



Gentherapie zur Behandlung der HIV-Infektion und des kutanen T-Zell Lymphoms

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Thomas Schulz
aus Frankfurt am Main

Frankfurt (2006)

(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (FB15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: _____

Gutachter: _____

Datum der Disputation: _____

*Meinen Eltern
und Angela gewidmet*

1. EINLEITUNG	1
1.1 HIV-Infektionen und AIDS	1
1.1.1 Das humane Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1)	3
1.1.1.1 Genomaufbau von HIV-1	7
1.1.1.2 Replikationszyklus von HIV	9
1.1.2 Behandlung von HIV	11
1.2 Gentherapie und Gentransfer	13
1.3 Vektoren für Gentherapie	14
1.4 Zielzell-spezifisches Targeting	14
1.5 Retrovirale Vektoren	15
1.5.1 Chimäre T-Zell-Rezeptoren als therapeutische Gene	17
1.5.2 HIV bindende Liganden für chimäre T-Zell Rezeptoren	21
1.5.2.1 CD4	22
1.5.2.2 DC-SIGN	22
1.5.2.3 5-Helix	23
1.6 Das kutane T-Zell Lymphom	25
1.6.1 Gentherapie zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms	28
1.7 Zielsetzung der Arbeit	30
2. MATERIALIEN	31
2.1 Reagenzien und Verbrauchsmittel	31
2.2 Antikörper	32
2.3 DNA und Plasmide	33
2.4 Allgemeine Puffer und Nährmedien	36
3. METHODEN	37
3.1 Zellkultur und Zelllinien	37
3.1.1 Transfektion von Säugerzellen	39
3.1.1.1 Kalzium-Phosphat Transfektion	39
3.1.1.2 Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat und Chloroquine	40
3.1.1.3 "Activated Dendrimer" Transfektion	40
3.1.2 Gewinnung viraler Vektoren zur Transduktion von Zellen	41
3.1.3 Transduktion von Zellen mit viralen Vektoren	41
3.1.4 Anreicherung von Vektorpartikeln	42
3.1.4.1 Virusanreicherung mit VivaSpin Säulen	42

3.1.4.2	Virusanreicherung durch langsame Zentrifugation	42
3.1.5	Einfrieren und Lagerung von Vektorpartikeln	43
3.1.6	Isolierung von Lymphozyten aus Blut	43
3.1.6.1	Isolierung PBMCs aus peripherem Blut (<i>buffy coat</i>)	43
3.1.6.2	Isolierung von CD8+ Zellen aus frischem Vollblut	44
3.1.7	Stimulation von PBMCs	44
3.1.8	Entfernung der Beads aus Bead-stimulierten PBMCs	44
3.1.9	Beschichtung von Zellkulturschalen mit Retronectin	45
3.1.10	Einfrieren und Lagerung von Zellen	45
3.1.11	Mycoplasmentest	45
3.1.12	Vergleich der Zellproliferation	46
3.1.13	Anreicherung von Zellen mittels MACS in MS-Säulen	46
3.1.14	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	47
3.1.15	FACS Adhäsionstest mit fluoreszierenden Beads	47
3.1.16	FACS Adhäsionstest mit GFP-exprimierenden Zellen	48
3.1.17	Färbung von Suspensionszellen mit den Membranfarbstoffen PKH26 oder PKH67	49
3.1.18	Analyse der Lyse von HIV Env-exprimierenden Zellen mittels FACS	49
3.2	Protein-biochemische Methoden	51
3.2.1	Zellernte und Zellaufschluss	51
3.2.2	Proteinmengenbestimmung	51
3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
3.2.4	Immunoblotting	52
3.2.5	Strippen von Nitrozellulosemembranen	54
3.2.6	Interferon gamma (IFN- γ) ELISA	54
3.3	Gentechnische Methoden	55
3.3.1	Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen	55
3.3.2	Polymerasekettenreaktion (PCR)	55
3.3.3	Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen	57
3.3.4	Ligation von DNA-Fragmenten	57
3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	58
3.3.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	58
3.3.7	Herstellung chemokompetenter Bakterien	58
3.3.8	Transformation von kompetenten <i>Escherichia coli</i> -Zellen	59
3.3.9	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen	60
3.3.9.1	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab ("Minipräp")	60
3.3.9.2	Plasmidisolierung im präparativen Maßstab	60
3.3.10	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA	61
3.4	Methoden im Tierexperiment	62
3.4.1	Transplantation kutaner MyLa-Lymphome auf NMRI nu/nu Mäuse	62
3.4.2	Messung Tumervolumina	63

4. ERGEBNISSE	64
4.1 Das HIV Hüllprotein als Zielstruktur für chimäre T-Zell-Rezeptoren	64
4.1.1 DC-SIGN	64
4.1.1.1 Funktionelle Charakterisierung von DC-SIGN wt und DC-SIGN V351G	65
4.1.1.2 Untersuchung der Bindungsspezifität von DC-SIGN V351G	68
4.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von 5-Helix	70
4.1.3 Klonierung chimärer T-Zell-Rezeptoren	72
4.1.3.1 Klonierung von CD28 und CD3zeta	74
4.1.3.2 Klonierung von DC-SIGN	75
4.1.3.3 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit DC-SIGN	76
4.1.3.4 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit der extrazellulären Domäne von CD4	77
4.1.3.5 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit 5-Helix	78
4.1.4 Einbringung eines Detektionsepitops	78
4.1.5 Expression chimärer T-Zell-Rezeptoren mittels verschiedener Expressionsplasmide	79
4.1.6 Bindung chimärer T-Zell-Rezeptoren an gp120	83
4.1.7 Einbringung der Verbindungsregion von CD8	84
4.1.8 Bindungsassay mit HIV Env exprimierenden Zellen	85
4.1.9 Test auf Generierung künstlicher Virusreservoirs mit HOS CXCR4 Zellen	86
4.1.10 Generierung HIV-spezifischer T-Zellen	88
4.1.11 Induzierbar HIV Env-exprimierende Zielzellen	90
4.1.12 Analyse der Immunantwort transduzierter T-Zellen	91
4.1.13 DC-SIGN+Repeats/zeta transformiert NK-Zellen nicht zu Il-2-unabhängigem Wachstum	96
4.1.14 Analyse der Immunantwort transduzierter NK-Zellen	97
4.2 Das kutane T-Zell Lymphom	100
4.2.1 Etablierung eines Maus-Modells	100
4.2.2 Generierung der Verpackungszelllinie Fly syn Env	103
4.2.3 <i>Trans</i> -Infektion von retroviralen Partikeln durch DC-SIGN	104
4.2.4 Stabilisierung von retroviralen Partikeln durch lösliches DC-SIGN	108
4.2.5 Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von syn Env <i>in vitro</i>	110
4.2.6 Vergleich der therapeutischen Gene: HIV Env versus Thymidinkinase <i>in vitro</i>	113
4.2.7 Vergleich der therapeutischen Gene: HIV Env versus Thymidinkinase <i>in vivo</i>	114
5. DISKUSSION	117
5.1 Entwicklung chimärer T-Zell-Rezeptoren gegen HIV Env	117
5.2 HIV Env als therapeutisches Gen zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms	126
6. ZUSAMMENFASSUNG	132

7. ANHANG	134
8. LITERATURVERZEICHNIS	139

1. Einleitung

1.1 HIV-Infektionen und AIDS

Die Infektion mit dem humanen Immundefizienzvirus HIV bzw. das Krankheitsbild AIDS (erworbene Immunschwäche, engl. *acquired immunodeficiency syndrome*) hat mittlerweile pandemische Ausmaße angenommen: ca. 40 Millionen Menschen sind weltweit mit HIV infiziert. Die Zahl der Neuinfektionen weltweit hat sich von geschätzten 500.000 im Jahr 1983 auf rund 5 Millionen im Jahr 2005 verzehnfacht. Dabei ist anzumerken, dass einige Staaten keine oder nur veraltete Zahlen liefern. Abbildung 1.1 zeigt anhand aktueller WHO-Daten die Zahl der HIV-positiven Menschen nach Regionen geordnet auf dem Hintergrund einer Weltkarte.



Total: 40,3 Millionen

Abbildung 1.1: Geschätzte Anzahl HIV-infizierter Menschen weltweit Ende 2005.
Modifiziert nach WHO/UNAIDS, Dezember 2005. http://www.who.int/hiv/pub/epidemiology/en/epi_core2005_en.ppt

Aufmerksam auf die Erkrankung wurde man im Frühjahr 1981, als – vor allem in den USA – viele jüngere Männer in Krankenhäusern erschienen, die an opportunistischen Infektionen und seltenen Erkrankungen litten. Hierzu gehörten vor allem eine aggressive Form des Kaposi Sarkoms – eine Tumorerkrankung die normalerweise in eher benigner Form bei älteren Menschen auftritt – und eine seltene Form der Lungenentzündung verursacht durch *Pneumocystis carinii* (aus: <http://www.avert.org>).

Nachdem diese Symptome auch verstärkt bei Blutern auftraten, ließ sich das HI-Virus als krankheitsauslösendes Agens ermitteln. Wie sich zeigte, verläuft die Krankheit bei allen Patienten sehr ähnlich ab: während der Virämiephase leiden die Patienten an Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Schwindel und Gliederschmerzen, die aber bald wieder verschwinden. Oft passiert dann jahrelang nichts, bis die Patienten anfangen, von opportunistischen Erregern befallen zu werden, die ansonsten nur bei immunsupprimierten (z.B. Transplantat-Empfänger) auftreten (siehe auch Abbildung 1.2). Auch bestimmte Krebsarten kommen vermehrt bei HIV-Patienten vor. Eine Liste von opportunistischen Erregern und Krebsarten wurde von der amerikanischen Seuchenbehörde (CDC) 1993 als AIDS-definierende Krankheiten zusammengestellt (Centers for Disease Control and Prevention, 1992). Nancy Crum und Kollegen veröffentlichten 2006 eine Studie, die die Todesursachen und Sterbezahlen einer Gruppe von HIV-Patienten zwischen 1990 und 2003 untersuchte (Crum et al., 2006). Die Zahl der Todesfälle HIV-infizierter nahm nach dieser Studie kontinuierlich ab, und entsprechend die mittlere Überlebensdauer von 8 auf 12 Jahre zu. Auffällig ist die Veränderung der Todesursachen. Waren 1990 – 1996 fast 80% durch AIDS-definierende Erkrankungen verursacht, sank dieser Wert über 65% (1997 – 1999) auf 56% (2000-2003). Im Gegensatz dazu stieg der Anteil der Todesursachen, die keine Verbindung zu AIDS haben (z.B. Unfall, Mord/Selbstmord, Leber- und Herzerkrankungen) stetig an: von 9% (1990 – 1996) auf 32% (2000-2003). Vor allem der Anstieg der Leber- und Herzerkrankungen kann zum einen durch die antiretrovirale Therapie verursacht sein. Zum anderen könnte aber auch eine Kombination mit einer Hepatitisinfektion die Ursache sein. Crum und Kollegen spekulieren, dass früher der Tod durch eine opportunistische Infektion die wahre Auswirkung der Hepatitisinfektion verdeckt haben könnte, da hier bis zum Auftreten signifikanter Symptome mehr als 10 Jahre vergehen können. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen laut [aidsmap.com](http://www.aidsmap.com) (www.aidsmap.com) Puoti *et al.*, die eine Kohorte von HIV-Patienten untersuchten, bei denen bei 60% der Teilnehmer eine Ko-Infektion mit dem Hepatitis C Virus (HCV) vorlag. Hier starben zwischen 1997 und 2004 37% an mit HIV in Zusammenhang stehenden Erkrankungen, 36% an Lebererkrankungen und 27% aus anderen Gründen. Von den an Lebererkrankungen gestorbenen Patienten hatten 96% eine HCV-Koinfektion (Puoti, M et al., 2006).

Durch die AIDS-Forschung der vergangenen 20 Jahre wurde der molekulare und zelluläre Lebenszyklus von HIV immer mehr offen gelegt (Stevenson, 2003). Nach der Entdeckung von CD4 als HIV-Rezeptor 1984 dauerte es allerdings noch bis 1996, als erkannt wurde, dass auch noch ein Ko-Rezeptor nötig ist. Jetzt erklärte sich auch, warum manche Menschen, die mehrfach HIV ausgesetzt waren, trotzdem nicht erkrankten: durch eine

Mutation im Ko-Rezeptor CCR5 wurde dieser nicht auf die Zelloberfläche exportiert. Somit konnte das Virus nicht in die Zellen eindringen. Man findet aber auch HIV-infizierte, so genannte „long term non-progressors“ (LTNP), deren Immunsystem es schafft, ohne anti-retrovirale Therapie das Virus unter Kontrolle zu halten. Durch Untersuchungen des Immunsystems dieser LTNP lassen sich möglicherweise neue Therapiemöglichkeiten ableiten. Über eine Gruppe kenianischer Prostituiertes, die zu den LTNP gehören, wurde berichtet, dass ein großer Teil von ihnen über spezifische zytotoxische T-Zellen verfügt, die bei der Kontrolle der Infektion eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Rowland-Jones et al., 1998). Daher dürfte die Generierung zytotoxischer T-Zell-Antworten ein wichtiger Schritt zur Bekämpfung dieser Krankheit sein.

Augenblicklich gibt es keine heilende Therapie für HIV (siehe auch Kapitel 1.1.2). Die sich auf dem Markt befindenden Medikamente können den Ausbruch von AIDS lediglich verzögern, nicht jedoch das Virus selbst zerstören. Allerdings befinden sich einige neue Medikamente in klinischer Erprobung, die an verschiedenen Stellen der HIV-Infektion und -Vermehrung eingreifen.

1.1.1 Das humane Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1)

Das humane Immundefizienzvirus HIV gehört zur Familie der komplexen Retroviren (*retro* [lat.] rückwärts), speziell zu den Lentiviren (*lentus* [lat.] langsam). Benannt wurden die Retroviren nach einer besonderen Eigenschaft: sie verstoßen gegen das zentrale Dogma der Molekularbiologie, da sie den Informationsfluss in der Zelle (DNA → RNA → Protein) teilweise umkehren. Das viruseigene Enzym Reverse Transkriptase schreibt die Virus-RNA in DNA um und diese DNA kann stabil in das Wirtsgenom integrieren.

Entdeckt wurde HIV-1 1983 von der Arbeitsgruppe von Luc Montagnier am Institut Pasteur in Paris (Barre-Sinoussi et al., 1983). HIV-2 wurde ebenfalls von Montagniers Arbeitsgruppe 1986 entdeckt (Clavel et al., 1986). Beide Stämme unterscheiden sich in ihrem Genom und vor allem auch in ihrer Pathogenese. HIV-1 ähnelt eher den in Schimpansen gefundenen Immundefizienzviren SIV_{scz} (Gao et al., 1999), während HIV-2 mehr Ähnlichkeit mit SIV_{sm} aus Rauchgrauen Mangaben (lat. *Cercocebus atys*; engl. *Sooty Mangabeys*) hat (Hirsch et al., 1989). Auf Nukleotid-Ebene unterscheiden sich HIV-1 und HIV-2 um 40-60% (Hu et al., 1996). Während HIV-1 weltweit verbreitet ist (vgl. Abbildung 1.1), tritt HIV-2 vor allem in Westafrika auf.

Bei näherer molekularbiologischer Untersuchung von HIV fiel auf, dass sich verschiedene HIV-1 Viren in der DNA-Sequenz ihres Hüllproteins deutlich unterscheiden. Man erkannte drei große Gruppen von miteinander verwandten Viren: die Hauptgruppe M (*major*), die Gruppe N (*new*) und die Gruppe O (*outlier*). Innerhalb der Gruppe M, die für etwa 90% der bekannten HIV/AIDS Fälle verantwortlich ist, fand man ebenfalls eine sehr hohe genetische Diversität, weshalb man innerhalb der Gruppe weitere Subtypen definierte: A-D, F-H, J und K (E ist nicht als Subtyp definiert, da es nie als einzelner Erreger auftritt). Die einzelnen Subtypen weisen deutliche regionale Häufungen auf: so finden sich A und A/G Rekombinanten vorwiegend in West- und Zentralafrika. Subtyp B überwiegt in Europa und den amerikanischen Kontinenten. In Süd- und Ostafrika sowie China und Indien überwiegt der Subtyp C. Die anderen Subtypen sind häufig auf kleinere Regionen oder sogar einzelne Länder begrenzt. Ein wichtiger Unterschied zwischen den Subtypen besteht darin, dass sie sehr verschieden empfindlich gegenüber antiretroviralen Medikamenten sind (Wainberg, 2004). Die als humorale Immunantwort gebildeten Antikörper sind nicht kreuzreaktiv, d.h. sie binden nur an Epitope des gleichen Subtyps. Die einzigen Proteine, die an alle bis jetzt untersuchten Subtypen binden, sind neben CD4, das Oberflächenprotein DC-SIGN und das künstliche, aus HIV gp41 abgeleitete, 5-Helix (siehe auch 1.5.2.2 und 1.5.2.3).

Grundsätzlich wird HIV entweder durch Geschlechtsverkehr oder durch Blut (Blutprodukte oder z.B. blutige Kanülen) übertragen. Man nimmt an, dass bei der Übertragung durch Geschlechtsverkehr – der häufigsten Übertragungsart – das Virus zuerst mit mukosalen Dendritischen Zellen in Kontakt kommt.

Dendritische Zellen (DC) sind unregelmäßig geformt und verfügen über lange dendritische Ausläufer. DC gelangen über das Blut oder aktiv in die Gewebe, wo sie als unreife Zellen vorkommen, die sehr effektiv Antigene aufnehmen und prozessieren können. Nach einem Antigenkontakt migrieren sie aus den Geweben in den nächstgelegenen Lymphknoten (*homing*). Auf dem Weg dorthin reifen sie, d.h. sie verfügen nun über eine stark hochregulierte Fähigkeit zur T-Zellstimulation. Im Lymphknoten angekommen, binden viele T-Zellen daran. Nur T-Zellen, die das Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen, werden zur Proliferation stimuliert. Eine reife Dendritische Zelle ist in der Lage, mehrere tausend T-Zellen zu stimulieren (Banchereau und Steinman, 1998).

Im Jahr 2000 veröffentlichten *Geijtenbeek et al.* (Geijtenbeek et al., 2000c) die Entdeckung eines für Dendritische Zellen spezifischen C-Typ Lektins (DC-SIGN, siehe auch 1.5.2.2), das den frühen Kontakt zwischen T- und Dendritischen Zellen herstellt. Gleichzeitig

zeigten sie, dass HIV sehr affin an dieses Lektin bindet und dass mit HIV ko-inkubierte DCs auch 5 Tage später noch T-Zellen infizieren können; ohne Dendritische Zellen zerfällt HIV nach etwa einem Tag im Körper bzw. Inkubator.

Die heutige Vermutung ist, dass nach Kontakt mit HIV die Dendritischen Zellen in die Lymphknoten wandern, wo HIV die CD4-positiven T-Zellen infiziert. HIV-1 scheint so in der Lage zu sein, die Wanderung von Immunzellen als Transportweg zu den Lymphknoten zu nutzen (Baribaud et al., 2001). Sobald HIV im Lymphknoten angekommen ist, verbreitet es sich schnell durch Replikation und Transport durch Lymphozyten im gesamten Körper.

Allgemein verläuft die Pathogenese von HIV nach folgendem, in Abbildung 1.2 dargestellten, Schema:

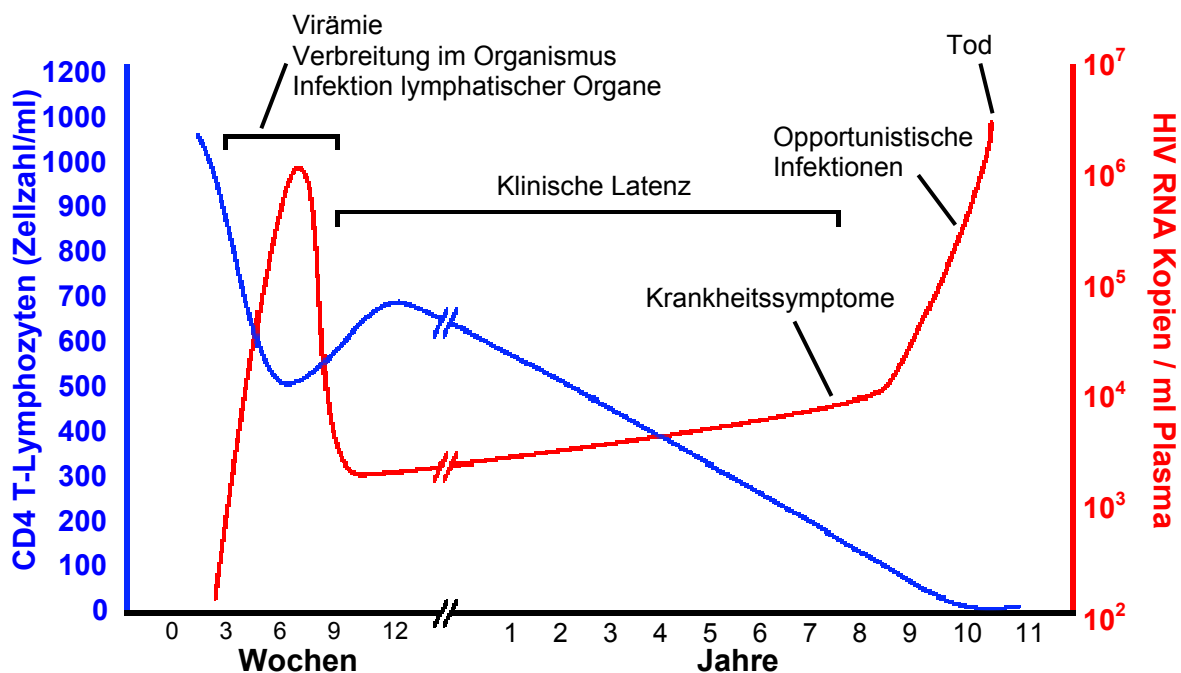


Abbildung 1.2: Zeitlicher Verlauf der HIV-Infektion mit Bezug auf die Zahl der RNA-Kopien/ml Blutplasma (rote Linie und Achse) und der CD4+ Zellzahl (blaue Linie und Achse).
(modifiziert nach: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Hiv-timecourse.png>)

Die Anzahl CD4+-Zellen pro ml Blut (dargestellt durch die blaue Linie) nimmt während der akuten Virämiephase deutlich ab, da das Immunsystem zu diesem Zeitpunkt die infizierten Zellen entfernt. Am Ende der Virämie steigt die Zahl der CD4+ Zellen wieder an, da sie nachgebildet werden, erreicht aber nicht mehr die Ursprungswerte. Während der Latenzzeit, in der das Immunsystem die Infektion offenbar im Griff hat und die Zahl der T-Zellen keinen starken Schwankungen unterliegt, sinkt die Zahl CD4-positiver Zellen

langsam ab. Invers verhält sich die Anzahl der HIV RNA-Kopien im Blut (rote Linie): sie steigt während der Virämie extrem an, sinkt deutlich ab, um schließlich wieder anzusteigen, da das Immunsystem die Infektion nicht mehr kontrollieren kann. Bei der Untersuchung von HIV-Patienten zeigt sich, dass die Zahl der HIV RNA-Kopien während der Virämie Aussagen auf den späteren Verlauf der Erkrankung bzw. die Zeit bis zum Ausbruch von AIDS zulässt. Mellors *et al.* zeigten, dass bei 80% der untersuchten Patienten, deren Zahl der HIV RNA-Kopien während der Virämie auf mehr als 30.000/ml Blut anstieg, sich innerhalb von sechs Jahren das klinische Bild von AIDS zeigte. Bei Patienten mit niedriger Anzahl an HIV RNA-Kopien (<500/ml) entwickelten nur 5,4% AIDS (Mellors *et al.*, 1997).

Die Herkunft von HIV und warum dieses Virus ab der Mitte des 20. Jahrhunderts im Menschen auftritt, ist noch nicht abschließend geklärt. Wie oben erwähnt, haben HIV-1 und HIV-2 große Ähnlichkeit mit in Affen vorkommenden Immundefizienzviren, daher ist eine Übertragung vom Affen auf den Menschen sehr wahrscheinlich und konnte für HIV-2 auch mit sehr großer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden (Lemey *et al.*, 2003). Durch phylogenetische Analyse verschiedener HIV-Isolate – u.a. aus einer afrikanischen Plasmaprobe von 1959 – konnten Tuofu Zhu und Kollegen 1998 zeigen, dass der letzte gemeinsame Vorfahre der heutigen HIV-1 Subtypen eine Sequenz hatte, die zwischen den Subtypen B und D der Hauptgruppe M einzuordnen ist (Zhu *et al.*, 1998). 2000 veröffentlichten Bette Korber und Kollegen eine mathematische Berechnung, die die vermutliche Zeitspanne des ersten Auftretens von HIV-1 im Menschen mit 1915 – 1941 angibt (Korber *et al.*, 2000). Das Wissen um die molekulare Herkunft und Weiterentwicklung von HIV ermöglicht auch die Verbesserung von antiretroviralen Medikamenten.

1.1.1.1 Genomaufbau von HIV-1

Allgemein kennzeichnen sich Retroviren durch drei essentielle Gene: *env*, *pol* und *gag*. Ihr Aufbau und die einzelnen Genprodukte sind in Abbildung 1.3 für HIV-1 dargestellt.

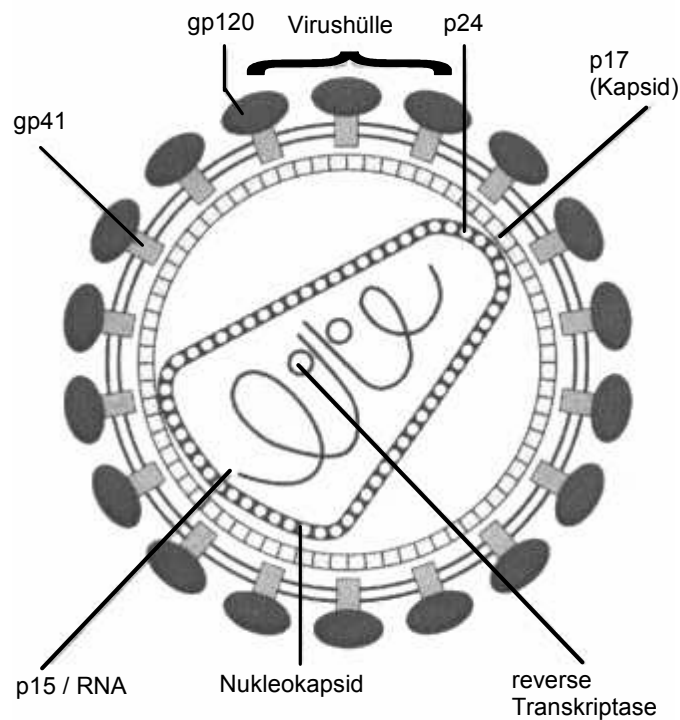


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau eines HI Virus

Env codiert für das Hüllglykoprotein (im Folgenden mit Env, für engl. *envelope glycoprotein* abgekürzt). Die Synthese der Transmembran- (TM) (gp41) und der Oberflächenkomponente (SU, von engl. *surface*) (gp120) erfolgt als gemeinsames Vorläuferprodukt (gp160), das von einer zellulären Protease gespalten wird. Beide Proteine bleiben nicht-kovalent miteinander verbunden und oligomerisieren, vermutlich als Trimere, an der Oberfläche des Virions.

gag codiert für die internen Proteine, die die Kapsid- und Nukleokapsidstrukturen bilden.

pol codiert für die viralen Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase und Protease.

Das Genom eines Retrovirus besteht aus zwei plus-Strang RNA Molekülen, die sich im konisch aufgebauten Nukleokapsid, komplexiert mit weiteren Kapsidproteinen, befinden.

Eine wichtige Eigenschaft von Lentiviren ist, dass sie auch ruhende Zellen infizieren können. Einfache Retroviren wie z.B. das Maus Leukämie Virus (MLV) benötigen für ihre Vermehrung proliferierende Zellen, da erst ab der Prometaphase die Kernmembran aufgelöst wird und das Virus vorher keine Möglichkeit hat, seine DNA aktiv in den Kern zu transportieren. Komplexe Retroviren wie HIV enthalten noch weitere Gene, die für regulatorische und akzessorische Proteine codieren (Abbildung 1.4). Bei HIV-1 sind dies *nef*, *rev*, *tat*, *tev*, *vif*, *vpr* und *vpu* (Modrow, S und Falke, D, 1997).

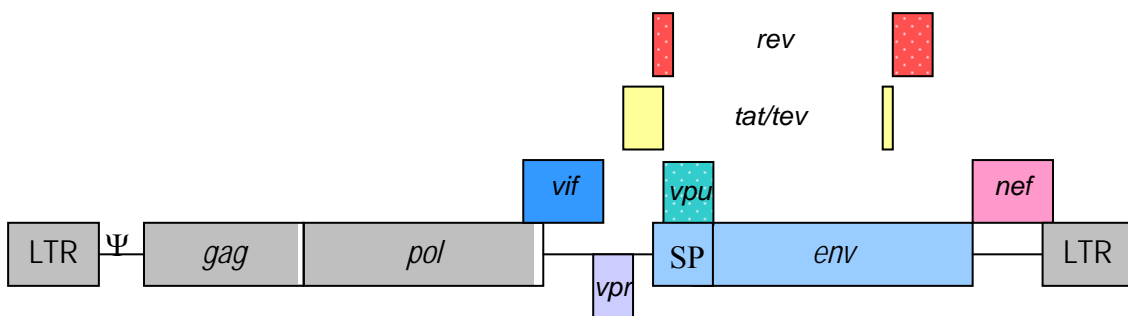


Abbildung 1.4: Das HIV-Genom. Wie das MLV-Genom (Abbildung 1.1) enthält es neben den LTRs das Verpackungssignal und die Gene *gag*, *pol* und *env*. Weiterhin verfügt HIV über die sogenannten akzessorischen Gene *nef*, *rev*, *tat*, *tev*, *vif*, *vpr* und *vpu*, die in einem anderen Leseraster innerhalb der essentiellen Gene codiert sind.

1.1.1.2 Replikationszyklus von HIV

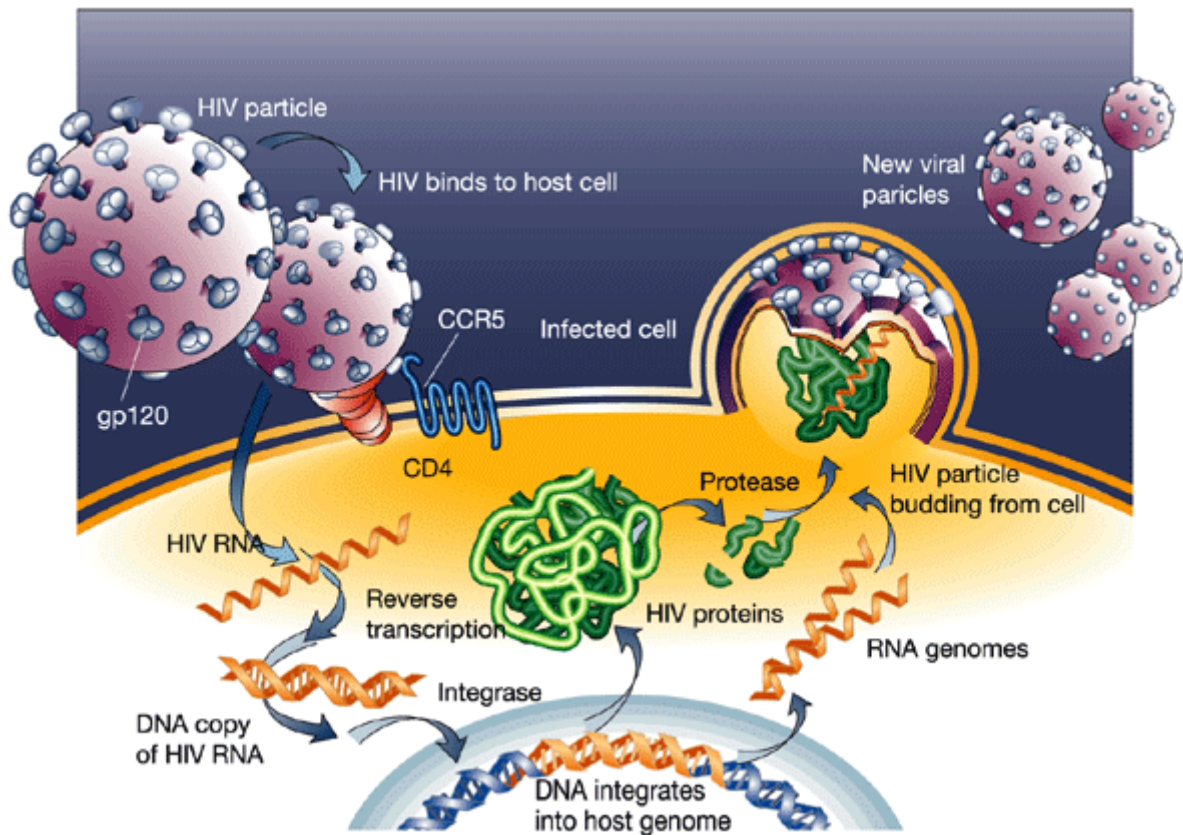


Abbildung 1.5: Lebenszyklus von HIV. Das Virus dringt nach Bindung an Rezeptor und Ko-Rezeptor in die Zelle ein. Die RNA wird revers transkribiert und ins zelluläre Genom integriert. Anschließend kommt es zur Transkription viraler Gene und der Freisetzung von Nachkommenviren. (Entnommen aus Weiss, 2001)

Abbildung 1.5 stellt den Replikationszyklus von HIV dar. Zunächst dringt HIV in die Zellen durch die Fusion der viralen mit der zellulären Membran ein. Diese Membranfusion beginnt mit der Interaktion des viralen Hüllproteins (Env [engl. *envelope*]) mit dem zellulären Rezeptor CD4 und anschließend mit einem Ko-Rezeptor der Chemokinrezeptor Familie (vorwiegend CCR5 oder CXCR4). Durch bindungsinduzierte Konformationsänderungen im HIV Env wird das Fusionspeptid aus dem gp41 Anteil freigelegt und dringt in die Zielzellmembran ein. Das HIV Hüllprotein ist natürlicherweise ein Trimer, d.h. drei Moleküle interagieren miteinander. Ist das Fusionspeptid inseriert, besteht eine Verbindung zwischen Virus und Zelle. Die räumliche Struktur von gp41, dargestellt in Abbildung 1.6, besteht aus zwei α -helikalen Wiederholungsregionen HR1 und HR2. Diese können sich als 6-Helix Bündel zusammenlagern und bringen so die beiden Membranen in hinreichende räumliche Nähe, so dass die Fusion ablaufen kann (Abbildung 1.7, vgl. auch Kapitel 1.5.2.3).

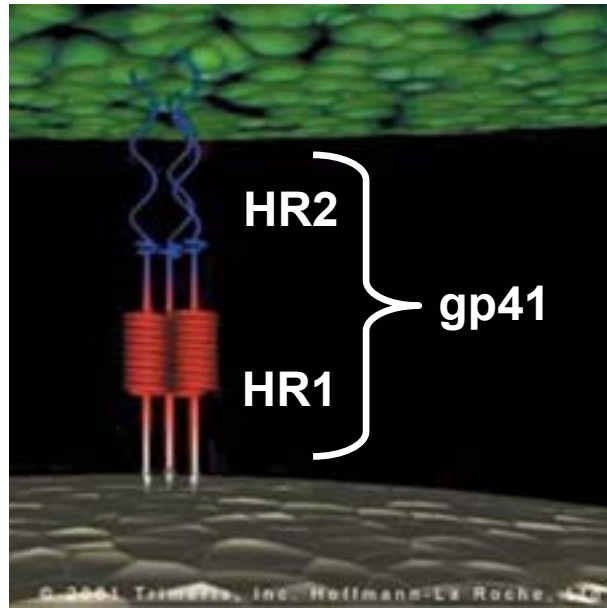


Abbildung 1.6: Darstellung der Wiederholungsregionen HR1 und HR2 von HIV gp41. Die blauen Bereiche von HR2 enden in der Virusmembran, die roten HR1-Bereiche sind in die Zielzellmembran inseriert. (Quelle: <http://www.trimeris.com>)

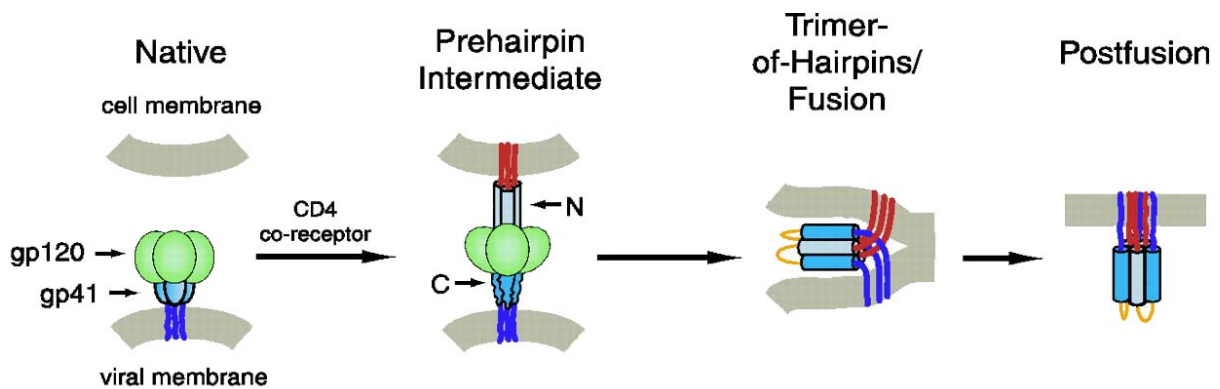


Abbildung 1.7: Fusion der viralen und zellulären Membranen. Nach Bindung von CD4 und Korezeptor wird das N-terminale Fusionspeptid in die Zielzellmembran inseriert. Die α-helikalen Bereiche lagern sich zu einem 6-Helix Bündel zusammen und die Membranen können fusionieren. (Entnommen aus: Root et al., 2001)

Nach erfolgreicher Membranfusion wird die virale RNA revers in DNA transkribiert und mit Hilfe des viralen Proteins Integrase in das zelluläre Genom eingefügt. Im Anschluss an die Integration ins Wirtsgenom kann die virale DNA genau so wie zelluläre DNA transkribiert, gespleißt und translatiert werden. Anfangs sind es vor allem akzessorische Proteine, die zur Translation mehrfach gespleißt werden müssen. Später sorgt dann z.B. das akzessorische Protein rev für den Export ungespleißter oder nur einmal gespleißter RNA aus dem Kern. Von dieser RNA werden dann die Strukturproteine Gag, Pol und Env

translatiert, außerdem dient ungespleißte RNA als Genom für neue Viren. An der Zellmembran lagern sich die Strukturproteine, das Genom und einige virale Enzyme zusammen und bilden ein neues Virus, welches durch Knospung die Zelle verlässt. In der Regel verhindert das körpereigene Immunsystem eine weitere Verbreitung von Viren im Organismus, in dem befallene Zellen abgetötet werden. Bei einer HIV-Infektion sind die befallenen Zellen allerdings T-Helferzellen des Immunsystems. Infizierte T-Zellen werden vom Immunsystem eliminiert und haben zusätzlich eine sehr kurze Lebenszeit (ca. 2 Tage) (Perelson et al., 1996). Durch diese starke Reduzierung von T-Zellen wird eine Immundefizienz „erworben“. Diese, und die hohe Mutationsrate von HIV verhindern eine effiziente körpereigene Abwehr der HIV Infektion.

Obwohl man mittlerweile über eine sehr effektive HIV-Kombinationsbehandlung verfügt (vgl. Kapitel 1.1.2), lässt sich die Infektion nicht überwinden. Ein Grund liegt in der Fähigkeit von HIV Zellen latent zu infizieren. Bei einer latenten Infektion wird das virale Genom in die infizierte Zelle integriert, allerdings kommt es nicht zur Proteinsynthese und der Bildung neuer Virionen. Zur Ausbildung einer Latenz kommt es oft, wenn die infizierte Zelle den Zellzyklus verlässt und in ein Ruhestadium eintritt. Dies ist häufig der Fall, wenn eine T-Zelle zur T-Gedächtniszelle (*memory T cell*) wird (Chun et al., 1997). Allerdings haben Studien gezeigt, dass es auch während der T-Zellreifung im Thymus zu Infektionen kommen kann, wenn die T-Zellen (auch solche, die später CD8 exprimieren) temporär CD4 auf ihrer Oberfläche tragen (Brooks et al., 2001). Sobald diese Zellen stimuliert werden und damit wieder in den Zellzyklus eintreten, kann HIV auch wieder replizieren. Dieses Reservoir latent infizierter Zellen stellt die größte Herausforderung in der Behandlung von HIV dar.

1.1.2 Behandlung von HIV

Heute wird HIV in der Regel mit Hilfe der *highly active anti-retroviral therapy* (HAART) behandelt. Mit diesem Begriff wird eine Kombinationsbehandlung mit antiviralen Substanzen beschrieben. Häufig enthalten diese Medikamente 3 Wirkstoffe, die an verschiedenen Stellen des HIV Replikationszyklus angreifen: Nukleotidanaloga, Inhibitoren der reversen Transkriptase und Proteaseinhibitoren. Neuerdings wird vermehrt versucht, das Eindringen von HIV in seine Zielzellen zu verhindern. Hierfür werden Strukturen entwickelt, die die Bindung des Hüllproteins an den zellulären Rezeptor CD4 oder die Ko-

Rezeptoren CXCR4 bzw. CCR5 verhindern. Ein ganz neuer Ansatz versucht die Verschmelzung der viralen mit der zellulären Membran zu verhindern (Rusconi et al., 2004) (siehe auch Kapitel 1.5.1 und 1.5.2.3).

Die zurzeit praktizierte HIV Behandlung ist nicht kurativ und verursacht viele, z.T. schwere, Nebenwirkungen. Auf Grund seiner hohen Variabilität, die in erster Linie in der fehlerhaften reversen Transkription begründet ist, bilden sich immer wieder Mutanten, die gegen die aktuell verwendeten antiviralen Medikamente resistent sind. Je mehr verschiedene Substanzklassen in der Therapie verwendet werden, desto länger kann die Ausbildung von Resistenzen und damit der Ausbruch von AIDS verzögert werden; häufig um mehrere Jahre.

