somit für den Einsatz als iSAVE-Peptid geeigneter sind.

6 DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden C-Peptid-basierte *in vivo* sezernierte antivirale Eintrittsinhibitoren (iSAVE) für die Gentherapie der HIV-Infektion entwickelt. Kurze Peptide, wie die antiviralen C-Peptide, werden von eukaryotischen Zellen aufgrund von Größenbeschränkungen beim Eintritt in den Sekretionsweg jedoch nur unzureichend sezerniert. Um die effiziente Sekretion von iSAVE-Peptiden durch genmodifizierte Zellen zu erreichen, wurde das therapeutische C-Peptid auf zwei verschiedene Weisen verlängert: Einerseits wurde das Peptid um nicht antiviral aktive Gerüstelemente ergänzt. Andererseits wurden Concatemer-Konstrukte generiert, in denen zwei C-Peptide jeweils über einen flexiblen oder proteolytisch spaltbaren Linker verbunden sind.

Die unterschiedlichen iSAVE-Peptid-Varianten wurden *in vitro* in transfizierten und transduzierten Zelllinien und in primären humanen T-Lymphozyten charakterisiert. Hierbei wurden Sekretionseffizienz und Prozessierung sowie antiretrovirale Aktivität und Bystander-Inhibition der sezernierten Peptide untersucht. Die wichtigsten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Effizienz der Sekretion korreliert stark mit der Peptidlänge, so dass durch Sequenzverlängerungen die Sekretion von C-Peptiden verbessert werden kann.
- N-Glykosylierungen sind für die effiziente Sekretion von C-Peptiden unerlässlich.
- Die antivirale Aktivität der sezernierten C-Peptide wird durch Verlängerungen stark beeinträchtigt, so dass weder die durch Gerüstelemente verlängerten C-Peptide, noch die unprozessierten Concatemere antivirale Wirkung zeigen. Durch die Spaltung von Concatemeren in Monomere C-Peptide kann die volle antiretrovirale Aktivität jedoch wiederhergestellt werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse im Hinblick auf pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften der iSAVE-Peptide diskutiert. Üblicherweise werden hierbei die Wechselwirkungen zwischen einem Arzneistoff und dem Körper untersucht, wobei die Pharmakokinetik Freisetzung, Absorption, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung umfasst. Da bei dem in dieser Arbeit vorgestellten gentherapeutischen Ansatz der Arzneistoff (iSAVE-Peptid) im Körper hergestellt wird, kommt die Biosynthese in genmodifizierten Zellen hinzu. Bei den pharmakodynamischen Eigenschaften wird insbesondere auf die antiretrovirale Aktivität und die Immunogenität der iSAVE-Peptide eingegangen.

6.1 Biosynthese und Freisetzung

Die Biosynthese und Sekretion physiologischer Peptide durch genmodifizierte Zellen ist vergleichsweise einfach zu bewerkstelligen. Hierbei kann die Erbinformation der natürlichen Vorläuferproteine oder leicht modifizierter Analoga in die Zellen eingebracht werden, z.B. für Insulin (Wilson et al., 2005), GM-CSF oder Interleukine (Dranoff et al., 1993), Neurotrophin-3 (Mastroeni et al., 2009) oder Enkephalin A (Antunes Bras et al., 1998). Diese Proteine sind im Laufe der Evolution optimiert worden und enthalten alle notwendigen Strukturelemente für die korrekte Faltung sowie Prozessierung und Sekretion.

Die Produktion vollständig artifizieller sezernierter Peptide, wie der iSAVE-Peptide, ist dagegen weitaus diffiziler. In der vorliegenden Arbeit musste eine künstliche Gerüststruktur entwickelt werden, die die Biosynthese und Sekretion therapeutisch wirksamer Peptidkonzentrationen erlaubt. Dabei wurde zunächst die Peptidlänge für eine effiziente Translokation ins ER angepasst. Darüber hinaus musste die Gerüststruktur im Hinblick auf Glykosylierungen und gegebenenfalls proteolytische Prozessierung optimiert werden. Dabei durfte die biologische Funktionalität des Peptids nicht beeinträchtigt werden und weder Peptid noch Gerüststruktur sollten Immunreaktionen des Körpers oder anderweitige unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen.

6.1.1 Der Einfluss von Peptidlänge und -sequenz auf die Sekretion

Die Mindestgröße für den effizienten Eintritt von Peptiden in den sekretorischen Weg beträgt etwa ~50-80 Aminosäuren (Eskridge & Shields, 1983; Lipp et al., 1987; Okun et al., 1990). C-Peptide sind in der Regel zwischen 34 und 46 Aminosäuren lang und sollten damit auch nach dem Anfügen eines Signalpeptids für die effiziente Translokation ins ER zu kurz sein. Erwartungsgemäß konnte ein iSAVE-Peptid, das lediglich aus dem C-Peptid C46 und einem aminoterminalen Signalpeptid bestand (Konstrukt C46) nicht im Überstand transfizierter 293T-Zellen, sondern nur intrazellulär nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5.2). Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieses Konstrukt so kurz ist, dass es im Cytosol freigesetzt wird, bevor ein Translationsarrest durch Bindung an SRP und die Translokation ins ER stattfinden können (Walter & Blobel, 1981a).

Für die erfolgreiche Sekretion antiretroviraler C-Peptide durch genmodifizierte Zellen musste daher die C46-Sequenz mit Hilfe einer Gerüststruktur verlängert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hierfür zunächst die Verlängerung des C-Peptids mit antiviral inaktiven Sequenzen getestet. Mit zunehmender Peptidlänge konnte dabei eine Steigerung der Peptidsekretion beobachtet werden. Durch die Multimerisierung verlängerter C-Peptide konnte die Sekretionseffizienz weiter erhöht werden, was die Daten von X. Dervillez und Kollegen bestätigt, die mit Hilfe der Multimerisierungs-

domäne von humanem C46p die Sekretion eines verlängerten C46-Peptids steigern konnten (Dervillez et al., 2006).

In einem zweiten Ansatz wurde die proteolytische Freisetzung antiretroviraler C-Peptide aus Peptid-Concatemeren erprobt. Auf diese Weise wurde die Peptidsekretion drastisch gesteigert. Im Überstand transfizierter 293T-Zellen konnten so C46-Peptidkonzentration von mehr als 1 $\mu\text{mol/l}$ gemessen werden, was einer Sekretion von über 600 pmol Peptiden pro 1×10^6 Zellen innerhalb von 24 Stunden entspricht. D.J. Groskreutz und Kollegen exprimierten rekombinantes durch Furin spaltbares Proinsulin in transfizierten 293-Zellen (Groskreutz, Sliwowski & Gorman, 1994). Dabei konnten Insulinkonzentrationen von 300-1500 ng/ml im Zellkulturüberstand erreicht werden, was bei einem Molekulargewicht von 5,7 kDa umgerechnet ca. 50-260 nmol/l entspricht. Die optimierten iSAVE zeigten also vergleichsweise gute Sekretionseffizienz, obwohl es sich im Gegensatz zu Insulin um ein vollständig artifizielles Peptid handelt.

Diese Stärke der Sekretion war jedoch von der Sequenz des verwendeten C-Peptids abhängig. Das Ersetzen der C46-Sequenz durch C46-EHO führte vermutlich zu reduzierter Sekretionseffizienz (siehe Abschnitt 5.6.3), was sich in schwächerer Bystander-Inhibition des Viruseintritts äußerte. Die Ursachen hierfür sind bislang unklar. Die N-Glykosylierungsstelle in der C46-EHO-Sequenz liegt jedoch im Vergleich zu C46 an einer anderen Position innerhalb der Helix, was eventuell die Proteinfaltung und Sekretionseffizienz negativ beeinflussen könnte. Darüber hinaus ist das C46-EHO-Peptid etwas hydrophober als das C46-Peptid, was die Sekretion ebenfalls beeinträchtigen könnte. Die Hydrophilizität der Peptide wurde anhand der von T.P. Hopp & K.R. Woods beschriebenen empirischen Hydrophilizitätsskala für Aminosäuren berechnet (Hopp & Woods, 1981). Dabei werden den einzelnen Aminosäuren Werte zwischen +3 (sehr hydrophil, z.B. Arginin) und -3,4 (sehr hydrophob, z.B. Tryptophan) zugeordnet und diese für alle Aminosäuren des Peptids summiert. Der Hydrophilizitätswert für C46 beträgt demnach +1,3 und für C46-EHO -2,1, C46-EHO ist somit etwas hydrophober als C46.

6.1.2 Der Einfluss von N-Glykanen auf die Sekretion

N-Glykane unterstützen die Sekretion von Proteinen, indem sie bei der Proteinfaltung und Qualitätskontrolle im Endoplasmatischen Retikulum eine wichtige Rolle spielen und auch den intrazellulären Transport beeinflussen (Helenius & Aebi, 2001; Parodi, 2000). Die hydrophilen Oligosaccharide erleichtern die Proteinfaltung, indem sie die Löslichkeit und thermodynamische Stabilität von Proteinen erhöhen (Hurtley et al., 1989; Imperiali & Rickert, 1995; Shental-Bechor & Levy, 2008). Darüber hinaus ermöglichen sie die Interaktion mit den Lectinen Calnexin oder Calreticulin und ERp57, die für die Qualitätskontrolle im ER verantwortlich sind und fehlgefaltete Proteine im ER zurückhalten, bis sie ihre native Konformation angenommen haben (Helenius & Aebi, 2001; Molinari, 2007).

N-Glykane sind für den Export aus der Zelle nicht zwingend notwendig, da auch einige nicht-glykosylierte Proteine sezerniert werden, z.B. Decoy Receptor 3 (DcR3), Spondin-2 oder das Makrophagen-inhibierende Cytokin 1 (MIC-1) (Liu et al., 2009; Varki, 1993). Dennoch sind Oligosaccharide für die effiziente Sekretion der meisten Proteine erforderlich (Gahmberg & Tolvanen, 1996; Kadowaki et al., 2000; Ray et al., 1998; Varki, 1993; Zhou et al., 2004). Dies zeigte sich auch bei der Analyse von Glykosylierungsvarianten der iSAVE-Peptide, wobei die Sekretionseffizienz durch die Mutation potentieller N-Glykosylierungsstellen stark reduziert wurde (siehe Abbildung 5.4 und Abschnitt 5.4.4). Die iSAVE-Peptide sind hydrophob und schwer löslich, daher könnten hydrophile Oligosaccharide hier für die Faltung und den weiteren intrazellulären Transport besonders wichtig sein. Die Sekretionseffizienz der iSAVE-Peptide könnte daher in besonderem Maße von Glykosylierungen abhängen.

6.1.3 Proteolytische Prozessierung im Sekretionsweg

Die proteolytische Spaltung der C46-Concatemere durch Furin war für die antiretrovirale Aktivität der Peptide unerlässlich (siehe Abbildung 5.11). Die Prozessierung durch die Protease war jedoch nicht einfach zu erreichen. Die Effizienz der Spaltung wurde durch die Architektur der Schnittstelle und ihrer Umgebung maßgeblich beeinflusst, wobei sowohl die Aminosäuresequenzen als auch N-Glykosylierungen eine Rolle spielten.

6.1.3.1 Die Architektur der Schnittstelle

Der Einbau einer minimalen Furin-Konsensussequenz in C46-Concatemere führte nicht zur Prozessierung in Monomere. Erst nach der Verlängerung und Optimierung der Schnittstelle und dem Anfügen flexibler Linkersequenzen konnte eine effektive Spaltung in Monomere erreicht werden (siehe Abbildung 5.10).

C-Peptide liegen in wässriger Lösung normalerweise in ungeordneter Form vor (Judice et al., 1997; Lawless et al., 1996). Die Concatemere könnten jedoch durch Interaktion der beiden C-Peptide untereinander eine Struktur annehmen, die die Zugänglichkeit zur Furinschnittstelle sterisch beschränkt, was die effiziente Prozessierung verhindert. Längere Linker zwischen den beiden C-Peptiden könnten die nötige Flexibilität geben, die die Bindung der Protease an ihre Zielsequenz erlaubt.

Für einige natürliche Furinsubstrate wurde gezeigt, dass sich die Proteaseschnittstelle inmitten einer flexiblen Schleife befindet (Abrami et al., 1998; Chen et al., 1998; Sen et al., 2007). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass in den Concatemeren, die nur kurze Furinlinker enthalten, die Zugänglichkeit zur Schnittstelle nicht optimal ist und erst durch das Einfügen flexibler Glycin-Alanin Repeats beiderseits der Furin-Konsensussequenz die benötigte Flexibilität hergestellt werden konnte, so dass die Protease korrekt binden und das Vorläuferprotein spalten kann.

In mehreren Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die Aminosäuren, die sich N- und C-terminal an das Konsensusmotiv R-X-K/R-R anschließen, bei der Erkennung und Prozessierung durch Furin eine wichtige Rolle spielen (Duckert et al., 2004; Henrich et al., 2003; Hosaka et al., 1991; Jean et al., 1995; Krysan et al., 1999; Liu et al., 1993). Auf Grundlage dieser Daten war die Furinschnittstelle der C46-Concatemere erfolgreich optimiert worden. Durch statistische Analysen von 130 bekannten Furinschnittstellen konnte S. Tian zeigen, dass das Furin-Erkennungsmotiv insgesamt sogar etwa 20 Aminosäuren umfasst (Abbildung 6.1) (Tian, 2009).

Aminosäureposition		Sequenz in GAFur ₀ GA	Übereinstimmung	
Kontakt zum Lösungsmittel	P14	G		
	P13	G		
	P12	A		
	P11	G		
Kontakt zum Lösungsmittel. Kleine hydrophile AS werden bevorzugt. Die polaren Seitenketten können schwache Wechselwirkungen mit der polaren Oberfläche von Furin eingehen.	P10	A	(✓)	
	P9	G	(✓)	
	P8	A	(✓)	
	P7	G	(✓)	
Positiv geladene Kernregion, wird in der Furin-Bindungstasche gebunden. Seitenketten mit hohem Isoelektrischen Punkt werden bevorzugt. Die Anwesenheit von Cystein kann die Spaltung durch Furin stören.	P6	Bevorzugt positiv geladene AS, insbesondere falls P4 nicht positiv geladen.	R	✓
	P5		S	
	P4	Bevorzugt positiv geladene AS, insbesondere Arginin, aliphatische Seitenketten werden toleriert.	R	✓
	P3	Bevorzugt flexible, nicht zu starre AS.	A	✓
	P2	Arginin, Lysin oder sehr kleine flexible AS.	K	✓
	P1	Arginin	R	✓
Furin-Spaltstelle (P1↓P1')	P1'	Bevorzugt kleine, insbesondere kleine hydrophile AS. Negative Ladungen werden toleriert. Limitiertes Volumen.	S	✓
	P2'	Bevorzugt aliphatische AS, insbesondere Valin, oder hydrophobe AS.	V	✓
Kontakt zum Lösungsmittel. Kleine hydrophile AS werden bevorzugt. Die polaren Seitenketten können schwache Wechselwirkungen mit der polaren Oberfläche von Furin eingehen.	P3'		G	(✓)
	P4'		G	(✓)
	P5'		A	(✓)
	P6'		G	(✓)

Abbildung 6.1 | Aufbau und physikalische Eigenschaften des Furin-Erkennungsmotivs

Das Furin-Erkennungsmotiv umfasst die Aminosäurepositionen P14 bis P6' N- und C-terminal der Spaltstelle. Die acht Aminosäuren lange Kernregion (blau, P6-P2') mit der Furin-Spaltstelle wird von zwei polaren Regionen P14-P7 und P3'-P6' (gelb) eingeschlossen. Die entsprechende Aminosäuresequenz des Konstrukts GAFur₀GA ist angegeben. Die Übereinstimmung der einzelnen Aminosäuren in GAFur₀GA mit den geforderten physikalischen Eigenschaften ist angegeben (✓: hohe Übereinstimmung, (✓): teilweise Übereinstimmung). Verändert nach S. Tian, 2009.