Seit der Entdeckung von HIV als Erreger von AIDS, gibt es viele verschiedene Ansätze eine Impfstrategie zu entwickeln (Giri et al., 2004). Auf Grund seines komplexen Lebenszyklus' und der hohen Mutationsrate, konnten bis jetzt jedoch keine konstanten und immunogenen Epitope definiert werden. D.h., es ist kein Impfstoff verfügbar.

Als weitere Schwierigkeit kommt hinzu, dass jedes Tiermodell für die Erkrankung und Impfstofftestung verschiedene Schwierigkeiten bereithält. So repliziert HIV in Mäusen nicht, bzw. müssen SCID-Mäusen durch aufwändige und schwankungsanfällige Verfahren humane Zellen appliziert werden. SIV und SHIV (replikationskompetentes SIV mit HIV Hüllprotein) repliziert in Makaken, die Pathogenese entspricht aber nicht der von HIV im Menschen. Ein Schimpansen-Modell existiert, jedoch sind die Tiere selten und damit sehr teuer; auch wirft die Verwendung von Schimpansen, in Versuchsreihen mit tödlichen Erregern, ethische Fragen auf. Weiterhin sind Schimpansen nicht durch Virus infizierbar, das CCR5 als Ko-Rezeptor verwendet und eine Infektion mit Virus aus Patienten führt nicht zum Ausbruch von AIDS.

Die meisten, der bis jetzt *in vivo* untersuchten Impfstrategien liefern entweder nicht genug Antigen, um eine hinreichende Aktivierung des Immunsystems zu erzeugen und/oder die zelluläre Immunantwort ist nicht ausreichend hoch. Die wichtige Rolle einer zellulären Immunantwort zum Schutz vor AIDS konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (Rowland-Jones et al., 1998; Schmitz et al., 1999). Nur bei sehr wenigen Patienten konnten neutralisierende Antikörper gegen HIV gefunden werden, die kreuzreaktiv mit anderen HIV Subtypen sind. Ein Beispiel dafür sind z.B. die Antikörper 2F5 und 4E10. Für diese Antikörper konnte kürzlich gezeigt werden, dass sie nicht nur konservierte Bereiche der gp41 Untereinheit des HIV Hüllproteins binden, sondern auch an eigene zelluläre Strukturen wie, im Fall der Antikörper 2F5 und 4E10, das Phospholipid Cardiolipin (Haynes et al., 2005). Diese Entdeckung kann erklären, warum neutralisierende, kreuzreaktive

Antikörper so selten bei HIV-Patienten zu finden sind. Außerdem lässt es vermuten, dass die Entwicklung kreuzreaktiver, neutralisierender Antikörper sehr schwierig wird, da in vielen Fällen vermutlich erst die immunologische Toleranz für diese Antigene gebrochen werden muss. Weiterhin stellt sich die Frage, welche Nebenwirkungen solche Antikörper haben werden.

1.2 Gentherapie und Gentransfer

Als Behandlungsmethode eignen sich Gentherapien vor allem für verschiedene (Erb-) Krankheiten, bei denen eine konventionelle, medikamentöse Therapie nicht erfolgreich oder nicht möglich ist. Bis jetzt befinden sich jedoch alle gentherapeutischen Behandlungsmethoden noch in klinischen Versuchsstadien.

Es gibt gentherapeutische Ansätze u.a. zur Behandlung der schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) (Hacein-Bey-Abina et al., 2002), septischen Granulomatosen (engl. *chronic granulomatous disorder*, CGD) (Ott et al., 2006), Hämophilie (Arruda et al., 2005), verschiedener Krebserkrankungen (Pinthus et al., 2004; Westwood et al., 2005) und chronischer Infektionen wie HIV oder Hepatitis B (Masiero et al., 2005; Morrissey et al., 2005). In der Regel wird bei gentherapeutischen Ansätzen versucht, ein defektes Gen durch ein funktionsfähiges zu ersetzen (SCID, CGD, Hämophilie), infizierte oder entartete Zellen spezifisch durch toxische Gene abzutöten (Krebs und Infektionen), Immunreaktionen gegen infizierte oder entartete Zellen anzustoßen (Krebs und Infektionen) oder die Infektion und Replikation von Viren durch „maßgeschneiderte“ Gene oder Nukleinsäuren zu verhindern.

Grundsätzlich lässt sich zwischen zwei verschiedenen Wegen der Gentherapie unterscheiden: einerseits kann das therapeutische Gen stabil in das Zielzellgenom eingebracht werden oder es befindet sich als extrachromosomale DNA in der Zelle. Beide Wege haben Vor- und Nachteile: eine stabile Integration sorgt für dauerhafte Expression des Transgens, findet aber in der Regel in unmittelbarer Nähe aktiver zellulärer Gene statt und kann deshalb zu Insertionsmutagenese und der Ausbildung von Krebs führen, da hier ungewollt Tumorsuppressorgene inaktiviert oder Proto-Onkogene aktiviert werden können (Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Dieses Problem lässt sich theoretisch durch optimierte Gentransfervehikel reduzieren, diese befinden sich aber noch in sehr frühen Entwicklungsstadien. Gentransfervehikel, bei denen die DNA nicht ins Genom inseriert

wird, umgehen dieses Problem ebenfalls. Allerdings wird das therapeutische Gen nur transient abgelesen, was durchaus auch gewünscht sein kann.

1.3 Vektoren für Gentherapie

Seit einigen Jahren werden immer mehr Vektoren und Systeme beschrieben, die sich für den therapeutischen Gentransfer eignen. Diese sind vor allem von humanpathogenen Viren abgeleitet, da Viren viele Grundvoraussetzungen für Vektoren von vornherein erfüllen: sie sind hinreichend klein, lassen sich verhältnismäßig einfach, rein und in großen Mengen herstellen, sie sind dafür „gemacht“ die von ihnen verpackte Erbinformation von Zellen produzieren zu lassen. Einige haben sogar eine Spezifität für bestimmte Gewebe.

Auf Grund ihrer Pathogenität ist es bei einer Vielzahl von Viren unerwünscht, dass sie sich im Organismus vermehren, d.h. replizieren. Für einige Viren wurden deshalb Mutanten entwickelt, die replikationsdefizient sind, d.h. sie können sich nicht alleine vermehren. Durch Deletion essentieller oder sogar aller viralen Gene wird dem Virus die Replikationsfähigkeit genommen und gleichzeitig Platz für therapeutische Gene geschaffen. Solche replikationsdefizienten Viren werden als virale Vektoren bezeichnet.

Folgende Viren und daraus abgeleitete virale Vektoren werden in der Forschung häufig für Gentransferstudien verwendet: Adenovirus, Adenoassoziiertes Virus, Hepadnaviren (v.a. Hepatitis B), Herpesvirus, Masernvirus, Retroviren (v.a. Maus Leukämie Virus, HIV und Foamy Virus) oder Vaccinia Virus (Fisher et al., 1996; Geller und Breakefield, 1988; Hermonat und Muzyczka, 1984; Lorin et al., 2004; Pear et al., 1993; Poznansky et al., 1991; Protzer et al., 1999; Russell und Miller, 1996; Sutter und Moss, 1992).

1.4 Zielzell-spezifisches Targeting

Bei der Verwendung von Viren oder viralen Vektoren als Gentransfervehikel bietet der natürliche Tropismus der Viren die Möglichkeit das Transgen gezielt in Gewebe einzubringen. So infizieren z.B. Hepadnaviren bevorzugt die Leber. Allerdings können die

meisten Viren in Zellen aus vielen verschiedenen Geweben eindringen; sie verwenden ubiquitäre Rezeptoren. Bei umhüllten Viren wie z.B. dem Maus Leukämie Virus (MLV) besteht die Möglichkeit das Hüllprotein eines anderen Virus zu verwenden. Dieser Prozess wird als Pseudotypisierung bezeichnet und erlaubt die Änderung des Tropismus unter Beibehaltung der restlichen viralen Genprodukte. So erlaubt z.B. die Verwendung des HIV Hüllproteins mit den Matrix- und Kapsidproteinen von MLV die spezifische Einbringung von therapeutischen Genen in T-Zellen mittels eines Virusvektors, der keine weiteren akzessorischen Protein benötigt (Haynes et al., 2003).

1.5 Retrovirale Vektoren

Die Genom-Struktur eines vollständigen und replikationsfähigen Maus Leukämievirus ist in Abbildung 1.8 schematisch dargestellt. Am 5'-Ende befindet sich die langen terminalen Sequenzwiederholungsbereiche (engl. *long terminal repeat*, LTR), die während der reversen Transkription als Primer-Bindungsstelle dienen und auch Promotorfunktion haben. Es folgt das Verpackungssignal Psi (Ψ), welches die Aufnahme der genomischen RNA in neue Partikel ermöglicht und im Anschluss die codierende Sequenz der viralen Gene *gag*, *pol* und *env*.

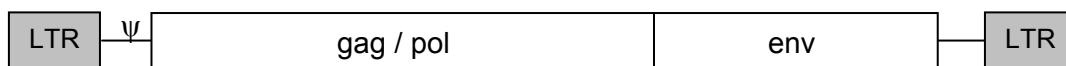


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Moloney Maus Leukämie Virus-Genoms, eines einfachen Retrovirus.

Um einen replikationsunfähigen viralen Vektor zu erhalten, müssen die essentiellen viralen Gene *gag*, *pol* und *env* voneinander getrennt und ohne Verpackungssignal in so genannte Verpackungszellen transfiziert werden. Die Verpackungszelllinien exprimieren dann stabil die einzelnen viralen Genprodukte und damit Vektorpartikel. Durch die Wahl eines bestimmten Hüllproteins eines anderen Virus kann so der Wirtstropismus des pseudotypisierten Virusvektors festgelegt werden. So infizieren z.B. mit HIV Env pseudotypisierte Vektoren spezifisch T-Helferzellen ($CD4^+$ und $CXCR4^+$). Zur Erzeugung infektiöser Pseudotyp-Viruspartikel muss zusätzlich noch ein virales Genom in die Verpackungszellen eingebracht werden. Dieses virale Genom muss von allen viralen

proteincodierenden Sequenzen befreit sein und darf neben dem therapeutischen Gen lediglich das Verpackungssignal Ψ und die LTRs enthalten. Durch Entfernung der proteincodierenden Sequenzen im diesem Virusgenom wird die Replikationsfähigkeit der Viren verhindert und gleichzeitig Platz für therapeutische Gene geschaffen (Abbildung 1.9). Die jetzt entstehenden Viruspartikel enthalten alle für die Infektion nötigen Proteine, tragen als Genom allerdings nur das therapeutische Gen. Einen solchen Vorgang bei dem ein Virus in eine Zelle eindringen kann, aber keine Nachkommen produziert, bezeichnet man als Transduktion. Transduzierte Zellen können also selbst keine Viruspartikel freisetzen.

therapeutischer Vektor

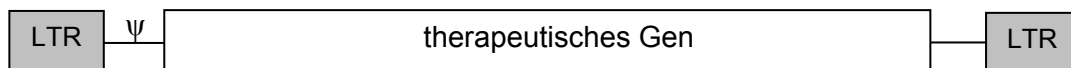


Abbildung 1.9: Schematische Struktur eines therapeutischen Vektors. Aus dieser Sequenz wurden alle viralen proteincodierenden Bereiche entfernt und durch ein therapeutisches Gen ersetzt. Lediglich die LTRs und das Verpackungssignal ψ sind erhalten geblieben. Die zur Herstellung infektiöser Partikel notwendigen Proteine werden unabhängig von diesem Vektor in den Verpackungszellen produziert.

Virale Pseudotypvektoren sind eine Mischung aus Bestandteilen zweier verschiedener Viren. Bei einem Teil der in dieser Arbeit verwendeten Pseudotypvektoren (Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms) stammen die Kapsidproteine aus Mo-MLV (Moloney Maus Leukämievirus) und das Hüllprotein Env von HIV. Sie werden deshalb als MLV/HIV Pseudotypvektoren bezeichnet. Diese rekombinanten, T-Helferzell-spezifischen, retroviralen Vektoren sind demnach gut geeignet zielzellspezifisch therapeutische Gene zu transduzieren. In erster Linie können diese Vektoren bei Erkrankungen von T-Zellen verwendet werden. So gibt es eine Reihe von Leukämien, Krebserkrankungen der weißen Blutkörperchen, bei denen sich T-Zellen ungehemmt vermehren. Durch pseudotypisierte MLV/HIV Vektoren können therapeutische Gene, die z.B. für Tumorsuppressoren, anti-angiogenetisch wirksame oder auch toxische Proteine codieren, verwendet werden. Anwendungsmöglichkeiten von MLV/HIV Pseudotypvektoren bestehen in der HIV-Therapie und dem kutanen T-Zell Lymphom. Bei beiden Erkrankungen sind T-Zellen betroffen.

Für den unspezifischen Transfer, der in dieser Arbeit entwickelten chimärer T-Zell-Rezeptoren, in humane Lymphozyten wurden pseudotypisierte Vektoren verwendet, bei denen das Hüllprotein aus dem Gibbonaffen Leukämie Virus (GaLV) stammt. Es gibt

noch eine ganze Reihe anderer Hüllproteine, von denen bekannt ist, dass sie zusammen mit dem Kapsid von MLV funktionsfähige pseudotypisierte Vektoren bilden können. Hierzu gehören u.a. VSV (vesikuläres Stomatitis Virus), LCMV (Lymphozytisches Choriomeningitis Virus), Sindbis Virus, Hepatitis B oder Ebola (Haynes et al., 2003). Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Transfer in T-Zellen am besten mit GaLV funktioniert (Muhlebach et al., 2003).

1.5.1 Chimäre T-Zell-Rezeptoren als therapeutische Gene

Ein ergänzender Ansatz zur herkömmlichen HIV Behandlung oder auch der Impfung ist eine Gentherapie. Hierbei stehen einem zwei theoretische Wege der Behandlung offen: die dauerhafte Einbringung eines Gens, welches eine produktive Infektion mit HIV verhindert oder die (temporäre) Modifikation des Immunsystems, damit es HIV infizierte Zellen anhand konservierter Bereiche erkennt und spezifisch eliminiert.

Bei dem Vergleich der beiden Alternativen fällt auf, dass prinzipiell die Behandlung gesunder Patienten, die sich möglicherweise mit HIV infizieren könnten, mittels Gentherapie viel aufwändiger ist, als die Behandlung einzelner, infizierter Patienten. Als effiziente Proteine *in vitro* haben sich hier dominant negative Formen der Protease und dem Rev Protein (revM10) (Bevec et al., 1992) oder auch eine membranständige Version von T-20 (Enfuvirtide) erwiesen (Hildinger et al., 2001; Kilby et al., 1998).

Für die Behandlung bereits infizierter Patienten bietet vor allem die Entwicklung chimärer T-Zell Rezeptoren an. Chimäre T-Zell Rezeptoren sind Fusionsmoleküle aus einer cytoplasmatischen Signaldomäne und einer extrazellulären Bindedomäne. Besonders für Tumoren wurden schon viele chimäre T-Zell Rezeptoren beschrieben, die meist einen „single-chain“ Antikörper (scFv) als Bindedomäne und den cytoplasmatischen Teil von CD3 ζ (zeta) oder des Fc gamma Rezeptors beinhalten.

Die Aktivierung des Immunsystems durch eine Virusinfektion beinhaltet die Aufnahme von Antigenen durch antigenpräsentierenden Zellen (APCs). Dort werden sie prozessiert, in Form von Peptiden am major histocompatibility complex II (MHCII-Komplex, beim Menschen als HLA bezeichnet) intrazellulär gebunden und anschließend an der Zelloberfläche präsentiert. T-Zellen binden an APCs und der T-Zell Rezeptor (TCR) wird auf Bindung an das präsentierte Peptid überprüft. Bindet er nicht, löst sich die APC/T-Zell-

Interaktion wieder ohne ein Signal zu generieren. Bindet der TCR jedoch, erfolgt in der T-Zelle die Phosphorylierung von intrazellulären Ketten des T-Zell Rezeptors CD3; vor allem von CD3zeta (CD247). Durch Bindung und Phosphorylierung weiterer zytoplasmatischer Kinasen, wie Lck oder ZAP-70, wird das Signal der Antigenerkennung in der Zelle weitergeleitet. Professionelle APCs exprimieren ko-stimulatorische Moleküle, wie z.B. CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2), die vom CD28 Molekül auf T-Zellen erkannt werden (Abbildung 1.10). Nur bei Vorliegen der ko-stimulatorischen Signale kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung der T-Zellen zu bewaffneten T-Effektorzellen (Signale 1 und 2, Abbildung 1.10). Ohne diese ko-stimulatorischen Signale (nur Signal 1) kommt es zur Anergie der T-Zellen, d.h. sie werden inaktiviert bzw. in Apoptose (programmierter Zelltod) getrieben. Dieser Mechanismus kommt auch am Ende einer Infektion zum Tragen, wenn der Infektionserreger vom Immunsystem zerstört wurde und die Zahl spezifischer T-Zellen wieder absinken kann. Hier wird von den T-Zellen dann vermehrt das inhibitorische Molekül CTLA4 produziert, welches mit CD28 um die Bindung an CD80/CD86 konkurriert und dadurch die T-Zellen inaktiviert. Die Affinität von CTLA4 für CD80/CD86 ist etwa 500x höher als die von CD28 für CD80/CD86 (Greene et al., 1996).

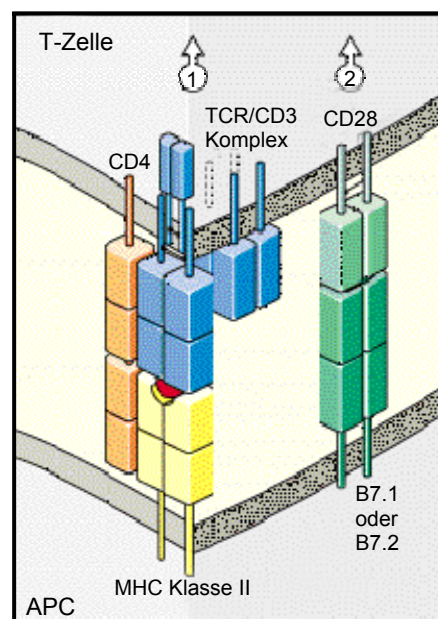


Abbildung 1.10: T-Zell Rezeptor/ MHC Interaktion und Ko-Stimulation. Durch Bindung des Peptid-beladenen MHC-Moleküls an den T-Zell Rezeptor (TCR) erhält die T-Zelle das stimulatorische Signal 1. Erfolgt anschließend eine Interaktion eines der ko-stimulatorischen B7-Moleküle mit CD28 erhält die T-Zelle außerdem ein zweites Signal: sie wird aktiviert und proliferiert. Bleibt das zweite Signal aus, kann sie nicht aktiviert werden. (modifiziert nach: Janeway, Charles A et al., 2001)

1989 zeigten Gross et al., dass es möglich ist, ein Fusionskonstrukt aus dem T-Zell-Rezeptor und den variablen Regionen eines Antikörpers, dem so genannten variablen Fragment (Fv), zu generieren (Gross et al., 1989). Sie konnten zeigen, dass damit ausgestattete T-Zellen an die vom Antikörper erkannte Struktur bindet und zusätzlich die gleichen Signale in der T-Zelle auslöst, wie die vom endogenen T-Zell-Rezeptor; deshalb wurde das Konstrukt als chimärer T-Zell Rezeptor bezeichnet. Diese Technik wurde immer weiter verbessert, so dass die variablen Regionen der leichten und schweren Kette in einem Polypeptid konstruiert werden konnten (*single-chain Fv*, scFv) (Bird et al., 1988) und dass die CD3zeta Kette des T-Zell Rezeptors ausreichend für eine „TCR-gleiche“ Signalweiterleitung in der Zelle ist (Irving und Weiss, 1991). Mittlerweile werden chimäre T-Zell-Rezeptoren in experimentellen Studien vor allem bei Krebs- und HIV-Patienten getestet (Willemsen et al., 2003; Alvarez-Vallina, 2001). Im Jahr 2000 berichteten Mitsuyasu et al., dass sie erfolgreich autologe T-Zellen von HIV-Patienten mit einem Fusionskonstrukt aus der extrazellulären- und Transmembrandomäne von CD4 und dem zytoplasmatischen Teil von CD3zeta transduzieren und in die Patienten zurück infundieren konnten. Auch ein Jahr nach dem Zelltransfer konnten noch CD4/CD3zeta-exprimierende Zellen in Patienten nachgewiesen werden, allerdings konnte keine Änderung der Plasma-RNA- oder Provirus-DNA-Mengen gezeigt werden (Mitsuyasu et al., 2000). 2002 veröffentlichten Maher und Kollegen die Konstruktion eines chimären T-Zell Rezeptors, der zusätzlich zu einem scFv und CD3zeta die Transmembranregion von CD28 enthielt (Maher et al., 2002). Dieses Konstrukt liefert nach Bindung des scFv an seine Zielstruktur beide zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen nötigen Signale: CD3zeta imitiert Signal 1 des T-Zell Rezeptors und der Transmembranbereich von CD28 liefert das ko-stimulatorische Signal 2 (vgl. Abbildung 1.10).

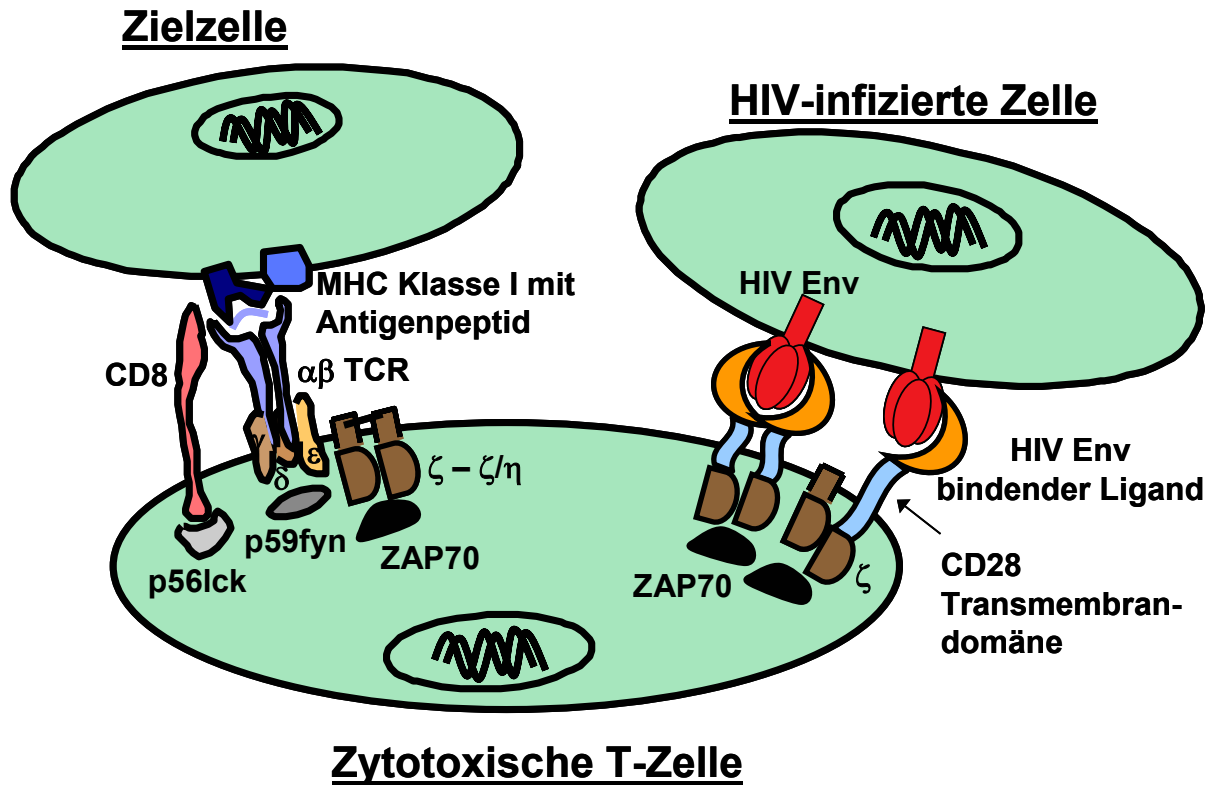


Abbildung 1.11: Vergleichende Darstellung der beteiligten Moleküle in der natürlichen, MHC-vermittelten, T-Zell Aktivierung (links) und der Aktivierung durch chimäre T-Zell Rezeptoren (rechts).

Die in dieser Arbeit verwendeten chimären T-Zell Rezeptoren bestehen neben den oben beschriebenen CD3zeta und der CD28-Transmembranregion aus einem Liganden, der das native Protein auf der Oberfläche von Zielzellen erkennt; im Falle dieser Arbeit handelt es sich bei dem Zielprotein um das HIV Hüllprotein. Der chimäre T-Zell Rezeptor wird als ein durchgängiges Protein translatiert, das aus den oben genannten Komponenten besteht und nach Bindung des HIV Hüllproteins sowohl das aktivierende, von CD3zeta erzeugte, wie auch das CD28-induzierte ko-stimulatorische Signal in die T-Zelle weiterleitet (Abbildung 1.11). Als Ergebnis dieser Signalkaskaden proliferiert die T-Zelle unter Sekretion von Perforinen und Granzymen sowie Interferon gamma (IFN- γ) und Interleukin-2 (Il-2).

1.5.2 HIV bindende Liganden für chimäre T-Zell Rezeptoren

Abbildung 1.12 zeigt die an der Bindung und Infektion beteiligten Proteinstrukturen von HI-Virus und Zielzelle. Die Möglichkeit der Erkennung virusinfizierter Zellen besteht in der Bindung an die beiden Untereinheiten des viralen Hüllproteins: gp120 und gp41. Zur spezifischen Bindung einer der beiden Untereinheiten wurden die unten beschriebenen Liganden verwendet. Obwohl sie sich strukturell sehr unterscheiden, eint sie der Mechanismus der Bindung an HIV Env: sie binden das Hüllprotein sequenzunabhängig und somit verschiedene Subtypen. Zwar bindet 5-Helix die HR2 Region von gp41, wodurch grundsätzlich die Entwicklung von Mutationen, die nicht länger gebunden werden können, möglich ist. Jedoch zeigte sich bei der Sequenzierung verschiedener Isolate der Hauptgruppe M, dass die 5-Helix-Bindestellen in HR2 hoch konserviert sind und nur geringe, meist konservative, Mutationen (z.B. Valin → Isoleucin oder Glutamat → Aspartat) gefunden werden konnten, die die Gesamtstruktur der Bindungsregion vermutlich nicht beeinträchtigen (Hanna et al., 2002). Dies ist ein großer Unterschied zu den oben beschriebenen scFv Antikörpern, die in der Regel an eine kurze, spezifische Aminosäuresequenz binden und auf Grund der hohen Variabilität von HIV schnell ihre Bindungsspezifität zur Zielstruktur verlieren.

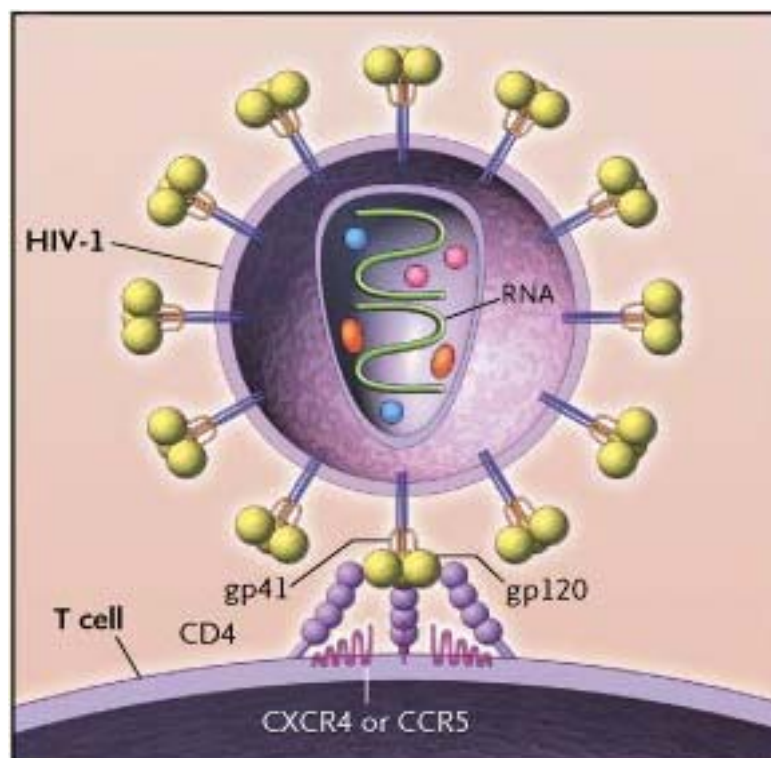


Abbildung 1.12: Die an der Bindung und Infektion beteiligten Proteinstrukturen von HI-Virus und T-Zelle: die beiden Untereinheiten des viralen Hüllproteins gp41 und gp120 auf der Virushülle bzw. CD4 und CXCR4 oder CCR5 auf der T-Zelle. Modifiziert nach Kilby und Eron, 2003.

1.5.2.1 CD4

CD4 ist ein Oberflächenprotein von T-Lymphozyten, welches vor allem bei der Interaktion des T-Zell-Rezeptors mit MHC Klasse II Molekülen beteiligt ist. Es ist ein Typ I Transmembranprotein der Immunglobulin-Superfamilie mit einer Größe von 458 aa und einer Masse von etwa 51 kDa. Der zytoplasmatische Teil ist mit der Kinase p56-LCK assoziiert, die ein wichtiges Molekül im Signaltransduktionsweg des T-Zell-Rezeptors ist. Außerdem ist CD4 der Hauptrezeptor für die Infektion humaner Zellen durch die meisten HIV Subtypen (s.a. Abbildung 1.12), daher ist die Verwendung der extrazellulären Domäne von CD4 in chimären T-Zell-Rezeptoren eine nahe liegende Möglichkeit.

1.5.2.2 DC-SIGN

DC-SIGN wird auf der Oberfläche von Dendritischen Zellen exprimiert und ist an der Aufnahme und Prozessierung von Pathogenen beteiligt, deren Antigene später von der Zelle in Lymphknoten dem Immunsystem präsentiert werden. Seine systematische Bezeichnung ist CD209.

Strukturell ist DC-SIGN ein glykosyliertes Typ II Transmembranprotein, d.h. der N-Terminus befindet sich im Zytoplasma (Abbildung 1.13), mit einer Größe von 404 aa und einer Masse von etwa 46 kDa. Auf den kurzen zytoplasmatischen N-Terminus (37 aa) folgt eine 20 aa lange Transmembranregion (TM). Unmittelbar hinter der Transmembranregion befindet sich eine Sequenz aus sieben vollständigen und einer unvollständigen Wiederholung (R1 – R7 ½) eines 23 Aminosäuremotivs, die die Bildung von Homotetrameren ermöglicht. Der C-Terminus endet mit einer Lektindomäne, die Kalzium-abhängig eine Vielzahl N-verbundener Mannoseoligosacchariden binden kann.

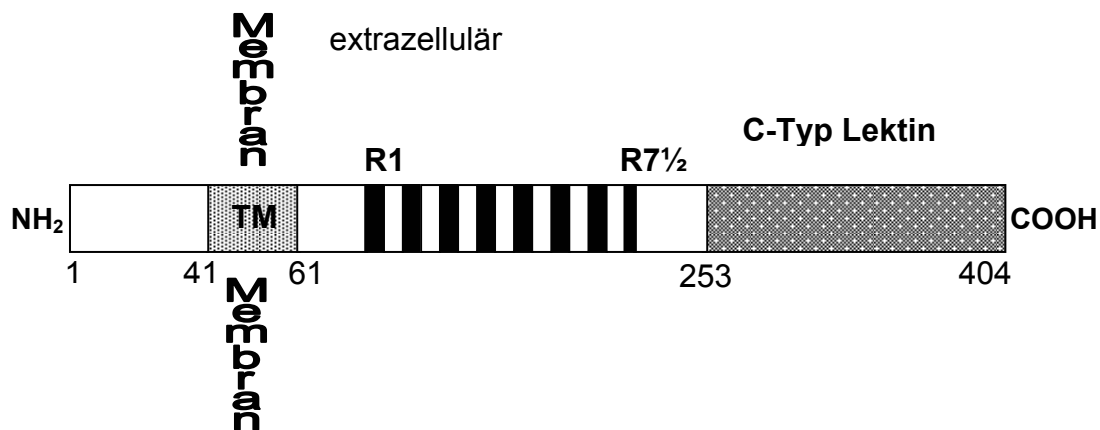


Abbildung 1.13: Schematische Struktur von DC-SIGN

Bereits 1992 publizierten Curtis *et al.* eine CD4 unabhängige Bindung von HIV Env an ein unbekanntes membranassoziiertes C-Typ Lektin, welches aus einer Plazenta cDNA-Bibliothek gewonnen wurde (Curtis *et al.*, 1992).

Körpereigene Liganden von DC-SIGN sind vor allem die interzellulären Adhäsionsmoleküle 2 und 3 (ICAM, engl. *intercellular adhesion molecule*), die für die transendotheliale Migration (ICAM 2) und Stabilisierung der Bindung an T-Zellen (ICAM 3) benötigt werden (Geijtenbeek *et al.*, 2000a; Geijtenbeek *et al.*, 2000c). Aus der Interaktion mit ICAM3 leitet sich auch die Abkürzung DC-SIGN ab: sie steht für „*Dendritic Cell-specific ICAM 3-grabbing non-integrin*“. DC-SIGN bindet auch glykosylierte Oberflächenmoleküle einiger Pathogene. So wurde neben der Bindung an HIV gp120 die Bindung an Ebola Virus Glykoprotein, Leishmania Amastigoten, Hepatitis C Virus Proteine E1/E2, Dengue Virus Glycoprotein E, verschiedene Lewis-x Antigene und Mannosemotive im LPS von verschiedenen Bakterien beschrieben (Alvarez *et al.*, 2002; Colmenares *et al.*, 2002; Pohlmann *et al.*, 2003; Tassaneeritthep *et al.*, 2003; Appelmelk *et al.*, 2003).

1.5.2.3 5-Helix

Root *et al.* beschrieben die Entwicklung eines Moleküls, welches sich aus den C und N Helices der gp41 Untereinheit des HIV Hüllproteins ableitet und das die Fusion des Virus mit der Zellmembran verhindern kann (Root *et al.*, 2001). Abbildung 1.14 zeigt eine schematische Darstellung dieses 5-Helix genannten Moleküls. Die Benennung in 5-Helix

erfolgte, da es aus 5 der 6 Helices von gp41 besteht. Die einzelnen Helices sind durch kurze Glyzin/Serin-Sequenzen miteinander verbunden (rote Bögen). Durch die fehlende sechste Helix hat dieses Molekül eine hohe Affinität für einzelne C-Peptide bzw. -Helices.

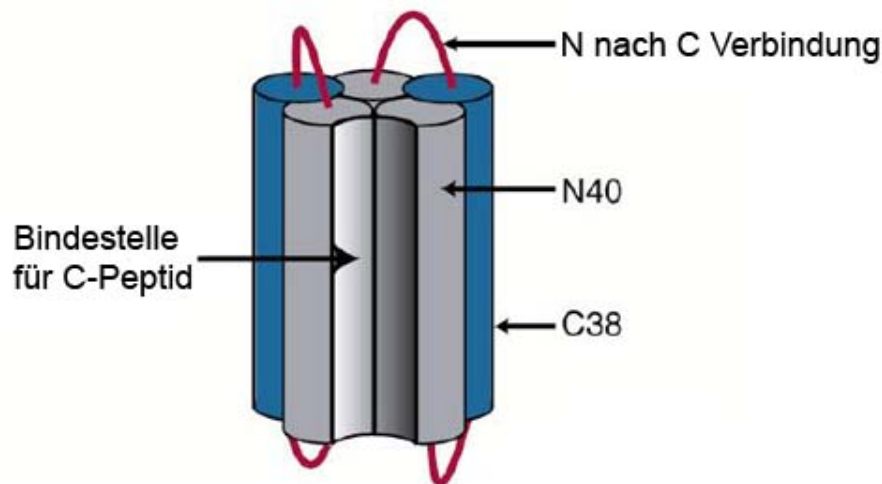


Abbildung 1.14: Schematische Struktur von 5-Helix. 5-Helix bildet das von den 6 Helices gebildete Bündel synthetisch nach, jedoch fehlt eine C-Helix. Hierdurch hat das 5-Helix Bündel zum einen eine hohe Stabilität und vor allem eine hohe Affinität für einzelne C-Helices. Durch die Bindung an einzelne Helices kann eine Membranfusion verhindert werden. Modifiziert aus Root et al., 2001.

Die Gruppe konnte zeigen, dass die Zugabe von löslichem 5-Helix allein die Infizierbarkeit von Zellkulturzellen durch verschiedene Stämme von HIV deutlich reduzieren kann (Root et al., 2001). In Kombination mit einem bakteriellen Toxin wurden infizierte, virusproduzierende Zellen selektiv abgetötet (Root und Hamer, 2003). Auf Grund der nur transienten Freilegung der gp41 Helices könnte man annehmen, dass eine Verwendung dieser Helices als Zielstruktur nicht erfolgreich sein wird. Jedoch ist besonders beachtlich, dass Root und Hamer zeigen konnten, dass ihr 5-Helix Konstrukt auch unabhängig von einer vorherigen CD4/gp120-Interaktion an die gp41 Helices binden kann. Auch für T-20 konnte schon gezeigt werden, dass die versteckte Lage der sechs gp41 Helices die fusionsinhibitorischen Eigenschaften dieses Moleküls nicht beeinflusst (Hildinger et al., 2001). Daher scheint auch 5-Helix als Ligand für chimäre T-Zell-Rezeptoren gut geeignet.

1.6 Das kutane T-Zell Lymphom

Die Bezeichnung „kutanes T-Zell Lymphom“ (engl. *cutaneous T-cell lymphoma*: CTCL) beschreibt eine heterogene Gruppe von Erkrankungen. Maligne klonale CD4-positive T-Zellen sammeln sich unter der Haut und werden üblicherweise als non-Hodgkin Lymphome bezeichnet. Die beiden häufigsten CTCL-Formen sind Mycosis fungoides (MF) und Sézary Syndrom (SS), die zusammen etwa 65% der kutanen Lymphome ausmachen. Die Häufigkeit des CTCL liegt bei etwa 1 Fall pro 100.000 Einwohner/Jahr – wobei es bei Frauen etwa doppelt so häufig auftritt wie bei Männern und Schwarze eine etwa doppelt so hohe Inzidenz wie Weiße haben – und manifestiert sich in der Regel nicht vor dem 50. Lebensjahr. Die Ursache für das Auftreten eines kutanen T-Zell Lymphoms ist unbekannt. Frühere Annahmen über den Einfluss von Umwelteinflüssen, wie z.B. chronische Antigen-Stimulation durch Industriechemikalien, Herbizide, Schwermetalle oder Radioaktivität, konnten in neueren Studien nicht bestätigt werden. Ebenso wenig konnten Infektionen z.B. mit dem humanen T-Zell Leukämie Virus Typ-1 (HTLV-1) als ursächlich für die Erkrankung ausgemacht werden. Es gibt jedoch gewisse Hinweise, dass Immunsuppression ein Risikofaktor für das CTCL ist, da einige Patienten vorher Organ-transplantiert wurden, sich einer Lymphomtherapie unterzogen haben oder HIV infiziert waren (Whittemore et al., 1989; Tuyp et al., 1987; Pascual et al., 1992; Kaufman et al., 1987; Myskowski, 1991).

Auf Grund der Ähnlichkeit zu anderen Hauterkrankungen wie chronischem Ekzem, allergischer Kontaktdermatitis oder Schuppenflechte (Psoriasis), ist es schwierig das kutane T-Zell Lymphom zu diagnostizieren. Typischerweise verläuft die Erkrankung sehr langsam und über mehrere Stadien. Zunächst zeigen sich so genannte „*Plaques*“ und „*Patches*“, d.h. mehr oder weniger erhabene gerötete Flecken. Weitere Stadien können das Auftreten von Erythroderma – die geröteten Stellen erreichen Konfluenz und bedecken mehr als 80% der Körperoberfläche – oder dem Auftreten von Tumoren sein. Befinden sich deutliche Mengen der malignen Zellen im Blut spricht man von Sézary Syndrom, ansonsten von Mycosis Fungoides.

Benannt ist die Mycosis fungoides nach der pilzartigen Form der Tumoren im Tumorstadium der Erkrankung. Das Sézary Syndrom wurde nach dem französischen Dermatologen Albert Sézary (1880-1956) benannt, der als erster die klinischen Merkmale dieser Erkrankung beschrieb.

Da die Diagnose, besonders in den Anfangsstadien, sehr schwierig ist, kann nur über Biopsien und molekularbiologische Untersuchungen der Befund Mycosis Fungoides/Sézary Syndrom bestätigt werden. Ein erhöhtes CD4/CD8-Verhältnis (<4:1),

ein klonales T-Zell Rezeptor Repertoire oder der Verlust von CD7 und CD26 auf den CD4-positiven Zellen sind deutliche Indizien für das kutane T-Zell Lymphom (Kim et al., 2005).

Die Lebenserwartung von Patienten mit kutanem T-Zell Lymphom ist sehr stark vom jeweiligen Stadium abhängig. Im frühesten Stadium beträgt die mittlere Überlebenszeit mehr als 20 Jahre und die wenigsten Patienten sterben an der Erkrankung. In den späten Stadien der Erkrankung beträgt die mittlere Überlebensdauer etwa 5 Jahre und mehr als 50% der Patienten sterben an den Folgen des CTCL. Patienten, bei denen das Sézary Syndrom diagnostiziert wurde, habe eine mittlere Überlebenszeit von nur etwa 3 Jahren (<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/mycosisfungoides/healthprofessional>, National Cancer Institute, USA).

Abbildung 1.15 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen Stadien des kutanen T-Zell Lymphoms in Haut und Blut. In A ist gesunde Haut dargestellt: hier befinden sich nur einzelne Langerhans'sche Zellen in der Epidermis und wenige T-Zellen in der Dermis. Im „*Plaques*“ und „*Patches*“-Stadium (B) haben sich viele maligne Zellen in Dermis und vor allem Epidermis angesammelt, die viele weitere Zellen des Immunsystems anlocken, wie z.B. CD8-positiv T-Zellen, dem zellulären Teil des Immunsystems. Durch die Sekretion von T_H-2 Zytokinen, wie Interleukin-4, -5 und -10, durch die Tumorzellen wird die anti-tumorale Aktivität der CD8-positiven T-Zellen stark eingeschränkt. Im Tumor-Stadium (C) sind fast keine CD8-positiven Zellen mehr im Tumorgewebe zu finden und das Immunsystem der Patienten ist durch die starke T_H-2 Zytokinsekretion der malignen Zellen eingeschränkt. Die Lymphomzellen sind verstärkt in der Dermis zu finden, einzelne Tumorzellen befinden sich im Blutstrom. In den späten Stadien der Erkrankung (D), wie dem Sézary Syndrom, sind sehr viele maligne Zellen im Blut zu finden und die Patienten leiden an einer, durch übermäßige T_H-2 Zytokinproduktion verursachten, T_H-1 Immundefizienz (Kim et al., 2005).

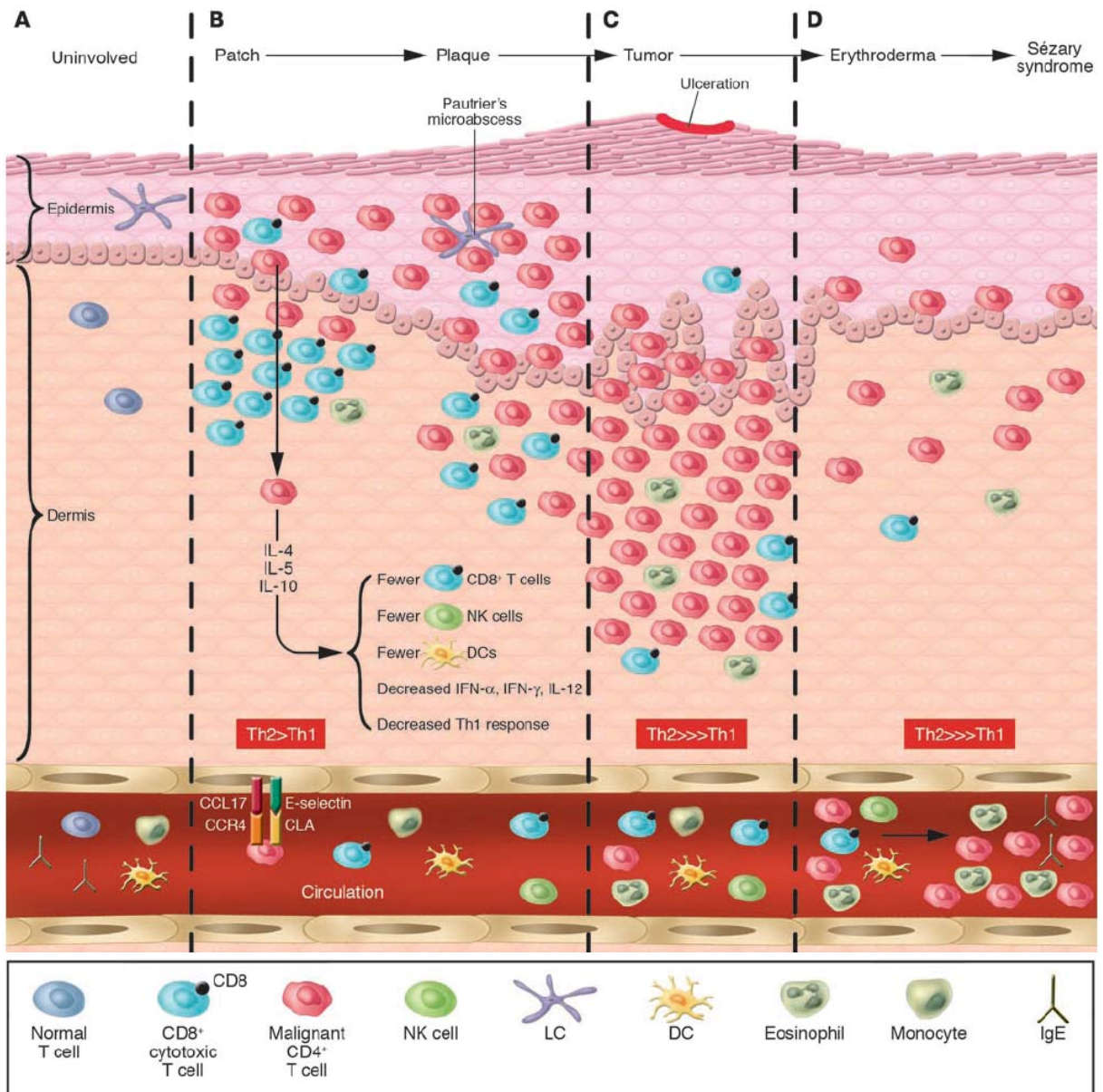


Abbildung 1.15: Die Verteilung von Zellen und Chemokinen während den verschiedenen Stadien von Mycosis Fungoides. (Aus: Kim et al., 2005)

Die Behandlung von CTCL ist stadienabhängig und zunächst vorwiegend auf der Haut. Sie beinhaltet PUVA (die Gabe von Psoralen in Kombination mit UV-A Bestrahlung) oder eine topische Chemotherapie z.B. mit Mechlorethamin (Stickstofflost, chemisch verwandt mit Senfgas). Systemische Therapien beinhalten die Gabe von Retinoiden oder Interferonen. In fortgeschrittenen Stadien oder bei Resistenzen gegen topische Therapien werden häufig mehrere Wirkstoffe in Kombination verwendet. Einige neue experimentelle Therapieansätze verwenden Retinoid X Rezeptor (RXR) Retinoide, die an RXR-Elemente im Genom binden und die Genexpression modulieren oder ein Fusionsprotein aus

Interleukin-2 und einem bakteriellen Toxin. CTCL-Zellen exprimieren den Interleukin-2 Rezeptor meist konstitutiv und binden das Fusionsprotein, woraufhin die Toxindomäne für eine selektive Abtötung der Tumorzellen sorgt (Foss und Whittaker, 2006). Bei vielen Krebserkrankungen wird auch durch Impfungen versucht, das Immunsystem auf bestimmte Tumorantigene „aufmerksam“ zu machen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung eines Fusionskonstruktes aus einem Tumorantigen und einem hoch immunogenen mikrobiellen Antigen (Stevenson et al., 2004). Durch diese Verbindung soll das Immunsystem dazu angeregt werden, auch das Tumorantigen als „fremd“ zu erkennen.

1.6.1 Genterapie zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms

Für die genterapeutische Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms ist die Verwendung verschiedener Effektorgene denkbar. So ist in der klassischen Tumorbehandlung die Chemotherapie ein häufig eingesetztes Mittel. Die hier verwendeten Pharmaka töten Zellen ab, die stark proliferieren. Neben Tumorzellen sind dies unter anderem jedoch auch blutbildende Zellen und Zellen des Darmepithels. Für einen genterapeutischen Ansatz eignen sich z.B. zytotoxische Genprodukte oder Enzyme, die ein Pharmazeutikum in eine toxische Substanz umwandeln. Alternative Therapieansätze bestehen in der Blockierung der Angiogenese und führen zu einem „Aushungern“ des Tumors oder im Einbringen von Tumorsuppressorgenen, die in gesunden Zellen für einen präzise regulierten Zellzyklus notwendig sind: sie sorgen dafür, dass die Zelle sich nur dann teilt, wenn es für den Organismus notwendig ist. Oft genügt eine funktionsfähige Kopie eines Tumorsuppressorgens, um einen normalen Zellzyklus wieder zu ermöglichen.

Zur Untersuchung der Anwendbarkeit der genterapeutischen Behandlung für das kutane T-Zell Lymphom etablierten wir ein Maus-Modell (Thaler et al., 2004). Als Therapie erhielten die Mäuse intra-tumoral MLV/HIV Pseudotypvektoren, die für ein Fusionsprotein aus dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) und der Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) codieren. HSV-TK ist in der Lage die Substanz Ganciclovir zu Ganciclovirmonophosphat phosphorylieren. Durch zelluläre Kinasen wird Ganciclovirmonophosphat in das toxische Ganciclovirtriphosphat verwandelt. Ganciclovirtriphosphat fungiert als Strukturanalogon von Guanosintriphosphat und führt zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation. Nach intra peritonealer (*i.p.*) Gabe von Ganciclovir konnte eine Verzögerung des Tumorwachstums, nicht jedoch ein völliger Wachstumsstopp oder gar eine Tumorregression beobachtet werden (Thaler et al., 2003).

Toxisches Ganciclovirmonophosphat kann in soliden Tumoren über so genannte „gap-junctions“ an Nachbarzellen weitergegeben werden. Die Zellen des kutanen T-Zell Lymphoms sind jedoch nicht durch „gap-junctions“ verbunden, daher wurden vermutlich nur die Tumorzellen durch Ganciclovir-Gabe getötet, die vorher von den Pseudotypvektoren transduziert wurden. Zur effektiven Behandlung von CTCL Tumoren ist also ein so genannter „Bystander“-Effekt notwendig, bei dem auch nicht-transduzierte Nachbar(tumor)zellen effizient getötet werden.

Das in dieser Arbeit verwendete therapeutische Gen codiert für das Hüllprotein Env von HIV. HIV Env ermöglicht die Verschmelzung der viralen Membran mit der Membran der Zielzelle mit Hilfe von CD4 und einem der Ko-Rezeptoren CXCR4 oder CCR5.

Nach Transduktion der CTCL-Zellen wird das HIV Hüllprotein von den Zellen produziert und in die Membran integriert. Die Tumorzellen haben einen T-Helfer Phänotyp, d.h. sie exprimieren CD4 und CXCR4 auf ihrer Oberfläche. Die Expression des HIV Hüllproteins auf der Oberfläche transduzierter Zellen erlaubt so die Fusion mit untransduzierten Nachbarzellen zu nicht lebensfähigen Riesenzellen, so genannten Synzytien. Auf diese Weise könnte ein *bystander*-Effekt erreicht werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Anwendung des HIV Hüllproteins Env einerseits als Zielstruktur für genetisch modifizierte T-Zellen im Rahmen einer möglichen Behandlung von HIV-Patienten und andererseits als therapeutisches Gen zur Behandlung von Patienten mit kutanem T-Zell Lymphom.

Für die Verwendung von HIV Env als Zielstruktur sollten chimäre T-Zell Rezeptoren konstruiert werden, die die zytoplasmatische Sequenz von CD3zeta, den Transmembranbereich von CD28 und einen HIV Env-bindenden Liganden (CD4, DC-SIGN in zwei verschiedenen Variationen und 5-Helix) enthalten. Zunächst sollte die HIV Env Bindung der Liganden überprüft und anschließend die Funktion der chimären T-Zell-Rezeptoren in humanen T-Zellen untersucht werden.

Zur Verwendung von HIV Env als therapeutischem Gen für die Therapie von kutanen T-Zelllymphomen sollte zunächst eine stabile Verpackungszelllinie (Fly syn Env) generiert werden, die HIV Env pseudotypisierte, MLV-basierende Vektoren mit HIV Env als therapeutischem Gen produziert. Die therapeutische Wirkung der durch Vektortransduktion entstehenden Synzytien und der damit verbundenen Reduzierung der Tumorzellen sollte zunächst *in vitro* und anschließend *in vivo* im Maus-Tumormodell gezeigt werden.

2. Materialien

2.1 Reagenzien und Verbrauchsmittel

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

Einwegplastikwaren wurden von den Firmen Costar (Bodenheim), BD Falcon™ (Becton Dickinson, Heidelberg), sowie Greiner (Frickenhausen) oder Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Enzyme für die Molekularbiologie, einschließlich der zugehörigen Puffer, stammten von New England Biolabs (NEB) (Frankfurt/Main) oder MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Molekulargewichtsmarker für Proteine und DNA-Fragmente wurden von Invitrogen (Karlsruhe), Stratagene (La Jolla, USA) und NEB geliefert. Proteinmengenbestimmung wurde mit dem Protein Assay Kit von BioRad (München) durchgeführt.

Bestandteile von Nährmedien zur Anzucht von Bakterien kamen von Difco (Augsburg). Medien, fötales Kälberserum (FCS), Antibiotika und Zusätze zur Kultur von Säugerzellen wurden von Cambrex/BioWhittaker (Verviers, Belgien) bezogen.

DNA-Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg/Martinsried) synthetisiert.

DNA-Sequenzierungen erfolgten im Georg-Speyer-Haus.

2.2 Antikörper

Die folgende Übersicht zeigt die monoklonalen Antikörper, die bei Immunoblot-Experimenten (WB) und Durchflusszytometrie Analysen (F) verwendet wurden:

Maus anti-human c-myc (9E10)	1:250 (WB+F)	Pharmingen (Hamburg)
Maus anti-human ICAM-3 (CD50)	1:200 (F)	DAKO (Hamburg)
Maus anti-human DC-SIGN (CD209)	1:200 (F)	R&D Systems (Wiesbaden)
Ratte anti-MLV p30 gag	1:3.000 (WB)	CRL-1912 (ATCC)
Maus anti-human CD3	1:100 (F)	Pharmingen (Hamburg)
Ziege anti-HIV gp120 (polyklonal)	1:1.000 (WB)	Biodesign (Saco, USA)
Maus anti-human CD4	1:100 (F)	Pharmingen (Hamburg)
Maus anti-human CXCR4	1:100 (F)	Pharmingen (Hamburg)
human anti-HIV Env V3 loop (447-52D)	1:100 (F)	Zolla-Patzner, NIH AIDS Reagents Program (#4030)
Maus anti-human CD8 FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)	1:200 (F)	Pharmingen (Hamburg)
Kaninchen anti-Ziege HRP (Meerrettichperoxidase)	1:10.000 (WB)	Jackson (Soham, GB)
Ziege anti-Maus FITC	1:100 (F)	Jackson (Soham, GB)
Ratte anti-Maus magnetische Beads	1:5	Miltenyi (Bergisch Gladbach)
Schaf anti-Maus HRP	1:10.000 (WB)	Amersham (Freiburg)
Protein A HRP	1:10.000 (WB)	Amersham (Freiburg)
Ziege anti-human R-PE (R-Phycoerythrin)	1:100 (F)	Jackson (Soham, GB)
Ziege anti-Maus R-PE	1:20 (F)	DAKO (Hamburg)
Maus anti-human CD8 FITC	1:100 (F)	Pharmingen (Hamburg)
Maus anti-human CD4 R-PE	1:100 (F)	Pharmingen (Hamburg)

2.3 DNA und Plasmide

Name	Insert/Verwendungszweck	Referenz
DC-SIGN+Repeats PCR-Fragment	gesamter extrazellulärer Bereich von DC-SIGN mit <i>HindIII</i> und <i>XhoI</i> Schnittstellen	Haynes, C. unveröffentlicht
DC-SIGN Lektin PCR-Fragment	nur Lektindomäne von DC-SIGN mit <i>BamHI</i> und <i>XhoI</i> Schnittstellen	Haynes, C. unveröffentlicht
pSecTag 2	Expressionsplasmid für Säugerzellen N-terminales Ig κ Exportsignal; C-terminale c- myc- und Hexahisdinepitope	Invitrogen (Karlsruhe)
pSecTag 2 DC-SIGN+Repeats	Extrazellulärer Bereich von DC-SIGN in Expressionsplasmid	diese Arbeit
pSecTag DC-SIGN Lektin	Lektindomäne von DC-SIGN in Expressionsplasmid	diese Arbeit
pBabe DC-SIGN Lektin/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pBabe DC-SIGN +Repeats/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pBluescript CD4/zeta	Zwischenkonstrukt	diese Arbeit
pcDNA DC-SIGN	Expressionsplasmid für DC-SIGN (komplett)	Pohlmann et al., 2001
pcDNA DC-SIGN V351G	Expressionsplasmid für DC-SIGN Mutante V351G (komplett)	diese Arbeit
pBabe CD4/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pBabe CD4/zeta + CD8 hinge	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pcDNA 5-Helix	Expressionsplasmid für 5-Helix	Root und Hamer, 2003
pBabe 5-Helix/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pBabe 5-Helix/zeta + CD8 hinge	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit

pMP71 CD4/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pMP71 CD4/zeta + CD8 hinge	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pMP71 5-Helix/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pMP71 5-Helix/zeta + CD8 hinge	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pSecTag 5-Helix/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in eukaryotischem Expressionsplasmid	diese Arbeit
pSecTag 5-Helix/zeta + CD8 hinge	chimärer T-Zell-Rezeptor in eukaryotischem Expressionsplasmid	diese Arbeit
pSecTag DC-SIGN Lektin/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in eukaryotischem Expressionsplasmid	diese Arbeit
pSecTag DC-SIGN +Repeats/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in eukaryotischem Expressionsplasmid	diese Arbeit
pMP71 DC-SIGN Lektin/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pMP71 DC-SIGN +Repeats/zeta	chimärer T-Zell-Rezeptor in verpackbarem retroviralem Vektorplasmid	diese Arbeit
pBluescript KS+	Plasmid für Klonierungen	Stratagene, La Jolla USA
pBluescript CD28TM	Zwischenkonstrukt	diese Arbeit
pBluescript CD28/CD3zeta	Zwischenkonstrukt	diese Arbeit
pSFG eGFP	grün fluoreszierendes Protein in retroviralem, verpackbaren Vektor	Lindemann et al., 1997
pGalV	Expressionsplasmid für das GalV-Hüllprotein	Stitz et al., 2000
pHIT60	Expressionsplasmid für MLV gag und pol	Soneoka et al., 1995
pMP71	retrovirales Vektorgenom, optimiert für die Expression in T-Zellen	Engels et al., 2003
pMP71 eGFP	retrovirales Vektorgenom, optimiert für die Expression in T-Zellen; enthält zusätzlich eGFP hinter IRES-Region	Hildinger et al., 1999

pGEM FRP5 hCD8 hCD3zeta	CD8 und CD3zeta	Moritz und Groner, 1995
pBluescript CD28	CD28 aus Jurkat Zellen	B. Gerstmayer
pKex-CD4	CD4	Sparacio et al., 2000
pczCFG5 IEGZ syn 89.6P	HIV Env 89.6P	U. Nack, Doktorarbeit Uni Frankfurt 2003
pBabe Puro	retrovirales Vektorgenom	Morgenstern und Land, 1990
pM57DAW	Codon-optimiertes Expressionsplasmid für MLV gag und pol	J. Bohne, Hannover

2.4 Allgemeine Puffer und Nährmedien

FCS	fötales Kälberserum (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert)	Gibco/BRL, Eggenstein
humanes Serum	30 min bei 56°C hitzeinaktiviert	BioWhittacker, Belgien
DMEM +	10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin	BioWhittacker, Belgien
RPMI 1640 +	10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin	BioWhittacker, Belgien
X-Vivo 10 +	5% humanes Serum, 100U/ml rekombinantes humanes IL-2	BioWhittacker, Belgien
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	BioWhittacker, Belgien
PBS-Tween	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 +0,1% (w/v) Tween 20	BioWhittacker, Belgien
LB-Medium	1% (w/v) NaCl, 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt pH 7,0	Ausubel, F. M. et al., 1988
SDS-PAGE Probenpuffer	50% Glycerin; 10% SDS; 0,005% Bromphenolblau; 312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 5% β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)
10x DNA- Auftragspuffer	5 ml Glycerin; 0,2 ml 1 M Tris-HCl, pH 8,0; 0,1 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; 25 mg Bromphenolblau; 4,7 ml H ₂ O	Roth (Karlsruhe)

3. Methoden

3.1 Zellkultur und Zelllinien

Zellkultur

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank (Heraeus Kendro, Langenselbold) bei 37°C und 5% - 10% CO₂ kultiviert. Etwa zweimal wöchentlich erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich mit Trypsin/EDTA (BioWhittaker, Vervies, Belgien) abgelöst (nur adhärente Zellen) und verdünnt frisch ausgesät. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus 90% FCS und 10% DMSO (Sigma, Deisenhofen). Für alle Linien wurde dem Zellkulturmedium bis zu 10% hitzeinkativiertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. FCS wurde zur Inaktivierung von Komplement vor Gebrauch 30 min bei 56°C erhitzt.

Zelllinien

Name	Medium	Typ	Referenz/ATCC-Nr.
293T	DMEM +	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 und SV40-T-Antigen	CRL- 1573
NK-92	X-Vivo +	humane natürliche Killerzelllinie	CRL-2407
NIH 3T3 CD4/CXCR4	DMEM +	Embryonale Mausfibroblasten, stabil mit humanem CD4 und CXCR4 transfiziert	Deng et al., 1997
MyLa	RPMI +	humanes kutanes T-ZellSyndrom	Dobbeling et al., 1998
HUT78	RPMI +	humanes kutanes T-Zell-Lymphom	TIB-161
FLY HIV-87	DMEM +	MLV/HIV Verpackungszelllinie ohne virales Genom	Thaler und Schnierle, 2001
FLY HIV-87-GFP	DMEM + Puromycin	MLV/HIV Verpackungszelllinie mit viralem Genom, das für GFP codiert	Thaler und Schnierle, 2001

FLY GFP-TK	DMEM + Puromycin	MLV/HIV Verpackungszelllinie mit viralem Genom, das für ein Fusionskonstrukt aus GFP und Herpes Thymidinkinase codiert	Thaler und Schnierle, 2001
PG-13	DMEM +	MLV/GaLV Verpackungszelllinie ohne virales Genom	Miller et al., 1991
BJAB-Env <i>i</i>	RPMI + G418	Prä-B-Zelllinie; exprimiert Dexamethason-induzierbar HIV Env IIB	Kruger et al., 1996
K562	RPMI +	human erytroleukämische Zellen	CCL-243
K562 DC-SIGN wt	RPMI + G418	human erytroleukämische Zellen; exprimieren stabil humanes DC-SIGN	diese Arbeit
K562 DC-SIGN V351G	RPMI + G418	human erytroleukämische Zellen; exprimieren stabil DC-SIGN V351G	diese Arbeit
BHK	DMEM +	Embryonale Hamsternierenzellen	CRL-1632
BHK DC-SIGN Klon 6	DMEM + Puromycin	Embryonale Hamsternierenzellen; exprimieren stabil humanes DC-SIGN	diese Arbeit
HOS CXCR4	DMEM +	humane Osteosarcomzellen, exprimieren HIV Korezeptor CXCR4, aber nicht CD4	N. Landau, NIH AIDS Reagent Program, (#3518)
Fly synEnv	DMEM + Zeocin	humane Fibrosarcomazellen; produzieren Vektorpartikel; Verpacken Codonoptimiertes HIV Env 89.6P	diese Arbeit
THP-1	RPMI +	humane monozytische Leukämiezelllinie; evtl. Raji : (Wu et al., 2004)	Geijtenbeek et al., 2000b
THP-1 DC-SIGN	RPMI + G418	humane monozytische Leukämiezelllinie; exprimiert stabil DC-SIGN	Geijtenbeek et al., 2000b

3.1.1 Transfektion von Säugerzellen

Je nach Zelltyp wurden 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen in Zellkulturschalen mit 6 Nöpfen (engl. *well*) bzw. $2-5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Schalen ca. 18 Stunden vor der Transfektion ausgesät.

Für beide Kalzium-Phosphat Transfektionsmethoden ist jeweils die verwendete Menge für die Transfektion in 10 cm Schalen angegeben. Für die Transfektion im 6-*Well* Maßstab wurde jeweils die Hälfte an DNA und Puffern verwendet.

3.1.1.1 Kalzium-Phosphat Transfektion

Puffer I:	Low TE Puffer:	1 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 μ M EDTA, pH 8,0; sterilfiltriert
Puffer II:	CaCl ₂ :	2 M CaCl ₂ ; sterilfiltriert
Puffer III:	2x HBS-Puffer:	280 mM NaCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 50 mM HEPES; Einstellen auf pH 7,12 und sterilfiltrieren

Unmittelbar vor der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel und die Zellen erhielten 2 ml frisches, vorgewärmtes Vollmedium.

20 μ g Plasmid-DNA, gelöst in 20 μ l H₂O, wurden in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert und 120 μ l Low TE Puffer hinzugegeben. 20 μ l 2 M CaCl₂ wurden tropfenweise hinzugegeben und die Mischung anschließend gut durchmischt (*vortex*). In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 160 μ l 2x HBS-Puffer gegeben. Hierzu wurde anschließend die DNA-Mischung pipettiert und durch mehrfaches auf- und abpipettieren gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch tropfenweise in das Kulturmedium gegeben, die Zellen über Nacht (>16 Stunden) mit dem Präzipitat bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt.

3.1.1.2 Transfektion von 293T Zellen mittels Kalzium-Phosphat und Chloroquine

Alle Lösungen wurden mit Endotoxin-freiem Wasser (z.B. W-3500 von Sigma, Deisenhofen) hergestellt.

- Chloroquine (C6628, Sigma) wurde als 25 mM Stammlösung angesetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Puffer I: 2,5 M Kalziumchlorid (C7902, Sigma) wurde bei 4°C gelagert.

Puffer II: HBS-Puffer setzt sich folgendermaßen zusammen: 281 mM NaCl (S7653, Sigma), 100 mM Hepes (H3375, Sigma) und 1,5 mM Na₂HPO₄ (S0876, Sigma). Der pH wird auf 7,12 eingestellt und anschließend mittels eines 0,22 µm Filters (Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert. HBS-Puffer wurde in Aliquots bei -20°C gelagert.

Am Tag vor der Transfektion wurden 4 - 5 x 10⁶ 293T Zellen in einer 10cm Schale ausgesät. 1 Stunde vor der Zugabe der Kalzium-Phosphat Transfektionslösung wurde das Medium durch 10 ml DMEM ohne FCS und Penicillin/Streptomycin, aber mit L-Glutamin und 25 µM Chloroquine, ersetzt.

20 µg DNA wurden in 430 µl Wasser aufgenommen und mit 50 µl der 2,5 M CaCl₂ Lösung versetzt. Es wurden 500 µl HBS-Puffer zugegeben, sofort auf einem Schüttler gemischt und unmittelbar auf die Zellen getropft.

Nach 5 - 7 Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsmedium abgenommen, vorsichtig mit PBS gewaschen und Vollmedium zugegeben.

Diese Methode wurde vor allem zur Gewinnung retroviraler Vektoren für die Transduktion von humanen PBMC verwendet.

3.1.1.3 "Activated Dendrimer" Transfektion (SuperFect™)

Zu 100 µl serumfreiem DMEM-Medium werden 2 µg Plasmid-DNA, gelöst in 2 µl H₂O, und 10 µl SuperFect™ (Qiagen, Hilden) hinzupipettiert. Die Mischung wurde für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 600 µl serumhaltigem DMEM-Medium aufgefüllt. Zu den mit PBS gewaschenen Zellen wurde nun diese Mischung (ohne weiteres

Medium) zugegeben und die Zellen für 2 bis 3 Stunden im Inkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium versorgt.

3.1.2 Gewinnung viraler Vektoren zur Transduktion von Zellen

293T Zellen wurden wie unter Abschnitt 3.1.1.2 beschrieben mit Plasmiden für die viralen Genprodukte Gag/Pol und Env, sowie einem Transfergenom transfiziert. 2 Tage nach der Transfektion wurden das Zellkulturmedium abgenommen und steril filtriert.

Parallel konnten die Zellen abgelöst und die Transfektionseffizienz mittels FACS-Analyse bestimmt werden.

3.1.3 Transduktion von Zellen mit viralen Vektoren

Steril filtrierte Zellkulturüberstände wurden sofort, oder nach Anreicherung (siehe Kapitel 3.1.4), zu den zu transduzierenden Zellen gegeben. Hierbei ist es gegebenenfalls notwendig vor der Ernte der Überstände zu prüfen, ob die zu transduzierenden Zellen im Zellkulturmedium der Vektor-produzierenden Zellen wachsen, oder das Medium angepasst werden muss. Nach 4 - 16 Stunden Transduktion wird das Medium gewechselt und 48 Stunden nach Transduktionsbeginn kann der Transduktionserfolg im Fluoreszenzmikroskop, FACS oder Western Blot überprüft werden.

3.1.4 Anreicherung von Vektorpartikeln

3.1.4.1 Virusanreicherung mit VivaSpin Säulen (Vivascience, Hannover)

Am Tag vor der Anreicherung wurde das Zellkulturmedium durch Medium ohne FCS, Phenolrot und Antibiotika ersetzt. Am Tag der Anreicherung wurde das Medium abgenommen und sterilfiltriert. Die VivaSpin Säulen wurden mit 70% Ethanol sterilisiert und anschließend 2x mit PBS gewaschen. Das sterilfiltrierte virushaltige Medium wurde in die Säulen gegeben und bei 4°C und maximal 1.000 Upm (70 ml Fassungsvermögen) bzw. 3.000 Upm (15 ml Fassungsvermögen) zentrifugiert.

Diese Technik wurde zur Anreicherung von Vektorpartikeln für Tierexperimente eingesetzt.

3.1.4.2 Virusanreicherung durch langsame Zentrifugation

Die Anreicherung von Vektorpartikeln durch langsame Sedimentation eignet sich vor allem für virale Vektoren, deren Hüllprotein nicht kovalent mit dem Transmembrananteil verbunden ist und sich deshalb leicht lösen kann (engl. *shedding*). Bei niedriger Umdrehungszahl entstehen wenig Scherkräfte, die *shedding* fördern können.

Zellkulturüberstände wurden sterilfiltriert und in konische Polypropylenröhrchen (15 ml oder 50 ml) gegeben. Die Zentrifugation erfolgte über Nacht (ca. 16 Stunden) bei 3.600 Upm in einer Heraeus Megafuge 1 S-R Kühlzentrifuge bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der Überstand dekantiert, ein geringes Volumen frisches Medium auf das Sediment gegeben und für eine Stunde bei 4°C in den Kühlschrank gestellt. Resuspendiertes Vektorsediment kann sofort verwendet oder eingefroren (s.a. Kapitel 3.1.5) werden.

3.1.5 Einfrieren und Lagerung von Vektorpartikeln

Sterilfiltrierte oder angereicherte Vektorpartikel wurden aliquotiert und in einem Dewar-Gefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C . Für Transduktionen mit gelagerten Vektorpartikeln wurden diese möglichst rasch im Wasserbad bei 37°C aufgetaut.

3.1.6 Isolierung von Lymphozyten aus Blut

3.1.6.1 Isolierung PBMCs aus peripherem Blut (*buffy coat*)

Als PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) werden aus Peripherblut isolierte mononukleäre Zellen bezeichnet.

Ein *buffy coat* wurde a 20 ml in 50 ml Falcon Röhrchen aliquotiert und 8 min bei $500 \times g$ zentrifugiert.

Das in der oben befindlichen Phase abgetrennte gelb-orangene Plasma wurde vorsichtig mit einer 5 ml Pipette abgenommen. Das Zellpellet wurde anschließend 1:1 (ca. 10 ml) mit PBS verdünnt und vorsichtig auf 20 ml Ficoll (Amersham, Braunschweig) geschichtet und für 30 min bei $500 \times g$ ohne Bremse zentrifugiert.

Durch die Zentrifugation werden die Lymphozyten von den restlichen Blutbestandteilen getrennt und sammeln sich als milchig-weiße Interphase. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, mit 30 ml PBS verdünnt und wieder zentrifugiert. Nach einem weiteren Wasch-Schritt wurde das Zellpellet in 10 ml 0,86% Ammoniumchlorid (w/v) aufgenommen und zur Lyse verbliebener Erythrozyten 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und wieder zentrifugiert. Nach einem weiteren Wasch-Schritt mit PBS wurden die Zellen in 30 ml RPMI+ aufgenommen und für mindestens eine Stunde liegend in einer großen Flasche (z.B. 175 cm^2) im Inkubator inkubiert. Diese Inkubation eliminiert Makrophagen aus der Lymphozytensuspension, da diese an das Plastik adherieren. Anschließend wurde die Zellsuspension abgenommen und die Zellen gezählt.

Üblicherweise lassen sich aus 20 ml buffy coat mindestens $1-2 \times 10^7$ PBMCs isolieren.

3.1.6.2 Isolierung von CD8⁺ Zellen aus frischem Vollblut

Ca. 40 ml frisches Vollblut wurden einem freiwilligen Spender entnommen und mit einem Antikörper-Cocktail (RosetteSep CD8 T Cell Enrichment Cocktail, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) versetzt. Dieser Antikörper-Cocktail besteht aus tetrameren Antikörperkomplexen gegen CD4, CD16, CD19, CD36, CD56, CD66b, TCR $\gamma\delta$ und Glycophorin A und führt zur Quervernetzung der spezifisch erkannten Zellen mit Erythrozyten. CD8⁺ Zellen kommen bei dieser Anreicherungs-methode nicht mit Antikörpern in Kontakt. Nach Zugabe des gleichen Volumens PBS wurden diese so genannten Rosetten durch Zentrifugation für 20 min bei 1200 x g ohne Bremse über Ficoll (Amersham, Braunschweig) sedimentiert und die nicht quervernetzten CD8⁺ Zellen wurden aus der Interphase isoliert. Nach zwei Waschschr-itten konnten die Zellen gezählt und für weitere Experimente (z.B. Stimulation mit CD3/CD28 beads) verwendet werden.

3.1.7 Stimulation von PBMCs

1 x 10⁶ PBMCs wurden mit 75 μ l CD3/CD28 Dynabeads (4x10⁷/ml) (DynaI Biotech, Hamburg) für 3 Tage in RPMI-Medium mit Interleukin-2 (Il-2) (2 x 10⁵ Zellen/ml) normal weiter inkubiert.

3.1.8 Entfernung der Beads aus Bead-stimulierten PBMCs

Die Zellen wurden kräftig resuspendiert und sofort in einem Röhrchen in den MPC-1 Magneten (DynaI Biotech, Hamburg) überführt. Nach 1-2 min wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert (ohne das Röhrchen aus dem Magneten zu nehmen), in ein neues Röhrchen überführt und dieses noch einmal für 1-2 min in den Magneten gestellt. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen zentrifugiert, in frischem RPMI-Medium mit Il-2 aufgenommen und mittels einer Zählkammer gezählt.

3.1.9 Beschichtung von Zellkulturschalen mit Retronectin

Lyophilisiertes Retronectin (Takara Bio, Japan) wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml in Wasser aufgenommen und durch einen Millex GV 0,22 µm Filter (Millipore, Schwalbach) sterilfiltriert. Das Filtrat kann bei -20°C gelagert werden oder auf 50 µg/ml mit PBS verdünnt sofort verwendet werden.

500 µl Retronectinlösung pro *Well* wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abnahme der Retronectinlösung erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindung durch Inkubation von 500 µl PBS/2%BSA (w/v) pro *Well* für 30 min bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die *Wells* mit 500 µl HBSS/Hepes (HBSS + 2,5% [v/v] 1M Hepes) Puffer gewaschen.

Die beschichteten *Wells* können sofort verwendet werden oder zur späteren Verwendung bei 4°C gelagert werden.

3.1.10 Einfrieren und Lagerung von Zellen

Eine dichte Zellpopulation wurde ggf. abgelöst, pelletiert und in 1 ml einer Mischung von 90% hitzeinaktiviertem FCS und 10% DMSO (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen, in Cryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Die längerfristige Lagerung erfolgte in der Gasphase von flüssigem Stickstoff.

3.1.11 Mycoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden Zellen auf Befall durch Mycoplasmen mittels DNA-Färbung getestet (Uphoff et al., 1992). Hierfür wurden Zellen in 6-*Well* Schalen ausgebracht und am nächsten Tag zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit einer eiskalten 1:1 Mischung von Methanol und Aceton für 5 min bei -20°C fixiert. Das Gemisch wurde wieder abgenommen und die Zellen noch einmal mit PBS gewaschen

bevor sie mit DAPI-Färbelösung (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide in PBS, 0,1 µg/ml) (Sigma, Deisenhofen) für 30 min bei 37°C inkubiert werden. Nach Abnahme der Färbelösung und Zugabe von PBS konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Mycoplasmenbefall zeigte sich hier durch sehr viele, sehr hell leuchtende Punkte auf der Zellmembran. Befallene Zellen wurden entsorgt und eine frühere Passage aufgetaut.

3.1.12 Vergleich der Zellproliferation

MyLa-Zellen wurden zusammen mit Vektorüberständen in Retronectin-beschichteten Schalen transduziert. Nach 2 Tagen erfolgte nach vorheriger Zellzahlbestimmung die Zugabe von Ganciclovir (10 µg/ml Endkonzentration; Cymeven®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) zu allen transduzierten Zellen. An den folgenden Tagen wurde ebenfalls die Zellzahl bestimmt und täglich Ganciclovir zugegeben.

3.1.13 Anreicherung von Zellen mittels MACS in MS-Säulen

1×10^7 Zellen wurden mit PBS/0,02% EDTA (w/v) abgelöst und je einmal mit Vollmedium und anschließend PBS/0,5% BSA (w/v) gewaschen. Das Zellsediment wurde in 90-95 µl PBS/0,5% BSA aufgenommen und 5-10 µl unverdünnter spezifischer Antikörper zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 4°C werden die Zellen 2x mit PBS/BSA gewaschen, in 80 µl PBS/BSA aufgenommen und 20 µl magnetische Beads entsprechend des ersten Antikörpers zugegeben (z.B. erster Antikörper aus Maus → anti-Maus Beads). Die anschließende Inkubation fand für 15 min bei 4°C statt. Abschließend wurden die Zellen 2x mit PBS/BSA gewaschen und in 500 µl PBS/BSA aufgenommen.

Die MS-Säulen (Miltenyi-Biotech, Bergisch Gladbach) wurden in den passenden Magneten gesteckt und mit 500 µl PBS/BSA äquilibriert. Anschließend wurden die 500 µl Zellsuspension auf die Säule gegeben und 2x mit je 500 µl PBS/BSA die Säulen gewaschen. Zur Elution der angereicherten Zellen wurde die Säule aus dem Magneten genommen und zunächst mit 500 µl PBS/BSA eluiert. Um alle Zellen von der Säule zu

lösen, wurden noch mal 500 µl PBS/BSA auf die Säule gegeben und alles mit dem Stempel herausgedrückt.

Die Effizienz der Anreicherung – wie auch der Wasch-Fractionen – kann anschließend im FACS (siehe 3.1.14) analysiert werden.

3.1.14 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Durchflusszytometrie wurde dazu benutzt die Expression membranständiger Rezeptoren oder die intrazelluläre Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) nachzuweisen.

Adhärente Zellen wurden mit 0,02% (w/v) EDTA abgelöst. Hierbei wird ausschließlich die Bindung der Zellen an die Kulturschale und untereinander aufgehoben. Für Suspensionszellen ist dieser Schritt nicht nötig. Die Zellzahl wurde in einem Zellzähler (Particle Counter Z1; Coulter Electronics, Krefeld) oder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 1×10^6 Zellen wurden in 5 ml Polypropylenröhrchen gegeben und 5 min bei 1.500 Upm zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 50-100 µl des entsprechenden Antikörpers aufgenommen und für 1 Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50-100 µl des entsprechenden Sekundärantikörpers für 1 Stunde bei 4°C inkubiert.

Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 300 µl PBS resuspendiert und in einem FACScan™ Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

3.1.15 FACS Adhäsionstest mit fluoreszierenden Beads

Die Zellen wurden mit TSA Puffer gewaschen. 5×10^4 Zellen wurden mit 20 beads/Zelle für 30 min bei 37°C in PCR-Reaktionsgefäßen in einem Gesamtvolumen von ca. 12 µl inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Mischung in FACS-Röhrchen überführt, gewaschen und im FACS analysiert.

Zusammensetzung TSA-Puffer:

20mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 0,5% (w/v) BSA

Fluoreszierende Beads:

Emission/Extinktion 488/645 nm, 1,0 µm Ø

Carboxylat-modifizierte TransFluorSpheres (MolecularProbes, Oregon, USA) wurden mit gp120 beschichtet (Geijtenbeek et al., 2000b). Die Analyse am FACS erfolgte durch Messung der Fluoreszenz im FL-3 Kanal.

Die gp120-beschichteten fluoreszierenden Beads waren ein Geschenk von Teunis Geijtenbeek (Amsterdam, Niederlande).

3.1.16 FACS Adhäsionstest mit GFP-exprimierenden Zellen

Zellen, die die chimären T-Zellrezeptoren exprimieren, wurden mit EDTA abgelöst und mit dem roten Membranfarbstoff PKH26 gefärbt (siehe 3.1.17) und für 15 min zusammen mit GFP-exprimierenden und das HIV Hüllprotein tragenden Zielzellen im Verhältnis 1:1 bei 4°C inkubiert. Unmittelbar vor der Messung im Durchflusszytometer wurde die Zellsuspension vorsichtig 3-4 Mal hoch- und runter pipettiert, damit keine großen Zellaggregate das Gerät verstopfen. Ein Vortex-Schüttler darf nicht verwendet werden, da sonst alle Zell-Zell Bindungen gelöst würden.

Die Auswertung der Messergebnisse vergleicht die Zahl der doppelt-positiven Ereignisse miteinander. Sind beim Durchtritt durch den FACS-Laserstrahl eine rot- und eine grün-fluoreszierende Zelle aneinander gebunden, erkennt das Gerät nur eine Zelle, die (für die Software) sowohl rot als auch grün fluoresziert. Dementsprechend sind alle doppelt-positiven Ereignisse zwei Zellen, bei denen der chimäre T-Zellrezeptor und das HIV Hüllprotein Env gebunden haben.