Das Furin-Erkennungsmotiv lässt sich in eine acht Aminosäuren lange Kernregion und zwei daran N- bzw. C-terminal anschließende polare Regionen unterteilen. Die Kernregion (Positionen P6-P2'; Nummerierung der Aminosäuren im Bereich der Schnittstelle gemäß Schlechter und Berger (Schechter & Berger, 1968), wobei P1, P2 etc., bzw. P1', P2' etc. die Aminosäuren N- bzw. C-terminal der spaltbaren Peptidbindung bezeichnen) mit der Erkennungssequenz R-X-K/R-R wird innerhalb der Furinbindungstasche gebunden. Die beiden polaren flexiblen Regionen (acht Aminosäuren an den Positionen P14-P7 und vier Aminosäuren an den Positionen P3'-P6'), befinden sich außerhalb der Bindungstasche und stellen vermutlich den Kontakt zum Lösungsmittel her.

Insbesondere N-terminal der Schnittstelle ist demnach das Vorhandensein eines langen flexiblen Linkers entscheidend, was erklärt, warum vor allem das Einfügen des N-terminalen Glycin-Alanin Repeats die Prozessierung des C46-Concatemers förderte. Zwar sind die in den C46-Concatemeren verwendeten Glycin-Alanin Repeats keine polaren Linker, jedoch bestehen sie aus kleinen, flexiblen Aminosäuren und erfüllen somit zumindest teilweise die geforderten physikalischen Eigenschaften. Durch den Austausch gegen einen flexiblen polaren Linker, beispielsweise einen Glycin-Serin Linker, könnte die Prozessierung durch Furin eventuell noch weiter gesteigert werden.

Die Aminosäuren an den Positionen P6-P2' in der Kernregion des Furinerkennungsmotivs entsprechen bei der optimierten Schnittstelle Fur₀ genau den Vorgaben, die sich aus den statistischen Analysen von S. Tian ergeben. Die positiv geladene Kernregion sollte daher problemlos innerhalb der Bindungstasche des Enzyms gebunden und prozessiert werden können. Eine weitere Optimierung dieser Sequenz zur Steigerung der Spaltungseffizienz scheint kaum möglich.

6.1.3.2 Der Einfluss von N-Glykanen auf die Prozessierung

Der Einfluss von N-Glykanen auf die Prozessierung der C46-Concatemere wurde anhand des Konstrukts Fur₀GA untersucht, indem N-Glykosylierungsstellen an den Positionen P43 bzw. P20' mutiert und die Prozessierung der Peptide in transfizierten 293T-Zellen in *pulse-chase*-Experimenten analysiert wurden. Unsere Annahme war, dass N-Glykane nahe der Schnittstelle die Prozessierung in Monomere beeinträchtigen könnten, indem sie die Zugänglichkeit zur Schnittstelle einschränken. Es zeigte sich jedoch, dass N-Glykane die Spaltung der iSAVE-Concatemere nicht stören, sondern im Gegenteil, die Effizienz der Furinspaltung erhöhen (siehe Abbildung 5.14).

Die Zugänglichkeit der Proteaseschnittstelle wird durch Oligosaccharide also nicht eingeschränkt, stattdessen könnten diese die korrekte Faltung des Concatemers fördern und somit die Zugänglichkeit der Schnittstelle und die folgende Spaltung durch Furin unterstützen. Chemische *cross-linking* Experimente (Daten nicht gezeigt) von Andreas Volk und Dr. Jörg Kahle aus der Arbeitsgruppe von Laer zeigten, dass N-Glykane die Aggregation bzw. Homodimerisierung der hydrophoben C46-Regionen verhindern. Somit

könnten N-Glykane in den vollständig glykosylierten Vorläuferproteinen die Zugänglichkeit der Furinschnittstelle sicherstellen. Für verschiedene Proteine konnte gezeigt werden, dass größere Glykanstrukturen durch sterische Hinderung der Protein-Protein-Interaktion Aggregation reduzieren oder verhindern können (Sola & Griebenow, 2009).

Darüber hinaus enthalten auch eine Reihe natürlicher Furin-spaltbarer Vorläuferproteine potentielle N-Glykosylierungsstellen in unmittelbarer Nähe der Furin-Spaltstelle, beispielsweise humanes Neurotrophin-3 (Asn₁₃₁ an Position P8; GenBank: AAI07076.1), humanes Integrin- α 3-chain (Asn₈₅₇ an Position P19; GenBank: AAA36120.1) sowie das Hüllprotein des Felinen Foamy Virus (Asn₁₁₈ und Asn₁₃₉ an Positionen P10 bzw. P12'; GenBank: CAA11582.1) oder das Glykoprotein B des humanen Herpesvirus 5 (Asn₄₄₇ und Asn₄₅₂ an Positionen P13 bzw. P8; GenBank: AAA45933.1). N-gebundene Oligosaccharide in der Nähe einer Furinschnittstelle werden demnach von der Protease toleriert. N-Glykane unmittelbar an der Spaltstelle (Position P1') verhindern jedoch die Prozessierung durch Furin (Tian, 2009).

6.1.3.3 Die Verfügbarkeit von Furin

Säugerzellen haben einen relativ niedrigen Gehalt an endogenen Proprotein-Convertasen wie Furin (Seidah & Chretien, 1997), was ein großes Hindernis bei der Produktion sezernierter Proteine darstellt, die auf proteolytische Spaltung angewiesen sind. Durch Furinüberexpression in transfizierten Zellen konnte die Spaltung der C46-Concatemere gesteigert werden, was verdeutlicht, dass die Verfügbarkeit von Furin die Spaltungseffizienz limitiert (siehe Abbildung 5.12).

Ähnliches konnten J. Gäken und Kollegen beobachten, die ein Furin-spaltbares Concatemer aus dem Cytokin Interleukin-2 und dem Transmembranprotein B7.1 in transduzierten humanen Zelllinien exprimierten. Bei geringer Expression des Concatemers wurde dieses annähernd vollständig von Furin gespalten. Mit zunehmender Expressionsstärke verringerte sich jedoch der Anteil prozessierten Concatemers. Diese Sättigung der Furin-vermittelten Spaltung konnte wiederum durch Überexpression der Protease ausgeglichen werden (Gaken et al., 2000).

Furinüberexpression ist jedoch mit einer Reihe humaner Tumoren assoziiert, so sind die Furinmengen in Lungen-, Brust- sowie Hals- und Kopftumoren erhöht (Bassi et al., 2001a; Bassi et al., 2001b; Cheng et al., 1997; Mbikay et al., 1997). Furin ist für die proteolytische Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmolekülen zuständig, die ihrerseits an Invasion und Metastasierung von Tumoren beteiligt sind (Bassi et al., 2001a; Khatib et al., 2002). Eine Überexpression der Protease zur Erhöhung der Spaltungseffizienz ist daher in gentherapeutischen Ansätzen keine vernünftige Option.

Durch Optimierung der Furinschnittstelle konnte die Prozessierungseffizienz der C46-Concatemere allerdings stark erhöht werden (siehe Abbildung 5.10). Die limitierten Furinmengen konnten auf diese Weise ausgeglichen werden, was eine Coexpression von rekombinantem Furin überflüssig macht.

6.2 Absorption und Verteilung

Das in der HAART-Therapie verwendete T-20 (Enfuvirtide / Fuzeon®, Roche) ist nicht oral bioverfügbar und muss daher subkutan injiziert werden. Bei Injektion von zweimal täglich 90 mg T-20 liegt die absolute Bioverfügbarkeit bei 85% (Fuzeon, 2008). Die maximale Peptidkonzentration im Plasma C_{max} beträgt im Gleichgewicht dabei etwa 6 µg/ml, die minimale Konzentration C_{trough} nach 12 Stunden beträgt ca. 3,8 µg/ml (Thompson et al., 2006).

Für therapeutische Effektivität werden T-20-Plasmakonzentrationen von über 2 µg/ml (entspricht ~450 nM) benötigt (de Requena et al., 2008), zwei Größenordnungen über der effektiven *in vitro*-Konzentration (IC_{50} ca. 2-4 nM, siehe Abbildung 5.15). Zusammen mit dem geringen Distributionsvolumen von etwa 5,5 l im menschlichen Körper (Fuzeon, 2008) weist dies darauf hin, dass T-20 die lymphatischen Gewebe, in denen der Großteil der HIV-Replikation stattfindet (Hufert et al., 1997), nur unzureichend durchdringt.

iSAVE-Peptide hingegen könnten von genmodifizierten T-Lymphozyten direkt in den Lymphgeweben freigesetzt werden, so dass deutlich geringere Peptidmengen für einen therapeutischen Effekt benötigt würden. Darüber hinaus sind die iSAVE-Peptide N-glykosyliert, was die Löslichkeit von C-Peptiden verbessert (Wang et al., 2005) und die Bioverfügbarkeit erhöhen könnte.

293T-Zellen, die mit dem optimierten iSAVE-Konstrukt GAFur₀GA transfiziert waren sezernierten innerhalb von 24 Stunden etwa 600 pmol C-Peptide pro 10^6 Zellen (Konzentration im Überstand ca. 1 µmol/l). In einem Lymphknoten mit einem Durchmesser von 5 mm (entspricht bei Kugelform einem Volumen von ca. 65 µl bzw. ca. 65 mg) befinden sich etwa $1,5 \times 10^7$ T-Zellen (Lymphknotengewebe enthält ca. 4×10^5 Immunzellen pro 1 mg, davon etwa 60% T-Zellen (Kim et al., 2008)). Bei einem Anteil von 1% iSAVE-exprimierender T-Zellen (150.000 Zellen) könnte somit eine lokale Peptidkonzentration von 1,4 µmol/l im Lymphknoten erzeugt werden. Selbst bei zehnfach geringerer Sekretionseffizienz in den transduzierten Zellen könnte eine vollständige Unterdrückung der HIV-Replikation erreicht werden.

6.3 Metabolisierung und Ausscheidung

Die anhand von *pulse-chase*-Versuchen ermittelte Halbwertszeit des iSAVE-Peptids GAFur₆GA in Zellkulturüberstand war länger als 30 Stunden (siehe Abbildung 5.17). Für synthetisches T-20 wurde von J.M. Kilby und Kollegen eine mittlere Halbwertszeit von 1,8 Stunden im Serum von Patienten bestimmt (Kilby et al., 1998). Dr. Ingrid Müller aus der Arbeitsgruppe von Laer ermittelte für synthetisches T-20 in Zellkulturmedium, das mit 10% FCS supplementiert war, eine Halbwertszeit von 4-6 Stunden (persönliche Kommunikation).

Die deutlich verlängerte Halbwertszeit der iSAVE-Peptide könnte auf eine Stabilisierung der sezernierten Peptide durch N-Glykane zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass Glykosylierungen die chemische und physikalische Stabilität von Proteinen stark beeinflussen können (Sola & Griebenow, 2009). Insbesondere die Sensitivität gegenüber proteolytischer Degradation wird durch Glykosylierungen vermindert (Elliott et al., 2003; Gu et al., 1989; Sareneva et al., 1995; Vegarud & Christensen, 1975). Dies konnte auch für das C-Peptid C34 gezeigt werden. Chemisch glykosyliertes C34 ist verglichen mit unglykosyliertem C34 deutlich stabiler gegenüber der Degradation durch Proteasen *in vitro* (Huang et al., 2009).

Auch andere Kohlenhydrate, wie Polyethylenglykan (PEG), können die Halbwertszeit von Arzneistoffen im Körper erhöhen, indem die Ausscheidung über die Nieren und die proteolytische Degradation verzögert werden. So hat PEGyliertes Interferon α -2b, das zur Therapie der chronischen Hepatitis C eingesetzt wird, eine etwa zehnfach längere Plasmahalbwertszeit als unmodifiziertes Interferon α -2b (Zeuzem, Welsch & Herrmann, 2003).

Effektiver Schutz vor Proteolyse und verzögerte Ausscheidung könnte auch die *in vivo*-Halbwertszeit glykosylierter C-Peptide signifikant verlängern. Daher könnten selbst bei niedriger Produktion *in vivo* therapeutische Konzentrationen leichter als bei synthetischen Peptiden erreicht werden. Die Bestimmung solcher klassischer pharmakokinetischer Parameter wie der Halbwertszeit *in vivo* ist für ein Gentherapeutikum jedoch schwierig. Da fortwährend neues Peptid produziert wird, können Peptidkonzentrationen nur im *steady-state* gemessen werden und dabei in Bezug zur Anzahl genmodifizierter Zellen betrachtet werden. Lediglich durch *in vivo pulse-chase*-Experimente mit radioaktiv markierten Aminosäuren könnte eine Abschätzung der Halbwertszeit *in vivo* vorgenommen werden.

6.4 Antiretrovirale Aktivität

6.4.1 Einfluss der Peptidlänge auf die antiretrovirale Aktivität

Die Verlängerung von C46 durch zusätzliche Sequenzen resultierte stets in einem weitgehenden Verlust der antiretroviralen Aktivität. Erst die Abspaltung von C46-Einheiten aus einem Concatemer (z.B. im Konstrukt GAFur₀GA) stellte die inhibitorische Aktivität wieder her.

Die schlechte antiretrovirale Aktivität der verlängerten C-Peptide könnte durch eine mangelnde Zugänglichkeit der C-Peptide zu ihrer N-Helix-Zielstruktur verursacht sein. A.E. Hamburger und Kollegen untersuchten die sterische Zugänglichkeit der HIV-1 gp41 N-Trimer-Region für C-Peptide, indem eine Reihe verschieden großer globulärer Proteine jeweils über einen flexiblen Linker an das aminoternale Ende des C-Peptids C37 angehängt wurde (Hamburger et al., 2005). Diese Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer antiretroviralen Eigenschaften analysiert, wobei sich die inhibitorische Aktivität mit zunehmendem Molekulargewicht des angehängten Proteins stark reduzierte. Dies weist auf eine sterische Beschränkung des Zugangs zur C-Peptidbindungsstelle hin, wobei jedoch ein 6,5 kDa großes Protein an C37 angehängt werden konnte ohne die antivirale Aktivität zu beeinflussen.

Im Fall der verlängerten C-Peptide wie L-C46-H-GAr beträgt das theoretische Molekulargewicht 14 kDa. Dazu kommen fünf N-Glykan-Strukturen (jeweils etwa 2 kDa bei mannosereichen Kohlenhydraten), wodurch sich die Konstruktgröße nochmals stark erhöht. Außerdem handelt es sich bei den an das C-Peptid angehängten Sequenzen nicht um kompakte globuläre, sondern vermutlich um weitgehend unstrukturierte Proteinbereiche. Diese könnten ein relativ großes Volumen beanspruchen und somit die Anlagerung der C-Peptide an die N-Helices sterisch hindern. Aufgrund der instabilen Tertiärstruktur der verlängerten C-Peptide kann es darüber hinaus zur verstärkten Wechselwirkung ungefalteter Sequenzen mit anderen Proteinen kommen, wodurch die Bindung an die eigentliche Zielstruktur zusätzlich beeinträchtigt würde. Die Zugänglichkeit zu den N-Helices könnte also durch die Sequenzverlängerungen der C-Peptide stark eingeschränkt sein.