3.1.17 Färbung von Suspensionszellen mit den Membranfarbstoffen PKH26 oder PKH67 (Sigma, Deisenhofen)

Die Färbung wurde gemäß den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt:

Färbelösung: 2 µl Farbstoff pro Milliliter Diluent C in einem Polypropylenröhrchen

1×10^6 Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen und in einem Polypropylenröhrchen (z.B. 15 ml Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg) in 1 ml Diluent C aufgenommen. 1 ml Färbelösung wurde zugegeben, gut gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur unter gelegentlichem schütteln inkubiert. Die Färbereaktion wurde durch Zugabe von 2 ml FCS gestoppt. Nach Zugabe von 4 ml Vollmedium wurden die Zellen zentrifugiert und anschließend mindestens 2x mit Vollmedium gewaschen.

Nach Herstellerangaben wird die Fluoreszenz an die Tochterzellen weitergegeben und ist für ungefähr 30-60 Tage im FACS detektierbar. Der grüne Fluoreszenzfarbstoff PKH67 kann im Fluoreszenzkanal FL-1 detektiert werden, der rote Farbstoff PKH26 in den Kanälen FL-2 und FL-3.

3.1.18 Analyse der Lyse von HIV Env-exprimierenden Zellen mittels FACS

BJAB Env_i Zellen wurden 2 Tage vor Versuchsbeginn durch Zugabe von 25 nM Dexamethasone ins Zellkulturmedium zur Expression von HIV Env stimuliert (Kruger et al., 1996). Am Tag des Versuches wurden je 1×10^6 induzierte und nicht-induzierte BJAB Env_i Zellen pelletiert und wie im Abschnitt 3.1.17 beschrieben mit PKH67 gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden zusammen mit transduzierten T-Zellen, die die verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren exprimierten, im Verhältnis 5:1 (T-Zellen: BJAB Env_i) gemischt und RPMI-Medium ohne Interleukin-2 oder Dexamethasone für 16 Stunden inkubiert. Somit ergab sich für jedes der chimären T-Zell-Rezeptor Konstrukte ein Ansatz mit induzierten und ein Ansatz mit nicht-induzierten BJAB Env_i Zellen. Für die Analyse wurde ein *Gate* auf die grün-fluoreszierenden Zellen gesetzt, d.h., nur die grün-fluoreszierende Zellen wurden weiter analysiert und der Zell-Mischung Propidiumiodid (PI) zugegeben. PI ist ein DNA-bindendes, fluoreszierendes Molekül, welches die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann und deshalb nur tote Zellen – mit durchlässiger Membran – anfärbt (Darzynkiewicz et al., 1994). Spezifische Lyse HIV Env-exprimierender Zellen konnte durch einen Anstieg

der doppelt positiven Zellen (HIV Env-exprimierende BJAB Env_i wurden grün gefärbt [=“grün-positiv“] und tote BJAB Env_i sind PI-positiv) ausgelesen werden.

3.2 Protein-biochemische Methoden

3.2.1 Zellernte und Zellaufschluss

Lysispuffer: 1% NP40, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl,
(auf Eis) + 40 µl/ml Complete Protease Inhibitor (Roche, Penzberg)
(der Proteaseinhibitor muss frisch zugesetzt werden)

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und für 5 min im Lysispuffer auf Eis inkubiert. Pro *Well* einer 6-*Well* Platte wurden 200 µl Lysispuffer hinzugegeben und die Zellen mit einem Schaber auf Eis abgelöst und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 14000 Upm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde für die Proteinmengenbestimmung und die Immunoblot-Analyse eingesetzt. Die Lagerung von Zelllysaten erfolgte bei -80°C.

Alternativ sind die Zellen mit Trypsin/EDTA (oder nur 0,02% [w/v] EDTA, falls Oberflächenproteine analysiert werden sollen) von der Schale abgelöst worden. Die Zellen wurden in 10 ml PBS in 15 ml Röhrchen aufgenommen, 5 min bei 1500 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde in 100-400 µl Lysispuffer aufgenommen und nach einer Inkubation von 10 min auf Eis wie oben beschrieben weiterverfahen.

3.2.2 Proteinmengenbestimmung

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurde mit dem BioRad Protein Assay Kit (BioRad, München) nach der Bradford-Methode durchgeführt. Es wurde dabei nach Anleitung des Herstellers vorgegangen.

Zu 5 µl Zelllysate wurden 795 µl Wasser gegeben und die Mischung mit 200 µl BioRad Protein Reagenz versetzt. Nach gründlicher Durchmischung mit anschließender 5-minütiger Inkubation wurde die Absorption bei 595 nm gemessen und die Gesamtproteinmenge durch Vergleich mit einer Standard-Protein-Eichkurve ermittelt.

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit 12,5%igen Gelen durchgeführt.

SDS-Gelelektrophoresepuffer:	250 mM Glyzin, 0,1% SDS, 25 mM Tris-HCl
Sammelgelpuffer:	0,1%(w/v) SDS; 125 mM Tris-HCl, pH 6,8
Acrylamidlösung:	30% Acrylamid; 0,8% Bisacrylamid
Sammelgel:	1 ml Sammelgelpuffer, 400 µl Acrylamidlösung, 2,6 ml Wasser, 15 µl 10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS), 5 µl Tetramethyldiamin (TEMED)
Trenngelpuffer:	0,1%(w/v) SDS; 375 mM Tris-HCl, pH 8,8
Trenngel:	2 ml Trenngelpuffer, 2 ml Acrylamidlösung, 4 ml Wasser, 30 µl 10% (w/v) APS, 10 µl TEMED
4x Probenauftragspuffer: (Roth, Karlsruhe)	50% Glycerin, 10% SDS, 0,005% Bromphenolblau 312,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 5% β-Mercaptoethanol

Die Proteinproben wurden zusammen mit 4x Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend ein entsprechendes Aliquot auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 20 – 30 mA pro Gel.

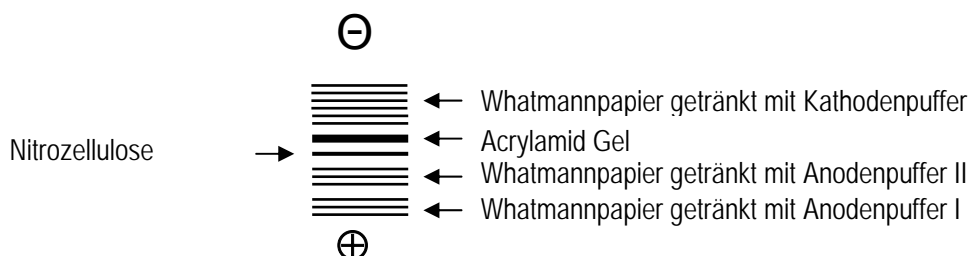
3.2.4 Immunoblotting

Kathodenpuffer: 25 mM Tris pH 10,4; 40 mM ε-Aminokapronsäure, 20% Methanol

Anodenpuffer I: 300 mM Tris pH 10,4; 20% Methanol

Anodenpuffer II: 25 mM Tris pH 10,4; 20% Methanol

Eine "halbtrocken Blot"-Apparatur wurde zum Transfer der Proteine aus den Acrylamid-Gelen auf eine Nitrozellulose Membran verwendet. Der Transfer erfolgte bei 100 mA für 1 Stunde (ca. 1 mA/cm²).



Wie in der Skizze gezeigt, wurde die Blotapparatur in folgender Reihenfolge aufgebaut:

Anode → 3 Lagen Wasmanpapier getränkt mit Anodenpuffer I → 3 Lagen Wasmanpapier getränkt mit Anodenpuffer II → Nitrocellulose Membran → Acrylamid Gel → 6 Lagen Whatmanpapier getränkt mit Kathodenpuffer → Kathode

Zur Reduzierung von unspezifischen Antikörperbindungen wurde die Membran in PBS-Tween (0,1% [w/v] Tween 20) mit 5% fettfreiem Magermilchpulver geblockt. Die Blockierung erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder alternativ über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde nach der Blockierung und nach jeder Antikörperinkubation je dreimal für 5 min bei Raumtemperatur mit PBS-Tween gewaschen. Der spezifische, primäre Antikörper wurde in der entsprechenden Verdünnung in PBS-Tween mit 5% fettfreiem Magermilchpulver für 1 Stunde mit der Membran inkubiert. Der entsprechende Sekundärantikörper, der mit dem Enzym Peroxidase aus Meerrettich gekoppelt ist, wurde in PBS-Tween mit 5% fettfreiem Magermilchpulver für 45 min mit der Membran inkubiert, nachdem der Blot zuvor 3x für je 5 min mit PBS-Tween gewaschen wurde. Der Bindungsnachweis der Antikörper erfolgte mit dem ECL-Plus Chemilumineszenzsystem (Amersham Bioscience, Braunschweig) entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Detektion erfolgte mit einem Lumi Imager F1TM Gerät und dem Programm „LumiAnalyst 3.1“ (beides Roche Diagnostics, Mannheim).

Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind in der Antikörperliste im Kapitel Material aufgeführt.

3.2.5 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Die Membran wurde 3 Mal à 5 min in Wasser gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 5 min mit 0,2 M NaOH inkubiert, gefolgt von 3 Waschstritten mit PBS-Tween. Anschließend wurde die Membran in PBS-Tween mit Magermilchpulver blockiert.

3.2.6 Interferon gamma (IFN- γ) ELISA

Der ELISA auf IFN- γ wurde gemäß den Angaben des Herstellers (PBL Biomedical Laboratories, Piscataway, USA) wie folgt durchgeführt:

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der mitgelieferten IFN- γ Stammlösung angesetzt: 500; 200; 100; 50; 25 und 12,5 pg/ml.

Die mit anti-IFN- γ Antikörper beschichteten Platten wurden mit je 100 μ l der zu testenden Proben oder der IFN- γ Verdünnungen befüllt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die *Wells* entleert und 1x mit Final Wash Solution gewaschen und die Platte trocken geklopft. Jedes *Well* wurde dann mit 100 μ l anti-IFN- γ Antikörperlösung befüllt und wieder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die *Wells* wurden entleert, 3x mit Final Wash Solution gewaschen und anschließend trocken geklopft. Die *Wells* wurden nun mit 100 μ l der HRP-Konjugat Lösung befüllt und wieder 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entleerung der *Wells* und viermaligem Waschen mit Final Wash Solution wurden 100 μ l TMB Substrat in die *Wells* gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μ l Stopp-Lösung beendet und die Absorption bei 450 nm innerhalb von 5 min nach Zugabe der Stopp-Lösung gemessen.

3.3 Gentechnische Methoden

3.3.1 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, La Jolla, USA
BL21(DE3)pLysS	E. coli B F ⁻ dcm, ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal	Stratagene, La Jolla, USA
HB101	F-Δ(gpt-proA)62 leuB6 supE44 ara-14 galkK2 lacY1 Δ(mcrC-mrr) rpsL20 (Str ^r) xyl-5 mtl-1 recA13	Boyer und Roulland-Dussoix, 1969
SCS110	rpsL (Str ^r) thr leu endA thi-1 lacY galk galT ara tonA tsx dam dcm supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI ^q ZΔM15]	Stratagene, La Jolla, USA

Die Abkürzungen der Genotypen beziehen sich auf die Nomenklatur von Bachmann (Bachmann, 1983). Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 220 Upm in LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angezogen. Die langfristige Lagerung plasmidhaltiger Bakterienstämme erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 50% Glycerin.

3.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Gewinnung definierter DNA-Abschnitte wurde die Polymerasekettenreaktion angewendet.

Verwendet wurden in einem 50 µl Ansatz je 125 ng der einzelnen Primer und 50 ng Ausgangs-DNA.

Nach Beendigung der PCR wurden 10 U/µl des Restriktionsenzym *DpnI* zugegeben, welches spezifisch nach einem methylierten Alanin in der Sequenz GATC schneidet. Nach Transformation in *E. coli* XL-1 Blue wurden die Bakterien auf, mit Ampicillin versetzten, LB Agarplatten (LB_{Amp} Agarplatten) ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und am

nächsten Tag einzelne Bakterienkolonien in LB_{Amp} Medium für eine DNA Präparation im analytischen Maßstab (Minipräp) angezogen

Die Mutagenesereaktion wurde unter folgenden Temperaturen und Zeiten nach Anleitung des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt:

Sequenz-spezifische Mutagenese von DC-SIGN (V351G)

30 sek 95°C
30 sek 95°C
1 min 55°C
14 min 68°C

} 12 Zyklen

Die Amplifikationsreaktion wurde unter folgenden Temperaturen und Zeiten mit Hilfe des Pfx-Polymerase Kits der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt:

DNA Amplifikation für Klonierungen

2 min 94°C
15 sek 94°C
30 sek 60°C
1 min 68°C
5 min 68°C

} 35 Zyklen

Abweichende Zeiten sind im Ergebnisteil bei dem entsprechenden Experiment vermerkt.

Die Sequenz aller PCR-Primer ist im Anhang aufgeführt.

3.3.3 Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA oder PCR Fragmenten an spezifischen Sequenzmotiven wurden 3 - 10 Einheiten/ μg DNA des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Inkubationszeit betrug 1 - 3 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Ladepuffer beendet.

3.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Die gereinigte und geöffnete Plasmid-DNA wurde mit dem gewünschten Insert in einem bestimmten Mengenverhältnis gemischt. Dieses Mengenverhältnis wurde durch folgende Gleichung berechnet:

$$g_i = \frac{3 \times g_v \times l_i}{l_v}$$

g_i = Gewicht insert [ng] g_v = Gewicht Vektor [ng] (üblicherweise 100 – 200 ng)

l_i = Länge insert [bp] l_v = Länge Vektor [bp]

Das Gesamtvolumen der Mischung betrug 30 μl . Es enthielt außerdem 3 μl Ligationspuffer (1:10), 1 μl Ligase (1:50) und Wasser. Das DNA-Volumen ist abhängig von der Konzentration.

Die Mischung wurde über Nacht bei 16°C inkubiert und 1 μl davon in *E. coli* transformiert.

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Laufpuffer zur Gelelektrophorese: 40mM Tris-Base, 1mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8,0 eingestellt.

0,8% - 1,5% (w/v) Agarose wurden in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und 1:20.000 mit Ethidiumbromidlösung versetzt. Als Längenstandard diente die "1 kb DNA-Leiter" (NEB, Frankfurt/Main). Nach erfolgter Elektrophorese in einer BioRad (München) oder Peqlab (Erlangen) Gelelektrophoresekammer bei konstanter Spannung (50-100 V) wurden die DNA-Fragmente im Transilluminator unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einer Videokamera (BioRad, München oder Intas, Göttingen) fotografiert.

3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNA-Fragmente wurden nach abgeschlossener gelelektrophoretischer Auftrennung unter UV-Licht zügig mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA-Fragmente erfolgte nach dem Herstellerprotokoll mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden).

3.3.7 Herstellung chemokompetenter Bakterien

Chemokompetente Bakterien, die durch Hitzeschockbehandlung Plasmide aufnehmen, wurden durch Behandlung der Zellen nach dem (modifizierten) Protokoll von Hanahan erhalten (Hanahan, 1983):

Lösung 1: 100mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl₂; 13% Glyzerin (v/v)

Der pH-Wert wurde mittels 0,2 M Essigsäure auf 5,8 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

Lösung 2: 10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 13% Glycerin (v/v)

Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 7,0 eingestellt und die Lösung anschließend sterilfiltriert.

Einzelne Bakterienklone wurden von einer LB-Agar Platte gepickt und in 6 ml LB-Medium über Nacht angezogen. Am nächsten Tag wurde 1/100 der Kultur in 600 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,48 bis 0,5 wachsen gelassen. Nach Erreichen der OD wurde die Kultur für 15 min auf Eis abgekühlt und anschließend die Bakterien durch 15 minütige Zentrifugation bei 3.000 Upm und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 200 ml eiskalter Lösung 1 aufgenommen und für 1-2 h auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien wieder zentrifugiert und in 15 ml eiskalter Lösung 2 aufgenommen. Die Suspension wurde à 100 µl in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.3.8 Transformation von kompetenten *Escherichia coli*-Zellen

Für jeden Transformationsansatz wurde ein Aliquot von 50 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1 µl Ligationsansatz oder 1-5 ng Plasmid-DNA wurden die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 sec bei 42°C hitzegeschockt und danach für 2 min auf Eis wieder abgekühlt. 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikazusatz wurde zu jedem Ansatz hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, damit das Plasmid-codierte Resistenzgen exprimiert werden konnte.

200 - 500 µl des Ansatzes wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Selektionsmedium (100 µg Ampicillin / ml Medium) ausplattiert und über Nacht (>16 Stunden) bei 37°C inkubiert.

3.3.9 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

3.3.9.1 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab ("Minipräp")

Für analytische Zwecke wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA das NucleoSpin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der optimierten alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979).

Einzelkolonien von *E. coli* wurden in 2 ml antibiotikahaltigem LB-Medium inokuliert und über Nacht unter schütteln bei 37°C inkubiert. Davon wurden 1,5 ml abgenommen, 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert und die Zellen in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer A2 wurden die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl kalter Puffer A3 hinzugegeben, kräftig geschüttelt und für 10 min bei 14.000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in die mitgelieferten Säulen gegeben und für 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 600 µl Waschpuffer A4 beladen und eine weitere Minute bei 13.000 Upm zentrifugiert. Nach Verwurf des Durchflusses wurde die Säule 2 min bei 13.000 Upm getrocknet und die Plasmid-DNA mit 50 µl Wasser für 1 min bei 13.000 Upm eluiert.

Für Restriktionsanalysen wurden 10 µl dieser Lösung (> 1 µg DNA) verwendet.

3.3.9.2 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mit Qiagen Plasmid Maxi-Kit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend den Herstellerangaben präpariert und gereinigt. Das Prinzip dieses Kits beruht auf der optimierten alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly, 1979). Der Inhalt der Puffer und die Vorgehensweise sind analog zur oben (Kapitel 3.3.9.1) beschriebenen Durchführung.

3.3.10 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Der Gehalt an DNA wurde mit Hilfe eines UV-Spektrometers bestimmt. Hierzu wurde die Lösung 1:100 in Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht eine optische Dichte von 1 einer Konzentration doppelsträngiger DNA von 50 µg/ml.

Eine weitere Messung bei 280 nm wurde zur Abschätzung der Reinheit durchgeführt. Ist Quotient aus OD_{260} und OD_{280} kleiner 1,8, so deutet dies auf eine Verunreinigung mit Protein hin (Sambrook, J. et al., 1989).

3.4 Methoden im Tierexperiment

3.4.1 Transplantation kutaner MyLa-Lymphome auf NMRI nu/nu Mäuse

Die „Spender“-Maus (HsdCpb: NMRI Foxn1^{nu}, Harlan-Winkelmann, Borcheln) wurde in ein Glasgefäß mit Deckel gesetzt, in dem sich mit dem Inhalationsanästhetikum Methoxyflurane (Medical Developments Int. Ltd, Springvale, Australien) getränktes Papier befand. Die Tiefe der Narkose, in welche die Maus nach wenigen Minuten gefallen war, ließ sich anhand des Zwischenzehen-Reflexes (Schmerzreflex) überprüfen: reagierte die Maus nicht mehr auf Druck zwischen den Zehen, war die Narkose ausreichend tief. Durch zervikale Dislokation wurde die Maus getötet und der Tumor explantiert. Mit Hilfe von Skalpell und Pipette wurde der Tumor in ca. 2x2 bis 3x5 mm große Stücke zerteilt, die zum Schutz vor Austrocknung in PBS gelegt wurden; nekrotisches Material wurde verworfen.

Eine „Empfänger“-Maus wurde wie oben beschrieben narkotisiert. Zeigt sie keinen Zwischenzehenreflex mehr, wurde sie aus dem Glasgefäß genommen. Durch einen 2-3 mm langen Schnitt in die Flanke wurde eine Tasche unter der Haut geschaffen, in die ein Fragment des Spender-Tumors geschoben werden konnte. Der Schnitt wurde per Knopf-Naht mit einem Stich geschlossen und die Tumor-Transplantation auf der anderen Körperseite wiederholt. Während der gesamten Transplantation wurde der Kopf der Maus in ein 50 ml Röhrchen gehalten, in dem sich ein mit Methoxyflurane getränktes Papier befand, da die Maus ansonsten zu schnell wieder aus der Narkose aufwachte. Nach Abschluss der Transplantation an beiden Flanken, wurde die narkotisierte Maus zurück in den Käfig gesetzt und mit einer Infrarot-Lampe bestrahlt. Dies verhinderte ein Auskühlen der haarlosen Tiere. Während der gesamten Narkose wurde die Atmung der Tiere überwacht.

Nach ca. 1 Woche wurden die Fäden entfernt, sofern die Tiere sie nicht bereits selbst abgeknabbert hatten.

3.4.2 Messung Tumorvolumina

Zur Bestimmung der Tumorvolumina wurden die Mäuse in der Hand fixiert und die Tumorlänge und Tumorbreite mittels einer Schieblehre bestimmt. Das Tumorumen wurde mit Hilfe der Formel

$$\frac{Länge \times Breite^2 \times \Pi}{6}$$

bestimmt.

Bei der Messung ist darauf zu achten, dass möglichst immer die gleiche Person die Messung vornimmt, da es sonst leicht zu verschiedenen „Messtechniken“ und damit zu schwankenden Werten kommt.

4. Ergebnisse

4.1 *Das HIV Hüllprotein als Zielstruktur für chimäre T-Zell-Rezeptoren*

Es gibt Berichte über HIV-positive Menschen, so genannte „*long-term non-progressors*“ (LTNP), die vorwiegend durch zytotoxische T-Zellen, ohne anti-retrovirale Medikamente, die Infektion unter Kontrolle halten können (Rowland-Jones et al., 1998). Daher sollten T-Zellen so modifiziert werden, dass sie zytotoxische Reaktionen gegen das HIV Hüllprotein Env einer großen Bandbreite von verschiedenen Virusstämmen zeigen. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden chimäre T-Zell-Rezeptoren generiert, die die gleichen intrazellulären Signale erzeugt, wie sie nach einer erfolgreichen Interaktion von T-Zelle und Antigen entstehen. Der Vorteil dieser chimären Rezeptoren besteht darin, dass sie das Antigen unabhängig von einer MHC-Präsentation erkennen und gleichzeitig auch das, für eine volle Aktivierung der T-Zelle notwendige, ko-stimulatorische Signal liefern. Als HIV Env-bindende Liganden wurden DC-SIGN, CD4 und 5-Helix verwendet. Die Einbringung der chimären Rezeptoren erfolgte durch retrovirale Vektoren, die eine stabile Integration der chimären Rezeptoren ins Genom der primären T-Zellen erlauben.

Als Vorbedingung der Erzeugung von chimären T-Zell-Rezeptoren wurde zunächst die Bindung der Liganden DC-SIGN, CD4 und 5-Helix funktionell charakterisiert.

4.1.1 DC-SIGN

Bei DC-SIGN handelt es sich um ein, von Dendritischen Zellen (DC) exprimiertes, Protein, dass an der Interaktion von DCs mit T-Zellen beteiligt ist. Auch an der Aufnahme und Prozessierung von einer Reihe von Pathogenen, deren Antigene später von der Zelle in Lymphknoten dem Immunsystem präsentiert werden, ist es beteiligt (Geijtenbeek et al., 2000c; Alvarez et al., 2002; Colmenares et al., 2002; Pohlmann et al., 2003; Tassaneeritthep et al., 2003; Appelmek et al., 2003). Am wichtigsten für diese Arbeit ist, dass DC-SIGN auch an das Hüllprotein von HIV bindet und diese Bindung vermutlich eine

wichtige Rolle bei der HIV-Infektion im Menschen spielt (Geijtenbeek et al., 2000b; Curtis et al., 1992).

Geijtenbeek et al. beschrieben 2002 einen künstlich eingeführten Aminosäureaustausch von Valin nach Glyzin in der Lektindomäne von DC-SIGN an Position 351 (Geijtenbeek et al., 2002b). Dieser Austausch verhinderte die Bindung des natürlichen Liganden ICAM-3 auf T-Zellen, ließ aber weiterhin die Bindung an das HIV Hüllprotein Env zu.

Mit den Primern DC-SIGN V351G #1 und DC-SIGN V351G #2 (siehe Primerliste im Anhang) wurde der Aminosäureaustausch durch sequenz-spezifische Mutagenese eingeführt, wodurch in der entstandenen DNA die Sequenz GGT für Glyzin durch das Valin-Tripletts GTT ersetzt wurde. Die Primer wurden mit einer Länge von 23 Basenpaaren generiert, die den Aminosäureaustausch in der Mitte trugen. Dies erlaubte eine 100%-ige Bindung der Primer an beiden Enden. Die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde nach Anleitung des QuickChange Site-Directed Mutagenis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt und durch Sequenzierung validiert.

Das Plasmid mit dem Aminosäureaustausch wurde pcDNA DC-SIGN V351G genannt und – neben wt DC-SIGN – dazu verwendet, die humane Zelllinie K562 mittels SuperFect zu transfizieren. Um eine stabile Zelllinie mit DC-SIGN wt bzw. DC-SIGN V351G zu erhalten, wurde ein Resistenzplasmid für Neomycin im Verhältnis 1:10 mit der DC-SIGN DNA gemischt, die Zellen unter G418-Selektion (1 mg/ml) kultiviert und anschließend einzelne Klone auf DC-SIGN-Expression untersucht. Die Klone mit der besten Expressionsrate wurden für die folgenden Experimente verwendet.

4.1.1.1 Funktionelle Charakterisierung von DC-SIGN wt und DC-SIGN V351G

DC-SIGN wt- bzw. DC-SIGN V351G-exprimierende Zellen wurden verwendet, um die Bindung an das HIV Hüllprotein gp120 funktionell zu charakterisieren. Dafür bekamen wir freundlicherweise von Teunis Geijtenbeek (Amsterdam, Niederlande) THP DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000b) und die parentale Zelllinie THP, sowie fluoreszierende Beads zur Verfügung gestellt, an die gp120 gekoppelt ist.

Zellen und Beads wurden gemeinsam inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie (FACS) können an Zellen gebundene fluoreszierende Beads erkannt werden: ungebundene Beads

sind zu klein und werden nicht registriert, Zellen ohne Beads werden als nicht-fluoreszierend erkannt.

Ein Teil der Zellen wurde nicht mit den Beads inkubiert, sondern mit DC-SIGN-spezifischem Antikörper gefärbt und die Expression im FACS analysiert. Abbildung 4.1 zeigt die Auswertung der FACS-Daten, aus denen zu erkennen ist, dass sowohl THP DC-SIGN, als auch die stabil transfizierten K562 Zellen das Molekül auf ihrer Oberfläche tragen. Die Expression von DC-SIGN wt und DC-SIGN V351G ist vergleichbar gut.

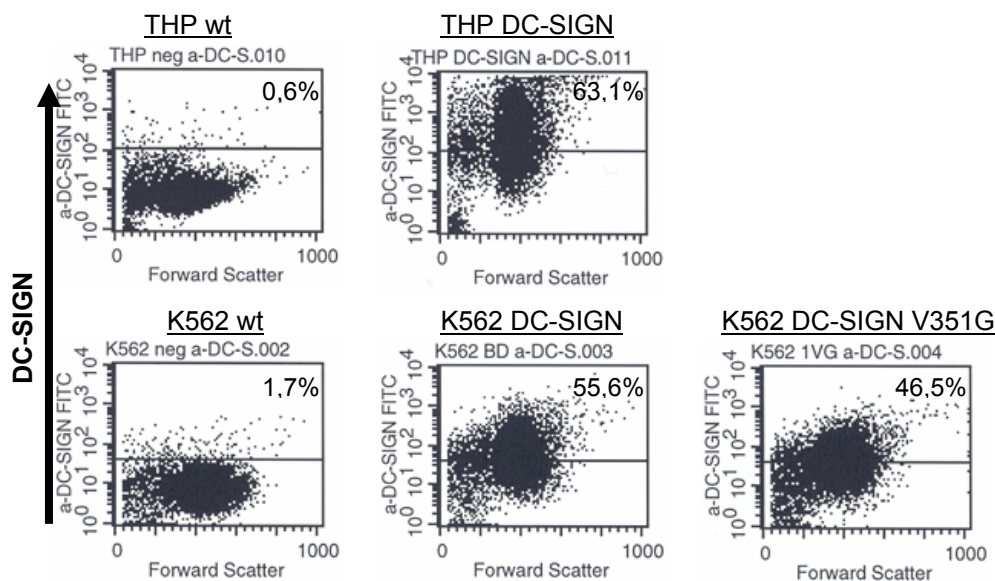


Abbildung 4.1: Bestätigung der Expression von DC-SIGN auf THP DC-SIGN wt, K562 DC-SIGN wt und K562 DC-SIGN V351G Zellen. DC-SIGN-exprimierende THP und K562 Zellen, sowie die dazugehörigen parentalen Zelllinien wurden mit DC-SIGN Antikörper und FITC-gekoppeltem anti-Maus Antikörper inkubiert und die Expression mittels FACS-Analyse ausgewertet.

In der oberen Zeile von Abbildung 4.1 ist die Expression von DC-SIGN auf THP DC-SIGN wt Zellen bzw. parentalen THP-Zellen mit Hilfe eines anti-DC-SIGN Antikörpers gezeigt. In der unteren Zeile ist die Expression von DC-SIGN auf K562, K562 DC-SIGN wt bzw. K562 DC-SIGN V351G gezeigt. THP DC-SIGN Zellen exprimieren das Protein in dieser Messung zu über 63%, während rund 56% der K562 DC-SIGN wt bzw. rund 46% der K562 DC-SIGN V351G DC-SIGN exprimieren. THP bzw. K562 Zellen ohne DC-SIGN zeigen bei diesem Versuch lediglich Hintergrundbindung. Hintergrundbindung bedeutet hier, dass nur ein geringer Teil der Zellen aus der Negativkontrolle mit einer Intensität fluoresziert, die höher als die Trennlinie zwischen positiven und negativen Zellen ist. Eine solche Hintergrundfluoreszenz ist in der Regel auf unspezifische Bindung von Antikörpern zurückzuführen und kann meist nicht vollständig vermieden werden. In Abbildung 4.1 beträgt das Hintergrundniveau 0,6% bei THP und 1,7% bei K562. Da bei den DC-SIGN-

exprimierenden Zellen die Zahl der positiven Zellen deutlich mehr als 45% ausmachen, fällt die Hintergrundbindung der Negativkontrollen nicht weiter ins Gewicht.

Für die Untersuchung der Bindung an die fluoreszierenden gp120-gekoppelten Beads dienten wieder THP bzw. THP DC-SIGN wt Zellen als Kontrollen. Aus Abbildung 4.2 ist erkennbar, dass etwa 41% THP DC-SIGN Zellen fluoreszierende Beads gebunden haben, während es bei K562 DC-SIGN wt nur gut 12% und bei K562 DC-SIGN V351G knapp 20% sind. Wie erwartet, binden die Beads untransfizierte K562 oder THP nur je mit einer etwa um Faktor 10 schlechteren Effizienz. Obwohl der Prozentsatz DC-SIGN-exprimierender K562 bzw. THP Zellen mit 46% bis 63% relativ ähnlich ist, binden die fluoreszierenden Beads wesentlich besser an DC-SIGN wt-exprimierende THP Zellen als an DC-SIGN wt- bzw. DC-SIGN V351G-exprimierende K562.

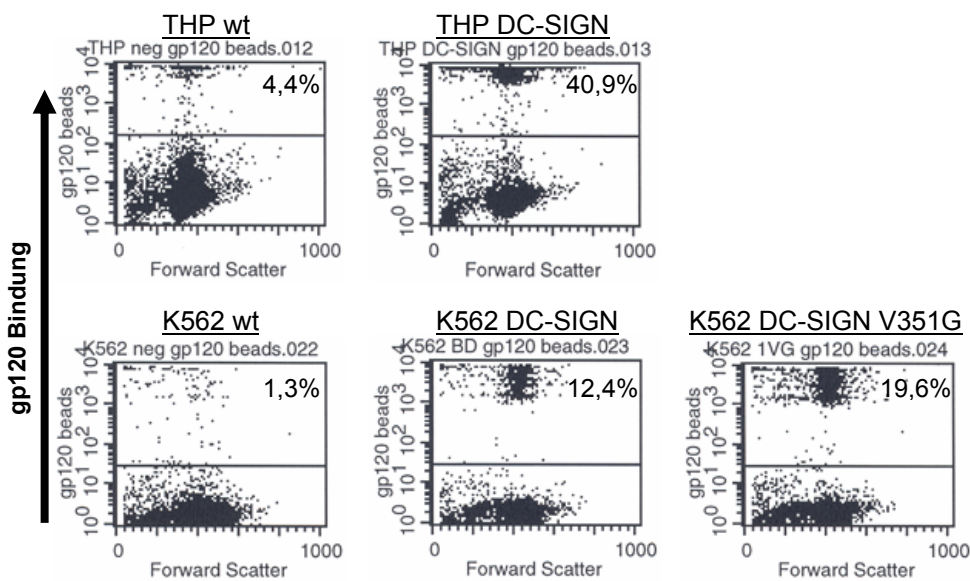


Abbildung 4.2: Bindung von DC-SIGN-exprimierenden THP und K562 Zellen und ihrer Vorläufer an gp120-gekoppelte fluoreszierende Beads. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Zusätzlich wurde die Bindung von gp120 an DC-SIGN wt-exprimierende BHK Zellen (BHK DC-SIGN Klon6) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die fluoreszierenden Beads sogar an diese adhärenen Hamsterzellen binden können (Abbildung 4.3). Expressionsuntersuchungen mit anti-DC-SIGN Antikörper ergaben, dass mehr als 77% der Zellen von BHK DC-SIGN Klon6 das Protein auf der Oberfläche exprimiert (Daten nicht gezeigt).

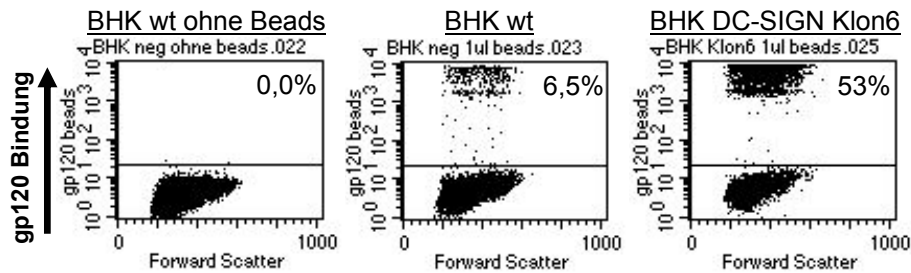


Abbildung 4.3: Bindung von BHK DC-SIGN Klon6 und BHK wt Zellen an gp120-gekoppelte fluoreszierenden Beads. Die Auswertung erfolgte mittels FACS-Analyse.

Die Messungen belegen, dass das Hüllglykoprotein gp120 von HIV an jede der getesteten, DC-SIGN-exprimierenden Zelllinien (THP, K562 und BHK) binden kann, wobei je nach Zelllinie unterschiedliche Affinitäten bestehen.

4.1.1.2 Untersuchung der Bindungsspezifität von DC-SIGN V351G

In Abbildung 4.2 konnte gezeigt werden, dass die gp120-gekoppelten, fluoreszierenden Beads sowohl an DC-SIGN-exprimierende (wt und V351G) K562, wie auch an THP DC-SIGN wt binden. Als natürlicher Ligand von DC-SIGN wurde das interzelluläre Adhäsionsmolekül-3 (ICAM-3) beschrieben (Geijtenbeek et al., 2000c). Sollen chimäre T-Zell-Rezeptoren gegen HIV-infizierte Zellen eingesetzt werden, muss sichergestellt sein, dass sie nur das Zielprotein erkennen, jedoch nicht andere Proteine. Daher sollte untersucht werden, ob die Bindung von gp120-Beads an zelluläres DC-SIGN durch lösliches ICAM-3 kompetitiert werden kann. Das heißt, ob durch den Aminosäureaustausch V351G der natürliche Ligand ICAM-3 noch gebunden werden kann. Dafür wurden DC-SIGN-exprimierende Zellen mit gp120-gekoppelten Beads inkubiert und zusätzlich lösliches ICAM-3 (sICAM-3) in mehreren Verdünnungen (1,1 µg; 110 ng und 11 ng) in den Inkubationsansatz gegeben. Abbildung 4.4 zeigt, dass die Zugabe von löslichem ICAM-3 nur einen mäßigen Effekt auf die Bindung der gp120-Beads an DC-SIGN-exprimierende THP Zellen hatte.

THP DC-SIGN Zellen hatten selbst bei 1,1 µg sICAM-3 immer noch zu 32% Beads gebunden, während DC-SIGN wt K562 zu 9,7% positiv und DC-SIGN V351G zu 6,1% positiv waren. Durch Verdünnung der sICAM-3-Konzentration auf 110 ng konnte keine wesentliche Veränderung der Zahl von Zellen mit gp120-Beads beobachtet werden. Durch

eine weitere Verdünnung der sICAM-3 Konzentration um Faktor 10 erhöhte sich die Zahl an Zellen mit gp120-Beads auf 12,4% bei K562 DC-SIGN wt und 13,7% bei K562 DC-SIGN V351G.

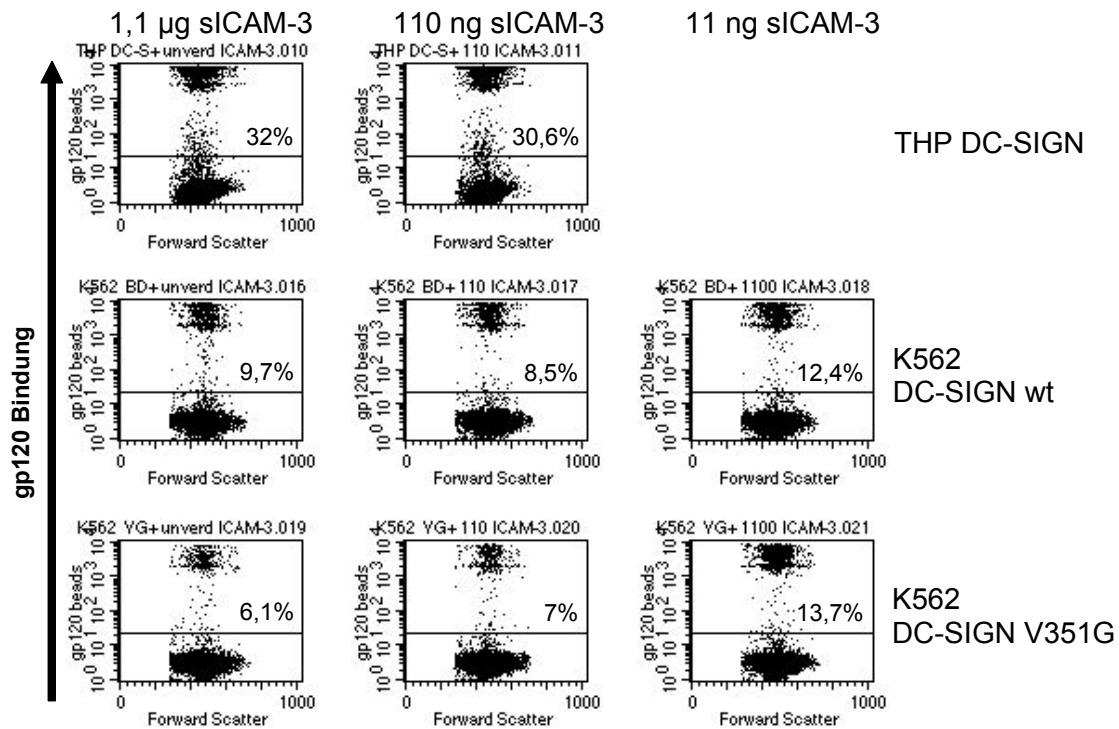


Abbildung 4.4: Einfluss von löslichem ICAM-3 auf die Fähigkeit DC-SIGN-exprimierender Zellen fluoreszierende, gp120-gekoppelte Beads zu binden. Zum Inkubationsansatz von gp120 Beads mit Zellen wurden 1,1 µg lösliches ICAM-3 zugegeben.

Tabelle 4.5 fasst die Messergebnisse, zusammen mit den Werten der Inkubation ohne lösliches ICAM-3, zusammen. Es wird erkennbar, dass die Zugabe von sICAM-3 die Bindung der Beads an DC-SIGN-exprimierende Zellen maximal um Faktor 2 ändert und damit nicht signifikant ist. Die Bindung wird vermutlich vielmehr durch die Zugabe der großen Proteinmenge vermindert. Die Bindung von gp120-Beads an wt-Zellen ändert sich nicht und bleibt im Rahmen des Hintergrunds (Daten nicht gezeigt). Obwohl für DC-SIGN V351G die Verhinderung der ICAM-3 Bindung nicht sicher gezeigt werden konnte, wurde es für die Generierung der chimären T-Zell-Rezeptoren verwendet, da mit diesen primär die Funktionalität der Moleküle bestätigt werden sollte (*proof of principle*).

sICAM-3	THP DC-SIGN	K562 DC-SIGN wt	K562 DC-SIGN V351G
1,1 µg	32,0%	9,7%	6,1%
110 ng	30,6%	8,5%	7,0%
11 ng	nicht bestimmt	12,4%	13,7%
ohne	40,9%	12,4%	19,6%

Tabelle 4.5: Bindung gp120-gekoppelter Beads an DC-SIGN-exprimierende Zelllinien. Der Anteil an fluoreszierenden Beads, die an die Zellen gebunden haben, ist für die verschiedenen Mengen an löslichem ICAM-3 aufgeführt.

4.1.2 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von 5-Helix

5-Helix ist ein Protein, welches aus den C und N Helices der gp41 Untereinheit des HIV Hüllproteins abgeleitet wurde. Bei der Fusion eines HI-Virus mit der Zielzellmembran kommt es zur Ausbildung eines Bündels von sechs dieser Helices (je drei von N und C). 5-Helix bildet insofern dieses Stadium nach, jedoch nur mit fünf Helices. Hierdurch hat dieses Protein eine hohe Affinität zu einzelnen Helices des HIV Hüllproteins und kann, wenn es als lösliches Protein zu einer Mischung aus Viren und Zielzellen gegeben wird, die Infektion mit HIV verhindern (Root et al., 2001). Zur Überprüfung, ob 5-Helix auch die in dieser Arbeit verwendeten HIV Hüllproteine inhibiert, wurde 5-Helix per PCR mit den Primern „5-Helix 5Prime“ und „3-Helix 3Prime“ aus dem Plasmid pcDNA 5-Helix (Root und Hamer, 2003), wie im Kapitel Methoden beschrieben, amplifiziert.