Bei den ungespaltenen C46-Concatemeren, die ebenfalls keine inhibitorische Aktivität zeigten, sind die beiden C-Peptide über einen kurzen Linker verbunden und enthalten mit dem jeweils anderen C-Peptid einen zusätzlich angehängten Proteinanteil von 5,8 kDa (plus N-Glykan), so dass auch hier der Zugang zur C-Peptidbindungsstelle durch die Proteingröße eingeschränkt sein könnte. Des Weiteren ist eine Wechselwirkung der beiden hydrophoben C-Peptide untereinander denkbar, die die Bindung an die N-Helix *coiled-coil*-Struktur verhindert.

6.4.2 Einfluss von N-Glykanen auf die antiretrovirale Aktivität

Der Einfluss von N-Glykanen auf die inhibitorische Aktivität der iSAVE-Peptide sollte anfangs beim Konstrukt L-C46-H-GAr anhand der Varianten untersucht werden, in denen einzelne oder mehrere N-Glykosylierungsstellen deletiert waren. Da aber auch das Ausgangskonstrukt keine signifikante antiretrovirale Aktivität zeigte, konnte hier keine Aussage über den Einfluss von N-Glykanen auf die Hemmung des Viruseintritts gemacht werden (siehe Abbildung 5.5).

Anhand des Concatemer-Konstrukts GAFur₆GA konnte jedoch ein leichter negativer Effekt von N-Glykanen auf die inhibitorische Aktivität festgestellt werden. Nach Deglykosylierung von peptidhaltigem Überstand durch PNGase F verdoppelte sich die inhibitorische Aktivität im *single-round infection assay* (siehe Abbildung 5.16).

Dies ist in Einklang mit Daten aus dem Labor von L.-X. Wang, der zeigte, dass die chemische Kopplung von N-Glykan-Strukturen an das synthetische C-Peptid C34 eine etwa 2- bis 7-fache Verringerung der antiretroviralen Aktivität zur Folge hat (Huang et al., 2009; Wang et al., 2005). N-glykosyliertes C34 bildet dabei weniger stabile Sechs-Helix-Bündel mit dem N-Peptid N36 aus und weist einen geringeren α -Helix-Anteil auf als unmodifiziertes C34-Peptid. Die Zuckerreste führen daher vermutlich zu einer sterischen Hinderung während der Bindung an die N-Helix-Zielstruktur.

6.5 Immunogenität

Peptidtherapeutika, die ohne zusätzliche Adjuvantien appliziert werden, lösen in der Regel kaum eine Immunreaktion des Körpers aus. Antiretrovirale C-Peptide wie T-20 sind jedoch von der HIV-1 gp41-Sequenz abgeleitet, gegen die im Verlauf der Infektion im Patienten eine humorale Immunantwort ausgelöst und Antikörper produziert wurden. In den meisten HIV-Infizierten präexistieren daher anti-gp41-Antikörper, die gegen C-Peptide Kreuzreaktivität zeigen. Diese beeinflussen jedoch weder die antiretrovirale Aktivität oder Pharmakokinetik noch die Sicherheit der Therapie (van Lunzen et al., 2007; Walmsley et al., 2003).

Dennoch ist es bei der Entwicklung von iSAVE-Peptiden wichtig, die potentielle Immunogenität der Peptide soweit wie möglich zu reduzieren. Hierfür wurden in die iSAVE-Peptide vom Epstein-Barr-Virus abgeleitete Glycin-Alanin Repeats eingefügt, die die Immunogenität von Proteinen verringern, indem sie die Präsentation von Peptidfragmenten auf dem Klasse I MHC-Komplex inhibieren (Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997; Tellam et al., 2001).

Darüber hinaus können auch N-Glykane die MHC I-Präsentation potentiell immunogener Peptide, die eine N-Glykosylierungsstelle enthalten oder sich in der Nähe einer solchen befinden, verhindern (Kario et al., 2008). N-Glykosylierungen können

außerdem die Aggregation der Peptide, die mit erhöhter Immunogenität einhergeht, verhindern (Man et al., 1989; Moore & Leppert, 1980). Das Vorhandensein von N-Glykanen in den iSAVE-Peptiden kann demnach dazu beitragen die Immunogenität zu verringern.

Des Weiteren werden in der Arbeitsgruppe von Laer derzeit nicht-immunogene C-Peptid-Varianten entwickelt, gegen die weder in gesunden Probanden noch in HIV-Infizierten Antikörper präexistieren oder cytotoxische T-Zell-Antworten ausgelöst werden. Die Verwendung solcher optimierter C-Peptide in iSAVE-Konstrukten könnte die Sicherheit der antiviralen Therapie weiter steigern.

6.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit generierten iSAVE-Peptide bilden eine hervorragende Grundlage für die weitere präklinische und klinische Entwicklung eines neuen Gentherapieansatzes zur Behandlung der HIV-1-Infektion.

Die Sekretion therapeutischer iSAVE-Peptide durch genmodifizierte T-Lymphozyten *in vivo* birgt dabei großes Potential. Es wird erwartet, dass sich die T-Zellen in den Lymphgeweben anreichern, wo der Großteil der HIV-Replikation stattfindet (Hufert et al., 1997). Durch Sekretion des antiviralen Genprodukts könnten hier hohe lokale Konzentrationen des therapeutischen Peptids aufgebaut werden und somit ein klarer antiviraler Effekt hervorgerufen werden.

Andererseits ist die Wirksamkeit von iSAVE-Peptiden im Gegensatz zu membranverankerten C-Peptiden nicht mehr von der Expression in den HIV-Zielzellen abhängig. Stattdessen könnten andere hämatopoetische Zelltypen (z.B. B-Zellen) oder sogar andere Organe (z.B. die Leber), die für die Sekretion großer Peptidmengen prädestiniert sind, als Produzentenzellen im Körper dienen.

Durch die Verwendung alternativer Vektorsysteme anstelle gammaretroviraler oder lentiviraler Vektoren, die beispielsweise auf Adeno-assoziierten Viren (AAV) basieren, kann zudem die Therapie vereinfacht und sicherer gemacht werden. Wildtyp AAV kann sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infizieren und integriert dabei an einer spezifischen Stelle in das humane Genom (Kotin, Linden & Berns, 1992; Surosky et al., 1997). AAV-basierte Gentherapievektoren können jedoch auch so modifiziert werden, dass sie nicht in die zelluläre DNA integrieren, sondern lediglich in episomaler Form im Nukleus der Zielzelle verbleiben. Dies erlaubt einen sehr sicheren und stabilen Gentransfer in ruhende Zellen und solche mit geringer Teilungsaktivität (Belur et al., 2008; Niemeyer et al., 2008). Darüber hinaus ist es möglich durch Mutationen im Capsid-Protein rekombinante AAV-Vektoren mit modifiziertem Zelltropismus zu generieren (Buning et al., 2008), wobei im Fall der iSAVE-Peptide hämatopoetische Stammzellen und T-Lymphozyten potentielle Zielzellen wären.

Hierdurch eröffnet sich die Möglichkeit für die Entwicklung von *in vivo* Gentherapieansätzen mit systemischer Vektorapplikation, was bei Verwendung lentiviraler Vektoren aus Sicherheitsgründen nicht durchführbar wäre. Dies könnte die Gentherapie mit iSAVE-Peptiden stark vereinfachen und die Kosten reduzieren, wodurch die Behandlung auch leichter für Patienten in Entwicklungsländern zugänglich gemacht werden könnte. Darüber hinaus wäre eine prophylaktische Anwendung denkbar, falls auch zukünftig keine potente HIV-Vakzine gefunden werden kann.

7 LITERATUR

- (1981a). Kaposi's Sarcoma and pneumocystis pneumonia among homosexual men - New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**, 305-308.
- (1981b). Pneumocystis pneumonia - Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **30**, 250-252.
- ABRAMI, L., FIVAZ, M., DECROLY, E., SEIDAH, N. G., JEAN, F., THOMAS, G., LEPPLA, S. H., BUCKLEY, J. T. & VAN DER GOOT, F. G. (1998). The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin. *J Biol Chem* **273**, 32656-61.
- AIKEN, C., KONNER, J., LANDAU, N. R., LENBURG, M. E. & TRONO, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**, 853-64.
- ANTUNES BRAS, J. M., EPSTEIN, A. L., BOURGOIN, S., HAMON, M., CESSÉLIN, F. & POHL, M. (1998). Herpes simplex virus 1-mediated transfer of preproenkephalin A in rat dorsal root ganglia. *J Neurochem* **70**, 1299-303.
- ATKINSON, P. H. & LEE, J. T. (1984). Co-translational excision of alpha-glucose and alpha-mannose in nascent vesicular stomatitis virus G protein. *J Cell Biol* **98**, 2245-9.
- BALTIMORE, D. (1988). Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* **335**, 395-6.
- BARRE SINOUSSE, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER BLIN, C., VEZINET BRUN, F., ROUZIUX, C., ROZENBAUM, W. & MONTAGNIER, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**, 868-871.
- BASSI, D. E., LOPEZ DE CICCIO, R., MAHLOOGI, H., ZUCKER, S., THOMAS, G. & KLEIN-SZANTO, A. J. (2001a). Furin inhibition results in absent or decreased invasiveness and tumorigenicity of human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10326-31.
- BASSI, D. E., MAHLOOGI, H., AL-SALEEM, L., LOPEZ DE CICCIO, R., RIDGE, J. A. & KLEIN-SZANTO, A. J. (2001b). Elevated furin expression in aggressive human head and neck tumors and tumor cell lines. *Mol Carcinog* **31**, 224-32.
- BELUR, L. R., KAEMMERER, W. F., MCLIVOR, R. S. & LOW, W. C. (2008). Adeno-associated virus type 2 vectors: transduction and long-term expression in cerebellar Purkinje cells in vivo is mediated by the fibroblast growth factor receptor 1 : bFGFR-1 mediates AAV2 transduction of Purkinje cells. *Arch Virol*.
- BERGER, E. A., MURPHY, P. M. & FARBER, J. M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* **17**, 657-700.
- BERGERON, F., LEDUC, R. & DAY, R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol* **24**, 1-22.
- BEWLEY, C. A., LOUIS, J. M., GHIRLANDO, R. & CLORE, G. M. (2002). Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41. *J Biol Chem* **277**, 14238-45.
- BLOBEL, G. & DOBBERSTEIN, B. (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**, 835-51.
- BLOBEL, G. & SABATINI, D. D. (1970). Controlled proteolysis of nascent polypeptides in rat liver cell fractions. I. Location of the polypeptides within ribosomes. *J Cell Biol* **45**, 130-45.
- BRESNAHAN, P. A., LEDUC, R., THOMAS, L., THORNER, J., GIBSON, H. L., BRAKE, A. J., BARR, P. J. & THOMAS, G. (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro-beta-NGF in vivo. *J Cell Biol* **111**, 2851-9.
- BRINKMAN, K., SMEITINK, J. A., ROMIJN, J. A. & REISS, P. (1999). Mitochondrial toxicity induced by nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors is a key factor in the pathogenesis of antiretroviral-therapy-related lipodystrophy. *Lancet* **354**, 1112-5.
- BROWN, H. E., CHEN, H. & ENGELMAN, A. (1999). Structure-based mutagenesis of the human immunodeficiency virus type 1 DNA attachment site: effects on integration and cDNA synthesis. *J Virol* **73**, 9011-20.
- BROWN, P. O., BOWERMAN, B., VARMUS, H. E. & BISHOP, J. M. (1989). Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2525-9.
- BUKRINSKAYA, A. G. (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* **149**, 1067-82.
- BUKRINSKY, M. I., HAGGERTY, S., DEMPSEY, P., SHAROVA, N., ADZHUBEI, A., SPITZ, L., LEWIS, P., GOLDFARB, D., EMERMAN, M. & STEVENSON, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature* **365**, 666-669.
- BUNING, H., PERABO, L., COUTELLE, O., QUADT-HUMME, S. & HALLEK, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* **10**, 717-33.
- CAMMACK, N. (2001). The potential for HIV fusion inhibition. *Curr Opin Infect Dis* **14**, 13-6.
- CARUSO, M., SALOMON, B., ZHANG, S., BRISSON, E., CLAVEL, F., LOWY, I. & KLATZMANN, D. (1995). Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology* **206**, 495-503.

- CERVIA, J. S. & SMITH, M. A. (2003). Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin Infect Dis* **37**, 1102-6.
- CHAN, D. C., CHUTKOWSKI, C. T. & KIM, P. S. (1998). Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15613-7.
- CHAN, D. C., FASS, D., BERGER, J. M. & KIM, P. S. (1997). Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell* **89**, 263-273.
- CHAN, D. C. & KIM, P. S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**, 681-4.
- CHEN, J., LEE, K. H., STEINHAUER, D. A., STEVENS, D. J., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. (1998). Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. *Cell* **95**, 409-17.
- CHEN, L. F., HOY, J. & LEWIN, S. R. (2007). Ten years of highly active antiretroviral therapy for HIV infection. *Med J Aust* **186**, 146-51.
- CHENG, M., WATSON, P. H., PATERSON, J. A., SEIDAH, N., CHRETIEN, M. & SHIU, R. P. (1997). Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer* **71**, 966-71.
- CHINNADURAI, R., MUNCH, J. & KIRCHHOFF, F. (2005). Effect of naturally-occurring gp41 HR1 variations on susceptibility of HIV-1 to fusion inhibitors. *Aids* **19**, 1401-5.
- COHEN, E. A., SUBBRAMANIAN, R. A. & GOTTLINGER, H. G. (1996). Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* **214**, 219-35.
- D'SOUZA, M. P. & HARDEN, V. A. (1996). Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. *Nat Med* **2**, 1293-300.
- DAI, Z. & LAKKIS, F. G. (2001). Cutting edge: Secondary lymphoid organs are essential for maintaining the CD4, but not CD8, naive T cell pool. *J Immunol* **167**, 6711-5.
- DALGLEISH, A. G., BEVERLEY, P. C., CLAPHAM, P. R., CRAWFORD, D. H., GREAVES, M. F. & WEISS, R. A. (1984). The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**, 763-7.
- DAYTON, A. I., SODROSKI, J. G., ROSEN, C. A., GOH, W. C. & HASELTINE, W. A. (1986). The trans-activator gene of the human T cell lymphotropic virus type III is required for replication. *Cell* **44**, 941-7.
- DE REQUENA, D. G., BONORA, S., CASTAGNA, A., HASSON, H., MARUCCO, D. A., D'AVOLIO, A., SCIANDRA, M., TRENTINI, L., CALCAGNO, A., LAZZARIN, A. & DI PERRI, G. (2008). Pharmacokinetic and pharmacodynamic determinants of early virological response to enfuvirtide-based regimens in HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother* **62**, 384-7.
- DELWART, E. L., MOSIALOS, G. & GILMORE, T. (1990). Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 703-6.
- DEMAISON, C., PARSLEY, K., BROUNS, G., SCHERR, M., BATTMER, K., KINNON, C., GREZ, M. & THRASHER, A. J. (2002). High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* **13**, 803-13.
- DERDEYN, C. A., DECKER, J. M., SFAKIANOS, J. N., WU, X., O'BRIEN, W. A., RATNER, L., KAPPES, J. C., SHAW, G. M. & HUNTER, E. (2000). Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J Virol* **74**, 8358-67.
- DERVILLEZ, X., HUTHER, A., SCHUHMACHER, J., GRIESINGER, C., COHEN, J. H., VON LAER, D. & DIETRICH, U. (2006). Stable expression of soluble therapeutic peptides in eukaryotic cells by multimerisation: application to the HIV-1 fusion inhibitory peptide C46. *ChemMedChem* **1**, 330-9.
- DORR, P., WESTBY, M., DOBBS, S., GRIFFIN, P., IRVINE, B., MACARTNEY, M., MORI, J., RICKETT, G., SMITH-BURCHNELL, C., NAPIER, C., WEBSTER, R., ARMOUR, D., PRICE, D., STAMMEN, B., WOOD, A. & PERROS, M. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4721-32.
- DRANOFF, G., JAFFEE, E., LAZENBY, A., GOLUMBEEK, P., LEVITSKY, H., BROSE, K., JACKSON, V., HAMADA, H., PARDOLL, D. & MULLIGAN, R. C. (1993). Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3539-43.
- DUCKERT, P., BRUNAK, S. & BLOM, N. (2004). Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Eng Des Sel* **17**, 107-12.
- DWYER, J. J., HASAN, A., WILSON, K. L., WHITE, J. M., MATTHEWS, T. J. & DELMEDICO, M. K. (2003). The hydrophobic pocket contributes to the structural stability of the N-terminal coiled coil of HIV gp41 but is not required for six-helix bundle formation. *Biochemistry* **42**, 4945-53.
- DWYER, J. J., WILSON, K. L., DAVISON, D. K., FREEL, S. A., SEEDORFF, J. E., WRING, S. A., TVERMOES, N. A., MATTHEWS, T. J., GREENBERG, M. L. & DELMEDICO, M. K. (2007). Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12772-7.
- ECKERT, D. M. & KIM, P. S. (2001a). Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11187-92.
- ECKERT, D. M. & KIM, P. S. (2001b). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* **70**, 777-810.
- EGELHOFFER, M., BRANDENBURG, G., MARTINIUS, H., SCHULT-DIETRICH, P., MELIKYAN, G., KUNERT, R., BAUM, C., CHOI, I., ALEXANDROV, A. & VON LAER, D. (2004). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol* **78**, 568-75.