Das 670 bp große DNA-Fragment sowie das Plasmid pSecTag wurden mit den Restriktionsenzymen *Sfi*I und *Not*I gespalten. Anschließend wurden das Plasmidrückgrat von pSecTag und das geschnittene PCR-Fragment isoliert und miteinander ligiert (Abbildung 4.6). Die korrekte DNA-Sequenz des so entstandenen Plasmids pSecTag 5-Helix wurde durch Sequenzierung validiert.



Abbildung 4.6: Schematische Struktur des Plasmids pSecTag 5-Helix. Dargestellt sind die wichtigsten Restriktionsschnittstellen, sowie die relative Lage des Signalpeptids und der Detektions- bzw. Reinigungsepitope.

Durch die Ligation in das eukaryotische Expressionsplasmid pSecTag erhielt 5-Helix am 5'-Ende das Ig kappa Signalpeptid (SP), welches eine Sekretion des Proteins in das Medium erlaubt. Am 3'-Ende befinden sich ein c-myc Detektionsepitop und eine Abfolge von 6x der Aminosäure Histidin, die eine Affinitätsreinigung des Proteins durch Nickel-Agarose ermöglicht.

Die Expression und Reinigung des Proteins wurde durch Western Blot Analyse (Abbildung 4.7) bestätigt.

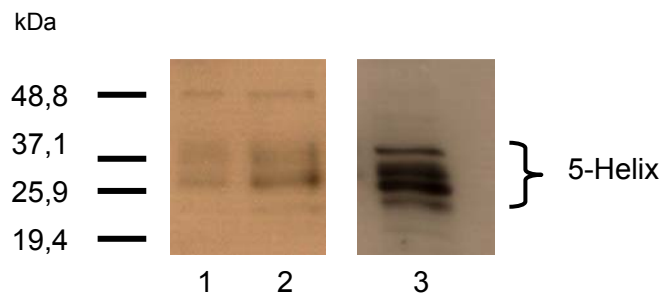


Abbildung 4.7: Sekretion von 5-Helix-myc-6xHis durch transfizierte 293T Zellen. Für die Analyse im Western Blot wurde der Antikörper 9E10 verwendet, der das im Protein enthaltene c-Myc Detektionsepitop erkennt. Spur 1: crude Überstände von mit 5-Helix transfizierten 293T. Spur 2: Affinitätsgereinigtes 5-Helix. Spur 3: Lysate transfizierter 293T Zellen.

Durch Zugabe ansteigender Mengen des gereinigten Proteins zu MLV/HIV pseudotypisierten Vektorpartikeln und NIH3T3 CD4/CXCR4 Zielzellen sollte die Funktionalität des löslichen 5-Helix bestätigt werden. Um die Bandbreite der Inhibition verschiedener HIV Hüllproteine zu testen, wurden sowohl Vektoren der Verpackungszelllinie Fly HIV-87-GFP (HIV Env BH10; verwendet CXCR4 als Ko-Rezeptor) (Thaler und Schnierle, 2001), als auch Überstände der Verpackungszelllinie Fly syn Env GFP (HIV Env 89.6P; verwendet CXCR4 oder CCR5 als Ko-Rezeptor (Doranz et al., 1996)) untersucht (Abbildung 4.8).

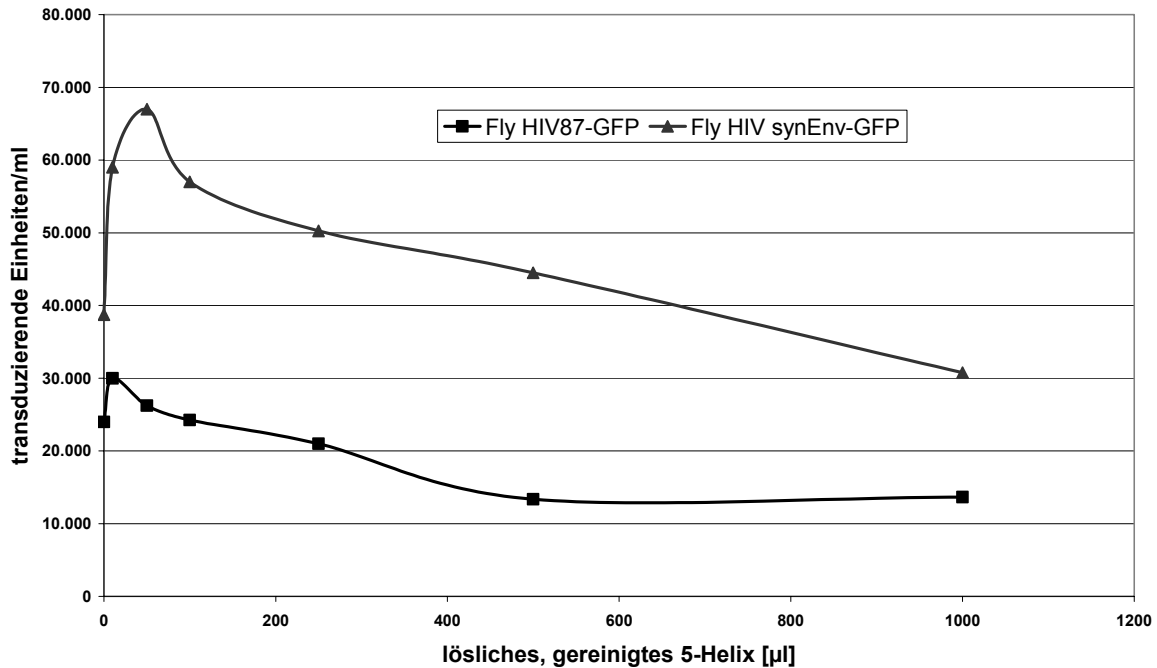


Abbildung 4.8: Die Zugabe von löslichem 5-Helix reduziert konzentrationsabhängig die Transduktion von Zielzellen durch MLV/HIV pseudotypisierte Vektoren. Ansteigende Mengen des gereinigten 5-Helix wurden zu GFP-transduzierenden retroviralen Partikeln gegeben und der Titer durch Messung GFP-exprimierender Zielzellen im FACS berechnet.

Aus der Graphik ist erkennbar, dass der Titer, in Abhängigkeit der Menge an löslichem 5-Helix, auf weniger als 50% seines Ausgangsniveaus absinkt, unabhängig von der Wahl des verwendeten HIV Hüllproteins. Diese Daten bestätigen die Funktionalität von 5-Helix und damit auch die Bindung an HIV Env.

4.1.3 Klonierung chimärer T-Zell-Rezeptoren

In den vorangegangenen Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass DC-SIGN und 5-Helix an das Hüllprotein Env von HIV binden. Von CD4 ist seit langem bekannt, dass Env daran bindet und es der Hauptrezeptor für eine HIV-Infektion ist (Dalglish et al., 1984). Daher wurden zur Generierung von chimären T-Zell-Rezeptoren für die HIV-Therapie diese drei Moleküle als HIV Env-bindende Liganden verwendet, um eine MHC-unabhängige, spezifische Immunreaktion gegen das HIV Hüllprotein Env zu ermöglichen.

Weiterhin setzen sich die chimären T-Zell-Rezeptoren aus folgende Fragmenten zusammen (Abbildung 4.9):

- der intrazelluläre Bereich von CD3zeta (aa 52 - 164 des wildtyp Proteins)
- die Transmembranregion von CD28 (aa 114 - 220 des wildtyp Proteins)
- ein c-Myc Epitop zur Detektion mit dem anti-Myc Antikörper 9E10 (EQKLISEEDL)
- die extrazelluläre Region von CD4, die Lektindomäne (LD) von DC-SIGN V351G (aa 253 - 404), der gesamte extrazelluläre Bereich von DC-SIGN V351G (aa 64 - 404) oder 5-Helix als das HIV Hüllprotein Env-bindender Ligand.

Die, für die Amplifikationen der einzelnen Fragmente verwendeten, Primer wurden so entwickelt, dass sie an ihrem jeweiligen 5'- und 3'-Ende zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle tragen. So konnten alle Teile hintereinander durch Ligation zusammengestellt werden. Die dafür genutzten Restriktionsschnittstellen sind ebenfalls in Abbildung 4.9 aufgeführt.

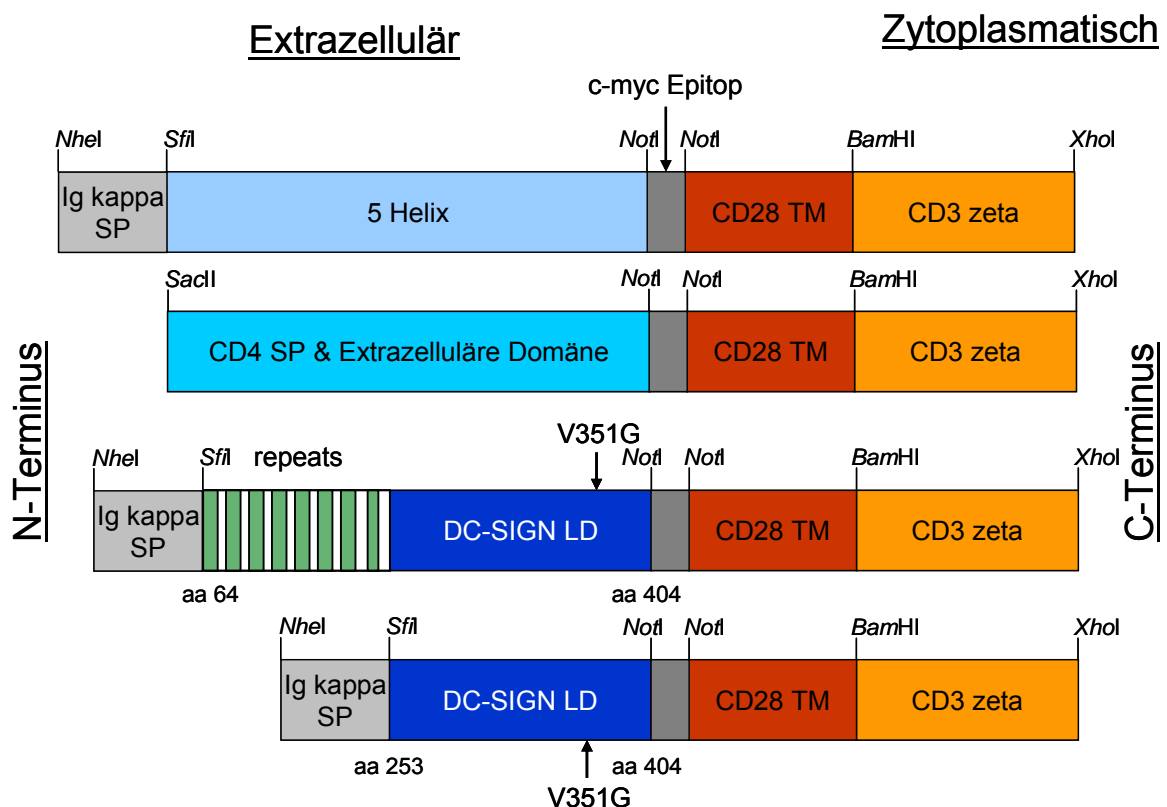


Abbildung 4.9: Schematische Strukturen der chimären T-Zell-Rezeptoren. Alle Konstrukte bestehen am C-Terminus aus der cytoplasmatischen Domäne von CD3zeta und enthalten die Transmembranregion von CD28. Der N-Terminus setzt sich aus den verschiedenen HIV Env-bindenden Liganden und dem c-myc-Epitop zusammen.

4.1.3.1 Klonierung von CD28 und CD3zeta

Zunächst wurde der Transmembranbereich von CD28 per PCR mit den Primern „SIGN/CD28#3“ (5') und „CD28/zeta#4“ (3') aus Jurkat cDNA (freundlicherweise überlassen von K. Engel, Frankfurt) mit den im Kapitel Methoden genannten Zeiten, Temperaturen und Zyklenzahl amplifiziert.

Das 330 bp große CD28TM PCR-Produkt und der Klonierungsvektor pBluescript KS+ (Stratagene, La Jolla, USA) wurde je mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *BamHI* geschnitten, anschließend erfolgte eine Ligation, deren Ergebnis schematisch in Abbildung 4.10 dargestellt ist.



Abbildung 4.10: Schematische Struktur des Plasmids pBluescript CD28TM mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen

Zur Amplifikation des cytoplasmatischen Teils der CD3zeta Kette wurde das Plasmid pGEM FRP5 hCD8 hCD3zeta (Moritz und Groner, 1995) der Polymerasekettenreaktion mit den Primern „CD28/zeta#5“ (5') und „zeta#6“ (3') und den im Kapitel Methoden genannten Zeiten, Temperaturen und Zyklenzahl unterzogen.

Das CD3zeta PCR-Produkt (351 bp) und das oben dargestellte pBluescript CD28TM Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *XhoI* geschnitten und die gewonnenen Fragmente miteinander ligiert. Abbildung 4.11 zeigt schematisch das Ligationsprodukt im Plasmid pBluescript CD28/CD3zeta.

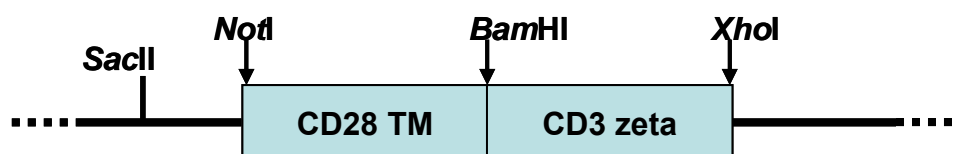


Abbildung 4.11: Schematische Struktur des Plasmids pBluescript CD28/CD3zeta mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen

4.1.3.2 Klonierung von DC-SIGN

Aufgrund der Struktur von DC-SIGN bieten sich zwei verschiedene Fragmente für lösliches DC-SIGN an (vgl. Abbildung 4.12): einerseits die Lektindomäne alleine (aa 253-404) und andererseits die gesamte extrazelluläre Region (aa 64-404). Die Lektindomäne enthält drei Disulfidbrücken und bindet Kalzium-abhängig Mannan und verwandte Zucker. Die gesamte extrazelluläre Domäne enthält zusätzlich zur Lektindomäne noch die „Repeat-Region“, die aus sieben vollständigen und einer unvollständigen Wiederholung eines Motivs aus 23 Aminosäuren besteht und u.a. eine Tetramerisierung von DC-SIGN Molekülen erlaubt.

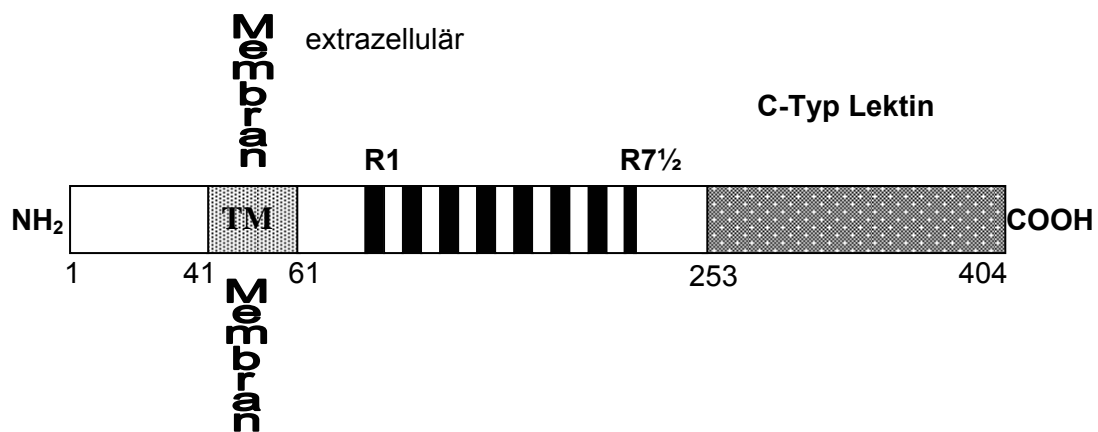


Abbildung. 4.12: Schematische Struktur von DC-SIGN. DC-SIGN ist ein glykosyliertes Typ II Transmembranprotein, d.h. der N-Terminus befindet sich im Zytoplasma. Auf den kurzen zytoplasmatischen N-Terminus folgt eine lange Transmembranregion (TM). Unmittelbar hinter der Transmembranregion befindet sich eine Sequenz aus sieben vollständigen und einer unvollständigen Wiederholung (R1 – R7 ½) eines 23 Aminosäuremotivs, die die Bildung von Homotetrameren ermöglicht. Der C-Terminus endet mit einer Lektindomäne, die Kalzium-abhängig eine Vielzahl N-verbundener Mannoseoligosacchariden binden kann.

Zur Generierung dieser Fragmente wurde zunächst jeweils eine PCR mit den Primern SIGN#1 (5') und SIGN/CD28#2 (3') zur Generierung der DC-SIGN Lektindomäne und mit den Primern CYTU (5') und SIGN/CD28#2 (3') für die gesamte extrazelluläre Domäne durchgeführt. Alle Primer enthalten in ihrem 5'-Bereich eine DNA-Sequenz, die von einem bestimmten Restriktionsenzym zur leichteren Klonierung geschnitten werden kann. Bei SIGN/CD28#2 handelt es sich um die Sequenz für *NotI*, SIGN#1 beinhaltet *SfiI* und für CYTU ist es *HindIII*. Im Plasmid pSecTag, in welches diese Konstrukte kloniert wurden, befindet sich eine *HindIII*-Schnittstelle weniger als 30bp hinter der, für die anderen Konstrukte verwendeten, *SfiI*-Schnittstelle im gleichen Leseraster (Abbildung 4.13).

Die Reaktion erfolgte mit den im Kapitel Methoden genannten Zeiten, Temperaturen und Zyklenzahl, jedoch wurde für die Amplifikation der gesamten extrazellulären Domäne von

DC-SIGN die Elongationszeit auf 1,5 min bei 68°C erhöht, da diese Region eine Länge von 1060 bp hat.

Die entstandenen PCR-Fragmente und das leere pSecTag Expressionsplasmid wurden mit den Restriktionsenzymen *SfiI/NotI* bzw. *HindIII/NotI* geschnitten und miteinander ligiert. Abbildung 4.13 zeigt schematisch einen Ausschnitt der Ligationsprodukte. Die gesamte extrazelluläre Domäne wird im Folgenden als „DC-SIGN+Repeats“ bezeichnet und das Plasmid als pSecTag DC-SIGN+Repeats. Entsprechend wurde die Lektindomäne als „DC-SIGN Lektin“ und das Plasmid als pSecTag DC-SIGN Lektin. Im Bereich zwischen den Restriktionsschnittstellen *NheI* und *SfiI* befindet sich das Signalpeptid (SP) der Immunglobulin (Ig) kappa Kette, welches für alle Konstrukte, mit Ausnahme von CD4, als Signal zum Transport an die Zelloberfläche verwendet wird. Da es sich bei DC-SIGN um ein Typ II Transmembranprotein handelt (d.h. der C-Terminus bildet den extrazellulären Bereich) musste die Lektindomäne bzw. der gesamte extrazelluläre Bereich in umgekehrter Orientierung kloniert werden (vergleiche Abbildungen 4.9 und 4.12).

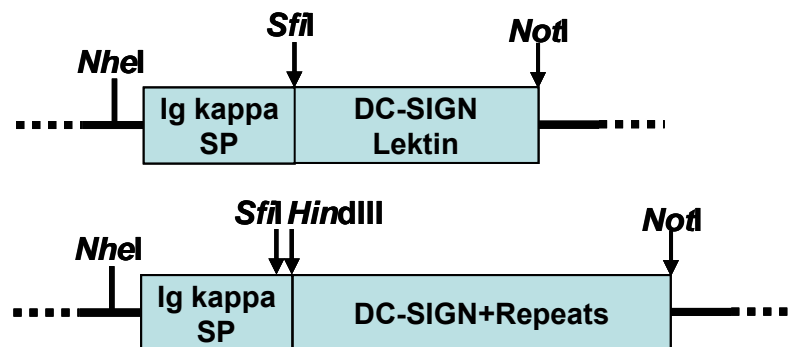


Abbildung 4.13: Schematische Strukturen der extrazellulären DC-SIGN Domänen nach Ligation in das Expressionsplasmid pSecTag. Rechts von der *NheI*-Schnittstelle befindet sich das Translationsstartcodon ATG. Die mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen von *SfiI* bzw. *HindIII* eingefügten Sequenzen der extrazellulären Region von DC-SIGN befinden sich ebenfalls in diesem Leseraster.

4.1.3.3 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit DC-SIGN

Für die Zusammenführung von DC-SIGN-Konstrukte mit CD28/CD3zeta wurden die Plasmide pSecTag DC-SIGN Lektin, pSecTag DC-SIGN+Repeats sowie pBluescript CD28/CD3zeta jeweils mit den Enzymen *NotI* und *XhoI* geschnitten, das etwa 680 bp große CD28/CD3zeta Fragment isoliert und mit den geöffneten pSecTag DC-SIGN Lektin bzw. pSecTag DC-SIGN+Repeats ligiert. Abbildung 4.14 zeigt schematisch das fertige Konstrukt, welches aus dem Signalpeptid (SP) der Ig kappa Kette gefolgt von der

DC-SIGN Lektindomäne bzw. dem gesamten extrazellulären Bereich von DC-SIGN, dem Transmembranbereich von CD28 und der cytoplasmatischen Domäne von CD3zeta besteht. Diese Fusionskonstrukte werden im Folgenden als „DC-SIGN Lektin/zeta“ bzw. „DC-SIGN+Repeats/zeta“ bezeichnet.

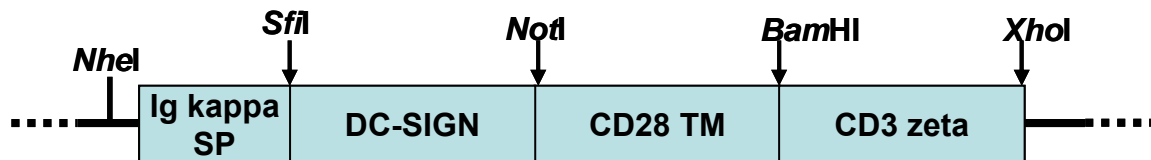


Abbildung 4.14: Schematische Struktur des Plasmids pSecTag DC-SIGN Lektin/zeta und pSecTag DC-SIGN+Repeats/zeta mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen. „DC-SIGN“ wurde hier als Platzhalter für eine der beiden Varianten verwendet.

4.1.3.4 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit der extrazellulären Domäne von CD4

Zur Gewinnung der extrazellulären Region von CD4 (aa 1-396), einschließlich des endogenen Signalpeptides (SP), wurde zunächst eine PCR mit den Primern „SacII-EcoRI-CD4Sign.Pept“ (5') und „3'NotI-extracell-CD4“ (3') und dem Plasmid pKex-CD4 durchgeführt. Die verwendeten Zeiten, Temperaturen und Zyklenzahl entsprechen den im Kapitel Methoden genannten Werten, jedoch wurde die Elongationszeit auf 1 min 20 sek bei 68°C erhöht.

Das so gewonnene 1194 bp DNA-Fragment und das Plasmid pBluescript CD28/CD3zeta (Abbildung 4.11) wurden sequentiell zuerst mit dem Restriktionsenzym *NotI* und dann mit *SacII* geschnitten und anschließend miteinander ligiert. Das komplette Fusionskonstrukt (im Folgenden als „CD4/zeta“ bezeichnet) ist in Abbildung 4.15 mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen abgebildet.

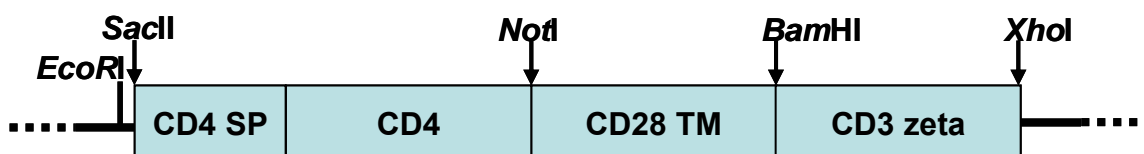


Abbildung 4.15: Schematische Struktur des Plasmids pBluescript CD4/zeta mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen

4.1.3.5 Generierung des chimären T-Zell-Rezeptors mit 5-Helix

Das Plasmid pSecTag 5-Helix (Abbildung 4.6) sowie das Plasmid pSecTag Lektin/zeta (Abbildung 4.14) wurde mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* gespalten. Durch diesen Schritt entstanden bei pSecTag 5-Helix 2 Fragmente, bestehend aus 5-Helix und dem leeren pSecTag Plasmidrückgrat. Bei pSecTag Lektin/zeta entstanden ebenfalls 2 Fragmente: DC-SIGN Lektin und das CD28 und CD3zeta enthaltende pSecTag Plasmidrückgrat. Dieses wurde, ebenso wie das 5-Helix Fragment isoliert und miteinander ligiert. Abbildung 4.16 zeigt das fertige Fusionskonstrukt (im Folgenden als „5-Helix/zeta“ bezeichnet).

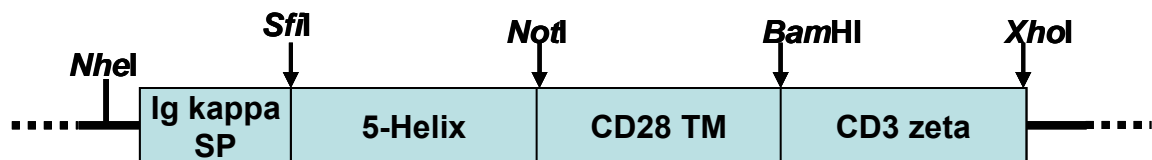


Abbildung 4.16: Schematische Struktur des Plasmids pSecTag 5-Helix/zeta mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen.

4.1.4 Einbringung eines Detektionsepitops

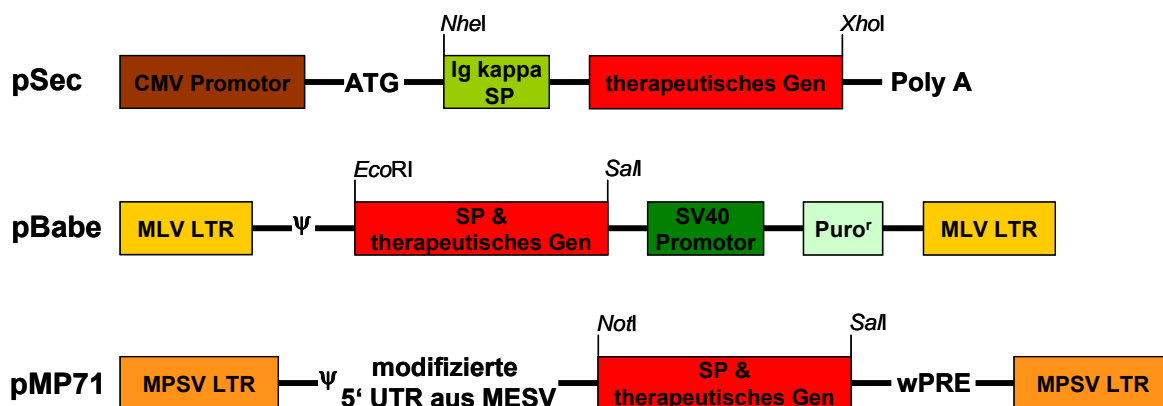
Zur Erleichterung der Detektion chimärer T-Zell-Rezeptoren mit verschiedenen Nachweismethoden, wurde ein c-myc Detektionsepitop in den extrazellulären Bereich aller Konstrukte eingefügt. Dafür wurde je ein ‚sense‘ und ‚anti-sense‘ Oligonukleotid (die Nukleotidsequenz ist im Anhang aufgeführt) entworfen, welches die vom kommerziell erhältlichen, monoklonalen Antikörper 9E10 erkannte Aminosäuresequenz (EQKLISEEDL, aus dem humanen c-myc Protein) codiert und an den Enden die entsprechenden Überhänge für die Ligation in eine geöffnete *NotI*-Schnittstelle hat (vgl. Abbildung 4.9). Die Oligonukleotide wurden gemischt, auf 95°C erhitzt und langsam bei Raumtemperatur abgekühlt. Die Plasmide wurden mit *NotI* geöffnet und mit den Oligonukleotiden ligiert.

Die Richtigkeit der Basenabfolge in den chimären Konstrukten wurde jeweils durch Sequenzierung überprüft und bestätigt.

4.1.5 Expression chimärer T-Zell-Rezeptoren mittels verschiedener Expressionsplasmide

Nach der Fertigstellung der verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren sollte ihre Funktionalität überprüft werden. Für eine Untersuchung der Funktionalität in hämatopoetischen Zellen, mussten die chimären Konstrukte in retroviral verpackbare Plasmide umkloniert werden, da sich Fremd-DNA dauerhaft in hämatopoetische Zellen am besten mit Hilfe von Retroviren einbringen lässt. Für die Aufnahme in retrovirale Partikel standen zwei verschiedene Plasmide zur Verfügung, für die zunächst getestet werden sollte, welches eine bessere Expression der Konstrukte bewirkt. Als Vergleich diente die mit pSecTag erreichbare Expression. Abbildung 4.17 stellt schematisch die verwendeten Expressionsplasmide und die verwendeten Restriktionsschnittstellen dar:

- pSecTag, ein Expressionsplasmid für Säugerzellen mit CMV Promotor, welches sich nicht für die Verpackung in retrovirale Vektoren eignet (dient daher als Vergleich).
- pBabe Puro, ein retrovirales Transferplasmid, enthält die als Promotor dienenden langen terminalen Repeats (LTR) aus dem Mausleukämievirus MLV
- pMP71 (Engels et al., 2003), ein retrovirales Transferplasmid, welches für die Expression in hämatopoetischen Zellen optimiert ist



MPSV = Myeloproliferative Sarcoma Virus
MESV = Mouse Embryonic Stem Cell Virus
SP = Signalpeptid

Abbildung 4.17: Schematische Strukturen der getesteten Expressionsvektoren für die chimären T-Zell-Rezeptoren. pSecTag hat einen Promotor aus dem Cytomegalie Virus (CMV) und ist nicht in retrovirale Partikel verpackbar. Die beiden Vektoren pBabe und pMP71 sind verpackbar und verwenden virale LTR-Sequenzen als Promotor. pBabe besitzt zusätzlich eine Antibiotikaresistenz, die eine Selektion mit Puromycin ermöglicht.

Zur Umklonierung in die retroviral verpackbaren Plasmide wurde folgendermaßen vorgegangen:

Zunächst wurde der chimäre Rezeptor CD4/zeta mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XhoI* aus dem pBluescript CD4/zeta Plasmid (siehe Abbildung 4.15) ausgeschnitten, da pBluescript nicht über einen eigenen Promotor verfügt und sich daher nicht zur Expression eignet. Als erstes Zielplasmid diente pBabe Puro, ein retrovirales Expressionsplasmid, welches zusätzlich über eine Puromycin-Resistenzkassette verfügt. Dieses Plasmid besitzt aufeinander folgend die einmalig vorkommenden Schnittstellen für die Enzyme *EcoRI* und *SaII*, mit denen das Plasmid geöffnet wurde. Obwohl *XhoI* und *SaII* verschiedene DNA-Sequenzen erkennen, sind die nach dem Schnitt entstandenen Überhänge gleich und können miteinander zum Plasmid pBabe CD4/zeta ligiert werden (siehe Abbildung 4.17).

Für den Transfer von CD4/zeta in das pMP71 Plasmid wurde entsprechend vorgegangen. In diesem Plasmid wurden die Schnittstellen von *NotI* und *SaII* zur Klonierung verwendet, wobei zunächst mit *NotI* und anschließender Glättung das Plasmid linearisiert wurde und anschließend der zweite Schnitt mit *SaII* erfolgte. Das Plasmid pBluescript CD4/zeta wurde mit *EcoRI* geöffnet und es erfolgte eine Glättung mit Klenow-Polymerase, gefolgt von einem zweiten Schnitt mit *SaII*. Die anschließende Ligation fügte die Fragmente zu dem Plasmid pMP71 CD4/zeta zusammen.

Mit den anderen Konstrukte in pSecTag Plasmiden wurden ähnlich verfahren: zunächst wurden sie mit *NheI* geöffnet, mittels Klenow-Polymerase geglättet und schließlich mit *XhoI* aus dem Plasmid herausgelöst. Auch hier diente pBabe Puro als erstes Zielplasmid. Es wurde zunächst mit dem Enzym *EcoRI* geöffnet und die Schnittstelle mit Klenow-Polymerase geglättet. Anschließend erfolgte der zweite Schnitt mit *SaII*. Die anschließende Ligation fügte die Fragmente zu den Plasmiden pBabe DC-SIGN Lektin/zeta, pBabe DC-SIGN+Repeats/zeta sowie pBabe 5-Helix/zeta zusammen (Abbildung 4.17).

Für den Transfer in das pMP71 Plasmid wurde für die chimären T-Zell-Rezeptoren wie eben beschrieben vorgegangen. Allerdings wurden in diesem Plasmid die Schnittstellen von *NotI* und *SaII* zur Klonierung verwendet, wobei das Plasmid zunächst mit *NotI* linearisiert und anschließend mit Klenow-Polymerase geglättet wurde. Der zweite Schnitt erfolgte mit *SaII*. Die anschließende Ligation fügte die Fragmente zu den Plasmiden pMP71 DC-SIGN Lektin/zeta, pMP71 DC-SIGN+Repeats/zeta sowie pMP71 5-Helix/zeta zusammen (Abbildung 4.17).

Abbildung 4.18 zeigt die Expression der verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren nach Transfektion in 293T Zellen. Durch Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) lässt sich die Expressionsrate verschiedener Expressionssysteme unabhängig von der Transfektionseffizienz vergleichen. In jeder Zeile ist die Expressionsrate eines chimären T-Zell-Rezeptorkonstrukts von den drei verschiedenen Expressionsplasmiden dargestellt: in der linken Spalte pSec, in der Mitte pBabe und in der rechten Spalte die Expression von pMP71. Die Detektion erfolgte im FACS mit Hilfe des c-Myc Antikörpers und eines FITC-markierten Sekundärantikörpers (vgl. Abbildung 4.9).

In der obersten Zeile sind 293T Zellen gezeigt, die mit dem chimären DC-SIGN Lektin/zeta T-Zell-Rezeptor transfiziert sind. In der zweiten Zeile ist DC-SIGN+Repeats/zeta abgebildet, gefolgt von CD4/zeta und 5-Helix/zeta in der letzten Zeile. Wegen der Klonierungsstrategie über einen pBluescript-Zwischenschritt gibt es für CD4 kein Konstrukt im pSecTag Plasmid. Für alle Konstrukte zeigt pBabe die schwächste Expressionsrate, während die Expression von pMP71 mindestens so gut ist, wie die von pSecTag.

Auf Grund der besseren Expressionsrate und der Notwendigkeit einer Verpackung in retrovirale Vektoren wurde für alle weiteren Experimente pMP71 als Expressionsrückgrat verwendet.

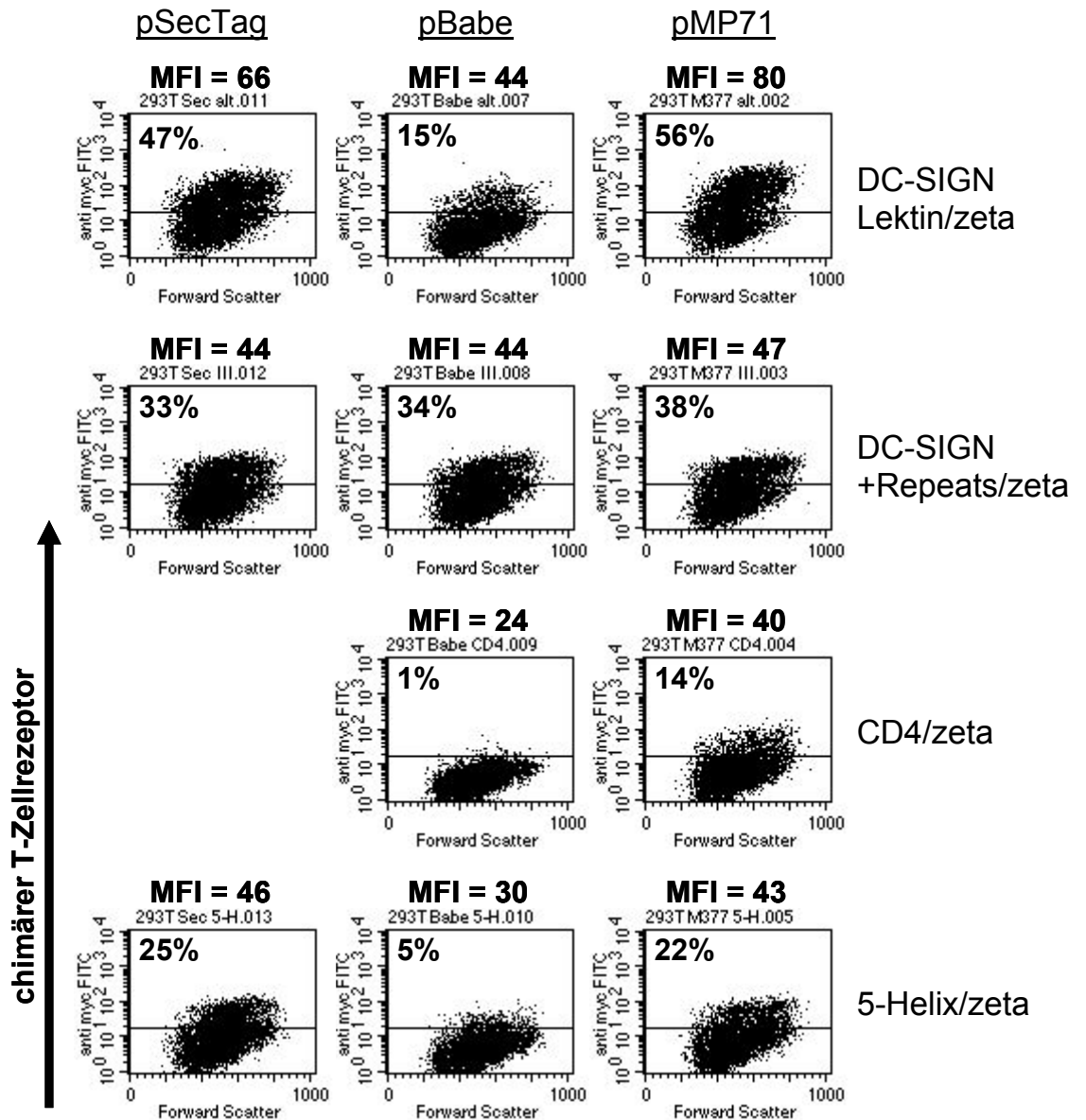


Abbildung 4.18: Auswertung des mittels FACS-Analyse vorgenommenen Vergleichs der Expressionsstärke der verschiedenen Expressionsvektoren. Innerhalb einer Zeile sind die Vektoren pSecTag, pBabe und pMP71 jeweils von links nach rechts für das gleiche Konstrukt dargestellt. Die Detektion erfolgte im FACS mit Hilfe des c-Myc Antikörpers und eines FITC-markierten Sekundäntikörpers.

4.1.6 Bindung chimärer T-Zell-Rezeptoren an gp120

Nach Bestätigung der Expression der Fusionskonstrukte, sollte untersucht werden, ob gp120 an die chimären Rezeptoren bindet. Dafür wurden 293T Zellen mit den chimären T-Zell-Rezeptoren transfiziert, mit gp120 gekoppelten fluoreszierenden Beads inkubiert und im FACS analysiert. Abbildung 4.19 zeigt in der oberen Zeile die Transfektionseffizienz der chimären T-Zell-Rezeptoren und in der unteren Zeile die Bindung von fluoreszierenden Beads. Die Transfektionseffizienz für die beiden DC-SIGN Konstrukte DC-SIGN Lektin/zeta und DC-SIGN+Repeats/zeta lagen bei etwa 50%, während gut ein Drittel der 293T CD4/zeta exprimierte. Mit leerem Vektor transfizierte Zellen zeigen nur 1% Hintergrundfluoreszenz. Die beiden DC-SIGN Konstrukte scheinen mit 4,6% bzw. 4,8% Fluoreszenz-positiver Zellen etwas stärker Beads zu binden als die Kontrolle mit leerem Vektor mit 3,4%. Das CD4-Konstrukt bindet mit 8,1% Fluoreszenz-positiver Zellen deutlich an die Beads, obwohl weniger Zellen transfiziert wurden.

5-Helix/zeta wurde in diesem Experiment nicht untersucht, da 5-Helix an den gp41-Bereich des HIV Hüllproteins bindet und die Beads lediglich die gp120 Untereinheit des HIV Hüllproteins tragen.

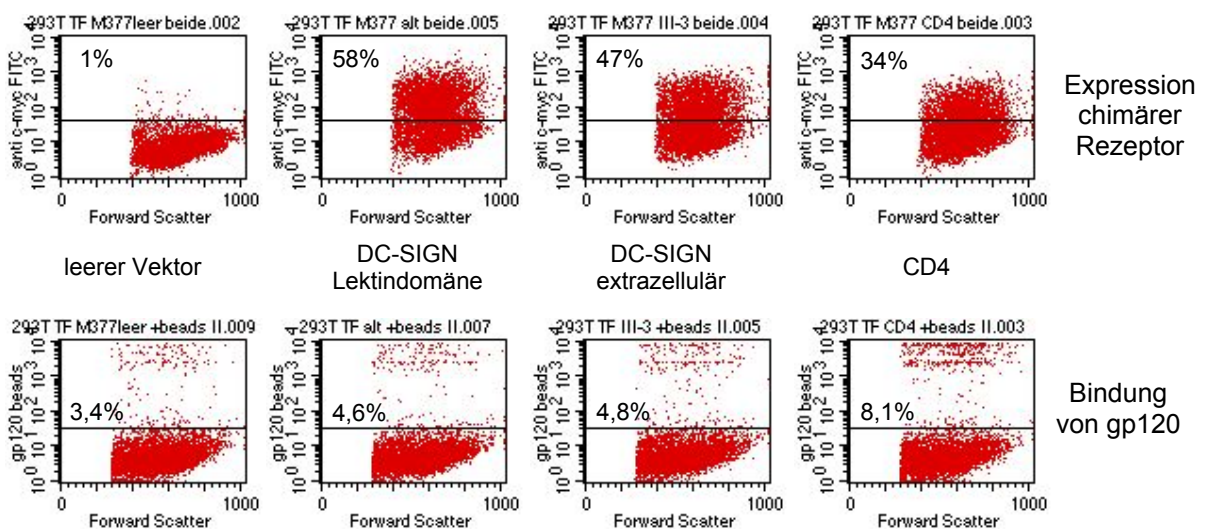


Abbildung 4.19: Bindung chimärer T-Zell-Rezeptoren an fluoreszierende, gp120-gekoppelte Beads. 293T Zellen wurden mit den verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren transfiziert. Ein Teil der Zellen wurde durch Färbung mit anti-c-Myc und FITC-markiertem Sekundärantikörper auf Expression der Konstrukte untersucht (obere Zeile), der andere Teil mit gp120-Beads inkubiert.