- ELLGAARD, L. & HELENIUS, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.
- ELLIOTT, S., LORENZINI, T., ASHER, S., AOKI, K., BRANKOW, D., BUCK, L., BUSSE, L., CHANG, D., FULLER, J., GRANT, J., HERNDAY, N., HOKUM, M., HU, S., KNUDTEN, A., LEVIN, N., KOMOROWSKI, R., MARTIN, F., NAVARRO, R., OSSLUND, T., ROGERS, G., ROGERS, N., TRAIL, G. & EGRIE, J. (2003). Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol* **21**, 414-21.
- ESKRIDGE, E. M. & SHIELDS, D. (1983). Cell-free processing and segregation of insulin precursors. *J Biol Chem* **258**, 11487-91.
- FAUCI, A. S. (1996). Host factors and the pathogenesis of HIV-induced disease. *Nature* **384**, 529-34.
- FEHSE, B., KUSTIKOVA, O. S., BUBENHEIM, M. & BAUM, C. (2004). Pois(s)on—it's a question of dose. *Gene Ther* **11**, 879-81.
- FERRAND, C., ROBINET, E., CONTASSOT, E., CERTOUX, J. M., LIM, A., HERVE, P. & TIBERGHIE, P. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes: influence of the transduction/selection process and of ex vivo expansion on the T cell receptor beta chain hypervariable region repertoire. *Hum Gene Ther* **11**, 1151-64.
- FINZI, D., HERMANKOVA, M., PIERSON, T., CARRUTH, L. M., BUCK, C., CHAISSON, R. E., QUINN, T. C., CHADWICK, K., MARGOLICK, J., BROOKMEYER, R., GALLANT, J., MARKOWITZ, M., HO, D. D., RICHMAN, D. D. & SILICIANO, R. F. (1997). Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* **278**, 1295-300.
- FISHER, A. G., FEINBERG, M. B., JOSEPHS, S. F., HARPER, M. E., MARSELLE, L. M., REYES, G., GONDA, M. A., ALDOVINI, A., DEBOUK, C., GALLO, R. C. & ET AL. (1986). The trans-activator gene of HTLV-III is essential for virus replication. *Nature* **320**, 367-71.
- FISHER, R. A., BERTONIS, J. M., MEIER, W., JOHNSON, V. A., COSTOPOULOS, D. S., LIU, T., TIZARD, R., WALKER, B. D., HIRSCH, M. S., SCHOOLEY, R. T. & ET AL. (1988). HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* **331**, 76-8.
- FLETCHER, C. V., DEVILLE, J. G., SAMSON, P. M., MOYE, J. H., JR., CHURCH, J. A., SPIEGEL, H. M., PALUMBO, P., FENTON, T., SMITH, M. E., GRAHAM, B., KRAIMER, J. M. & SHEARER, W. T. (2007). Nonlinear pharmacokinetics of high-dose recombinant fusion protein CD4-IgG2 (PRO 542) observed in HIV-1-infected children. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 747-50.
- FRANKEL, A. D. & YOUNG, J. A. (1998). HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem* **67**, 1-25.
- FREED, E. O. (1998). HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* **251**, 1-15.
- FREED, E. O. (2001). HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* **26**, 13-33.
- FULLER, R. S., BRAKE, A. J. & THORNER, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-6.
- FUZEON. (2008). Fuzeon Summary of Product Characteristics. *Roche Registration Limited*, 8 July 2008.
- GAHMBERG, C. G. & TOLVANEN, M. (1996). Why mammalian cell surface proteins are glycoproteins. *Trends Biochem Sci* **21**, 308-11.
- GAKEN, J., JIANG, J., DANIEL, K., VAN BERKEL, E., HUGHES, C., KUIPER, M., DARLING, D., TAVASSOLI, M., GALEA-LAURI, J., FORD, K., KEMENY, M., RUSSELL, S. & FARZANEH, F. (2000). Fusagene vectors: a novel strategy for the expression of multiple genes from a single cistron. *Gene Ther* **7**, 1979-85.
- GALLAHER, W. R., BALL, J. M., GARRY, R. F., GRIFFIN, M. C. & MONTELARO, R. C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res Hum Retroviruses* **5**, 431-40.
- GALLAY, P., HOPE, T., CHIN, D. & TRONO, D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9825-30.
- GALLO, S. A., SACKETT, K., RAWAT, S. S., SHAI, Y. & BLUMENTHAL, R. (2004). The stability of the intact envelope glycoproteins is a major determinant of sensitivity of HIV/SIV to peptidic fusion inhibitors. *J Mol Biol* **340**, 9-14.
- GARTNER, S., MARKOVITS, P., MARKOVITZ, D. M., KAPLAN, M. H., GALLO, R. C. & POPOVIC, M. (1986). The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science* **233**, 215-219.
- GAY, W., LAURET, E., BOSON, B., LARGHERO, J., MATHEUX, F., PEYRAMAURE, S., ROUSSEAU, V., DORMONT, D., DE MAEYER, E. & LE GRAND, R. (2004). Low autocrine interferon beta production as a gene therapy approach for AIDS: Infusion of interferon beta-engineered lymphocytes in macaques chronically infected with SIVmac251. *Retrovirology* **1**, 29.
- GELDERBLUM, H. R., HAUSMANN, E. H., OZEL, M., PAULI, G. & KOCH, M. A. (1987). Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* **156**, 171-6.
- GILMORE, R. & BLOBEL, G. (1983). Transient involvement of signal recognition particle and its receptor in the microsomal membrane prior to protein translocation. *Cell* **35**, 677-85.
- GILMORE, R., WALTER, P. & BLOBEL, G. (1982). Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **95**, 470-7.
- GORLICH, D. & RAPOPORT, T. A. (1993). Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **75**, 615-30.
- GOTTLIEB, G. J., RAGAZ, A., VOGEL, J. V., FRIEDMAN-KIEN, A., RYWLIN, A. M., WEINER, E. A. & ACKERMAN, A. B. (1981). A preliminary communication on extensively disseminated Kaposi's sarcoma in young homosexual men. *Am J Dermatopathol* **3**, 111-4.
- GRAHAM, F. L. & VAN DER EB, A. J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-67.

- GREENBERG, M. L., DAVISON, D., JIN, L., MOSIER, S., MELBY, T., SISTA, P., DEMASI, R., MIRALLES, D., CAMMACK, N. & MATTHEWS, T. J. (2002). In vitro antiviral activity of T-1249. *Antiviral Therapy* **7**, S10.
- GROSKREUTZ, D. J., SLIWKOWSKI, M. X. & GORMAN, C. M. (1994). Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* **269**, 6241-5.
- GU, J. X., MATSUDA, T., NAKAMURA, R., ISHIGURO, H., OHKUBO, I., SASAKI, M. & TAKAHASHI, N. (1989). Chemical deglycosylation of hen ovomucoid: protective effect of carbohydrate moiety on tryptic hydrolysis and heat denaturation. *J Biochem* **106**, 66-70.
- GUSTCHINA, E., HUMMER, G., BEWLEY, C. A. & CLORE, G. M. (2005). Differential inhibition of HIV-1 and SIV envelope-mediated cell fusion by C34 peptides derived from the C-terminal heptad repeat of gp41 from diverse strains of HIV-1, HIV-2, and SIV. *J Med Chem* **48**, 3036-44.
- HAMBURGER, A. E., KIM, S., WELCH, B. D. & KAY, M. S. (2005). Steric accessibility of the HIV-1 gp41 N-trimer region. *J Biol Chem* **280**, 12567-72.
- HAZUDA, D. J., FELOCK, P., WITMER, M., WOLFE, A., STILLMOCK, K., GROBLER, J. A., ESPESETH, A., GABRYELSKI, L., SCHLEIF, W., BLAU, C. & MILLER, M. D. (2000). Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* **287**, 646-50.
- HEBERT, D. N., FOELLMER, B. & HELENIUS, A. (1995). Glucose trimming and reglycosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-33.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-9.
- HENRICH, S., CAMERON, A., BOURENKOV, G. P., KIEFERSAUER, R., HUBER, R., LINDBERG, I., BODE, W. & THAN, M. E. (2003). The crystal structure of the proprotein processing proteinase furin explains its stringent specificity. *Nat Struct Biol* **10**, 520-6.
- HERMANN, F. G., EGERER, L., BRAUER, F., GERUM, C., SCHWALBE, H., DIETRICH, U. & VON LAER, D. (2009a). Mutations in gp120 contribute to the resistance of human immunodeficiency virus type 1 to membrane-anchored C-peptide maC46. *J Virol* **83**, 4844-53.
- HERMANN, F. G., MARTINIUS, H., EGELHOFER, M., GIROGLOU, T., TONN, T., ROTH, S. D., ZAHN, R., SCHULT-DIETRICH, P., ALEXANDROV, A., DIETRICH, U., BAUM, C. & VON LAER, D. (2009b). Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored antiviral peptides. *Hum Gene Ther* **20**, 325-36.
- HILDINGER, M., DITTMAR, M. T., SCHULT-DIETRICH, P., FEHSE, B., SCHNIERLE, B. S., THALER, S., STIEGLER, G., WELKER, R. & VON LAER, D. (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**, 3038-42.
- Ho, D. D. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Dynamics of HIV-1 replication in vivo. *J Clin Invest* **99**, 2565-7.
- HOFFMANN, C., ROCKSTROH, J. K. & KAMPS, B. S. (2008). *HIV.NET 2008*. Steinhäuser Verlag, D - 42399 Wuppertal-Beyenburg.
- HOGLUND, S., OFVERSTEDT, L. G., NILSSON, A., LUNDQUIST, P., GELDERBLUM, H., OZEL, M. & SKOGLUND, U. (1992). Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* **8**, 1-7.
- HOPP, T. P. & WOODS, K. R. (1981). Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 3824-8.
- HORTON, R., MORAN, L. A., SCRIMGEOUR, G., PERRY, M. & RAWN, D. (2005). *Principles of Biochemistry*, 4 edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA.
- HOSAKA, M., NAGAHAMA, M., KIM, W. S., WATANABE, T., HATSUZAWA, K., IKEMIZU, J., MURAKAMI, K. & NAKAYAMA, K. (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **266**, 12127-30.
- HUANG, W., GROOTHUYS, S., HEREDIA, A., KUIJPERS, B. H., RUTJES, F. P., VAN DELFT, F. L. & WANG, L. X. (2009). Enzymatic glycosylation of triazole-linked GlcNAc/Glc-peptides: synthesis, stability and anti-HIV activity of triazole-linked HIV-1 gp41 glycopeptide C34 analogues. *ChemBiochem* **10**, 1234-42.
- HUBBARD, S. C. & IVATT, R. J. (1981). Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **50**, 555-83.
- HUFERT, F. T., VAN LUNZEN, J., JANOSSY, G., BERTRAM, S., SCHMITZ, J., HALLER, O., RACZ, P. & VON LAER, D. (1997). Germinal centre CD4+ T cells are an important site of HIV replication in vivo. *Aids* **11**, 849-57.
- HURTLEY, S. M., BOLE, D. G., HOOVER-LITTY, H., HELENIUS, A. & COPELAND, C. S. (1989). Interactions of misfolded influenza virus hemagglutinin with binding protein (BiP). *J Cell Biol* **108**, 2117-26.
- IMPERIALI, B. & RICKERT, K. W. (1995). Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 97-101.
- JACKSON, R. C. & BLOBEL, G. (1977). Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes from dog pancreas containing signal peptidase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5598-602.
- JACOBSON, J. M., ISRAEL, R. J., LOWY, I., OSTROW, N. A., VASSILATOS, L. S., BARISH, M., TRAN, D. N., SULLIVAN, B. M., KETAS, T. J., O'NEILL, T. J., NAGASHIMA, K. A., HUANG, W., PETROPOULOS, C. J., MOORE, J. P., MADDON, P. J. & OLSON, W. C. (2004). Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 423-9.
- JEAN, F., BOUDREAU, A., BASAK, A., SEIDAH, N. G. & LAZURE, C. (1995). Fluorescent peptidyl substrates as an aid in studying the substrate specificity of human prohormone convertase PC1 and human furin and designing a potent irreversible inhibitor. *J Biol Chem* **270**, 19225-31.
- JONCKHEERE, H., ANNE, J. & DE CLERCQ, E. (2000). The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors. *Med Res Rev* **20**, 129-54.

- JONES, K. A. & PETERLIN, B. M. (1994). Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* **63**, 717-43.
- JUDICE, J. K., TOM, J. Y., HUANG, W., WRIN, T., VENNARI, J., PETROPOULOS, C. J. & McDOWELL, R. S. (1997). Inhibition of HIV type 1 infectivity by constrained alpha-helical peptides: implications for the viral fusion mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13426-30.
- KADOWAKI, T., TSUKUBA, T., BERTENSHAW, G. P. & BOND, J. S. (2000). N-Linked oligosaccharides on the meprin A metalloprotease are important for secretion and enzymatic activity, but not for apical targeting. *J Biol Chem* **275**, 25577-84.
- KARAGEORGOS, L., LI, P. & BURRELL, C. (1993). Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 817-23.
- KARIO, E., TIROSH, B., PLOEGH, H. L. & NAVON, A. (2008). N-linked glycosylation does not impair proteasomal degradation but affects class I major histocompatibility complex presentation. *J Biol Chem* **283**, 244-54.
- KHATIB, A. M., SIEGFRIED, G., CHRETIEN, M., METRAKOS, P. & SEIDAH, N. G. (2002). Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol* **160**, 1921-35.
- 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. & SAAG, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* **4**, 1302-7.
- KIM, C. S., LEE, S. C., KIM, Y. M., KIM, B. S., CHOI, H. S., KAWADA, T., KWON, B. S. & YU, R. (2008). Visceral fat accumulation induced by a high-fat diet causes the atrophy of mesenteric lymph nodes in obese mice. *Obesity (Silver Spring)* **16**, 1261-9.
- KLATZMANN, D., CHAMPAGNE, E., CHAMARET, S., GRUEST, J., GUETARD, D., HERCEND, T., GLUCKMAN, J. C. & MONTAGNIER, L. (1984). T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* **312**, 767-8.
- KLIGER, Y. & SHAI, Y. (2000). Inhibition of HIV-1 entry before gp41 folds into its fusion-active conformation. *J Mol Biol* **295**, 163-8.
- KLIMPEL, K. R., MOLLOY, S. S., THOMAS, G. & LEPPLA, S. H. (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10277-81.
- KOLSON, D. L., COLLMAN, R., HRIN, R., BALLIET, J. W., LAUGHLIN, M., MCGANN, K. A., DEBOUCK, C. & GONZALEZ-SCARANO, F. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Tat activity in human neuronal cells: uptake and trans-activation. *J Gen Virol* **75 (Pt 8)**, 1927-34.
- KORNFELD, R. & KORNFELD, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* **54**, 631-64.
- KOTIN, R. M., LINDEN, R. M. & BERNIS, K. I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. *Embo J* **11**, 5071-8.
- KRAUNUS, J., SCHAUMANN, D. H., MEYER, J., MODLICH, U., FEHSE, B., BRANDENBURG, G., VON LAER, D., KLUMP, H., SCHAMBACH, A., BOHNE, J. & BAUM, C. (2004). Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Ther* **11**, 1568-78.
- KRYSAN, D. J., ROCKWELL, N. C. & FULLER, R. S. (1999). Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* **274**, 23229-34.
- LAEMMLI, U. K., BEGUIN, F. & GUJER-KELLENBERGER, G. (1970). A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* **47**, 69-85.
- LALEZARI, J. P., BELLOS, N. C., SATHASIVAM, K., RICHMOND, G. J., COHEN, C. J., MYERS, R. A., JR., HENRY, D. H., RASKINO, C., MELBY, T., MURCHISON, H., ZHANG, Y., SPENCE, R., GREENBERG, M. L., DEMASI, R. A. & MIRALLES, G. D. (2005). T-1249 retains potent antiretroviral activity in patients who had experienced virological failure while on an enfuvirtide-containing treatment regimen. *J Infect Dis* **191**, 1155-63.
- LAWLESS, M. K., BARNEY, S., GUTHRIE, K. I., BUCY, T. B., PETTEWAY, S. R., JR. & MERUTKA, G. (1996). HIV-1 membrane fusion mechanism: structural studies of the interactions between biologically-active peptides from gp41. *Biochemistry* **35**, 13697-708.
- LAZZARIN, A., CLOTET, B., COOPER, D., REYNES, J., ARASTEH, K., NELSON, M., KATLAMA, C., STELLBRINK, H. J., DELFRAISSY, J. F., LANGE, J., HUSON, L., DEMASI, R., WAT, C., DELEHANTY, J., DROBNES, C. & SALGO, M. (2003). Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N Engl J Med* **348**, 2186-95.
- LE GALL, S., HEARD, J. M. & SCHWARTZ, O. (1997). Analysis of Nef-induced MHC-I endocytosis. *Res Virol* **148**, 43-7.
- LEDERGERBER, B., EGGER, M., OPRAVIL, M., TELENTI, A., HIRSCHL, B., BATTEGAY, M., VERNAZZA, P., SUDRE, P., FLEPP, M., FURRER, H., FRANCIOLI, P. & WEBER, R. (1999). Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. Swiss HIV Cohort Study. *Lancet* **353**, 863-868.
- LEVITSKAYA, J., CORAM, M., LEVITSKY, V., IMREH, S., STEIGERWALD-MULLEN, P. M., KLEIN, G., KURILLA, M. G. & MASUCCI, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**, 685-8.

- LEVITSKAYA, J., SHARIPO, A., LEONCHIKS, A., CIECHANOVER, A. & MASUCCI, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12616-21.
- LEVY-MINTZ, P., DUAN, L., ZHANG, H., HU, B., DORNADULA, G., ZHU, M., KULKOSKY, J., BIZUB-BENDER, D., SKALKA, A. M. & POMERANTZ, R. J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase [published erratum appears in *J Virol* 1998 Apr;72(4):3505-6. *J Virol.* **70**, 8821-8832.
- LEWIS, P. F. & EMERMAN, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **68**, 510-516.
- LEWIS, W., DAY, B. J. & COPELAND, W. C. (2003). Mitochondrial toxicity of NRTI antiviral drugs: an integrated cellular perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 812-22.
- LIPP, J., DOBBERSTEIN, B. & HAEUPTLE, M. T. (1987). Signal recognition particle arrests elongation of nascent secretory and membrane proteins at multiple sites in a transient manner. *J Biol Chem* **262**, 1680-4.
- LITTLE, S. J., HOLTE, S., ROUTY, J. P., DAAR, E. S., MARKOWITZ, M., COLLIER, A. C., KOUP, R. A., MELLORS, J. W., CONNICK, E., CONWAY, B., KILBY, M., WANG, L., WHITCOMB, J. M., HELLMANN, N. S. & RICHMAN, D. D. (2002). Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N Engl J Med* **347**, 385-94.
- LIU, S., LU, H., NIU, J., XU, Y., WU, S. & JIANG, S. (2005). Different from the HIV fusion inhibitor C34, the anti-HIV drug Fuzeon (T-20) inhibits HIV-1 entry by targeting multiple sites in gp41 and gp120. *J Biol Chem* **280**, 11259-73.
- LIU, Y., NGUYEN, A., WOLFERT, R. L. & ZHUO, S. (2009). Enhancing the secretion of recombinant proteins by engineering N-glycosylation sites. *Biotechnol Prog*, Epub ahead of print, 27 Jul 2009.
- LIU, Y. C., KAWAGISHI, M., MIKAYAMA, T., INAGAKI, Y., TAKEUCHI, T. & OHASHI, H. (1993). Processing of a fusion protein by endoprotease in COS-1 cells for secretion of mature peptide by using a chimeric expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8957-61.
- LOHRENGEL, S., HERMANN, F., HAGMANN, I., OBERWINKLER, H., SCRIVANO, L., HOFFMANN, C., VON LAER, D. & DITTMAR, M. T. (2005). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to membrane-anchored gp41-derived peptides. *J Virol* **79**, 10237-46.
- LU, M., BLACKLOW, S. C. & KIM, P. S. (1995). A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat Struct Biol* **2**, 1075-82.
- LU, M., STOLLER, M. O., WANG, S., LIU, J., FAGAN, M. B. & NUNBERG, J. H. (2001). Structural and functional analysis of interhelical interactions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J Virol* **75**, 11146-56.
- LUND, O., LUND, O. S., GRAM, G., NIELSEN, S. D., SCHONNING, K., NIELSEN, J. O., HANSEN, J. E. & MOSEKILDE, E. (1997). Gene therapy of T helper cells in HIV infection: mathematical model of the criteria for clinical effect. *Bull Math Biol* **59**, 725-45.
- LUSSO, P., COCCHI, F., BALOTTA, C., MARKHAM, P. D., LOUIE, A., FARCI, P., PAL, R., GALLO, R. C. & REITZ, M. S., JR. (1995). Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol* **69**, 3712-20.
- MALKIN, L. I. & RICH, A. (1967). Partial resistance of nascent polypeptide chains to proteolytic digestion due to ribosomal shielding. *J Mol Biol* **26**, 329-46.
- MAN, N., CARTWRIGHT, A. J., ANDREWS, K. M. & MORRIS, G. E. (1989). Treatment of human muscle creatine kinase with glutaraldehyde preferentially increases the immunogenicity of the native conformation and permits production of high-affinity monoclonal antibodies which recognize two distinct surface epitopes. *J Immunol Methods* **125**, 251-9.
- MANGASARIAN, A. & TRONO, D. (1997). The multifaceted role of HIV Nef. *Res Virol* **148**, 30-3.
- MASTROENI, R., BENSADOUN, J. C., CHARVIN, D., AEBISCHER, P., PUJOL, A. & RAOUL, C. (2009). Insulin-like growth factor-1 and neurotrophin-3 gene therapy prevents motor decline in an X-linked adrenoleukodystrophy mouse model. *Ann Neurol* **66**, 117-122.
- MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H. W. & CUNNINGHAM-RUNDLES, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* **305**, 1431-8.
- MAYER, G., BOILEAU, G. & BENDAYAN, M. (2003). Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* **116**, 1763-73.
- MAYER, G., BOILEAU, G. & BENDAYAN, M. (2004). Sorting of furin in polarized epithelial and endothelial cells: expression beyond the Golgi apparatus. *J Histochem Cytochem* **52**, 567-79.
- MBIKAY, M., SIROIS, F., YAO, J., SEIDAH, N. G. & CHRETIEN, M. (1997). Comparative analysis of expression of the proprotein convertases furin, PACE4, PC1 and PC2 in human lung tumours. *Br J Cancer* **75**, 1509-14.
- MCALLISTER, R. M., ISAACS, H., RONGEY, R., PEER, M., AU, W., SOUKUP, S. W. & GARDNER, M. B. (1977). Establishment of a human medulloblastoma cell line. *Int J Cancer* **20**, 206-12.
- MELIKYAN, G. B., MARKOSYAN, R. M., HEMMATI, H., DELMEDICO, M. K., LAMBERT, D. M. & COHEN, F. S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* **151**, 413-23.

- MILLER, M. D., FARNET, C. M. & BUSHMAN, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol* **71**, 5382-90.
- MITSUYASU, R. T., ANTON, P. A., DEEKS, S. G., SCADDEN, D. T., CONNICK, E., DOWNS, M. T., BAKKER, A., ROBERTS, M. R., JUNE, C. H., JALALI, S., LIN, A. A., PENNATHUR-DAS, R. & HEGE, K. M. (2000). Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4zeta gene-modified autologous CD4(+) and CD8(+) T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* **96**, 785-93.
- MIYAUCHI, K., KIM, Y., LATINOVIC, O., MOROZOV, V. & MELIKYAN, G. B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell* **137**, 433-44.
- MOLINARI, M. (2007). N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* **3**, 313-20.
- MOLLOY, S. S., THOMAS, L., VANSLYKE, J. K., STENBERG, P. E. & THOMAS, G. (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: localization to the TGN and recycling from the cell surface. *Embo J* **13**, 18-33.
- MOORE, W. V. & LEPPERT, P. (1980). Role of aggregated human growth hormone (hGH) in development of antibodies to hGH. *J Clin Endocrinol Metab* **51**, 691-7.
- MORGAN, R. A., BALER-BITTERLICH, G., RAGHEB, J. A., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C. & ANDERSON, W. F. (1994). Further evaluation of soluble CD4 as an anti-HIV type 1 gene therapy: demonstration of protection of primary human peripheral blood lymphocytes from infection by HIV type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1507-15.
- MORGAN, R. A., LOONEY, D. J., MUENCHAU, D. D., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C. & ANDERSON, W. F. (1990). Retroviral vectors expressing soluble CD4: a potential gene therapy for AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 183-91.
- MOTHES, W., PREHN, S. & RAPOPORT, T. A. (1994). Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *Embo J* **13**, 3973-82.
- MOYLE, G., DEJESUS, E., BOFFITO, M., WONG, R., COAKLEY, E., GIBNEY, C., BADEL, K., CALANDRA, G., BRIDGER, G. & BECKER, S. (2007). CXCR4 Antagonism: Proof of Activity with AMD11070. In *14th CROI*. Abstract 511, Los Angeles.
- MUNCH, J., STANDKER, L., ADERMANN, K., SCHULZ, A., SCHINDLER, M., CHINNADURAI, R., POHLMANN, S., CHAIPAN, C., BIET, T., PETERS, T., MEYER, B., WILHELM, D., LU, H., JING, W., JIANG, S., FORSSMANN, W. G. & KIRCHHOFF, F. (2007). Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide. *Cell* **129**, 263-75.
- NAKAYAMA, K. (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J* **327 (Pt 3)**, 625-35.
- NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F. H., VERMA, I. M. & TRONO, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**, 263-7.
- NIEMEYER, G. P., HERZOG, R. W., MOUNT, J., ARRUDA, V. R., TILLSON, D. M., HATHCOCK, J., VAN GINKEL, F. W., HIGH, K. A. & LOTHROP, C. D., JR. (2008). Long term correction of inhibitor prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2 mediated factor IX gene therapy. *Blood*.
- OKUN, M. M., ESKRIDGE, E. M. & SHIELDS, D. (1990). Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* **265**, 7478-84.
- OLIVA, R., LEONE, M., FALCIGNO, L., D'AURIA, G., DETTIN, M., SCARINCI, C., DI BELLO, C. & PAOLILLO, L. (2002). Structural investigation of the HIV-1 envelope glycoprotein gp160 cleavage site. *Chemistry* **8**, 1467-73.
- OTAKA, A., NAKAMURA, M., NAMEKI, D., KODAMA, E., UCHIYAMA, S., NAKAMURA, S., NAKANO, H., TAMAMURA, H., KOBAYASHI, Y., MATSUOKA, M. & FUJII, N. (2002). Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **41**, 2937-40.
- PARODI, A. J. (2000). Protein glucosylation and its role in protein folding. *Annu Rev Biochem* **69**, 69-93.
- PEAR, W. S., NOLAN, G. P., SCOTT, M. L. & BALTIMORE, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8392-8396.
- PLATT, E. J., WEHRLY, K., KUHMANN, S. E., CHESEBRO, B. & KABAT, D. (1998). Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macrophagetropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **72**, 2855-64.
- POLLARD, V. W. & MALIM, M. H. (1998). The HIV-1 Rev protein. *Annu Rev Microbiol* **52**, 491-532.
- POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M. G., READ, E. & GALLO, R. C. (1984). Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* **224**, 497-500.
- PURTSCHER, M., TRKOLA, A., GRUBER, G., BUCHACHER, A., PREDL, R., STEINDL, F., TAUER, C., BERGER, R., BARRETT, N., JUNGBAUER, A. & ET AL. (1994). A broadly neutralizing human monoclonal antibody against gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1651-8.
- RACZ, P., TENNER-RACZ, K., KAHL, C., FELLER, A. C., KERN, P. & DIETRICH, M. (1986). Spectrum of morphologic changes of lymph nodes from patients with AIDS or AIDS-related Complex. *Progress in Allergy* **37**, 81-181.
- RACZ, P., TENNER-RACZ, K., VAN VLOTEN, F., RAZZAQUE-ALI, A., DIETRICH, M., KERN, P. & GLUCKMAN, J. C. (1991). Classification of histopathological changes of lymph nodes in HIV-1 infection. *Antibiotics and Chemotherapy* **43**, 201-213.