4.1.7 Einbringung der Verbindungsregion von CD8

Auf Grund der geringen Differenz in der Bindung von Beads zwischen leerem Vektor und den Konstrukten, wurde ein Teil der extrazellulären Domäne von CD8 (aa 117-178) als Verbindungsgelenk (engl. *hinge*) zwischen die CD28 Transmembranregion und die Liganden kloniert (siehe Schema). Dies sollte den extrazellulären Bereich der chimären T-Zell-Rezeptoren flexibilisieren und gleichzeitig für einen größeren Abstand zur Membran sorgen. Die CD8 *hinge*-Region wurde durch PCR-Amplifikation mit den Primern „CD8hinge-5'NotI“ und „CD8hinge-3'SalI-NotI“ aus dem Plasmid pGEM FRP5 hCD8 hCD3zeta (Moritz und Groner, 1995) generiert. In diesem Plasmid befindet sich unmittelbar im Anschluss an die CD8 *hinge*-Region ein c-myc Detektionsepitop, welches in der PCR ebenfalls amplifiziert wurde und somit die Detektion durch den Antikörper 9E10 erlaubt. Durch das Primerdesign erhielten beide Enden der amplifizierten DNA *NotI* Schnittstellen. Durch *NotI* Verdau wurden die chimären T-Zell-Rezeptorplasmide geöffnet und die CD8 *hinge* Region per Ligation eingefügt. Abbildung 4.20 zeigt schematisch die Struktur.

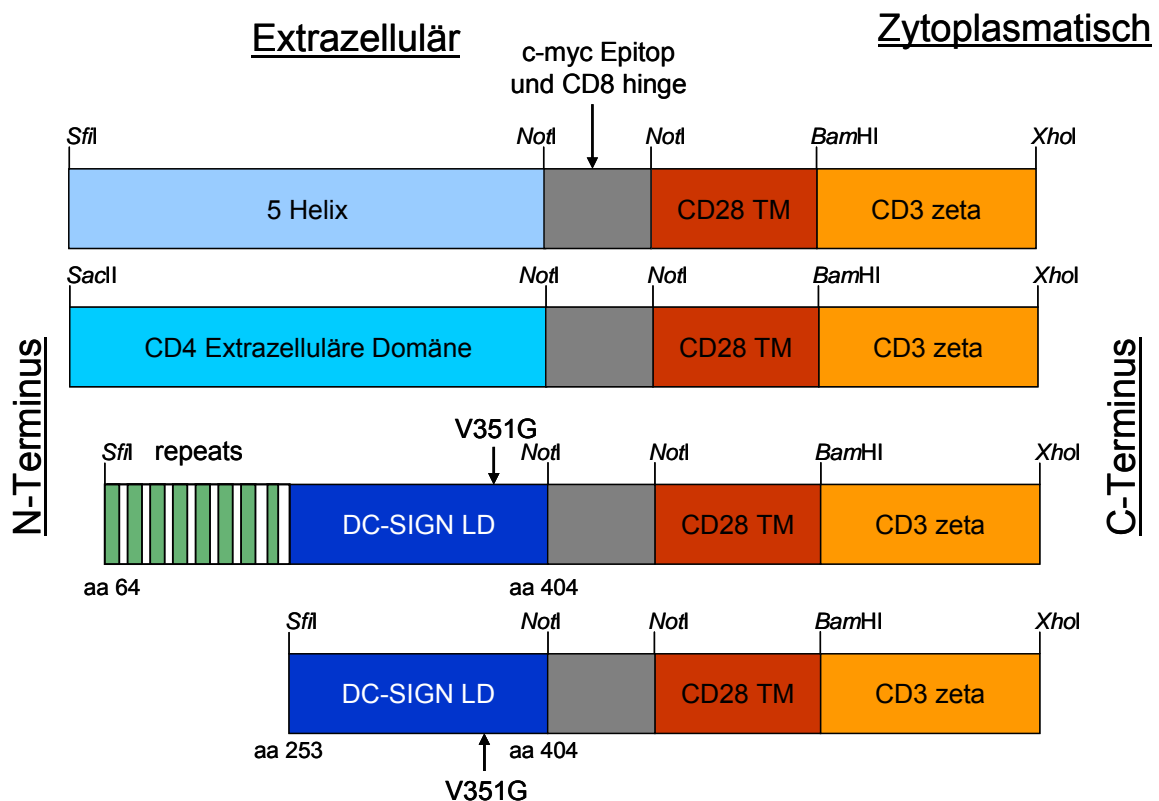


Abbildung 4.20: Schematische Strukturen der chimären T-Zell-Rezeptoren mit CD8 hinge Region zwischen den *NotI* Schnittstellen.

4.1.8 Bindungsassay mit HIV Env exprimierenden Zellen

Nach Einbringung der *hinge*-Region von CD8 in die chimären T-Zell-Rezeptoren, sollte der Einfluss auf die Bindung im natürlicheren Kontext untersucht werden. Hierzu wurden die Konstrukte mit und ohne CD8 *hinge* in 293T Zellen transfiziert, die Zellen mit dem roten Membranfarbstoff PKH26 gefärbt und mit der HIV Env und eGFP exprimierenden Zelllinie Fly syn Env (siehe Kapitel 4.2.2) koinkubiert. In Abbildung 4.21 sind die Messergebnisse dargestellt. Auf der Y-Achse ist die rote Fluoreszenzintensität dargestellt und auf der X-Achse die grüne. Die Quadranten unterteilen die verschiedenen Zellpopulationen. Oben links befinden sich mit dem roten Membranfarbstoff PKH26 gefärbte 293T, während sich rechts unten die HIV Env und GFP-exprimierenden Fly syn Env befindet. Rechts oben sind die „doppelt-positiven“ Zellen gezeigt, d.h. hier haben rot- und grün-fluoreszierende Zellen einander gebunden, können aber vom Durchflusszytometer nicht als zwei Zellen erkannt werden.

Werden Zellen miteinander koinkubiert kommt es meist auch zu unspezifischer Bindung der Zellen. Der Anteil an unspezifischer Bindung ist im ersten Dot Plot dargestellt: ca. 4% der Zellen binden unspezifisch aneinander. Bei DC-SIGN Lektin/zeta macht es keinen wesentlichen Unterschied, ob die CD8 *hinge*-Region enthalten ist oder nicht. Für DC-SIGN+Repeats/zeta hingegen steigt der Anteil aneinander bindender Zellen fast um das Doppelte auf 7,3% mit der CD8 *hinge*-Region, während bei 5-Helix/zeta genau das Gegenteil der Fall ist: hier binden mit der *hinge*-Region nur halb so viele Zellen aneinander. Für das CD4/zeta Konstrukt mit *hinge*-Region konnte keine Expression auf 293T nachgewiesen werden, deshalb wurde in diesem Experiment nur CD4/zeta ohne die *hinge*-Region verwendet. Dieses Konstrukt bindet am Besten an die HIV Env exprimierenden Fly syn Env Zellen.

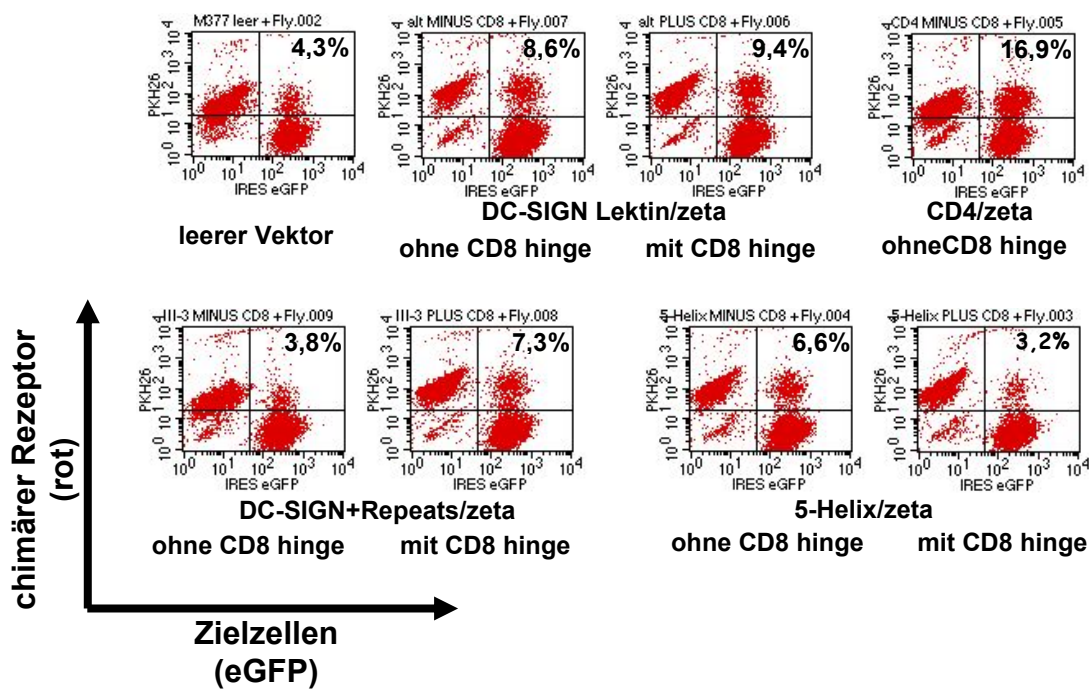


Abbildung 4.21: Bindungsassay membranefärbter, chimäre T-Zell-Rezeptoren exprimierender 293T Zellen mit HIV Env-tragenden Fly Verpackungszellen. In den Plots ist grüne Fluoreszenz von GFP auf der X-Achse gegen rote PKH26-Fluoreszenz auf der Y-Achse aufgetragen.

4.1.9 Test auf Generierung künstlicher Virusreservoirs mit HOS CXCR4 Zellen

Durch Einbringung von Konstrukten, die extrazellulär HIV-bindende Bereiche enthalten, besteht die Gefahr, dass eine transduzierte Zelle anschließend mit HIV infiziert werden kann. Dieses Infektionsrisiko besteht vor allem bei CD4-Konstrukten, da CD4 der primäre HIV-Rezeptor ist und viele Zellen einen oder mehrere Ko-Rezeptoren in Abwesenheit von CD4 auf ihrer Oberfläche tragen. Um die Möglichkeit einer HIV Env-vermittelten Infektion zu überprüfen und für die Liganden DC-SIGN und 5-Helix auszuschließen, wurden HOS CXCR4 Zellen mit den chimären T-Zell-Rezeptoren transduziert und mit HIV Env und GFP exprimierenden FLY HIV-87-GFP Zellen koinkubiert. Die HOS CXCR4 Zellen tragen auf ihrer Oberfläche nur den Ko-Rezeptor CXCR4. Die zur Ko-Inkubation verwendeten FLY HIV-87-GFP Zellen exprimieren neben dem Markerprotein GFP ein HIV Hüllprotein, welches CXCR4 als Ko-Rezeptor verwendet. Die Bildung von grün fluoreszierenden, multinukleären Riesenzellen (Synzytien) bedeutet, dass eine Fusion der Fly Zellen mit HOS CXCR4 stattgefunden hat und somit das entsprechende Konstrukt als Eintrittsrezeptor für HIV dienen kann.

Retrovirale Vektorpartikel, die für die verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren codieren wurden durch transiente Transfektion von 293T Zellen erzeugt: Plasmide, die für das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämie Virus (pGaLV), MLV Gag/Pol (pHIT60) und die chimären T-Zell-Rezeptoren (pMP71-basierend) codieren wurden im Verhältnis 1:6:4 gemischt und mittels Kalzium-Phosphat + Chloroquine Transfektion, wie im Kapitel Methoden beschrieben, 293T Zellen transfiziert. Die Überstände wurden 48 Stunden nach der Transfektion geerntet und für die Transduktion von HOS CXCR4 Zellen verwendet. Weitere 48 Stunden später wurde zur Bestätigung der Expression der chimären Rezeptoren ein Teil der transduzierten HOS Zellen vor der Ko-Inkubation mittels FACS analysiert. Die Detektion der Rezeptoren erfolgte durch vorherige Inkubation mit anti-c-Myc und einem sekundären FITC-markiertem Antikörper.

Die Expression von DC-SIGN Lektin/zeta konnte auf 3,7% der Zellen gezeigt werden. DC-SIGN+Repeats/zeta war auf 25,1% der Zellen, CD4/zeta auf 8,6% und 5-Helix/zeta auf 25,2% der Zellen nachzuweisen (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 4.22 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Ko-Inkubation. Die Transduktion von HOS CXCR4 mit leerem Kontrollvektor diente als Negativkontrolle. Die Ko-Inkubation mit 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, die beide HIV Rezeptoren exprimieren diente als Positivkontrolle. Wie erwartet induziert nur das CD4 Konstrukt die Bildung von Synzytien (Pfeil); DC-SIGN und 5-Helix hingegen nicht (Abbildung 4.22).

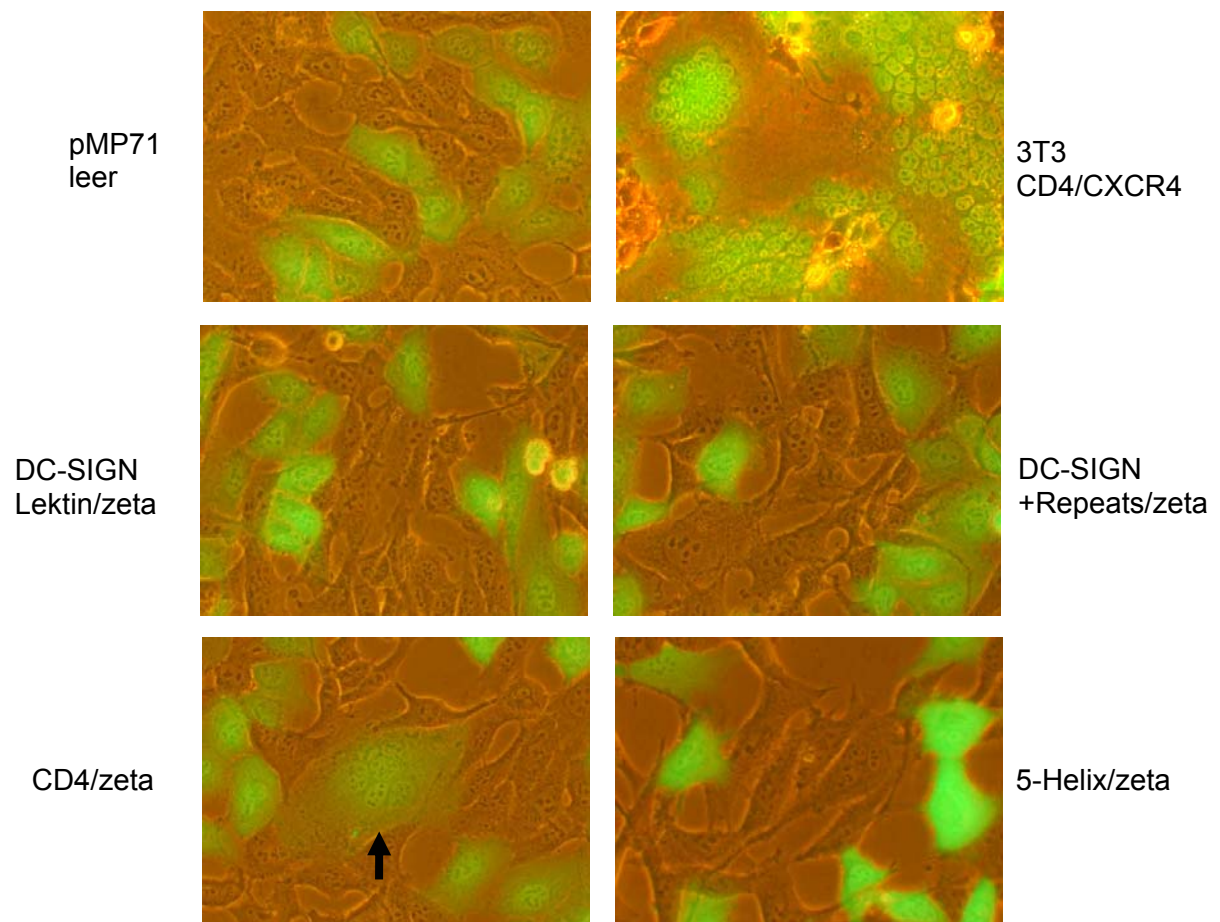


Abbildung 4.22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Ko-Inkubation von Fly HIV-87-GFP Verpackungszellen mit HOS CXCR4 Zellen, die mit den chimären T-Zell-Rezeptoren transduziert wurden. Durch die gleichzeitige Expression des HIV Korezeptors CXCR4 wurde überprüft, ob eines der Konstrukte als funktioneller Ersatz für den HIV Rezeptor CD4 dienen kann. Ist dies der Fall, kommt es zur Bildung grün fluoreszierender Syncytien. Die Ko-Inkubation mit 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, die beide HIV Rezeptoren exprimieren diente als Positivkontrolle.

4.1.10 Generierung HIV-spezifischer T-Zellen

Zur Untersuchung der funktionellen Aktivität von mit chimären T-Zell-Rezeptoren transduzierten Zellen wurden T-Zellen aus humanem Peripherblut isoliert und mit den verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren transduziert. Hierfür wurden jeweils 293T Zellen mit den Plasmiden für MLV gag/pol, das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämie Virus und den chimären T-Zell-Rezeptoren im pMP71 Vektor mittels Kalzium-Phosphat und Chloroquine transfiziert. Nach Ernte der Überstände erfolgte eine Anreicherung der Vektorpartikel und die Transduktion stimulierter T-Zellen.

Die Anreicherung der Vektorüberstände wurde notwendig, da sich T-Zellen deutlich schlechter als 293T Zellen transduzieren lassen. Tabelle 4.23 vergleicht die

durchschnittlichen Titer, in transduzierenden Einheiten pro Milliliter (t.E./ml), bei 293T Zellen und T-Zellen.

Konstrukt	Durchschnittlicher Titer mit 293T Zellen [t.E./ml]	Durchschnittlicher Titer mit T-Zellen [t.E./ml]
DC-SIGN Lektin/zeta	55.000	3.500
DC-SIGN+Repeats/zeta	25.000	1.000
CD4/zeta	15.000	800
5-Helix/zeta	30.000	1.000
GFP-Kontrolle	75.000	5.000

Tabelle 4.23: Unterschiede der Titer gleicher Vektorüberstände bei unterschiedlichen Zielzellen. GaLV pseudotypisierte retrovirale Vektoren wurden auf 293T bzw. primären T-Zellen getitert.

Es fällt bei diesen Zahlen auf, dass die retroviralen Vektoren mit T-Zellen nur etwa ein zwanzigstel des Titers haben, der auf 293T Zellen erreicht werden konnte. Auch schwankten die Titer zwischen verschiedenen transienten Transfektionen. Durch diese Problematik wurde es notwendig, die retroviralen Vektoren zu konzentrieren. Als geeignet erwies sich die Konzentration bei 3.600 Upm über Nacht bei 4°C. Hier konnte bei einer Volumenreduktion um Faktor 100 eine Erhöhung des Titers bis zu ca. Faktor 80 erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Abbildung 4.24 zeigt beispielhaft transduzierte T-Zellen nach anti-c-Myc-vermittelter Färbung auf Expression der chimären T-Zell-Rezeptoren. Alle Konstrukte konnten in T-Zellen exprimiert werden.

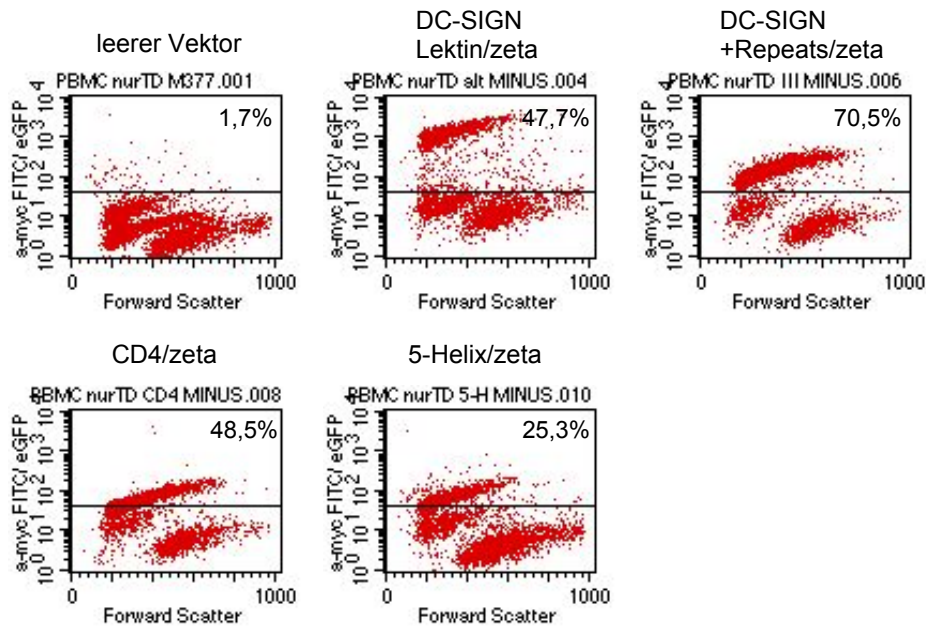


Abbildung 4.24: Transduktion von peripheren Blutlymphozyten (PBL) mit verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren. PBL wurden aus humanem Peripherblut gereinigt und 3 Tage mit anti-CD3- und anti-CD28-gekoppelten magnetischen Beads stimuliert, bevor sie mit angereicherten Überständen retroviraler Vektoren transduziert wurden. 48 h nach Transduktion erfolgte die Auswertung der Expression der chimären Rezeptoren mittels FACS-Analyse.

4.1.11 Induzierbar HIV Env-exprimierende Zielzellen

Zur weiteren Analyse der chimären T-Zell-Rezeptoren sollte die funktionale Auswirkung der Bindung an membranständiges HIV Hüllprotein in natürlicher Konformation untersucht werden. Dazu wurde die Zelllinie BJAB Env_i verwendet, die nach Induktion mit Dexamethason das HIV Hüllprotein Env produziert (Kruger et al., 1996). Zur Untersuchung der Expressionskinetik wurden die Zellen in mehreren Ansätzen jeweils für zwei Tage mit Dexamethason induziert und anschließend ohne Dexamethason weiter kultiviert. An den jeweiligen Tagen wurden die Zellen lysiert und HIV Env im Western Blot analysiert (Abbildung 4.25).

Bereits nach einem Tag Induktion ist das Vorläuferprotein gp160 von HIV Env detektierbar. An Tag 2 der Induktion wird die Bande noch stärker und das prozessierte gp120 erscheint als eine weitere, kleinere Bande auf der Höhe des 120 kDa Markers. Sobald Dexamethason aus dem Medium entfernt wird (ab Tag 3), lässt sich im Western Blot kein

Env mehr in den Zellen nachweisen. Für Experimente wurden BJAB Env_i 2 Tage mit Dexamethason induziert.

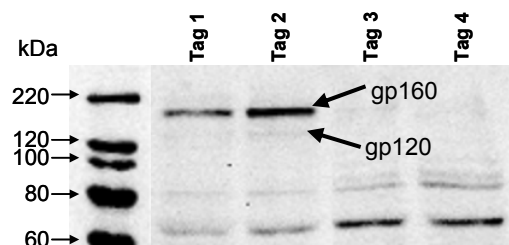


Abbildung 4.25: Western Blot Analyse der Induktion der HIV Env Expression in BJAB Env_i Zellen nach Zugabe von Dexamethason. 25nM Dexamethason wurde dem Medium an den Tagen 0 und 1 zugegeben. 24 und 48 Stunden nach der ersten Dexamethason-Zugabe wurden die Zellen gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

4.1.12 Analyse der Immunantwort transduzierter T-Zellen

Nach Bestätigung der in Kapitel 4.1.11 gezeigten Expression des HIV Hüllproteins auf BJAB Env_i Zellen und der Expression der chimären T-Zell-Rezeptoren auf T-Zellen, die aus humanem Peripherblut isoliert wurden, erfolgte die Untersuchung funktioneller Aktivität der T-Zellen. Hierfür wurden die mit den chimären Rezeptoren transduzierten T-Zellen mit induzierten bzw. uninduzierten BJAB Env_i Zellen in RPMI ohne Dexamethason oder Interleukin-2 (IL-2) ko-inkubiert. Zum Auslesen der Immunantwort wurde einerseits die Sekretion von IFN- γ ins Medium und andererseits die Veränderung des Anteils toter BJAB Env_i Zellen analysiert. IFN- γ ist ein Zytokin, das von zytotoxischen T-Zellen und T_H1-Zellen nach TCR:MHC-Interaktion freigesetzt wird. TCR:MHC-Interaktion führt außerdem bei zytotoxischen Zellen zur gerichteten Ausschüttung von Perforinen und Granzymen. Diese Zytotoxine können in ihre Zielzellen eindringen und Apoptose auslösen (Janeway, Charles A et al., 2001). Die Analyse toter Zielzellen zusammen mit IFN- γ Sekretion erlaubt eine gute Abschätzung der Immunantwort.

Induzierte (HIV Env-exprimierende) und uninduzierte (nicht HIV Env-exprimierende) BJAB Env_i Zellen wurden unmittelbar vor Beginn der Ko-Inkubation mit dem grünen Membranfarbstoff PKH67 gefärbt. Zur FACS-Analyse wurde zu den Zellen Propidiumiodid (PI) zugegeben. PI ist ein DNA-bindendes, fluoreszierendes Molekül, welches die intakte Zellmembran nicht durchdringen kann und deshalb nur tote Zellen – mit durchlässiger

Membran – anfärbt. Spezifische Lyse HIV Env-exprimierender Zellen konnte durch einen Anstieg der doppelt positiven Zellen (HIV Env exprimierende BJAB Env_i wurden grün gefärbt [=“grün-positiv“] und tote BJAB Env_i sind PI-positiv) ausgelesen werden. 24 Stunden nach Beginn der Ko-Inkubation wurde die zytotoxische Reaktion der transduzierten T-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht.

Abbildung 4.26 auf der folgenden Seite zeigt exemplarisch die Auswertung einer solchen Ko-Inkubation. Das Verhältnis der eingesetzten Effektorzellen (mit den chimären Rezeptoren transduzierte T-Zellen) zu BJAB Env_i Zielzellen betrug 5:1. Eine Lyse der HIV Env exprimierende BJAB Env_i Zellen konnte nicht gezeigt werden: der Anteil PI-positiver BJAB Env_i Zellen ist bei der Kontrolle mit leerem Vektor vergleichbar hoch, wie bei den verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren. Ein deutlicher Unterschied im Prozentsatz toter Zellen zwischen induzierten und uninduzierten BJAB Env_i Zellen konnte für keines der verschiedenen Konstrukte gezeigt werden.

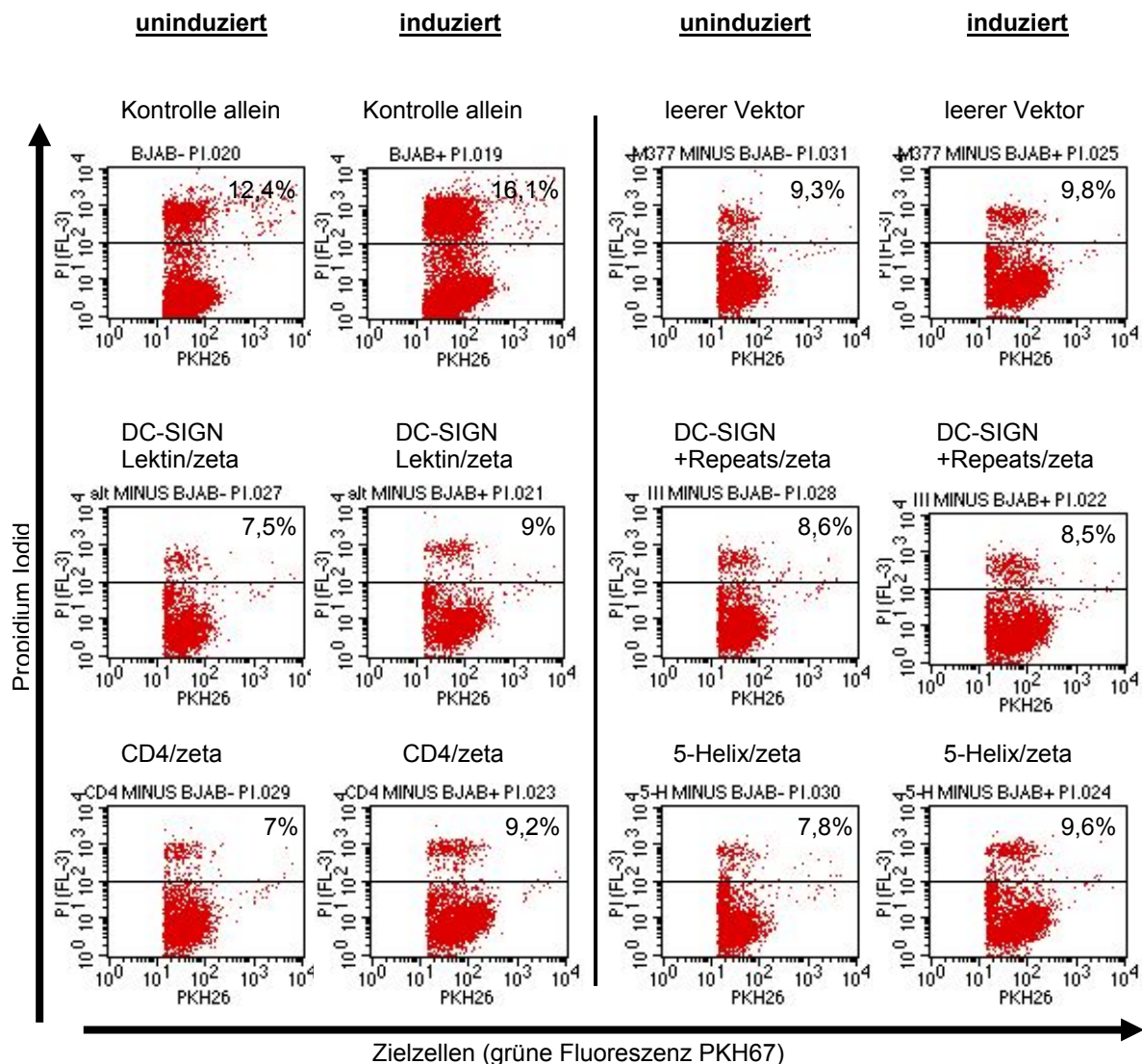


Abbildung 4.26: Ko-Inkubationsuntersuchung HIV Env exprimierender (induzierter) bzw. nicht-exprimierender (uninduzierter) Zielzellen mit chimären T-Zell-Rezeptoren exprimierender, transduzierter PBL. Ein Teil der Zielzellen wurde zwei Tage vor dem Experiment durch Zugabe von Dexamethason ins Zellkulturmedium zur Bildung von HIV Env auf der Oberfläche induziert. Vor Beginn des Experimentes wurden alle Zielzellen mit dem Membranfarbstoff PKH26 gefärbt. 16 Stunden nach Beginn der Ko-Inkubation wurden die Ansätze mit Propidium Iodid versetzt und im FACS analysiert. Zur Auswertung wurde ein Gate auf grün fluoreszierende Zellen gesetzt und diese auf den Anteil Propidium Iodid-positiver Zellen hin untersucht. Propidium Iodid färbt tote und spät-apoptotische Zellen und lässt einen Rückschluss auf die lytische Aktivität der chimären T-Zell-Rezeptoren zu.

Die aus peripherem Blut isolierten T-Zellen bestanden aus dem üblichen Verhältnis von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Da zytotoxische T-Zellen in der Regel das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen, wurden mit Hilfe eines Antikörper-Cocktails (RosetteSep CD8 T Cell Enrichment Cocktail, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada) CD8-positiv Zellen direkt aus Peripherblut isoliert. Die Anreicherung durch den Antikörper-Cocktail führte zu einem Anteil CD8-positiver Zellen auf über 80% (Abbildung 4.27).

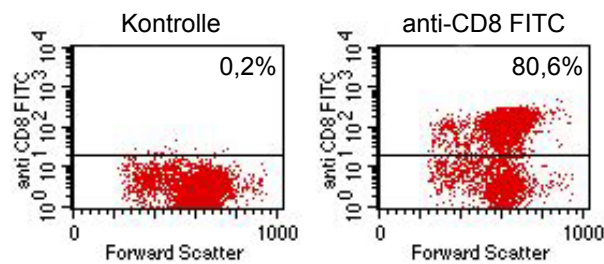


Abbildung 4.27: Bestätigung der Anreicherung CD8-positiver Zellen aus Blut mittels FACS-Analyse.

Diese wurden ebenfalls mit den chimären Rezeptoren transduziert und auf lytische Aktivität untersucht. Dabei konnte kein Unterschied zu den aus Blut isolierten gesamt T-Zellen gefunden werden.

Neben der lytischen Aktivität von T-Zellen ist die Ausschüttung des Zytokins Interferon-gamma (IFN- γ) ein charakteristisches Zeichen für die erfolgreiche Weiterleitung eines Signals vom T-Zell-Rezeptor. Daher sollte untersucht werden, ob es, unabhängig von der Lyse der Zielzellen, zur Ausschüttung von IFN- γ ins Zellkulturmedium kam. Für diesen Zweck wurden die CD8-positiven T-Zellen mit den chimären Rezeptoren transduziert und anschließend mit induzierten bzw. uninduzierten BJAB Env_i in RPMI ohne Dexamethasone oder Il-2 ko-inkubiert. Die ko-inkubierten Zellen wurden sedimentiert und das Medium mittels ELISA-Technik auf IFN- γ untersucht. Abbildung 4.28 zeigt ein typisches Ergebnis.

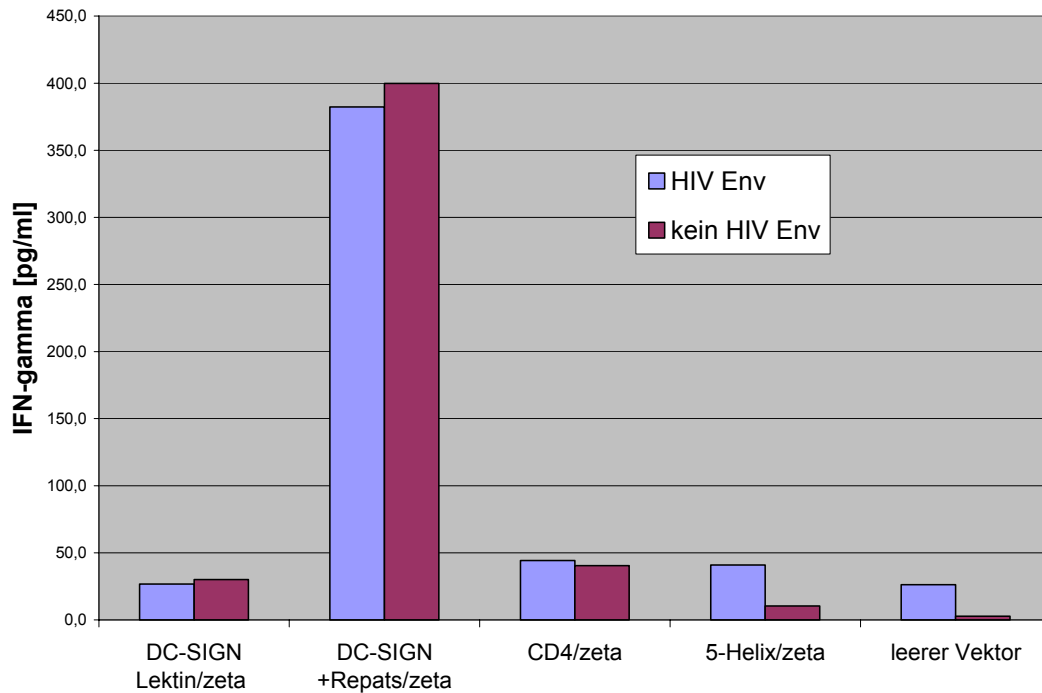


Abbildung 4.28: Bestimmung der der Interferon-gamma Menge im Zellkulturmedium nach 16-stündiger Ko-Inkubation mit BJAB Env_i Zellen. Die Mengen sind im Säulendiagramm dargestellt und für jedes der verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren ist die Freisetzung von IFN- γ in Gegenwart von induzierten (rot) und uninduzierten (blau) BJAB Env_i Zellen gezeigt.

Im Medium von Zellen, die mit DC-SIGN+Repeats/zeta transduziert wurden, sind große Mengen an IFN- γ , unabhängig von der Expression von HIV Env auf den Zielzellen, nachweisbar.

Bei den anderen Konstrukten kommt es nur zur Ausschüttung von sehr geringen Mengen an IFN- γ , die am unteren Ende der Sensitivität des ELISA liegen (12,5 pg/ml) und sich nicht stark zwischen der Ko-Inkubation mit induzierten oder uninduzierten Zielzellen unterscheiden.

Die Ausschüttung von IFN- γ durch DC-SIGN+Repeats/zeta transduzierte T-Zellen bestätigt die Fähigkeit der chimären Rezeptoren zur Signalweiterleitung. Dass es nur bei T-Zellen, die DC-SIGN+Repeats/zeta als Rezeptor trugen, zur Ausschüttung von IFN- γ kam, ist möglicherweise damit zu erklären, dass dieser Ligand – im Gegensatz zu DC-SIGN Lektin/zeta – zusätzlich über die Repeat-Region verfügt. Diese Sequenzwiederholungen wurden auch als Multimerisierungs-Region beschrieben (Mitchell et al., 2001). Daher ist es möglich, dass DC-SIGN+Repeats unabhängig von der Bindung an einen Liganden Multimere bildet, die zu einer konstitutiven Aktivierung des chimären T-Zell-Rezeptors führen. Deshalb wurde in einem weiteren Ansatz untersucht, ob es auch

zur Ausschüttung von IFN- γ durch DC-SIGN+Repeats/zeta transduzierte T-Zellen kommt, wenn keine anderen Zellen hinzugefügt werden. Dies konnte bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Eine konstitutive Aktivierung des T-Zell-Rezeptors birgt die Gefahr einer Transformation der Zellen. Daher wurde zunächst untersucht, ob DC-SIGN+Repeats/zeta transduzierte T-Zellen durch die Stimulation unkontrolliert weiter wachsen können. Dies war nicht der Fall: genau wie T-Zellen, die mit den anderen chimären Rezeptoren transduziert wurden, wuchsen sie drei Tage (nach Entfernung der CD3/CD28 Beads) traubenförmig, bevor ab Tag 4, trotz Vorhandensein von Il-2 im Zellkulturmedium, kein weiteres Wachstum mehr beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Da möglicherweise T-Zellen aus gesunden Patienten nicht hinreichend sensitiv für eine Transformation durch DC-SIGN+Repeats/zeta sind, wurde das Transformationspotential in einer Zelllinie untersucht.

4.1.13 DC-SIGN+Repeats/zeta transformiert NK-Zellen nicht zu Il-2-unabhängigem Wachstum

Für die Untersuchung des Transformationspotentials von DC-SIGN+Repeats/zeta wurde die humane NK-Zelllinie NK-92 verwendet. Die Verwendung dieser Zelllinie sollte ein recht sensitiver Test sein, da diese Zellen bereits immortalisiert, allerdings in ihrem Wachstum von der Anwesenheit von Interleukin 2 (Il-2) abhängig sind. Vor allem bei T-Zellen führt die Stimulation des T-Zell-Rezeptors zur Ausschüttung von IFN- γ und Il-2. Abbildung 4.29 stellt die Änderung der Zellzahl von mit DC-SIGN+Repeats/zeta bzw. DC-SIGN+Repeats/zeta + CD8-hinge transduzierten NK-92 über die Zeit dar. Es wurden 2×10^5 Zellen in 1 ml X-Vivo 10-Medium (mit humanem Serum, aber ohne Il-2) an Tag 0 ausgesät. Jeden Tag erfolgte die Bestimmung der Zahl lebender Zellen unter Verwendung einer Neubauer-Kammer und Trypanblau (Trypanblau-Ausschlussverfahren). Eine Abnahme der Zahl lebendiger Zellen ist gut erkennbar, d.h. trotz kontinuierlicher Stimulation durch den chimären T-Zell-Rezeptor, kommt es nicht zu einem Il-2-unabhängigen Wachstum der NK-92 Zellen.

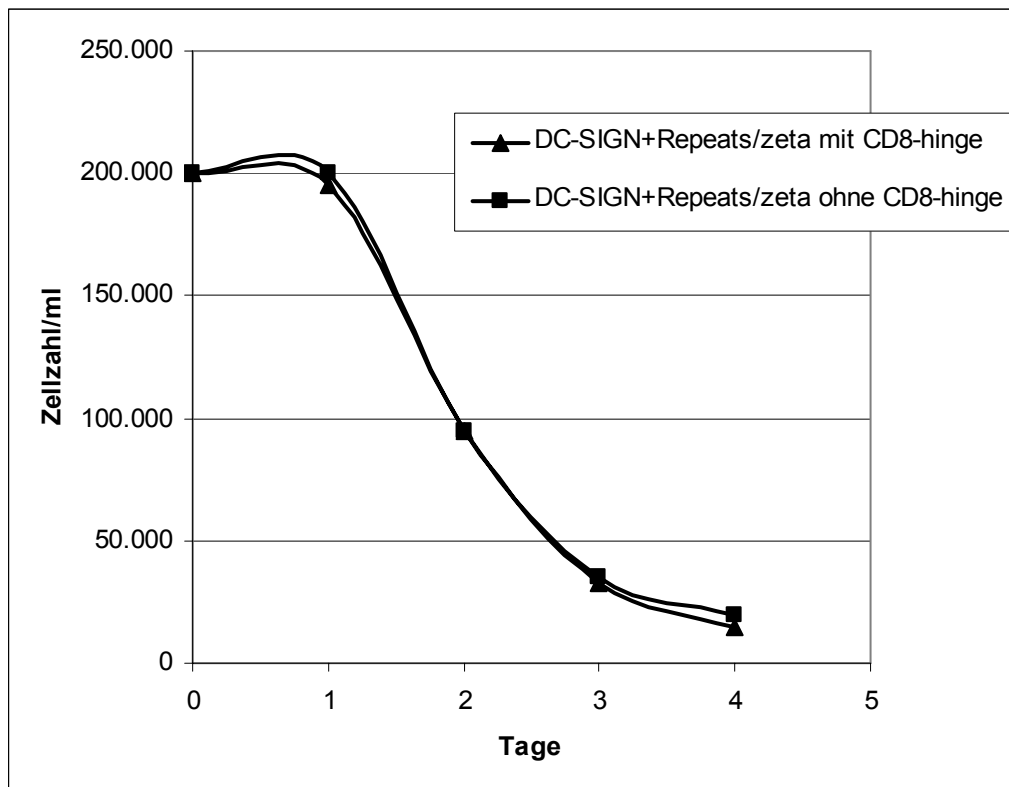


Abbildung 4.29: Wachstumskurve DC-SIGN+Repeats/zeta transduzierter NK-92 Zellen in Medium ohne Interleukin-2. An Tag 0 wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und die Zahl der lebenden Zellen täglich bestimmt.

4.1.14 Analyse der Immunantwort transduzierter NK-Zellen

Auf Grund der zeitlich limitierten Aktivität und des Wachstums primärer T-Zellen wurden Zellen der NK-Zelllinie NK-92 ebenfalls mit den chimären Rezeptoren transduziert. Diese Zellen konnten durch an magnetische Beads gekoppelten, gegen das c-Myc Epitop gerichteten, Antikörpern (MACS) angereichert werden. Mit diesen Zellen sollten daraufhin die mit den primären T-Zellen durchgeführten Experimente zur spezifischen Lyse HIV Env-exprimierender Zellen wiederholt und überprüft werden. Die Ausschüttung von IFN- γ wurde nicht durchgeführt, da die NK-Zelllinie NK-92 dieses Zytokin auch unabhängig von der Anwesenheit anderer Zellen sekretiert (T. Tonn, persönliche Kommunikation).

Retrovirale Vektoren, die für die verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren codieren, wurden, wie im Kapitel 4.1.10 beschrieben, durch Transfektion von 293T Zellen mit den Plasmiden für MLV gag/pol, das Hüllprotein des Gibbonaffen Leukämie Virus und den chimären T-Zell-Rezeptoren im pMP71 Vektor mittels Kalzium-Phosphat und Chloroquine

transfiziert. Nach Ernte der Überstände erfolgte eine Anreicherung der Vektorpartikel und die Transduktion der NK-92 Zellen. Da es sich bei NK-92 um eine kontinuierlich wachsende Zelllinie handelt, wurden die Zellen nach der Transduktion expandiert und mittels MACS angereichert. Die Anreicherung erfolgte durch Inkubation mit dem gegen das c-Myc Epitop in den chimären Rezeptoren gerichteten Antikörper 9E10 und anschließender Inkubation mit anti-Maus Antikörper-gekoppelten magnetischen Beads. Eine, sich in einem Magnetfeld befindliche Säule, hielt die Zellen, die magnetische Beads gebunden hatten auf. Durch Entfernung des Magnetfeldes konnten angereicherte Zellen in frisches Medium eluiert werden.

Die MACS-sortierten Zellen wurden mit HIV Env-exprimierenden Zielzellen, BJAB Env_i und Fly GFP-TK, für 4 Stunden ko-inkubiert. Parallel wurde der Anteil transduzierter Zellen durch Färbung mit anti-c-Myc und sekundärem, FITC-markiertem Antikörper ermittelt. Dieser lag für Lektin/zeta bei 65,4%, für DC-SIGN+Repeats bei 1,6%, für CD4/zeta bei 4,4% und für 5-Helix/zeta bei 22,6%. Bei früheren Anreicherungen fiel auf, dass der Anteil der Zellen mit chimären Rezeptoren über die Zeit wieder abnahm (Daten nicht gezeigt). Die Inkubation der angereicherten NK-Zellen mit HIV Env-exprimierenden Zielzellen erfolgte im Verhältnis 5:1, der Anteil toter Zielzellen wurde durch Färbung mit Propidiumiodid ermittelt. Tabelle 4.30 fasst die Ergebnisse der Ko-Inkubation zusammen. Der Anteil toter HIV Env-exprimierender Zellen bzw. der nicht-exprimierenden Kontrollzellen vor Beginn der Ko-Inkubation ist in der Tabelle nicht aufgeführt, lag aber bei allen Zelllinien deutlich unter 3%.

% tote Zielzellen	Fly HIV-87 (kein HIV Env)	Fly GFP-TK (HIV Env)	BJAB Env _i uninduziert	BJAB Env _i induziert
NK-92 wt	2,7	3,2	22,7	18,9
NK-92 Lektin/zeta	5,4	9,3	33,4	25,9
NK-92 Lektin+Repeats/zeta	3,8	7,3	50,2	37,2
NK-92 CD4/zeta	2,7	12,5	50,9	40,3
NK-92 5-Helix/zeta	3,2	8,3	41,9	44,1

Tabelle 4.30: Spezifische Lyse HIV Env-exprimierender Zielzellen durch mit chimären T-Zell-Rezeptoren ausgestattete NK-92 Zellen. Angereicherte NK-92 Zellen wurden 4 Stunden mit HIV Env-exprimierenden Zielzellen ko-inkubiert und die lytische Aktivität der NK-92 Effektorzellen durch Zugabe von Propidium Iodid analysiert. Propidium Iodid bindet an die DNA von toten Zellen, deren Membran permeabel geworden ist.

Aus der Tabelle 4.30 ist erkennbar, dass eine deutliche Diskrepanz zwischen der Lyse von induzierbar HIV Env-exprimierenden BJAB Env_i Zellen und der Verpackungszelllinie Fly GFP-TK (bzw. der nicht HIV Env-exprimierenden Parentalzelllinie Fly HIV-87) besteht. Während bei BJAB Env_i Zellen keine spezifische Lyse beobachtet werden konnte, wurden

Fly GFP-TK Zellen von allen, mit chimären T-Zell-Rezeptoren ausgestattet, NK Zellen lysiert. Eine spezifisch durch die chimären Rezeptoren vermittelte lytische Aktivität der NK Zellen konnte somit gezeigt werden.

4.2 Das kutane T-Zell Lymphom

Nachdem im ersten Abschnitt der Arbeit das Hüllprotein von HIV als Zielstruktur für eine HIV-Therapie mit chimären T-Zell-Rezeptoren verwendet wurde, sollte im zweiten Abschnitt das Hüllprotein Env als therapeutisches Gen dienen. Der therapeutische Effekt von HIV Env besteht in der Fähigkeit die Fusion zweier Membranen zu induzieren. Als Zielzellen für die Therapie wurden Zellen des kutanen T-Zell Lymphoms gewählt. Das kutane T-Zell Lymphom entsteht durch unbegrenztes Wachstum CD4-positiver T-Zellen unter der Haut. Dies ermöglicht u.a. eine Behandlung des Tumors durch Injektion von viralen Partikeln, die spezifisch in CD4-positive Zellen einzudringen vermögen. Zur Behandlung dieses Tumors wurden MLV-basierende retrovirale Vektoren mit dem Hüllprotein von HIV versehen. Eine detaillierte Beschreibung des Genomaufbaus befindet sich im Kapitel 1.5. Als therapeutisches Gen wurde die Variante 89.6P des HIV Hüllproteins verwendet. Dieses Hüllprotein ist sehr fusogen (Etemad-Moghadam et al., 2001), d.h. es bildet sehr leicht große Synzytien (nicht lebensfähige Riesenzellen). Eine Codon-optimierte DNA dieses Proteins wurde freundlicherweise von R. Wagner (Regensburg) zur Verfügung gestellt. Durch die Codon-Optimierung wurde der Anteil der Basen Adenosin und Thymin reduziert, da dadurch die mRNA dieses Hüllproteins unabhängig von dem akzessorischen HIV-Protein Rev aus dem Kern transportiert werden kann.

4.2.1 Etablierung eines Maus-Modells

Zur Untersuchung des therapeutischen Effekts wurde ein Maus Xenotransplantationsmodell für das kutane T-Zell Lymphom etabliert (Thaler et al., 2004). Hierfür wurde die kutane T-Zell Lymphom Zelllinie MyLa athymischen Nacktmäusen (HsdCpb: NMRI Foxn1^{nu}) subkutan injiziert. An den Injektionsstellen bildeten sich solide Tumoren, die als Tumorfragmente auf weitere Nacktmäuse transplantiert wurden. In Abbildung 4.31 ist beispielhaft eine Tumor-tragende Nacktmaus gezeigt. Die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Tumoren an beiden Flanken der Maus.

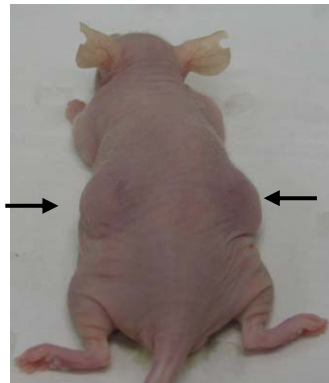


Abbildung 4.31: Foto einer Nacktmaus mit einem Tumor an jeder Flanke. Die schwarzen Pfeile zeigen auf die Tumoren.

Zur Bestätigung eines vergleichbaren Wachstums der transplantierten Tumoren, wurde einer Reihe von Nacktmäusen jeweils ein etwa 2x2 mm bis 3x5 mm großes Tumorfsegment an beiden Flanken unter die Haut transplantiert. Nach etwa 2 Wochen konnte festgestellt werden, welche Fragmente angewachsen waren. Das Wachstum der sich etablierenden Tumoren wurde jeweils einzeln über einen Zeitraum von 3 Wochen ermittelt. Abbildung 4.32 zeigt dieses Wachstum jeweils in Prozent, relativ zur Größe des Tumors 2 Wochen nach der Transplantation. Eine Darstellung des relativen Wachstums ist beim Vergleich transplantierte Tumoren notwendig, da schon die Größe der transplantierten Tumorfsegmente voneinander abweicht.

Mit Ausnahme von je zwei nach oben bzw. nach unten Abweichenden Kurven, ist ein gleichmäßiges Wachstum der Tumoren gut sichtbar. Die nach unten abweichenden Tumoren wuchsen auf der gleichen Maus, während die nach oben abweichenden Tumoren bei zwei verschiedenen Mäusen gemessen wurden.

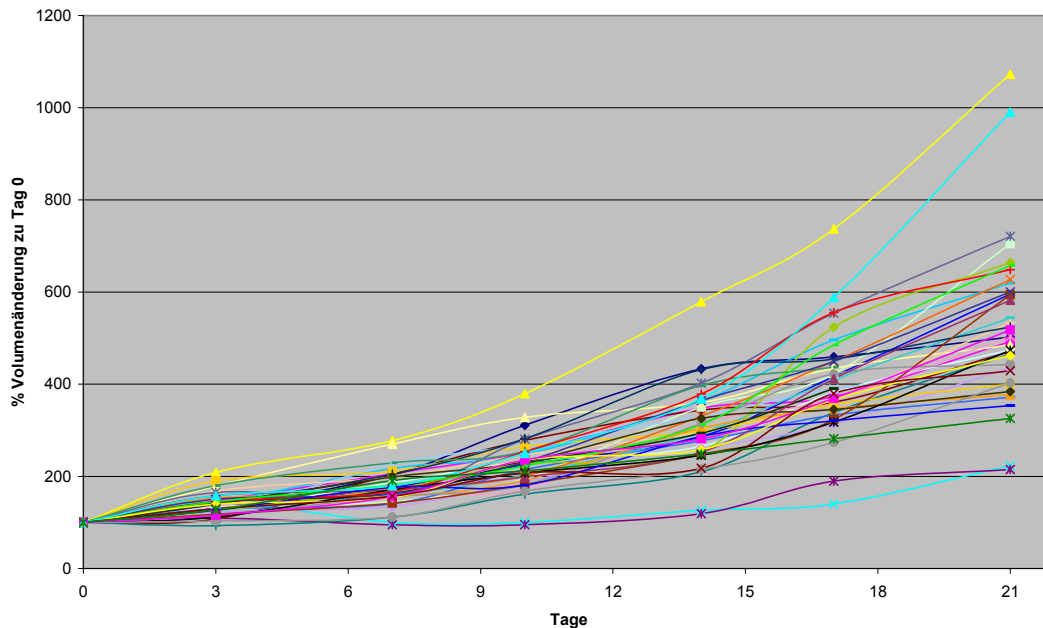


Abbildung 4.32: Wachstum einzelner Tumoren auf Nacktmäusen. Jede Kurve entspricht einem Tumor.

Bei Therapieversuchen mit retroviral verpackter *Herpes simplex* Thymidinkinase und Gancyclovirgabe (Wirkungsweise von Gancyclovir: siehe Kapitel 1.6.1) konnte gezeigt werden, dass es zu einer transienten Verlangsamung des Tumorwachstums kommt, anschließend die Tumoren jedoch wieder an Größe zunehmen (Thaler et al., 2003). Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass auf Grund nicht vorhandener Gap-junctions, Verbindungskanälen zwischen Zellen, das aktivierte Medikament Gancyclovir-Monophosphat nicht in benachbarte, nicht-infizierte Zellen weitergegeben werden kann. So werden nur die Tumorzellen abgetötet, die vorher mit den Thymidinkinase-Vektoren transduziert wurden. Daher sollte nun untersucht werden, ob durch die Verwendung von anderen therapeutischen Genen ein Einfluss auf untransduzierten Nachbarzellen (engl. *bystander effect*) ermöglicht werden kann. Von einigen viralen Hüllproteinen, auch von HIV Env, ist bekannt, dass ihre Expression auf der Zellmembran zur Fusion mit Nachbarzellen führen kann. Meist sind mehrere Zellen in die Fusion involviert, so dass es zur Bildung nicht lebensfähiger, vielkerniger Riesenzellen, den so genannten Synzytien, kommt.

Zur Erhöhung der Behandlungseffizienz wurden die unten beschriebenen Vektorpartikel generiert, die die codon-optimierte Version des HIV Hüllproteins 89.6P (Reimann et al., 1996) verpacken. Die Expression dieses HIV Hüllproteins führt zu einer ausgeprägten Synzytienbildung, dargestellt in den Abbildungen 4.40 und 4.41. Durch die Verwendung

retroviraler Partikel, die das HIV Hüllprotein 89.6P als therapeutisches Gen verpacken, sollen transduzierte Tumorzellen mit untransduzierten Nachbarzellen fusionieren, d.h. einen *bystander effect* ermöglichen.

4.2.2 Generierung der Verpackungszelllinie Fly syn Env

Das Plasmid pczCFG5 IEGZ syn 89.6P, mit dem die Verpackungszelllinie Fly syn Env generiert wurde, codiert einerseits für das notwendige Hüllprotein, um pseudotypisierte Vektoren zu generieren und ist gleichzeitig als RNA ein verpackbares retrovirales Genom. Von diesem kann dann wiederum in den entsprechenden Zielzellen das therapeutische Gen HIV *env* in Protein translatiert werden.

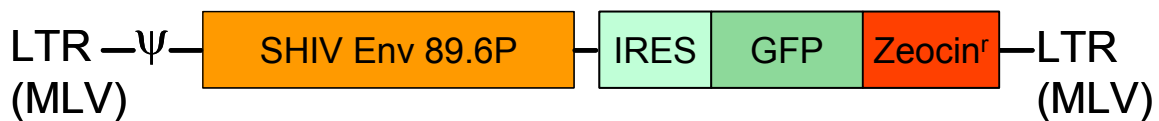


Abbildung 4.33: Schematischer Aufbau des syn Env Vektorgenoms. Zwischen den MLV LTRs befindet sich das Verpackungssignal und die Sequenz für das Hüllprotein 89.6P gefolgt von einer IRES-Sequenz, die die Expression eines Fusionsproteins von GFP und der Resistenz gegen Zeocin ermöglicht.

Weiterhin ist die transkribierte RNA von pczCFG5 IEGZ syn 89.6P ein so genannter bicistronischer Vektor, d.h. sie enthält neben der „normalen“, 5'-Cap vermittelten, eine weitere, interne, Ribosomenbindungsstelle (IRES, engl. *internal ribosome entry site*) aus dem Enzephalomyocarditis Virus. Durch diese IRES-Sequenz können Ribosomen ein, hinter der IRES-Sequenz gelegenes, Gen auf der gleichen mRNA translatieren. In diesem Fall befindet sich nach der IRES-Sequenz ein Fusionskonstrukt aus GFP und dem *Sh ble* Gen (Bleomycinresistenzgen aus *Streptoalloteichus hindustanus*), welches auch die Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin vermittelt.

Um große Mengen syn Env pseudotypisierter MLV Vektoren zu erhalten, wurde das Plasmid pczCFG5 IEGZ syn 89.6P (Abbildung 4.33) in MLV gag/pol exprimierende Fly HIV-87 Zellen transfiziert und mit Zeocin solange selektioniert, bis alle noch lebenden Zellen GFP exprimierten (Abbildung 4.34).

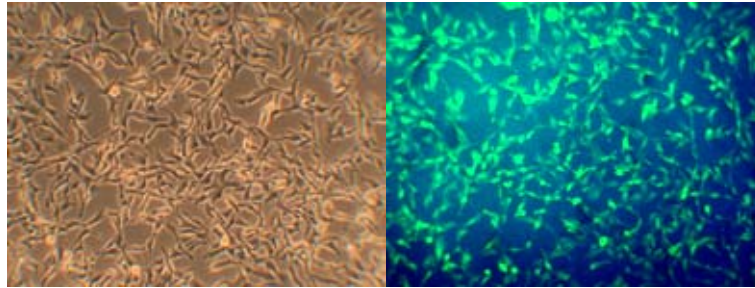


Abbildung 4.34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Verpackungszelllinie Fly syn Env. Alle im Durchlicht (links) sichtbaren Zellen exprimieren auch GFP (rechts).

In Abbildung 4.35 ist die GFP-Expression der so generierten Zelllinie Fly syn Env mit der, der parentalen Zelllinie Fly HIV-87 als FACS-Analyse verglichen. Mehr als 98% der Zellen exprimieren GFP. Der größte Teil der Zellen ist als deutliche Wolke mit einheitlicher Fluoreszenz erkennbar.

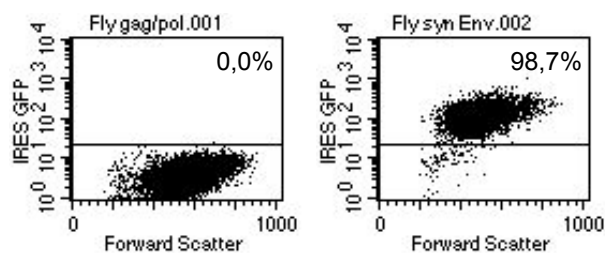


Abbildung 4.35: FACS-Analyse der Fly syn Env Zellen auf GFP-Expression im Vergleich zur parentalen Zelllinie Fly HIV-87 (benannt als Fly gag/pol).

Durch die parallele Expression von GFP dieser Vektorpartikel konnte der virale Titer durch FACS-Analyse bestimmt werden. Er betrug 2×10^5 /ml auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen.

4.2.3 *Trans*-Infektion von retroviralen Partikeln durch DC-SIGN

Für eine effiziente Behandlung von Tumoren ist es notwendig, dass möglichst viele virale Partikel den Tumor erreichen. Daher sollte untersucht werden, ob es, neben einer physikalischen Anreicherung durch Volumenreduktion, weitere Möglichkeiten gibt, den

Transfer von retroviralen Vektoren auf Zielzellen zu erhöhen. Geijtenbeek *et al.* beschreiben, dass selbst geringste Mengen an HI-Viren, die - direkt zu T-Zellen gegeben - nicht für eine Infektion ausreichend sind, durch die Expression von DC-SIGN auf THP Zellen „angereichert“ werden können und eine anschließende Ko-Inkubation mit Zielzellen wieder zur Infektion dieser Zielzellen führt (Geijtenbeek *et al.*, 2000b). Weiterhin stellten sie fest, dass DC-SIGN exprimierende THP Zellen HIV Partikel aufnehmen und sie auch nach bis zu 4 Tagen Inkubation in Zellkultur bei Kontakt mit T-Zellen wieder abgeben können. Es sollte untersucht werden, ob dieses System auch mit anderen Zellen und retroviralen Vektoren funktioniert. Als DC-SIGN-exprimierende Zellen wurden die Zelllinien K562 DC-SIGN bzw. K562 DC-SIGN V351G (siehe Kapitel 4.1.1) gewählt und mit THP DC-SIGN Zellen verglichen. Als retrovirale Vektoren wurden GFP codierenden Partikel aus Zellkulturüberständen von Fly HIV-87-GFP Zellen verwendet. Diese codieren ausschließlich GFP und ermöglichen eine quantifizierbare Anreicherung, da sie keinen weiteren zytotoxischen Effekt, wie *syn* Env-Überstände, verursachen. NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen dienen bei diesen Experimenten als Zielzellen. Sie tragen, wie auch MyLa Zellen, die, für eine Transduktion mit den verwendeten MLV/HIV pseudotypisierten Vektoren nötigen, Oberflächenmoleküle CD4 und CXCR4. Sie sind auch leichter zu handhaben, da sie adhärent wachsen und für die Transduktion keine vorherige Retronectin-Behandlung der Zellkulturgefäße notwendig ist.

Zunächst wurde die Fähigkeit der Zellen untersucht, retrovirale Partikel auf Zielzellen zu übertragen. Dafür wurden THP DC-SIGN wt Zellen oder K562 mit und ohne DC-SIGN mit 2 ml für GFP codierenden retroviraler Partikel (Zellkulturüberstände von Fly HIV-87-GFP Zellen) inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen gemeinsam mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und so auch die als Suspensionszellen wachsenden K562 und THP entfernt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die 3T3X4 Zellen abgelöst und die retrovirale Transduktion durch Messung der Zahl GFP-positiver Zellen im FACS bestimmt.

Wie erwartet, konnten mit retroviralen Vektorpartikeln beladene THP DC-SIGN wt Zellen, NIH3T3 CD4/CXCR4 Zielzellen transduzieren (Abbildung 4.36 a). Diese *trans*-Infektion ist durch die Zugabe des Polysaccharids Mannan reduzierbar: von 2,4% ohne Mannan auf den Bereich des Hintergrundes von jeweils 0,6% bei 50 µg/ml und 100 µg/ml Mannan (Abbildung 4.36 b+c). In den Abbildungen 4.36 d-f wurden retroviralen Vektorpartikeln beladene K562 Zellen ohne und mit DC-SIGN zur Transduktion von NIH3T3 CD4/CXCR4 Zielzellen verwendet. Hier ist erkennbar, dass auch schon ohne Zugabe von Mannan

durch K562 Zellen praktisch keine retroviralen Vektoren übertragen wurden. Der Anteil grün-fluoreszierender Zellen lag bei allen drei K562 Zelllinien mit 0,1% - 0,6% auf Hintergrundniveau.

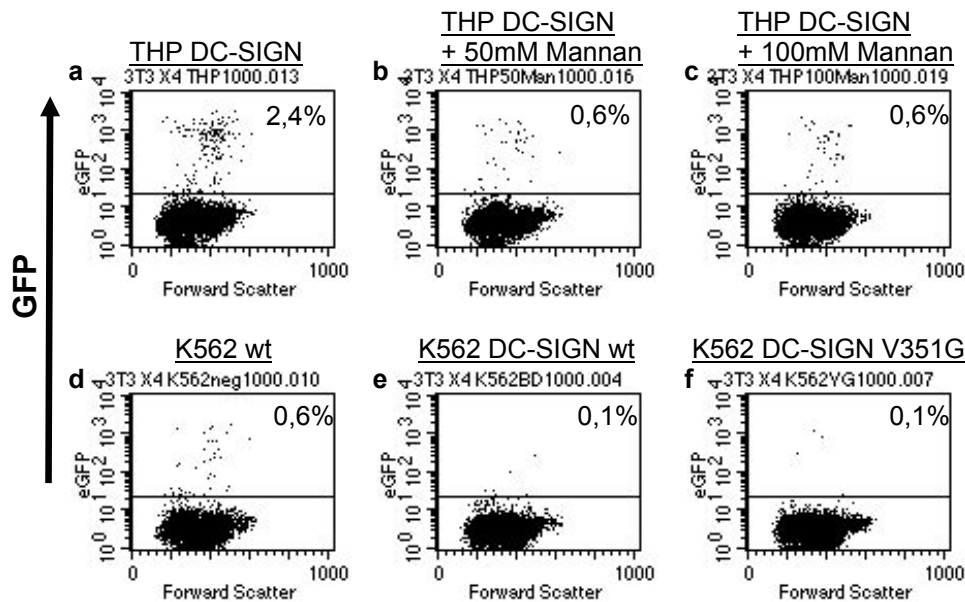


Abbildung 4.36: Trans-Infektion GFP-codierender retroviraler Partikel durch DC-SIGN-exprimierende Zellen. (a-c) THP DC-SIGN wt wurden mit GFP-codierenden Partikeln unter Zugabe von 0 mM, 50 mM oder 100 mM Mannan beladen und 24h mit NIH3T3 CD4/CXCR4 kokultiviert. (d-f) K562 wt, K562 DC-SIGN wt oder K562 DC-SIGN V351G wt wurden mit GFP-codierenden Partikeln beladen und 24h mit NIH3T3 CD4/CXCR4 kokultiviert. Der Prozentsatz GFP-transduzierter Zellen ist in den Dot Plots angegeben.

Obwohl für gp120-gekoppelte Beads eine Bindung an DC-SIGN-exprimierende K562 Zellen nachweisbar war (Abbildung 4.2), gelang mit diesen Zellen, im Gegensatz zu THP DC-SIGN Zellen, keine Übertragung von retroviralen Partikeln auf Zielzellen. Es besteht also offensichtlich eine zelltypspezifische Diskrepanz in der Übertragung retroviraler Vektoren durch verschiedene DC-SIGN exprimierende Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs.

Als nächstes wurde untersucht, ob DC-SIGN auf THP Zellen bei kurzer Inkubationszeit retrovirale Vektoren zumindest anreichern und damit den Titer einer gegebenen Menge retroviralen Überstands steigern kann. Dafür wurden DC-SIGN exprimierenden THP Zellen wieder wie oben beschrieben für vier Stunden mit Zellkulturüberständen von Fly HIV-87-GFP Zellen inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen gemeinsam mit NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen kultiviert.

Für das Experiment wurden 5×10^5 THP wt oder THP DC-SIGN Zellen in 5 ml Vektorüberstand inkubiert. D.h. jede Zelle konnte rechnerisch mindestens 1 Vektorpartikel binden. Nach 4 Stunden wurden sie in PBS gewaschen und 1×10^5 Zellen mit 1×10^5 NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen ko-inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und so auch die als Suspensionszellen wachsenden THP entfernt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die 3T3X4 Zellen abgelöst und im FACS analysiert (Abbildung 4.37).

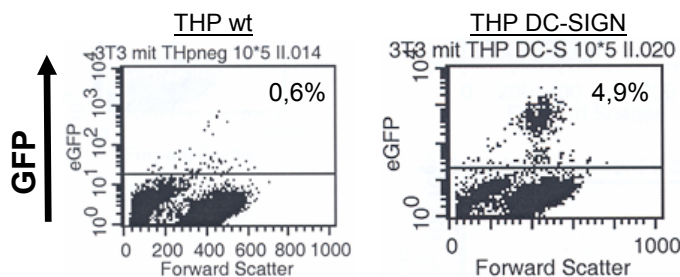


Abbildung 4.37: Trans-Infektion von NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit Überständen von Fly HIV-87-GFP Zellen durch DC-SIGN exprimierende THP Zellen. Parentale oder DC-SIGN wt THP Zellen wurden wie im Text beschrieben mit GFP-transduzierenden Überständen von Fly HIV-87-GFP Zellen inkubiert, gewaschen und mit CD4 und CXCR4 exprimierenden NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen ko-inkubiert. Nach 48 h bei 37°C wurden NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen mittels FACS-Analyse auf GFP-Expression untersucht.

Aus den FACS-Daten in Abbildung 4.37 ist wiederum ersichtlich, dass DC-SIGN-exprimierende THP Zellen retrovirale Partikel binden und Zielzellen *in trans* infizieren können. Allerdings konnten durch THP nur weniger als 5% der Partikel übertragen werden, auch bei niedrigeren Zellzahlen (10^4 THP Zellen mit 10^5 NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen) wurden ebenfalls nur etwa 5% der möglichen Partikel übertragen (Daten nicht gezeigt).

Unsere Annahmen, durch die kurzzeitige Inkubation von retroviralen Vektoren mit DC-SIGN auf der Oberfläche von Zellen, eine Anreicherung retroviraler Vektorpartikel zu erreichen, konnten durch dieses Experiment nicht bestätigt werden. Vielmehr gehen etwa 95% der möglichen Ausgangspartikel verloren.

4.2.4 Stabilisierung von retroviralen Partikeln durch lösliches DC-SIGN

Nach der Feststellung, dass membranständiges DC-SIGN nicht mit allen Zellen und nicht sehr effizient zur Anreicherung retroviraler Partikel verwendet werden kann, sollte untersucht werden, ob die *trans*-Infektion durch DC-SIGN-exprimierende Zellen und die beschriebene Stabilisierung von Retroviren durch DC-SIGN zwei unabhängige Mechanismen sind und ob für die Stabilisierung der Vektoren die Verwendung von löslichem DC-SIGN ausreichend ist. Eine Stabilisierung könnte eine bessere Effizienz der physikalischen Anreicherung erlauben.

Als Zwischenschritt der Generierung chimärer T-Zell-Rezeptoren wurden bereits Plasmide mit der extrazellulären Domäne von DC-SIGN und einem Sekretionssignal angefertigt: pSecTag DC-SIGN Lektin und pSecTag DC-SIGN+Repeats (vergleiche Abbildung 4.13 im Kapitel 4.1.3.2). Die Lektindomäne alleine (aa 253-404) hat unglykosyliert eine Masse von 16,6 kDa und die gesamte extrazelluläre Region (aa 64-404) hat unglykosyliert eine Masse von 37,4 kDa.

Für die Sekretion der beiden DC-SIGN Proteine ins Zellkulturmedium wurde das 5' der *Sfi*I Schnittstelle im pSecTag Vektor gelegene Sekretionssignal der Immunglobulin kappa Kette genutzt. Die Reinigung der löslichen Proteine erfolgte mittels einer 6x Histidin-Sequenz am N-Terminus und Nickel-Agarose mit steigenden Konzentrationen von Imidazol, einem Histidin-Analogen. Durch ein c-Myc Epitop, ebenfalls am N-Terminus, konnte lösliches Protein im Western Blot detektiert werden (Abbildung 4.38). Sowohl die 6x Histidin-Region, wie auch das c-Myc-Epitop waren bereits im Plasmid vorhanden. Die Durchgängigkeit des Leserasters wurde durch DNA-Sequenzierung sichergestellt.

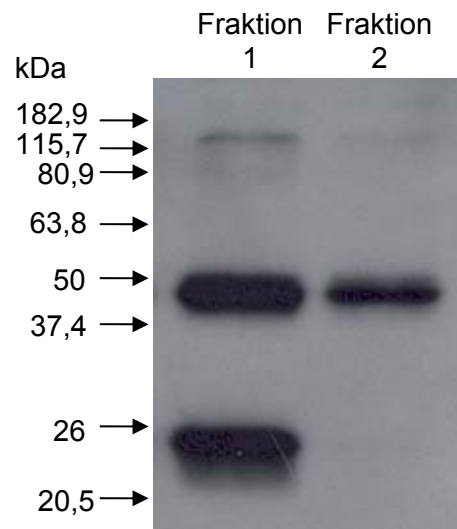


Abbildung 4.38: Western Blot Analyse der Reinigungsfractionen von löslichem DC-SIGN+Repeats. Die Reinigung erfolgte über Nickel-Agarose, die Detektion mit einem Antikörper gegen c-myc. Fraktion 1 entspricht einer Imidazolkonzentration von 50 mM, Fraktion 2 entspricht 100 mM.

Eine Abschätzung der eluierten Proteinmengen mittels Coomassie-Färbung ergab eine Menge von ca. 1 μg / 30 μl des glykosylierten Proteins aus Fraktion 1 und ca. 0,5 μg / 30 μl des Proteins aus Fraktion 2. In Fraktion 1 ist zusätzlich noch ein Abbauprodukt des Proteins zu erkennen. Eine Sequenzanalyse ergab eine Protease-Schnittstelle, die ein ca. 25 kDa Fragment des N-Terminus erzeugt. In diesem Fragment bleibt das c-myc Detektionsepitop erhalten und kann deshalb im Western Blot detektiert werden.

Die unten gezeigten Ergebnisse wurden unter Verwendung der gesamten extrazellulären Domäne von DC-SIGN (DC-SIGN+Repeats) erstellt, konnten aber auch mit der Lektindomäne allein reproduziert werden.

Zur Bestimmung eines stabilisierenden Einflusses von DC-SIGN auf retrovirale Vektoren wurden GFP-codierende Überstände von Fly HIV-87-GFP Zellen mit und ohne lösliches DC-SIGN+Repeats für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit diesen Vektoren transduziert. 48 Stunden später erfolgte eine Titerbestimmung (Tabelle 4.39).

Titerung ohne Inkubation	5×10^5
3h 37°C ohne DC-SIGN	$2,4 \times 10^5$
3h 37°C mit 1µg DC-SIGN+Repeats aus Fraktion 2	$2,6 \times 10^5$

Tabelle 4.39: Überprüfung stabilisierender Eigenschaften von löslichem DC-SIGN auf retrovirale Vektoren.

Durch 3-stündige Inkubation bei 37°C wurde der Titer der retroviralen Vektoren von 5×10^5 auf $2,4 \times 10^5$ reduziert. Die Zugabe von löslichem DC-SIGN hatte darauf keinen Einfluss: der Titer sank ebenfalls auf $2,6 \times 10^5$. Eine Stabilisierung von retroviralen Vektoren durch Zugabe von löslichem DC-SIGN konnte somit nicht gezeigt werden.

Die Experimente mit DC-SIGN zeigten, dass dieses Protein sich nicht, wie von uns vermutet, zur Stabilisierung oder Anreicherung von retroviralen Vektoren verwenden lässt. Daher wurden in den folgenden Experimenten durch Zentrifugation angereicherte Vektorpartikel verwendet.

4.2.5 Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von syn Env *in vitro*

Zur Untersuchung der funktionellen Eigenschaften der Zellkulturüberstände der Verpackungszelllinie Fly syn Env wurden Vektorpartikel auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen gegeben. Nach über Nacht-Inkubation waren große Synzytien deutlich erkennbar (Abbildung 4.40).

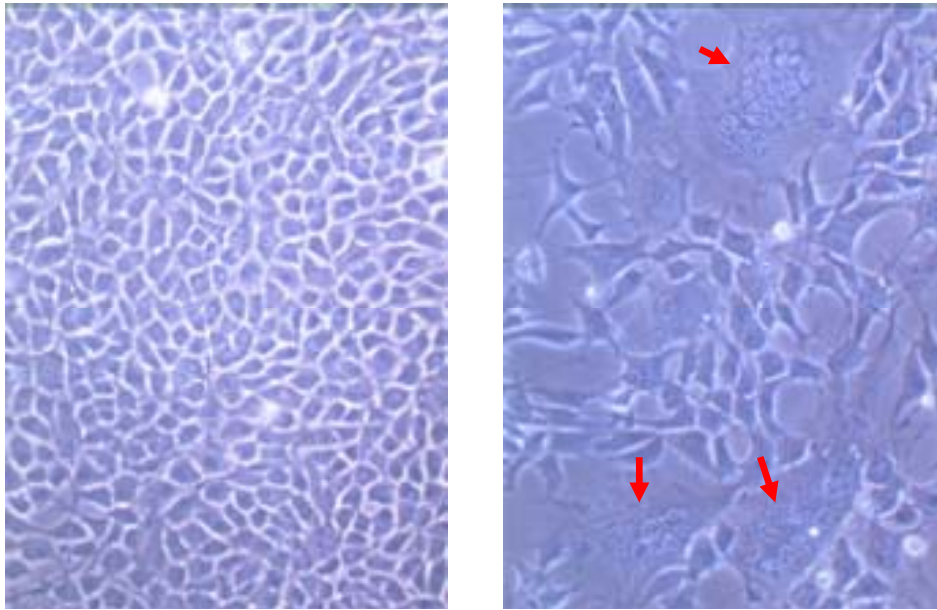


Abbildung 4.40: Induktion der Synzytienbildung von NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen durch syn Env codierende Vektorpartikel. Je 1 ml Zellkulturüberstand von parentalen Fly gag/pol (die keine Vektorpartikel produzieren) bzw. von Fly syn Env Zellen wurde auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen gegeben und am nächsten Tag fotografiert. Die roten Pfeile zeigen auf große Synzytien von NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen, die mit den Fly syn Env Überständen inkubiert wurden.

Zur Bestätigung, dass die Synzytienbildung auch mit den im Tumormodell verwendeten Zellen induziert werden kann, wurde das Experiment mit MyLa Zellen durchgeführt. Hierfür wurden MyLa Zellen mit Zellkulturüberständen von Fly syn Env bzw. Fly HIV-87-GFP inkubiert. Fly HIV-87-GFP produzieren ebenfalls MLV/HIV pseudotypisierte Vektoren, die jedoch nur GFP als Transgen mitführen. Abbildung 4.41 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der transduzierten MyLa Zellen, links im Durchlicht und rechts in der Fluoreszenz. Auf den unteren beiden Aufnahmen sind mit Fly syn Env Zellkulturüberständen transduzierte Zellen abgebildet. Große, meist schwächer fluoreszierende Zellen sind im Fluoreszenzlicht erkennbar (schwarze Pfeile). Hierbei handelt es sich um transduzierte MyLa Zellen, die mit untransduzierten Nachbarzellen verschmolzen sind; deshalb ist das Fluoreszenzsignal auch schwächer. Diese großen Zellen sind auch im Durchlicht erkennbar. Gut erkennbar wird hier, dass sie deutlich größer sind als die anderen (untransduzierten) Zellen. Auf den oberen Aufnahmen sind solche Riesenzellen nicht erkennbar: hier kam es zu keiner Zellfusion, da kein HIV Hüllprotein gebildet wird. Auffällig ist hier, dass die mit Zellkulturüberständen von Fly HIV-87-GFP transduzierten MyLa Zellen heller leuchten als die mit Fly syn Env transduzierten. Eine solch schwächere Fluoreszenz lässt sich jedoch häufig erkennen, wenn das fluoreszierende Protein durch eine IRES-Sequenz translatiert wird.

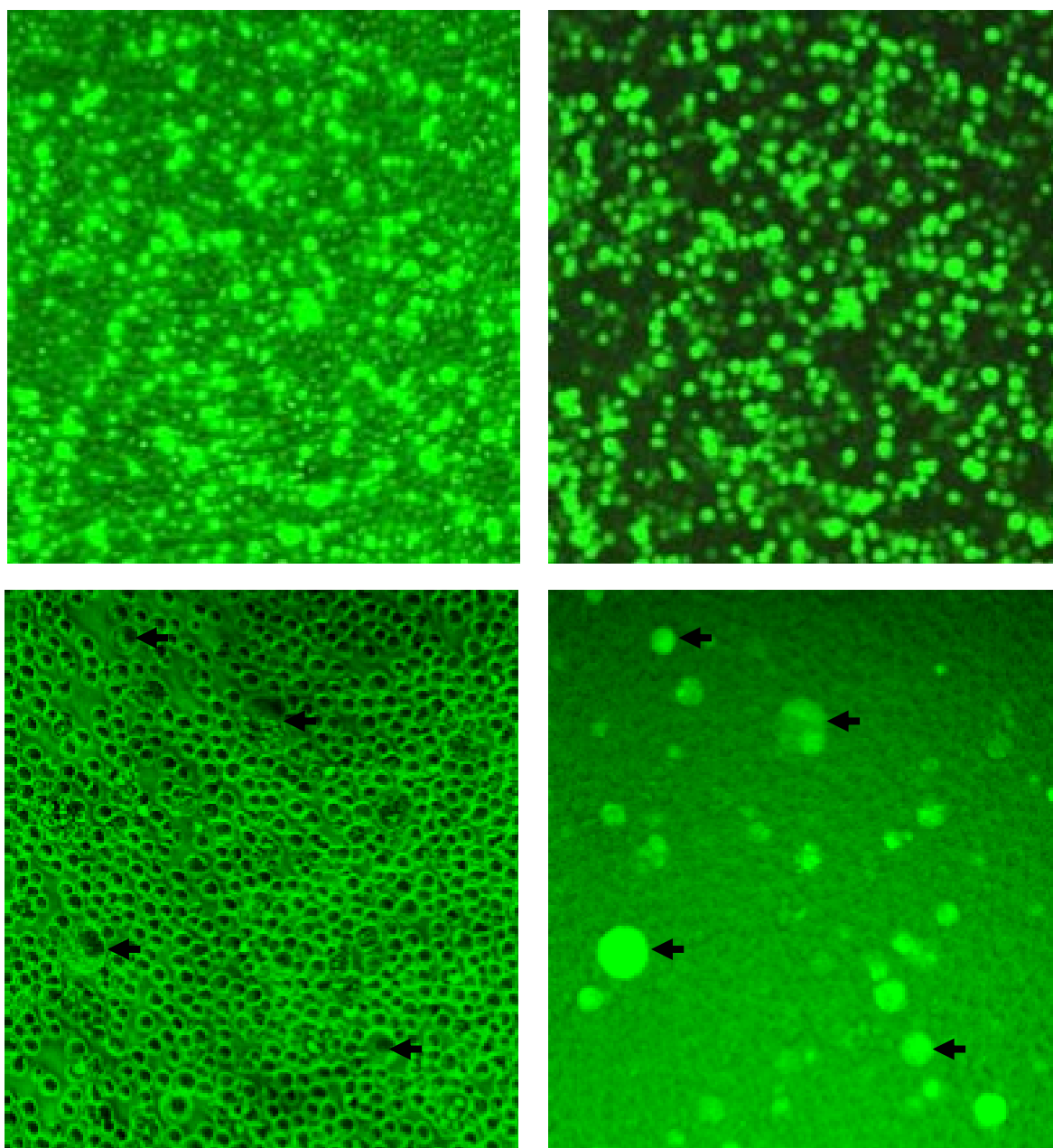


Abbildung 4.41: Induktion der Synzytienbildung von MyLa Zellen durch syn Env codierende Vektorpartikel. MyLa Zellen wurden mit je 1ml Zellkulturüberstand von Fly HIV-87-GFP (obere Zeile) bzw. syn Env (untere Zeile) inkubiert. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, Vergrößerungsfaktor 100x, zeigen Synzytien von MyLa Zellen (schwarze Pfeile).