- RAJAGOPALAN, R., LAITINEN, D. & DIETZ, B. (2008). Impact of lipoatrophy on quality of life in HIV patients receiving anti-retroviral therapy. *AIDS Care* **20**, 1197-201.
- RAY, K., CLAPP, P., GOLDSMITH, P. K. & SPIEGEL, A. M. (1998). Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. *J Biol Chem* **273**, 34558-67.
- RIMSKY, L. T., SHUGARS, D. C. & MATTHEWS, T. J. (1998). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41- derived inhibitory peptides. *J Virol* **72**, 986-993.
- RIZZUTO, C. & SODROSKI, J. (2000). Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein 120. *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**, 741-9.
- ROBERTS, J. D., BEBENEK, K. & KUNKEL, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. *Science* **242**, 1171-1173.
- ROOT, M. J., KAY, M. S. & KIM, P. S. (2001). Protein Design of an HIV-1 Entry Inhibitor. *Science* **11**, 11.
- ROTH, J., WANG, Y., ECKHARDT, A. E. & HILL, R. L. (1994). Subcellular localization of the UDP-N-acetyl-D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-mediated O-glycosylation reaction in the submaxillary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8935-9.
- SAAG, M., ROSENKRANZ, S., BECKER, S., KLINGMAN, K., KALLUNGAL, B., ZADZILKA, A., COAKLEY, E., ACOSTA, E., CALANDRA, G., JOHNSON, V. & AND NIAID AIDS CLINICAL TRIALS GROUP, B., MD USA. (2007). Proof of Concept of Antiretroviral Activity of AMD11070 (an Orally Administered CXCR4 Entry Inhibitor): Results of the First Dosing Cohort A Studied in ACTG Protocol A5210. In *14th CROI*. Abstract 512, Los Angeles.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- SANDERS, R. W., VENTURI, M., SCHIFFNER, L., KALYANARAMAN, R., KATINGER, H., LLOYD, K. O., KWONG, P. D. & MOORE, J. P. (2002). The mannose-dependent epitope for neutralizing antibody 2G12 on human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *J Virol* **76**, 7293-305.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- SANHADJI, K., GRAVE, L., TOURAINE, J. L., LEISSNER, P., ROUZIOUX, C., FIROUZI, R., KEHRLI, L., TARDY, J. C. & MEHTALI, M. (2000). Gene transfer of anti-gp41 antibody and CD4 immunoadhesin strongly reduces the HIV-1 load in humanized severe combined immunodeficient mice. *Aids* **14**, 2813-22.
- SARENEVA, T., PIHONEN, J., CANTELL, K. & JULKUNEN, I. (1995). N-glycosylation of human interferon-gamma: glycans at Asn-25 are critical for protease resistance. *Biochem J* **308 (Pt 1)**, 9-14.
- SAUCE, D., BODINIER, M., GARIN, M., PETRACCA, B., TONNELIER, N., DUPERRIER, A., MELO, J. V., APPERLEY, J. F., FERRAND, C., HERVE, P., LANG, F., TIBERGHEN, P. & ROBINET, E. (2002). Retrovirus-mediated gene transfer in primary T lymphocytes impairs their anti-Epstein-Barr virus potential through both culture-dependent and selection process-dependent mechanisms. *Blood* **99**, 1165-73.
- SCHAMBACH, A., MUELLER, D., GALLA, M., VERSTEGEN, M. M., WAGEMAKER, G., LOEW, R., BAUM, C. & BOHNE, J. (2006). Overcoming promoter competition in packaging cells improves production of self-inactivating retroviral vectors. *Gene Ther* **13**, 1524-33.
- SCHAMBACH, A., WODRICH, H., HILDINGER, M., BOHNE, J., KRAUSSLICH, H. G. & BAUM, C. (2000). Context dependence of different modules for posttranscriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol Ther* **2**, 435-45.
- SCHECHESTER, I. & BERGER, A. (1968). On the active site of proteases. 3. Mapping the active site of papain; specific peptide inhibitors of papain. *Biochem Biophys Res Commun* **32**, 898-902.
- SCHNEIDER, S. E., BRAY, B. L., MADER, C. J., FRIEDRICH, P. E., ANDERSON, M. W., TAYLOR, T. S., BOSHERNITZAN, N., NIEMI, T. E., FULCHER, B. C., WHIGHT, S. R., WHITE, J. M., GREENE, R. J., STOLTENBERG, L. E. & LICHTY, M. (2005). Development of HIV fusion inhibitors. *J Pept Sci* **11**, 744-53.
- SCHWEIZER, A., CLAUSEN, H., VAN MEER, G. & HAURI, H. P. (1994). Localization of O-glycan initiation, sphingomyelin synthesis, and glucosylceramide synthesis in Vero cells with respect to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Biol Chem* **269**, 4035-41.
- SCHWEIZER, M., FLORY, E., BUCHHOLZ, C. J. & CICHUTEK, K. (2001). Retroviral Vectors. *Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz* **44**, 1038-1046.
- SEIDAH, N. G. & CHRETIEN, M. (1997). Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* **8**, 602-7.
- SEN, J., JACOBS, A., JIANG, H., RONG, L. & CAFFREY, M. (2007). The disulfide loop of gp41 is critical to the furin recognition site of HIV gp160. *Protein Sci* **16**, 1236-41.
- SHAHEEN, F., DUAN, L., ZHU, M., BAGASRA, O. & 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**, 3392-400.
- SHEARER, W. T., ISRAEL, R. J., STARR, S., FLETCHER, C. V., WARA, D., RATHORE, M., CHURCH, J., DEVILLE, J., FENTON, T., GRAHAM, B., SAMSON, P., STAPRANS, S., MCNAMARA, J., MOYE, J., MADDON, P. J. & OLSON, W. C. (2000). Recombinant CD4-IgG2 in human immunodeficiency virus type 1-infected children: phase 1/2 study. The Pediatric AIDS Clinical Trials Group Protocol 351 Study Team. *J Infect Dis* **182**, 1774-9.
- SHENTAL-BECHOR, D. & LEVY, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: a close look at thermodynamic stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8256-61.
- SHINDE, U. & INOUE, M. (2000). Intramolecular chaperones: polypeptide extensions that modulate protein folding. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 35-44.

- SIMMONS, G., WILKINSON, D., REEVES, J. D., DITTMAR, M. T., BEDDOWS, S., WEBER, J., CARNEGIE, G., DESSELBERGER, U., GRAY, P. W., WEISS, R. A. & 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**, 8355-60.
- SOLA, R. J. & GRIEBENOW, K. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J Pharm Sci* **98**, 1223-45.
- STITZ, J., BUCHHOLZ, C. J., ENGELSTADTER, M., UCKERT, W., BLOEMER, U., SCHMITT, I. & CICHUTEK, K. (2000). Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**, 16-20.
- STREBEL, K., KLIMKAIT, T. & MARTIN, M. A. (1988). A novel gene of HIV-1, vpu, and its 16-kilodalton product. *Science* **241**, 1221-3.
- STRIZKI, J. M., TREMBLAY, C., XU, S., WOJCIK, L., WAGNER, N., GONSIORREK, W., HIPKIN, R. W., CHOU, C. C., PUGLIESE-SIVO, C., XIAO, Y., TAGAT, J. R., COX, K., PRIESTLEY, T., SOROTA, S., HUANG, W., HIRSCH, M., REYES, G. R. & BAROUDY, B. M. (2005). Discovery and Characterization of Vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 Antagonist with Potent Activity against Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4911-9.
- SUROSKY, R. T., URABE, M., GODWIN, S. G., MCQUISTON, S. A., KURTZMAN, G. J., OZAWA, K. & NATSOULIS, G. (1997). Adeno-associated virus Rep proteins target DNA sequences to a unique locus in the human genome. *J Virol* **71**, 7951-9.
- TELLAM, J., SHERRITT, M., THOMSON, S., TELLAM, R., MOSS, D. J., BURROWS, S. R., WIERTZ, E. & KHANNA, R. (2001). Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the Gly-Ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition. *J Biol Chem* **276**, 33353-60.
- THOMPSON, M., DEJESUS, E., RICHMOND, G., WHEELER, D., FLAHERTY, J., PILIERO, P., TRUE, A., CHIU, Y. Y., ZHANG, Y., MCFALLS, E., MIRALLES, G. D. & PATEL, I. H. (2006). Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of once-daily versus twice-daily dosing with enfuvirtide in HIV-infected subjects. *Aids* **20**, 397-404.
- TIAN, S. (2009). A 20 Residues Motif Delineates the Furin Cleavage Site and its Physical Properties May Influence Viral Fusion. *Biochemistry Insights* **2**, 9-20.
- TRKOLA, A., PAXTON, W. A., MONARD, S. P., HOXIE, J. A., SIANI, M. A., THOMPSON, D. A., WU, L., MACKAY, C. R., HORUK, R. & MOORE, J. P. (1998). Genetic subtype-independent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by CC and CXC chemokines. *J Virol* **72**, 396-404.
- TSUNEOKA, M., NAKAYAMA, K., HATSUZAWA, K., KOMADA, M., KITAMURA, N. & MEKADA, E. (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J Biol Chem* **268**, 26461-5.
- UNAIDS. (2008). Report on the global HIV/AIDS epidemic, Genf.
- VAN LUNZEN, J., GLAUNSINGER, T., STAHLER, I., VON BAEHR, V., BAUM, C., SCHILZ, A., KUEHLCKE, K., NAUNDORF, S., MARTINIUS, H., HERMANN, F., GIROGLOU, T., NEWRZELA, S., MÜLLER, I., BRAUER, F., BRANDENBURG, G., ALEXANDROV, A. & VON LAER, D. (2007). Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Molecular Therapy* **15**, 1024-1033.
- VARKI, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130.
- VEGARUD, G. & CHRISTENSEN, T. B. (1975). The resistance of glycoproteins to proteolytic inactivation. *Acta Chem Scand B* **29**, 887-8.
- VIGOUROUX, C., GHARAKHANIAN, S., SALHI, Y., NGUYEN, T. H., ADDA, N., ROZENBAUM, W. & CAPEAU, J. (1999). Adverse metabolic disorders during highly active antiretroviral treatments (HAART) of HIV disease. *Diabetes Metab* **25**, 383-92.
- VOCERO-AKBANI, A. M., HEYDEN, N. V., LISSY, N. A., RATNER, L., DOWDY, S. F., LEE, T. C., SULLENGER, B. A., GALLARDO, H. F., UNGERS, G. E. & GILBOA, E. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* **5**, 29-33.
- VON LAER, D. (2001). Gene therapy for HIV infection by 'intracellular immunization' with antiviral genes. *AIDS Rev* **3**, 169-77.
- VON LAER, D., HASSELMANN, S. & HASSELMANN, K. (2006a). Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *J Gene Med* **8**, 658-667.
- VON LAER, D., HASSELMANN, S. & HASSELMANN, K. (2006b). Impact of gene-modified T cells on HIV infection dynamics. *J Theor Biol* **238**, 60-77.
- WALMSLEY, S., HENRY, K., KATLAMA, C., NELSON, M., CASTAGNA, A., REYNES, J., CLOTET, B., HUI, J., SALGO, M., DEMASI, R. & DELEHANTY, J. (2003). Enfuvirtide (T-20) cross-reactive glycoprotein 41 antibody does not impair the efficacy or safety of enfuvirtide. *J Infect Dis* **188**, 1827-33.
- WALTER, P. & BLOBEL, G. (1981a). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* **91**, 557-61.
- WALTER, P. & BLOBEL, G. (1981b). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**, 551-6.
- WALTER, P., IBRAHIMI, I. & BLOBEL, G. (1981). Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol* **91**, 545-50.
- WALTER, P. & LINGAPPA, V. R. (1986). Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 499-516.

- WANG, L. X., SONG, H., LIU, S., LU, H., JIANG, S., NI, J. & LI, H. (2005). Chemoenzymatic synthesis of HIV-1 gp41 glycopeptides: effects of glycosylation on the anti-HIV activity and alpha-helix bundle-forming ability of peptide C34. *Chembiochem* **6**, 1068-74.
- WATANABE, T., NAKAGAWA, T., IKEMIZU, J., NAGAHAMA, M., MURAKAMI, K. & NAKAYAMA, K. (1992). Sequence requirements for precursor cleavage within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem* **267**, 8270-4.
- WEI, X., DECKER, J. M., LIU, H., ZHANG, Z., ARANI, R. B., KILBY, J. M., SAAG, M. S., WU, X., SHAW, G. M. & KAPPES, J. C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 1896-905.
- WEISS, A., WISKOCIL, R. L. & STOBO, J. D. (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* **133**, 123-8.
- WEISSENHORN, W., DESSEN, A., HARRISON, S. C., SKEHEL, J. J. & WILEY, D. C. (1997). Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* **387**, 426-30.
- WIGLER, M., PELLICER, A., SILVERSTEIN, S. & AXEL, R. (1978). Biochemical transfer of single-copy eucaryotic genes using total cellular DNA as donor. *Cell* **14**, 725-31.
- WILD, C., GREENWELL, T. & MATTHEWS, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Res Hum Retroviruses* **9**, 1051-3.
- WILD, C., OAS, T., MCDANAL, C., BOLOGNESI, D. & MATTHEWS, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 10537-41.
- WILD, C. T., SHUGARS, D. C., GREENWELL, T. K., MCDANAL, C. B. & MATTHEWS, T. J. (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 9770-9774.
- WILSON, M. O., SCOUGALL, K. T., RATANAMART, J., MCINTYRE, E. A. & SHAW, J. A. (2005). Tetracycline-regulated secretion of human (pro)insulin following plasmid-mediated transfection of human muscle. *J Mol Endocrinol* **34**, 391-403.
- WYATT, R. & SODROSKI, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**, 1884-8.
- YEE, J.-K., MIYANOHARA, A., LAPORTE, P., BOUIC, K., BURNS, J. C. & FRIEDMANN, T. (1994). A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: Highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 9564-9568.
- ZAHN, R. C., HERMANN, F. G., KIM, E. Y., RETT, M. D., WOLINSKY, S. M., JOHNSON, R. P., VILLINGER, F., VON LAER, D. & SCHMITZ, J. E. (2008). Efficient entry inhibition of human and nonhuman primate immunodeficiency virus by cell surface-expressed gp41-derived peptides. *Gene Ther* **15**, 1210-22.
- ZEUZEM, S., WELSCH, C. & HERRMANN, E. (2003). Pharmacokinetics of peginterferons. *Semin Liver Dis* **23 Suppl 1**, 23-8.
- ZHANG, L., HUANG, Y., HE, T., CAO, Y. & HO, D. D. (1996). HIV-1 subtype and second-receptor use. *Nature* **383**, 768.
- ZHOU, A., WEBB, G., ZHU, X. & STEINER, D. F. (1999). Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* **274**, 20745-8.
- ZHOU, Y. B., LIU, F., ZHU, Z. D., ZHU, H., ZHANG, X., WANG, Z. Q., LIU, J. H. & HAN, Z. G. (2004). N-glycosylation is required for efficient secretion of a novel human secreted glycoprotein, hPAP21. *FEBS Lett* **576**, 401-7.
- ZHU, P., CHERTOVA, E., BESS, J., JR., LIFSON, J. D., ARTHUR, L. O., LIU, J., TAYLOR, K. A. & ROUX, K. H. (2003). Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15812-7.
- ZHU, P., LIU, J., BESS, J., JR., CHERTOVA, E., LIFSON, J. D., GRISE, H., OFEK, G. A., TAYLOR, K. A. & ROUX, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature* **441**, 847-52.
- ZUFFEREY, R., NAGY, D., MANDEL, R. J., NALDINI, L. & TRONO, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**, 871-5.

8 ABKÜRZUNGEN

Tabelle 8.1 | Buchstabencodes für Aminosäuren

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

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AIDS	Erworbenes Immunschwäche Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
bp	Basenpaare
C46	46 AS langes Peptid aus dem C-terminalen <i>heptad repeat</i> von gp41
C4bp	<i>C4 (Complement component 4)-binding protein</i>

CA	Capsid-Protein
CCR5	Membranrezeptor für CC-Chemokine
CD4	Rezeptor auf T-Zellen
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIP	<i>calf intestinal phosphatase</i>
CMV	Cytomegalovirus
CXCR4	Membranrezeptor für CXC-Chemokine
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dLNGFR	cytoplasmatisch deletierter <i>low affinity nerve growth factor receptor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
Env	Hüllprotein (<i>envelope</i>)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FSC	Vorwärtsstreichlich beim Durchflusszytometer (<i>forward scatter</i>)
Gag	Gruppenspezifisches Antigen
GaLV	Gibbonaffen-Leukämievirus
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp41	41 kD großes Transmembranglykoprotein von HIV-1
gp120	120 kD großes peripheres Membranglykoprotein von HIV-1
gp160	Vorläuferprotein von gp120 und gp41
H+L	Schwere und leichte Kette von Antikörpern
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	<i>heptad repeat</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hum.	human
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IN	Integrase
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LI	Linkprotein

LTR	<i>long terminal repeat</i>
MA	Matrixprotein
MCS	Multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MESV	Murines embryonales Stammzellvirus (<i>murine embryonal stem cell virus</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MLV	Murines Leukämievirus
MPSV	Myeloproliferatives Sarcomavirus (<i>myeloproliferative sarcoma virus</i>)
mRNA	messenger RNA
NC	Nucleocapsidprotein
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen (<i>open reading frame</i>)
PC	Protein-Convertase
PE	Phytoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PBST	PBS mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
Pol	Polymerase
PR	Protease
PZN	Pharmazentralnummer
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
RRE	<i>Rev responsive element</i>
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SIN	<i>self-inactivating</i>
SSC	Seitwärtsstreuulich beim Durchflusszytometer (<i>side scatter</i>)
S	Signalpeptid
SV40	Simian Virus 40
T-20	synthetisches HIV-inhibitorisches Peptid aus dem HR2 von gp41
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
t-PA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
TRIS	Trishydroxyaminomethan
U	Einheit (<i>unit</i>)
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
VSV-G	G-Protein des Vesikulären Stomatitisvirus
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen (<i>weight per volume</i>)
wPRE	<i>woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element</i>

9 ANHANG

9.1 Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

In diesem Abschnitt sind die Nukleotid- und Aminosäuresequenzen der klonierten *open reading frames* der iSAVE-Konstrukte dargestellt. Potentielle N-Glykosylierungsstellen in der Konsensussequenz N-X-S/T sind durch das Symbol * gekennzeichnet. Die Restriktionsschnittstellen für NotI und Sall, die zur Klonierung in die *multiple cloning site* von M377 verwendet wurden, sind fett hervorgehoben.

C46 (M851)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGGCCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCCAGCTGGATGGAGTGGGACCGCGAGATCAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAAC
      V S P S W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N
----S-----« »-----C46-----

      170     180     190     200     210     220     230
      | | | | | | |
CAGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCTGATGATGTCGAC
      Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F - -
      -----C46-----«
  
```

C46-H-GAr (M788)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGGCCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCCAGCTGGATGGAGTGGGACCGCGAGATCAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAAC
      V S P S W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N
----S-----« »-----C46-----

      170     180     190     200     210     220     230     240     250
      | | | | | | | |
CAGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCTGATCTAACATACCAAT
      Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R S N* I T N
      -----C46-----« »-----H-----

      260     270     280     290     300     310     320     330
      | | | | | | | |
TGCTGTGGTACATCAAGCTGTTTCAATTAGGAGCCGGGGTGGCGGGTGGCGGGTGGCGGGGGTGGTGGGGCTGGGGCCGGA
      W L W Y I K L F E L G A G G A G G A G A G A G A G A G A G A G
      -----H-----« »-----GAr-----«

      340     350     360     370     380     390     400
      | | | | | | |
GAATTAGAACAGAAATTAATTTTCAAGAAGAGGACTTAGAATTCCTGCAGTAAATCAAGCTTATCGATACCGGTCGAC
      E L E Q K L I S E E D L E F L Q -
      »-----M-----«
  
```

L-C46-H-GAr (M699) und Glykosylierungsvarianten

L-C46-H-GAr:

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGGCGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      | | | | | | | |
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      >-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCAGCCGCGATCGCACCCTGCGGTGCCCTGGAACGCCAGCTGGAGCAACAAGAGCCTGGAGCAGATCTGGAACCAC
      | | | | | | | |
      V S P S R D R T T A V P W N* A S W S N* K S L E Q I W N* H
----S-----«      »-----L-----

      170     180     190     200     210     220     230     240     250
      | | | | | | | |
ACCACCTGGATGGAGTGGGACCGGAGATCAACAACCTACACCAGCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAACCAGCAG
      | | | | | | | |
      T T W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q
--L--«      »-----C46-----

      260     270     280     290     300     310     320     330
      | | | | | | | |
GAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGCCAGCCTGTGGAACGGTTTCAGATCTAACATCACCAATTGGCTG
      | | | | | | | |
      E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R S N* I T N W L
-----C46-----«      »-----H-----

      340     350     360     370     380     390     400     410
      | | | | | | | |
TGGTACATCAAGCTGTTTCAATTAGGAGCCGGGGTGC GGGTGGCGCGGGTGC GGGGGTGC TGGGGCTGGGGCCGGAGAATTA
      | | | | | | | |
      W Y I K L F E L G A G G A G G A G A G A G A G A G A G A G A G E L
-----H-----«      »-----GAr-----«

      420     430     440     450     460     470     480
      | | | | | | | |
GAACAGAAATTAATTTCAAGAGGACTTAGAATTCCTGCAGTAAATCAAGCTTATCGATACCGGTCGAC
      | | | | | | | |
      E Q K L I S E E D L E F L Q -
      >-----M-----«

```

In den von dem Konstrukt L-C46-H-GAr abgeleiteten Glykosylierungsvarianten wurden verschiedene Glykosylierungsstellen durch Punktmutation entfernt. Die Nukleotidposition und die Art der Mutation sind für die einzelnen Konstrukte im Folgenden angegeben:

Konstrukt	Triplettposition	Sequenz	Aminosäure
L1mut (M771)	129-131	AGC → GCC	S → A
L2mut (M768)	144-146	AGC → GCT	S → A
L3mut (M746)	168-170	ACC → GCC	T → A
C46mut (M747)	207-209	ACC → GCC	T → A
Hmut (M748)	324-326	ACC → GCC	T → A
L1-2mut (M734)	129-131	AGC → GCC	S → A
	144-146	AGC → GCT	S → A
5xmut (M766)	129-131	AGC → GCC	S → A
	144-146	AGC → GCT	S → A
	168-170	ACC → GCC	T → A
	207-209	ACC → GCC	T → A
	324-326	ACC → GCC	T → A

L-C46-H-ohne Linker (M683)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
GCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
| | | | | | | |
GTTTCGCCCGAGCCGCGATCGCACCACCTGCCGTGCCCTGGAAACGCCAGCTGGAGCAACAAGAGCCTGGAGCAGATCTGGAACCAC
  V S P S R D R T T A V P W N* A S W S N* K S L E Q I W N* H
-----S-----«      »-----L-----

      170     180     190     200     210     220     230     240     250
| | | | | | | |
ACCACCTGGATGGAGTGGGACCGCGAGATCAACAACCTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAACCAGCAG
  T T W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q
--L--«      »-----C46-----

      260     270     280     290     300     310     320     330
| | | | | | | |
GAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACCTGGTTTCAGATCTAACATCACCAATTGGCTG
  E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R S N* I T N W L
-----C46-----«      »-----H-----

      340     350     360     370     380     390     400     410
| | | | | | | |
TGGTACATCAAGCTGTTTCGAATTCCTGCAAGAACAGAAATTAATTTTCAGAAGAGGACTTGCTGCAGTAAATCAAGCTTATCGAT
  W Y I K L F E F L Q E Q K L I S E E D L L Q -
-----H-----«      »-----M-----«

420
| SalI
ACCGTCGAC

```

L-C46-H-IgC (M769) und L-C46-H-IgS (M784)**L-C46-H-IgC:**

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGGCGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      | | | | | | | |
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCAGCCGCGATCGCACCCTGCGGTGCCCTGGAACGCCAGCTGGAGCAACAAGAGCCTGGAGCAGATCTGGAACCAC
      | | | | | | | |
      V S P S R D R T T A V P W N* A S W S N* K S L E Q I W N* H
      ----S-----«      »-----L-----

      170     180     190     200     210     220     230     240     250
      | | | | | | | |
ACCACCTGGATGGAGTGGGACCGGAGATCAACAACCTACACCAGCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAACCAGCAG
      | | | | | | | |
      T T W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q
      --L--«      »-----C46-----

      260     270     280     290     300     310     320     330
      | | | | | | | |
GAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACGGTTCAGATCTAACATCACCAATTGGCTG
      | | | | | | | |
      E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R S N* I T N W L
      -----C46-----«      »-----H-----

      340     350     360     370     380     390     400     410
      | | | | | | | |
TGGTACATCAAGCTGTTTGAATTAGAGCGCAAGTGTGCGTGGAGTGCCTCCCTGCCCGCCCTCCCGTGGCCGGCCCCGAA
      | | | | | | | |
      W Y I K L F E L E R K C C V E C P P C P A P P V A G P E
      -----H-----«      »-----IgC-----«

      420     430     440     450     460     470     480     490
      | | | | | | | |
TTAGAACAGAAATTAATTTTTCAGAAGAGGACTTAGAATTCCTGCAGTAAATCAAGCTTATCGATACCGTCGAC
      | | | | | | | |
      L E Q K L I S E E D L E F L Q -
      »-----M-----«

```

In dem von L-C46-H-IgC abgeleiteten Konstrukt L-C46-H-IgS wurden alle Cysteinreste im Linker durch Punktmutation zu Serinresten mutiert:

Konstrukt	Triplettposition	Sequenz	Aminosäure
L-C46-H-IgS (M784)	369-371	TGC -> AGC	C -> S
	372-374	TGC -> AGC	C -> S
	381-383	TGC -> AGC	C -> S
	390-392	TGC -> AGC	C -> S

C46-Concatemer-Konstrukte

Die C46-Concatemer-Konstrukte unterscheiden sich lediglich durch den Linker, der die beiden C46-Einheiten verbindet. Die Linkersequenzen sind im Folgenden aufgeführt.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGCGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      | | | | | | | |
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCAGCTGGATGGAGTGGGACCGCGAGATTAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAAC
      | | | | | | | |
      V S P S W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N
-----S-----« »-----C46-----

      170     180     190     200     210     220     230
      | | | | | | | |
CAGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACCTGGTTC
      | | | | | | | |
      Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F - LINKER -
-----C46-----«

      240     250     260     270     280     290     300     310
      | | | | | | | |
TGGATGGAGTGGGACCGCGAGATCAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAACCAGCAGGAGAAG
      | | | | | | | |
      W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N Q Q E K
      »-----C46-----

      320     330     340     350     360     370     380     390     400
      | | | | | | | |
AACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAACCTGGTTCGCGCCGCTGCTGGATATCTAGTAGATCAAG
      | | | | | | | |
      N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R R L L D I - -
-----C46-----«

      410
      | SalI
CTTATCGATACCGTCGAC

```

Konstrukt	Nukleotid- und Aminosäuresequenz des Linkers
Fur (M818)	CGCGCCAAGAGGGAT R A K R D
Fur ₀ (M869)	AGGAGCCGCGCCAAGAGGAGCGTG R S R A K R S V
Fur ₀ GA (M902)	AGGAGCCGCGCCAAGAGGAGCGTGGGAGGTGCAGGTGCCGGCGCTGGA R S R A K R S V G G A G A G A G
GAFur ₀ (M903)	GGAGGTGCAGGTGCCGGCGCTGGAAGGAGCCGCGCCAAGAGGAGCGTG G G A G A G A G R S R A K R S V
GAFur ₀ GA (M918)	GGAGGTGCAGGTGCCGGCGCTGGAAGGAGCCGCGCCAAGAGGAGCGTGGGAGGTGCAGGTGCCGGCGCTGGA G G A G A G A G R S R A K R S V G G A G A G A G
Fur _m (M845)	CGCGCCAAGGTGGAT R A K V D
GS (M863)	TCCGGTGGAGGTGGATCTGGAGGTGGAGGATCCGGA S G G G G S G G G S G

Fur_oGA-GlykosylierungsvariantenFur_oGA:

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
CGGCGCGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGATGCAATGAAGAGAGGGCTCTGCTGTGTGCTGCTGTGTGGAGCAGTCTTC
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F
      »-----S-----

      90      100     110     120     130     140     150     160
      | | | | | | | |
GTTTCGCCAGCTGGATGGAGTGGGACCGGAGATCAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTGATCGAGGAGAGCCAGAAC
      V S P S W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L I E E S Q N
-----S-----« »-----C46-----

      170     180     190     200     210     220     230     240     250
      | | | | | | | |
CAGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCCAGGAGCCGCGCCAAGAGG
      Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F R S R A K R
-----C46-----« »-----Furo-----

      260     270     280     290     300     310     320     330
      | | | | | | | |
AGCGTGGGAGGTGCAGGTGCCGGCGCTGGATGGATGGAGTGGGACCGGAGATTAACAACACTACACCAGCCTGATCCACAGCCTG
      S V G G A G A G A G W M E W D R E I N N* Y T S L I H S L
-----« »-----GA-----« »-----C46-----

      340     350     360     370     380     390     400     410
      | | | | | | | |
ATCGAGGAGAGCCAGAACCAGCAGGAGAAGAACGAGCAGGAGCTGCTGGAGCTGGACAAGTGGGCCAGCCTGTGGAAGTGGTTCC
      I E E S Q N Q Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F
-----C46-----«

420
| SalI
TGATGAGTCGAC
- -

```

In den von dem Konstrukt Fur_oGA abgeleiteten Glykosylierungsvarianten wurden die Glykosylierungsstellen in C46 durch Punktmutation entfernt. Die Nukleotidposition und die Art der Mutation sind für die einzelnen Konstrukte im Folgenden angegeben:

Konstrukt	Triplettposition	Sequenz	Aminosäure
N33Q (M974)	123-125	AAC --> CAG	N --> Q
N95Q (M967)	309-311	AAC --> CAG	N --> Q
N33Q/N95Q (M968)	123-125	AAC --> CAG	N --> Q
	309-311	AAC --> CAG	N --> Q

EHO-GAFur_oGA (M951)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
NotI | | | | | | | |
GCGGCCGCGCCACCATGGACGCCATGAAGCGGGGCTGTGCTGCGTGCTGCTGTGTGGCGCCGTGTTTCGTGAGCCCCAGC
      M D A M K R G L C C V L L L C G A V F V S P S
      »-----S-----«

      90      100      110      120      130      140      150      160
TGGCAGCAGTGGGAGCGGCAGGTGCGGTTCTGGACGCCAACATCACCAAGCTGCTGGAAGAGGCCAGATCCAGCAGGAAAAG
      W Q Q W E R Q V R F L D A N I T K L L E E A Q I Q Q E K
      »-----C46-EHO-----«

      170      180      190      200      210      220      230      240      250
AACATGTACGAGCTGCAGGAAGTGGACAAGTGGCCAGCCTGTGGAATTGGTTCGGCGCGCCGGGGCTGGAGCTGGAAGAAGC
      N M Y E L Q E L D K W A S L W N W F G G A G A G A G R S
      -----C46-EHO-----« »-----GA-----« »-----

      260      270      280      290      300      310      320      330
CGGGCCAAGCGGAGCGTTGGAGGAGCTGGAGCAGGGGCCGGATGGCAGCAGTGGGAAAAGACAGGTCCGCTTTCATGCCAAT
      R A K R S V G G A G A G A G W Q Q W E R Q V R F L D A N
      -----Furo-----« »-----GA-----« »-----C46-EHO-----

      340      350      360      370      380      390      400      410
ATCACAAAGCTCCTCGAAGAAGCTCAGATTCAGCAGGAAAAGAATATGTATGAACTCCAGGAAGTGGATAAAATGGCCCTCTCTG
      I T K L L E E A Q I Q Q E K N M Y E L Q E L D K W A S L
      -----C46-EHO-----«

420      430
| | | | | SalI
TGGAAGTGGTTTTGATGAGGTCGAC
      W N W F - -
--C46-EHO--«

```

9.2 Plasmidkarten

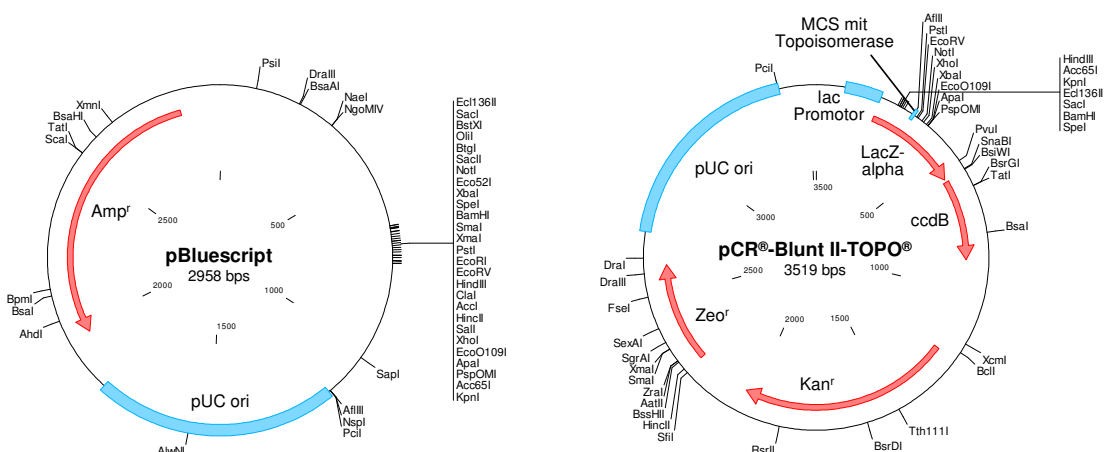
Im Folgenden sind die Karten, der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt. Die Darstellungsweise der Karten ist für jedes Konstrukt identisch: Rote Pfeile markieren Gene, blaue Bereiche stellen wichtige Sequenzelemente dar. Bei allen Konstrukten sind die singulären Restriktionsschnittstellen hervorgehoben. Weitere Informationen zu den Plasmiden sind dem Abschnitt 3.3 zu entnehmen.

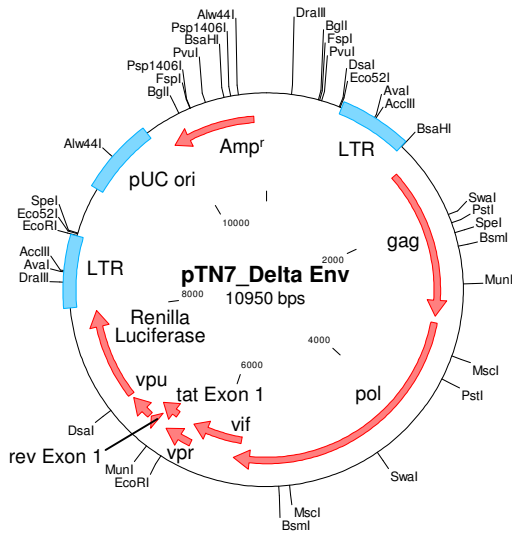
Die im Abschnitt 9.1 ausführlich dargestellten Transgenkassetten der klonierten C-Peptid-Varianten wurden jeweils in die *multiple cloning site* des leeren Vektors M377 eingefügt, so dass der Aufbau des Plasmidrückgrades immer identisch ist. Stellvertretend für alle klonierten C-Peptid-Konstrukte ist daher das Konstrukt GAFur₀GA (M918) gezeigt.

Folgende Abkürzungen werden in den Karten verwendet:

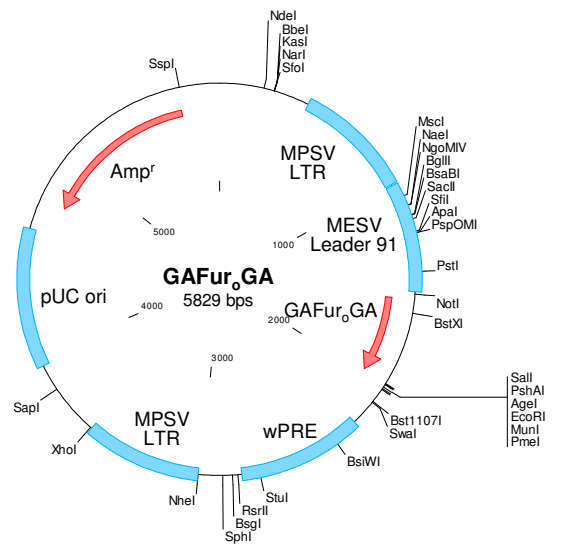
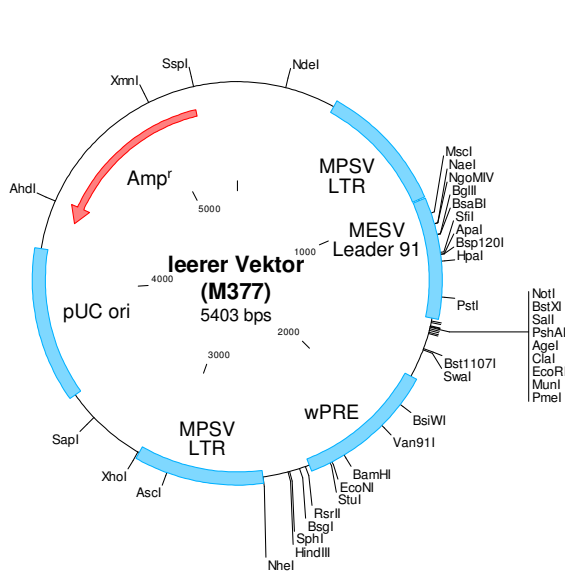
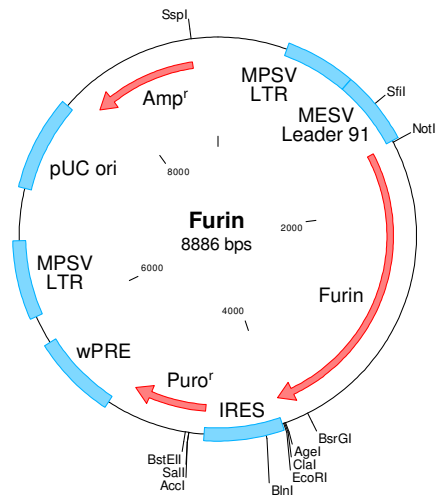
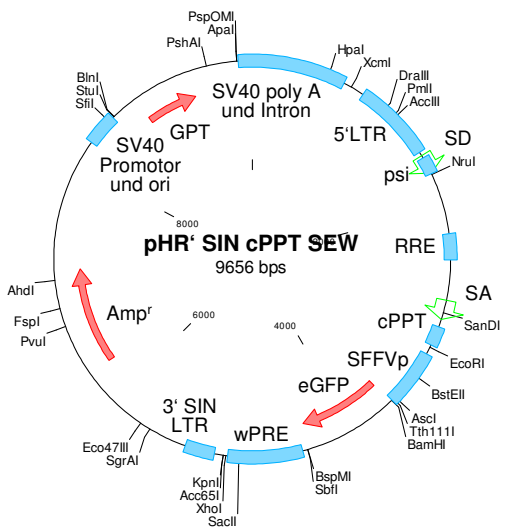
Amp^r: Ampicillinresistenzgen; ccdB: Plasmid F ccdB Toxin, CMV: Cytomegalovirus, cPPT: *central polypurine tract*, eGFP: *enhanced green fluorescent protein*, gag: Gruppenspezifische Antigene, GPT: Xanthin Guanin Phosphoribosyltransferase, IRES: *internal ribosome entry site*, Kan^r: Kanamycinresistenzgen, LacZ: β -Galactosidasegen, LTR: *long terminal repeat*, MCS: *multiple cloning site*, MESV: Murines embryonales Stammzellvirus, MPSV: Myeloproliferatives Sarcomavirus, ori: Replikationsursprung, pol: Polymerase, rev: *regulator of expression of virion proteins*, pUC: pUC Plasmid, Puro^r: Puromycinresistenzgen, RRE: *Rev responsive element*, SA: Splice Akzeptor, SD: Splice Donor, SFFV: *Spleen focus-forming virus*, SIN: *self inactivating*, SV40: Simian Virus 40, tat: *transactivator of transcription*, vif: *viral infectivity factor*, vpr: *viral protein R*, vpu: *viral protein U*, wPRE: *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element*, Zeo^r: Zeocinresistenzgen

9.2.1 Klonierungsplasmide





9.2.3 Virale Vektoren



DANKSAGUNG

Bei so vielen Seiten voller Daten und Wissen ist der Einfluss einiger kluger Menschen zu erwarten, denen ich für ihre jeweiligen Beiträge sehr danke:

Herrn Prof. Dr. Volker Dötsch an der Goethe-Universität Frankfurt danke ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer am Georg-Speyer-Haus ermöglichte mir die praktische Durchführung der Arbeit in ihrem Labor. Durch ihr großes Engagement für mein Projekt und ihr enormes Fachwissen hat sie ganz maßgeblich dazu beigetragen diese Arbeit zielführend und zügig zu beenden. Für das große in mich gesetzte Vertrauen sowie die fortwährende berufliche Förderung bin ich ihr sehr dankbar.

Ein großes Dankeschön gilt Felix Hermann der mein Projekt durch unzählige Denkanstöße und wertvolle Ratschläge vorangetrieben hat. Er hat meine Sorgen und Freuden geteilt und mich in allen Phasen der Arbeit ermutigt, angespornt und vor allem aufgefangen, wenn nicht alles so lief wie beabsichtigt.

Meinen ehemaligen und derzeitigen Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Laer danke ich für die freundliche, unterstützende Arbeitsatmosphäre und warme Gesellschaft. Sie alle waren unschätzbare Hilfen bei großen und kleinen Problemen im Laboralltag und haben mir mit Rat und Tat vielfach beigestanden. Für inspirierende Diskussionen und konstruktive Anregungen danke ich besonders Janine Kimpel, Frances Brauer, Sebastian Newrzela und Tsanan Heimann. Jörg Kahle und Andreas Volk danke ich ganz herzlich für die Durchführung der *pulse-chase*-Experimente. Gerne bedanke ich mich bei Patricia Schult-Dietrich, Marianne Hartmann und Tefik Merovci sowie Margot Landersz aus der Arbeitsgruppe Dietrich für die tatkräftige Unterstützung bei molekularbiologischen und Zellkulturexperimenten. Es war mir eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten.

Allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meiner Familie danke ich für Ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht mitveröffentlicht.

PUBLIKATIONEN

Originalartikel

EGERER, L., VOLK, A., KAHLE, J., KIMPEL, J., HERMANN, F. G. & VON LAER, D. Secreted Antiviral Entry Inhibitory (iSAVE) Peptides for Gene Therapy of HIV infection. *Manuskript in Vorbereitung*

LI PIRA, G., IVALDI, F., EGERER, L., VON LAER, D., KOOPMAN, G. & MANCA, F. Effector functions of antigen-specific human CD4 T-cells are preserved after lentiviral vector transduction. *Hum Gene Ther*, Manuskript in Revision

HERMANN, F. G., EGERER, L., BRAUER, F., GERUM, C., SCHWALBE, H., DIETRICH, U. & VON LAER, D. (2009). Mutations in gp120 Contribute to the Resistance of Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Membrane-Anchored C-Peptide maC46. *J Virol*; **83**(10): 4844-4853

SCHAMBACH, A., BOHNE, J., BAUM, C., HERMANN, F. G., EGERER, L., VON LAER, D. & GIROGLOU, T. (2006). Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element deleted from X protein and promotor sequences enhances retroviral vector titer and expression. *Gene Ther*; **13**(7): 641-645

Übersichtsartikel

EGERER, L., HUBERT, A., VON LAER, D. & DIETRICH, U. (2009). The Prevention of HIV Infection with Viral Entry Inhibitors. In: *Peptides as Drugs. Discovery and Development*. (Hrsg.: B. Groner): 73-102. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim

Patentanmeldung

Europäische Patentanmeldung am 09.01.2008 (Anmeldungsnummer: 08000298.3; Veröffentlichungsnummer EP2078726 A1) und PCT-Anmeldung am 09.01.2009 mit dem Titel „Secretable HIV entry inhibitory peptides for therapy of HIV infection“. Erfinder: von Laer, D. & Egerer, L. Veröffentlichung der Patentanmeldung am 15.07.2009

Präsentationen auf internationalen Konferenzen

- EGERER, L., KAHLE, J., BRAUER, F., KIMPEL, J., HERMANN, F. G. & VON LAER D. (2009). Secretable antiviral C peptides for HIV gene therapy expressed from retroviral vectors exhibit substantial antiviral activity. *Posterpräsentation*, Keystone Symposium: Prevention of HIV/AIDS, Keystone, Colorado, USA
– Auszeichnung: „Keystone Symposia Scholarship“
- EGERER, L., HERMANN, F. G. & VON LAER D. (2007). Retroviral vectors encoding secretable entry inhibitory peptides for HIV gene therapy. *Posterpräsentation*, XVth Annual Congress of the European Society of Gene and Cell Therapy, Rotterdam, Niederlande
- EGERER, L., HERMANN, F. G. & VON LAER D. (2007). Development of retroviral vectors encoding secretable entry inhibitory peptides for HIV gene therapy. *Posterpräsentation*, Third European Congress of Virology, Nürnberg
- EGERER, L., HERMANN, F. G. & VON LAER D. (2007). Retroviral vectors encoding secretable entry inhibitory peptides for HIV gene therapy. *Posterpräsentation*, 14. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie (DG-GT), Heidelberg
- EGERER, L., HERMANN, F. G. & VON LAER D. (2007). Development of retroviral vectors encoding secretable entry inhibitory peptides for HIV gene therapy. *Posterpräsentation*, 3. Deutsch-Österreichischer AIDS-Kongress (DÖAK), Frankfurt am Main