4.2.6 Vergleich der therapeutischen Gene: HIV Env versus Thymidinkinase *in vitro*

Zum Vergleich der Effizienz von HIV Env 89.6P (syn Env) als therapeutischem Gen gegenüber der *Herpes simplex* Thymidinkinase plus Ganciclovirgabe wurden 2×10^5 MyLa Zellen ausgesät und mit angereicherten syn Env (1×10^6 /ml) bzw. GFP-TK (4×10^5 /ml) Vektorpartikeln transduziert (Titerung auf NIH 3T3 CD4/CXCR4). Die Zellzahl wurde regelmäßig mit einer Neubauer-Kammer bestimmt. An den Tagen 4 - 6 erfolgte jeweils nach Bestimmung der Zellzahl die Zugabe einer Endkonzentration von 10 μ g/ml Ganciclovir (Cymeven $\text{\textcircled{R}}$, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen) zu allen Ansätzen. Die Zellzahlen sind auf der Y-Achse von Abbildung 4.42 aufgetragen. Man erkennt das verlangsamte Wachstum der GFP-TK transduzierten MyLa (offene Kreise) in Vergleich zur Mediumkontrolle (offenes Dreieck). Deutlich zeigt sich bei syn Env der *bystander*-Effekt: in den ersten Tagen stagniert die Zellzahl, um dann sogar abzunehmen (gefüllte Kreise).

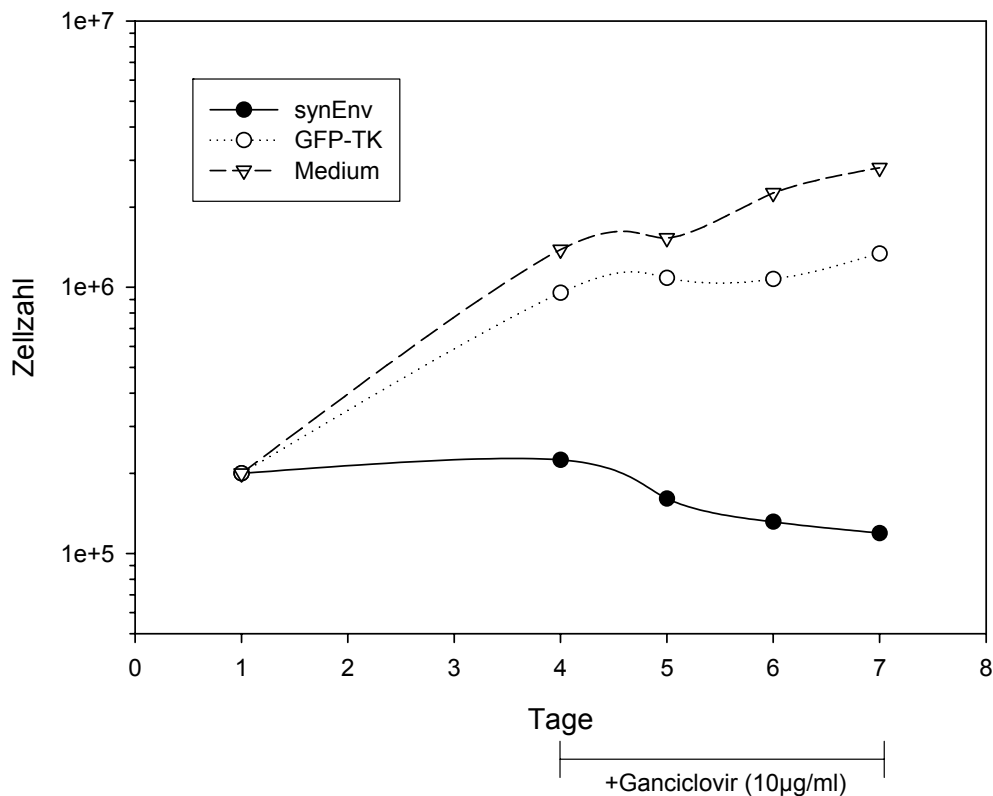


Abbildung 4.42: Vergleich des Wachstums mit GFP-TK bzw. syn Env transduzierter MyLa Zellen über einen Zeitraum von einer Woche.

4.2.7 Vergleich der therapeutischen Gene: HIV Env versus Thymidinkinase *in vivo*

Nach den vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen mit MyLa Zellen wurde der Effekt von HIV Env als therapeutischem Gen im Nackmausmodell untersucht. Nackmäusen wurde jeweils in die rechte Flanke ein etwa 2 x 2 mm bis 3 x 5 mm großes Tumorfragment unter die Haut transplantiert. Nach etwa 2 Wochen konnte festgestellt werden, welche Fragmente angewachsen waren. Zur Behandlung der kutanen T-Zell Tumoren im Maus-Modell wurden retrovirale Vektorpartikel generiert und wie im Kapitel 3.1.4.1 beschrieben angereichert. Die Applikation in die Maus erfolgte mit einer Insulinspritze. Das Volumen von 50 µl pro Applikation wurde auf mehrere, in der Regel drei, Stellen im Tumor verteilt. Zur Behandlung der Tumore wurden Vektoren, die *syn env* bzw. *gfp-tk* als therapeutisches Gen enthielten, verwendet. Als Kontrolle wurde einer Gruppe von Tieren PBS injiziert. Mäuse, die mit *syn Env* Vektorpartikeln behandelt wurden, erhielten diese je drei Mal à 5×10^4 transduzierende Einheiten (t.E.) im Abstand von je vier Tagen. GFP-TK Vektorpartikel (à 2×10^5 t.E.) bzw. PBS wurde drei Mal im Abstand von je einem Tag gegeben. Die mit GFP-TK behandelten Mäuse erhielten zusätzlich intra peritoneal (i.p.) Ganciclovir an den Tagen 6-11 in einer Dosis von 100 mg/kg/Tag. Diese Dosis wurde auf zwei Applikationen verteilt. Zur Bestimmung des Behandlungserfolges wurde zwei Mal wöchentlich das Tumolvolumen mittels einer Schieblehre ermittelt, bevor das Experiment an Tag 21 beendet wurde. Der Behandlungsverlauf ist schematisch in Abbildung 4.43 dargestellt.

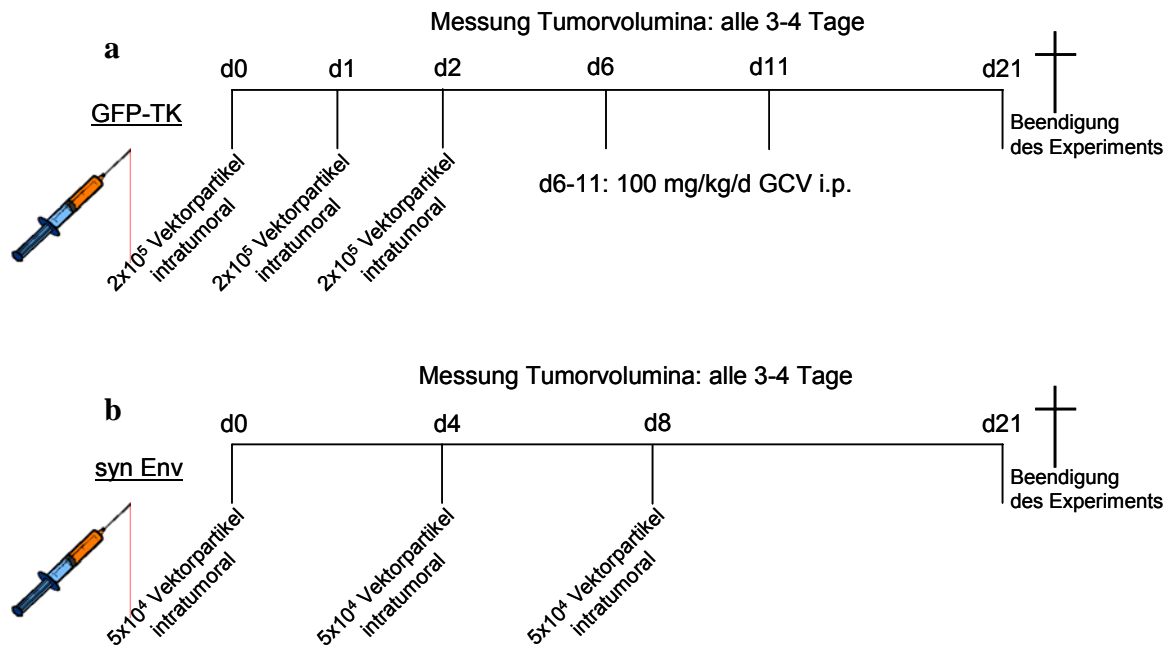


Abbildung 4.43: Behandlungsschema des Mausexperiments. Das Tumorumfugung wurde regelmäÙig alle 3-4 Tage durch Messungen mit einer Schieblehre bestimmt. (a) 2×10^5 GFP-TK-codierende retrovirale Vektoren wurden den Mäusen an den Tagen 0 - 2 intratumoral injiziert. An den Tagen 6 - 11 erhielten die Tiere intraperitoneal jeweils 100 mg/kg/Tag Ganciclovir. (b) 5×10^4 syn Env-codierende retrovirale Vektoren wurden den Mäusen an den Tagen 0, 4 und 8 intratumoral injiziert.

Wie in Kapitel 4.2.1 bereits geschildert, waren die sich entwickelnden Tumore auf Grund der Transplantation von Beginn an unterschiedlich groß, so dass ein direkter Vergleich der Tumorumfugung nicht möglich war. Die Festlegung des Tumorumfugung auf den Wert von 100% – vor der ersten Applikation von Vektorpartikeln – und die daraus resultierende prozentuale Änderung, lassen einen Vergleich jedoch zu. Eine solche Auftragung ist auch in Abbildung 4.44 verwendet.

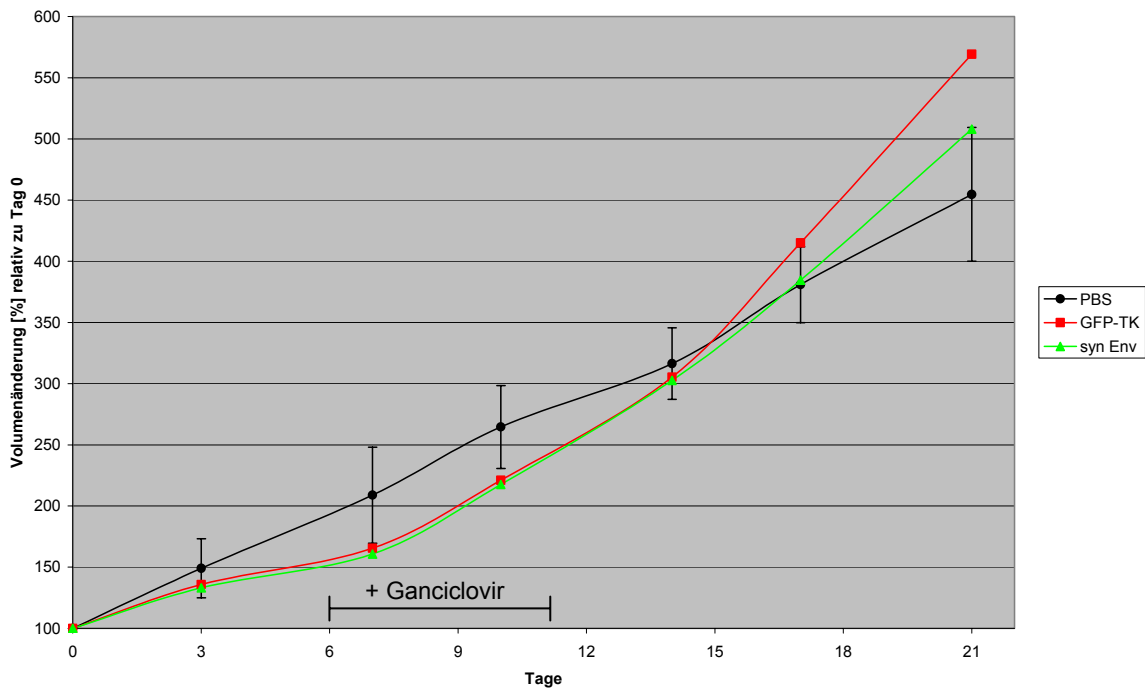


Abbildung 4.44: Vergleich des Tumorwachstums bei Behandlung mit unterschiedlichen therapeutischen Genen. Dargestellt ist der Mittelwert der Veränderung des Tumolvolumens im Vergleich zu Tag 0 von 9 (GFP-TK und syn Env) bzw. 5 (PBS) behandelten Tumoren. Für die PBS-behandelten Tumoren ist zusätzlich noch die Mittelwertabweichung als Fehlerbalken dargestellt. Die Behandlung erfolgte an den Tagen 0, 1 und 2 mit GFP-TK und PBS oder 0, 4 und 8 mit syn Env. Zusätzlich erhielt die GFP-TK Gruppe Ganciclovir an den Tagen 6 - 11.

In Abbildung 4.44 sind die prozentualen Veränderungen der Tumolvolumina, bezogen auf den Beginn des Experimentes, im Vergleich dargestellt. Bis etwa Tag 10 ist eine Abschwächung des Tumorwachstums bei den, mit den beiden therapeutischen Vektoren GFP-TK und syn Env behandelten, Tumoren im Vergleich zur PBS-Kontrolle erkennbar. Danach verstärkt sich das Tumorwachstum wieder. Die Verwendung von syn Env als therapeutischem Gen entspricht in ihrem Einfluss auf das Tumorwachstum in etwa dem, der Behandlung mit GFP-TK und anschließender Gabe von Ganciclovir, wobei jedoch etwa viermal mehr GFP-TK Vektorpartikel appliziert wurden (vgl. Abbildung 4.43). Daher lässt sich schlussfolgern, dass syn Env zum erwarteten *bystander*-Effekt führt.

5. Diskussion

5.1 Entwicklung chimärer T-Zell-Rezeptoren gegen HIV Env

Obwohl die Infektion durch HI-Viren schon seit 1983 als Ursache der Immunschwächekrankheit AIDS identifiziert ist, gelang bisher nur die Entwicklung verschiedener antiretroviraler Medikamente, die die Vermehrung der Viren im Körper hemmen, nicht jedoch die Infektion als solche heilen können. Im Gegensatz zu anderen sehr pathogenen Viren, wie z.B. *Influenza*, kann HIV Zellen auch latent infizieren und so über sehr lange Zeit in einer Zelle verweilen bis es wieder aktiviert wird. Während dieser Latenzzeit ist das Virus für das Immunsystem unsichtbar. Andere Viren, die auch der vollständigen Eliminierung durch das Immunsystem entgehen können, wie z.B. *Herpes simplex*, sind meist weit weniger pathogen. Viele virale Infektionen lassen sich sehr gut durch Impfungen behandeln. Hierfür werden entweder Virusfragmente bzw. inaktivierte Viren (Hepatitis A, Influenza) oder aber ein so genanntes attenuiertes Virus (z.B. bei Pocken- oder Masernimpfstoffen), welches nur über eingeschränkte Pathogenität gegenüber dem Wildtyp-Virus verfügt, verwendet. Ersteres induziert vor allem die Entstehung von Antikörpern, die auf Grund der hohen Mutationsrate und der damit verbundenen Variabilität von HIV bisher nicht zur Generierung neutralisierender Antikörper führten. Natürliche Infektionen und die Impfung mit attenuierten Viren führen zusätzlich zur Entstehung T-Zell vermittelter Immunantworten, da das Virus, wenn auch nur sehr begrenzt im Fall attenuierter Viren, zur Replikation fähig ist. Während der Replikation werden virale Proteinf Fragmente durch die infizierte Zelle über MHC Klasse-I präsentiert und induzieren eine zytotoxische T-Zell Antwort, bei der infizierte Zellen durch Sekretion toxischer Proteine lysiert werden (Janeway, Charles A et al., 2001).

Die Entwicklung attenuierter SI-Viren (*Simian Immunodeficiency Virus*; HIV-homologes Virus in nicht-menschlichen Primaten), z.B. durch Deletion der Gene für die akzessorischen Proteine Nef (Kestler, III et al., 1991), Rev und Vpr (Johnson et al., 1999) oder durch pharmakologische Regulierbarkeit des Transaktivator Proteins Tat (Verhoef et al., 2001), zeigten in Makaken-Modellen gute Erfolge (Daniel et al., 1992; Berkhout et al., 2002). Jedoch zeigte sich auch bald, dass einige dieser Viren noch immer replizierten und durch Mutation und Rekombination wieder zur Ausbildung von pathogenen Varianten führten (Whitney und Ruprecht, 2004; Koff et al., 2006). Das heißt, solche abgeschwächten Viren sind nicht sicher, da es im vakzinierten Patienten zur Ausbildung der Krankheit kommen könnte, gegen die er geimpft werden sollte.

Eine weitere große Schwierigkeit in der Entwicklung von Vakzinen und anderen HIV-Medikamenten ist das Fehlen eines probaten (Klein-)Tiermodells (Gardner und Luciw, 1989). Lediglich Primaten sind mit Lentiviren produktiv infizierbar. Am besten untersucht sind Modelle mit Schimpansen, allerdings sind Experimente mit Primaten sehr zeitaufwändig, teuer (da nur wenige Tiere zur Verfügung stehen) und außerdem mit großen ethischen Herausforderungen verbunden. Die Infektion muriner Zellen, die die humanen HIV-Rezeptoren CD4 und CCR5 bzw. CXCR4 exprimierten, konnte gezeigt werden, jedoch war diese Infektion nicht produktiv, d.h. es wurden nur wenige infektiöse Nachkommenviren gebildet und die Tiere zeigten kein Krankheitsbild (Keppler et al., 2002; Baumann et al., 2004). Diese Ergebnisse helfen jedoch verschiedene molekulare Grundlagen der HIV-Infektion aufzuklären.

Die Entwicklung genetisch modifizierter zytotoxischer T-Zellen kann daher ein Ansatz zur passiven Immunisierung sein. Die ersten Artikel über chimäre T-Zell-Rezeptoren wurden Ende der 1980er Jahre veröffentlicht (Gross et al., 1989; Kuwana et al., 1987). Beide Gruppen beschrieben die Generierung von Fusionskonstrukten bestehend aus den variablen Regionen der schweren und leichten Ketten von Antikörpern mit den konstanten Regionen der T-Zell-Rezeptor (TCR) alpha- und beta-Ketten. Nach Transfektion in murine Lymphozyten konnte die spezifische Signalweiterleitung durch den Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration (Kuwana et al., 1987) bzw. durch spezifische Lyse von Antigen-tragenden Zellen (Gross et al., 1989) gezeigt werden. Später stellte sich heraus, dass sich die zeta-Kette des TCR und die gamma-Kette des Fc epsilon Rezeptors (Fc ϵ RI) besser für die Konstruktion von chimären TCR eignen (Eshhar et al., 1993). Zusammen mit der Entwicklung von so genannten *single-chain* Antikörperfragmenten (scFv) (Bird et al., 1988), bei denen die variablen Regionen der leichten und schweren Immunglobulinketten durch eine kurze Aminosäuresequenz verbunden sind, konnten chimäre TCR so weit optimiert werden, dass die Einbringung eines einzelnen Fusionskonstruktes, aus scFv und CD3zeta bzw. Fc ϵ RI, eine zielgerichtete MHC-unabhängige zytotoxische Reaktion von T-Zellen erlaubt. Die Spezifität und Affinität entspricht bei einem solchen Konstrukt exakt den Eigenschaften des scFv. Dieses System ist von vielen Gruppen für die Anwendung in der Krebstherapie und zur Behandlung von Infektionskrankheiten untersucht worden (Bitton et al., 1999; Uherek et al., 2001). Eine weitere, wichtige Verbesserung chimärer TCR konnte erreicht werden, nachdem die Rolle ko-stimulatorischer Signale durch das Oberflächenmolekül CD28 erkannt wurde (Riley und June, 2005) und die dafür verantwortliche Region auf das Aminosäuremotiv YMNM eingegrenzt wurde (Harada et al., 2001). Diese intrazelluläre Signalregion wurde zwischen der scFv-Region und der intrazellulären CD3zeta bzw. Fc ϵ RI Region eingefügt (Hombach

et al., 2001; Maher et al., 2002; Finney et al., 1998). Lymphozyten, die Antigene auch MHC-unabhängig erkennen können, sind prinzipiell für den Einsatz gegen Tumore und Infektionen gleichermaßen geeignet. Jedoch sind für beide Anwendungen bestimmte Schwierigkeiten zu umgehen: Tumore entstehen aus körpereigenen Zellen und tragen deshalb viele Oberflächenmoleküle, die auch auf gesunden Zellen zu finden sind. Viele Infektionserreger sind sehr variabel, d.h. die Aminosäureabfolge ihrer Proteine kann sich leicht ändern, wodurch sie der Entdeckung durch das Immunsystem entgehen können.

Besonders bei der Verwendung chimärer T-Zell-Rezeptoren gegen Infektionskrankheiten wie HIV, besteht die Schwierigkeit darin, dass das Virus sehr variabel ist und somit Antikörpern und den für chimäre T-Zell-Rezeptoren verwendeten Antikörperfragmenten leicht entgehen kann. Daher eignen sich Moleküle, deren Bindung für die Vervollständigung des Lebenszyklus eines Virus notwendig sind, zum Einsatz in chimären TCR. CD4 ist ein plakatives Beispiel für ein solch essentielles zelluläres Molekül, da es gleichzeitig der zelluläre Rezeptor für HIV ist. Allerdings konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Verwendung von CD4 in chimären T-Zell-Rezeptoren diese Zellen auch mit HIV infizierbar macht, da die CD4-Region des chimären T-Zell-Rezeptors gleichzeitig auch als Eintrittsrezeptor für HIV dienen kann. Dies war nicht der Fall bei den Konstrukten mit DC-SIGN bzw. 5-Helix.

Deshalb wurde in dieser Arbeit die Verwendung alternativer HIV Env-bindender Moleküle untersucht: einerseits DC-SIGN, einem Oberflächenmolekül Dendritischer Zellen, und andererseits 5-Helix, einem künstlichen Protein, das aus HIV Env abgeleitet ist.

Von DC-SIGN nimmt man an, dass es eine wichtige Rolle bei der Ansteckung mit HIV spielt, da Dendritische Zellen in den Schleimhäuten (an denen der Kontakt mit HIV stattfindet) Antigen aufnehmen und in den T-Zell-reichen Regionen der Lymphknoten präsentieren. Dendritische Zellen werden von HIV demnach als Transporter auf dem Weg zu ihren Zielzellen genutzt (Geijtenbeek et al., 2002a). 5-Helix ist ein Molekül, welches aus den helikalen C- und N-Bereichen der gp41 Untereinheit von HIV Env entwickelt wurde. Diese Bereiche bilden nach der Interaktion von gp120 mit CD4 und dem Ko-Rezeptor ein Bündel von sechs Helices, die schließlich zur Fusion der zellulären und viralen Membran führen. 5-Helix entspricht diesem Bündel und hat, da es nur aus fünf Helices besteht, eine hohe Affinität zu einzelnen Helices, wobei es durch die Bindung der einzelnen Helix gleichzeitig auch die Bildung eines funktionellen 6-Helix-Bündels verhindert. 5-Helix stellt quasi das Gegenstück zu dem HIV-Medikament Enfuvirtide (Fuzeon, T-20) dar, welches

aus einer einzelnen Helix besteht und ebenfalls durch Bindung an andere Helices die Bildung eines funktionellen 6-Helix-Bündels verhindert.

Die Bindung von DC-SIGN an das HIV Hüllprotein gp120 konnte mittels FACS-Analyse - durch die Bindung gp120-gekoppelter fluoreszierender Beads an alle getesteten DC-SIGN-exprimierenden Zellen - bestätigt werden; unabhängig ob es sich um hämatopoetische Suspensionszellen (K562, THP; Abbildung 4.2), wie von Geijtenbeek beschrieben (2000b) oder um adhärenz Nierenzellen (BHK; Abbildung 4.3) handelte.

Zwei Jahre nach der Beschreibung von DC-SIGN durch Geijtenbeek und Kollegen (Geijtenbeek et al., 2000c; Geijtenbeek et al., 2000b), zeigte die gleiche Gruppe, dass der Austausch von Valin nach Glyzin an der Aminosäureposition 351 die Bindung des natürlichen Liganden ICAM-3 aufhebt, die Bindung des HIV Hüllproteins jedoch unverändert bleibt (Geijtenbeek et al., 2002b). Zur Untersuchung, ob die Bindung der gp120-Beads durch Zugabe von löslichem ICAM-3 bei DC-SIGN wt, nicht jedoch bei DC-SIGN V351G, inhibierbar ist, wurde dieses Experiment sowohl mit den von Geijtenbeek verwendeten THP DC-SIGN wt, als auch mit K562 DC-SIGN wt und K562 DC-SIGN V351G durchgeführt. Bei THP DC-SIGN wt konnte bei der Zugabe von löslichem ICAM-3 keine Reduktion der Bindung der Beads an die Zellen gezeigt werden. Bei beiden K562-exprimierten DC-SIGN Varianten, wt und V351G, kam zu einer Reduktion der Bindung, obwohl die Mutation V351G eine Bindung an ICAM-3 eigentlich verhindern sollte. Dieser Effekt könnte mehrere Ursachen haben: so handelt es sich bei ICAM-3 um ein Oberflächenprotein von Zellen und könnte deshalb im löslichen Zustand andere Eigenschaften haben. Die Verhinderung der Bindung von ICAM-3 durch die Mutation V351G wurde von Geijtenbeek durch Inkubation mit ICAM-3-gekoppelten, fluoreszierenden Beads gezeigt. Für die Verwendung von DC-SIGN in einem therapeutischen Kontext ist es von großer Bedeutung, dass DC-SIGN nicht länger an ICAM-3 binden kann. Dies ist z.B. der Fall bei den in dieser Arbeit verwendeten chimären T-Zell-Rezeptoren: sie sollen dafür sorgen, dass ausschließlich HIV Env-exprimierende Zellen abgetötet werden und nicht uninfizierte, ICAM-3-exprimierende, Zellen. Daher wurde in dieser Arbeit die Mutation V351G ebenfalls in die chimären Rezeptoren mit DC-SIGN eingefügt. Die Gruppe von Benhur Lee zeigte dann später mit Hilfe von Alanin-Mutationsanalysen, dass noch andere Aminosäuremutationen geeignete Möglichkeiten sind, die ICAM-3-Bindung zu reduzieren, ohne gleichzeitig auch eine Bindung an gp120 zu verlieren (Su et al., 2004). Ihre Ergebnisse bestätigen, dass der Austausch V351G wesentlich besser gp120 als ICAM-3 bindet, die Bindung jedoch nicht vollständig verloren

geht. Sie beschreiben weitere Stellen im Molekül (vor allem D367A), durch deren Mutation die Bindung von DC-SIGN an ICAM-3 noch stärker reduziert werden kann. Diese weiteren Aminosäureaustausche wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da nur die prinzipielle Eignung von DC-SIGN als HIV-bindender Ligand in Kontext chimärer T-Zell-Rezeptoren gezeigt werden sollte. Für eine Weiterentwicklung des Therapieansatzes mit DC-SIGN als HIV Env-bindendem Liganden sollte der Aminosäureaustausch D367A auf jeden Fall verwendet werden.

Auch für den anderen HIV Env-bindenden Liganden, 5-Helix, wurde die Expression des Proteins, sowie seine fusionsinhibitorischen Eigenschaften, in löslicher Form untersucht. Die Bindung von 5-Helix an HIV Env konnte durch eine konzentrationsabhängige Reduktion des Titers einer gegebenen Menge retroviraler Partikel gezeigt werden (Abbildung 4.8).

Nachdem die Bindung von gp120 an 5-Helix und DC-SIGN bestätigt werden konnte, wurden chimäre T-Zell-Rezeptoren konstruiert. Die in dieser Arbeit beschriebenen chimären TCR enthielten die zytoplasmatische Region von CD3zeta, die Transmembranregion von CD28, sowie verschiedene Liganden zur Bindung des HIV Hüllproteins: 5-Helix (Root et al., 2001), die Lektindomäne bzw. die gesamte extrazelluläre Region von DC-SIGN (Geijtenbeek et al., 2000c) und die extrazellulären Region von CD4.

Zur Einbringung in T-Zellen wurden die chimären Rezeptoren in das retrovirale Verpackungsplasmid pMP71 umklontiert, da mit diesem die besten Expressionseffizienzen erreicht werden konnten (Abbildung 4.18). Diese Konstrukte wurden anschließend in 293T transfiziert und die Funktionalität durch Bindung von gp120-gekoppelten fluoreszierenden Beads überprüft. Hier zeigte sich, dass die Beads und die DC-SIGN Konstrukte nur schwach aneinander banden. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass bei manchen chimären TCR mit scFv die Einfügung einer zusätzlichen „Gelenk-Region“ (engl. *hinge*) die Bindung des scFv an seine Zielstruktur verbessert (Moritz und Groner, 1995). Diese *hinge*-Region, ein Teil des humanen CD8 Moleküls, wurde daher zwischen die Liganden und den CD28 Anteil eingefügt. Da sich die Bindungseigenschaften des chimären TCR mit 5-Helix nicht mit gp120-gekoppelten Beads testen lässt – 5-Helix bindet an die gp41 Untereinheit des HIV Hüllproteins und ist bei den gp120-gekoppelten Beads nicht vorhanden – wurde der Vergleich der Bindung mit und ohne CD8 *hinge* in einem Zellbindungstest untersucht. Dieser Test beruht auf der Beobachtung, dass ein Durchflusszytometer zwei aneinander gebundene Zellen als nur eine Zelle zählt. Werden beide Zelltypen jeweils mit

unterschiedlichen Farbstoffen markiert, erscheinen ungebundene Zellen als einzelpositives Signal auf der, ihrer Fluoreszenz zugeordneten, Achse in einem zweidimensionalen Diagramm. Binden jedoch zwei Zellen unterschiedlicher Fluoreszenz aneinander, erscheint ein Punkt im Diagramm, der für beide Fluoreszenzen positiv („doppelt-positiv“) ist (Hombach et al., 2000). Für dieses Experiment wurde als Bindungspartner die GFP- und HIV Env-exprimierende Verpackungszelllinie verwendet. Die chimären TCR wurden in 293T Zellen transfiziert und diese Zellen anschließend mit einem Membranfarbstoff angefärbt. Der Effekt der *hinge*-Region zur Erhöhung der Bindungseffizienz der verschiedenen Konstrukte zeigte Unterschiede. Die Bindung von 5-Helix ohne CD8 *hinge* war deutlich besser als mit CD8 *hinge*. Für die gesamte extrazelluläre Domäne von DC-SIGN (DC-SIGN+Repeats) verhielt es sich umgekehrt. Auf die Bindung der DC-SIGN Lektindomäne an HIV Env hatte die CD8 *hinge*-Region keinen Einfluss. Die Expression von CD4 mit CD8 *hinge* ließ sich nicht nachweisen (Abbildung 4.21). Dieses Ergebnis, dass die Notwendigkeit einer solchen „Gelenk-Region“ vom einzelnen Liganden bzw. Bindungsstelle an der Zielstruktur abhängig ist, konnte kürzlich auch von einer anderen Arbeitsgruppe im Zusammenhang mit scFv-chimären TCR bestätigt werden (Guest et al., 2005). Bei der Gewinnung von retroviralen Vektoren durch transiente Transfektion, die für die verschiedenen chimären Rezeptoren codieren, wurde beobachtet, dass die Titer der Konstrukte mit der CD8-*hinge* Region deutlich schlechter waren; teilweise um mehr als eine Zehnerpotenz. Daher wurde versucht eine stabile Zelllinie zur Produktion von retroviralen Vektoren, die für chimäre T-Zell-Rezeptoren codieren, zu generieren. Hierfür wurde die Verpackungszelllinie PG-13, die stabil die MLV Polyproteine Gag und Pol, sowie GaLV Env exprimieren (Miller et al., 1991), mit den chimären T-Zell-Rezeptoren transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen durch Sortierung, mit Hilfe des c-Myc Epitops der chimären TCR, mit magnetischen Beads (MACS), an Stelle einer Antibiotika-Selektion, angereichert. Die FACS-Analyse bestätigte den Erfolg dieser Methode, jedoch war der erreichbare Titer bei der transienten Transfektion von 293T Zellen höher. Eine genaue Analyse der Ursache für die niedrigen Mengen infektiöser Partikel wäre mit großem Aufwand und ungewissem Erfolg verbunden. In der Folge wurden chimäre Rezeptoren mit der CD8-*hinge* Region daher nicht weiter eingesetzt.

Die einzig existierende Behandlungsmethode bei HIV ist die Gabe antiretroviraler Medikamente (HAART). Diese Medikamente greifen direkt in den molekularen Lebenszyklus des Virus ein, wirken jedoch nur dann, wenn das Virus sich aktiv vermehrt und nicht Zellen latent infiziert hat. Latente Infektion von Zellen stellt eine große Herausforderung in der Therapie von HIV-Patienten dar. Bei einer latenten Infektion wird

das virale Genom in die infizierte Zelle integriert, allerdings kommt es nicht zur Bildung neuer Virionen. Zur Ausbildung einer Latenz kommt es oft, wenn die infizierte Zelle den Zellzyklus verlässt und in ein Ruhestadium eintritt. Dies ist häufig der Fall, wenn eine T-Zelle zur T-Gedächtniszelle (*memory T cell*) wird (Chun et al., 1997). Allerdings haben Studien gezeigt, dass es auch während der T-Zellreifung im Thymus zu Infektionen kommen kann, wenn die T-Zellen (auch solche, die später CD8 exprimieren) temporär CD4 auf ihrer Oberfläche tragen (Brooks et al., 2001). Sobald diese Zellen stimuliert werden und damit wieder in den Zellzyklus eintreten, kann HIV auch wieder replizieren. Daher eignet sich die gentherapeutische Ausstattung von patienteneigenen T-Zellen mit chimären T-Zell-Rezeptoren, die HIV-infizierte Zellen erkennen und abtöten können, bei Behandlung von HIV-Patienten als Unterstützungstherapie zu HAART und vor allem auch bei Unterbrechungen der HAART-Gabe. Obwohl die gentherapeutische Behandlung sehr aufwändig ist, dem Patienten müssen Zellen entnommen, modifiziert, expandiert und reinfundiert werden, hat sie jedoch den großen Vorteil, dass die modifizierten Zellen über einen Zeitraum von mehreren Monaten aktiv sein können. Somit können sie auch noch aktiv sein, wenn durch Absetzen von HAART die HIV-Replikation nicht länger unterdrückt wird. Genmodifizierte Zellen konnten in zwei klinischen Studien nach mehr als einem Jahr noch in HIV-Patienten nachgewiesen werden (Mitsuyasu et al., 2000; Walker et al., 2000). In beiden Studien wurden chimäre T-Zell-Rezeptoren bestehend aus CD4, als HIV Env-bindendem Liganden, und CD3zeta, als Signaldomäne, verwendet. Eine Studie fand eine leichte Reduktion der Viruslast im Rektalgewebe bei einem Teil der Patienten, während die andere Studie unter sehr ähnlichen Bedingungen keinen Effekt zeigen konnte. Interessanterweise wurden beide Studien innerhalb eines Zeitraumes von 2 Wochen in der gleichen Zeitschrift veröffentlicht und zwei der Autoren haben an beiden Veröffentlichungen mitgearbeitet. Dies zeigt, dass die chimären T-Zell-Rezeptoren noch optimiert werden müssen, damit konsistente Ergebnisse in Untersuchungen erzielt werden können. Auch besteht die Möglichkeit, dass die CD4/CD3zeta chimären Rezeptoren ein mögliches Reservoir für HIV bilden. Außerdem wurden in den beiden genannten Studien CD28 nicht in den chimären T-Zell-Rezeptor integriert, damit war kein ko-stimulatorisches Signal vorhanden.

Kürzlich wurde beschrieben, dass die Verwendung von OX40 zusätzlich zu CD28 zu einer wesentlich verlängerten T-Zell Aktivierung führt (Pule et al., 2005). In diesem Zusammenhang ist eine genaue Analyse der Konstrukte und der HIV-bindenden Liganden nötig, da durch längerfristige Aktivierung bzw. Proliferationssignale ungewollte Reaktionen entstehen können. Eine dieser Gefahren, der Einbringung von zusätzlichen Genen in Zellen, besteht in der Möglichkeit, dass das Zellwachstum nicht mehr der natürlichen Zellzyklus-Kontrolle unterliegt. Dies kann zum einen durch den Integrationsort im Genom

geschehen, wenn benachbarte Onkogene aktiviert werden oder durch Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Zum anderen kann auch das Transgen selbst onkogene Aktivität haben, wenn z.B. die Zelle durch das Transgen stark aktiviert wird. Diese Möglichkeit besteht bei den in dieser Arbeit verwendeten Rezeptoren mit Signalweiterleitung durch CD28 und CD3. Sie könnten als gemeinsames Konstrukt onkogene Aktivität aufweisen. Besonders offensichtlich wurde diese Problematik des Einbringens von Fremdgenen im Fall der Gentherapie-Studie von Kindern mit schwerer Immundefizienz (SCID) in den Jahren 2002 und 2003 unter Leitung von Alain Fischer in Paris. Den Kindern wurden Blutstammzellen entnommen und mit Hilfe von retroviralen Vektoren ein funktionelles Gen der so genannten *common gamma chain*, die u.a. als Untereinheit der Interleukin (Il-)-2-, Il-4-, Il-7- und Il-13 Rezeptoren fungiert, eingefügt. Alle behandelten Kinder hatten einen Gendefekt in der *common gamma chain*, der dazu führte, dass keine ausdifferenzierten Immunzellen gebildet werden konnten. Durch die gentherapeutische Behandlung konnten zwar 9 von 10 Kinder von dieser Krankheit soweit geheilt werden, dass keine weitere Immunglobulin-Gabe oder eine sterile Umgebung nötig war (Hacein-Bey-Abina et al., 2002), jedoch entwickelten mehrere Kinder eine Leukämie. Als Ursache für die Leukämie konnte der Integrationsort der Retroviren in der Nähe des Proto-Onkogens *Lmo2* ausgemacht werden, möglicherweise spielte zusätzlich auch die starke Proliferation durch die Aktivität des korrigierten Gens eine Rolle (Hacein-Bey-Abina et al., 2003).

Daher wurde in dieser Arbeit auch überprüft, ob eine konstitutive Aktivierung der CD28- und CD3-Anteile in den chimären T-Zell-Rezeptoren zu einer unkontrollierbaren Proliferation der transduzierten Zellen führen kann. Für das DC-SIGN+Repeats/zeta Konstrukt konnte, im Gegensatz zu allen anderen Konstrukten, im ELISA eine starke Ausschüttung von Interferon-gamma gezeigt werden, unabhängig ob die Zielzellen im Ko-Inkubationsexperiment das HIV Hüllprotein Env exprimierten. Für eine Signaltransduktion muss CD3zeta multimerisieren. Die gesamte extrazelluläre Domäne von DC-SIGN, wie sie in dem Konstrukt DC-SIGN+Repeats/zeta vorhanden ist, enthält auch die Repeat-Region, von der gezeigt werden konnte, dass sie zur Entstehung von funktionellen DC-SIGN Tetrameren notwendig ist (Mitchell et al., 2001). So könnte durch die Multimerisierung von mehreren Repeat-Regionen ein intrazelluläres Signal völlig unabhängig von der Bindung an Zielstrukturen erzeugt werden.

Zunächst wurde überprüft, ob die Interferon-gamma Sekretion auch ohne Ko-Inkubation mit Zielzellen detektierbar ist; dies wäre ein Indiz für eine zielstruktur-unabhängige Multimerisierung. Dies war auch der Fall, daher wurde anschließend die Frage geklärt, ob durch die Einbringung dieses chimären Rezeptors transduzierte T-Zellen unkontrolliert proliferieren bzw. die Il-2-abhängige immortalisierte Zelllinie NK-92 zu Il-2-unabhängigem Wachstum gebracht werden können. Beides war nicht der Fall, d.h. trotz kontinuierlichem

Signal durch den chimären T-Zell-Rezeptor und einer Ausschüttung von Interferon-gamma konnten die Zellen nicht zur dauerhaften oder Il-2-unabhängigen Proliferation gebracht werden.

Dies ist ein wichtiger Sicherheitsaspekt für eine gentherapeutische Anwendung dieser Konstrukte, der nach einer möglichen Optimierung, z.B. durch Einbringung von OX40 (s.o.), erneut zu überprüfen ist. Eine erneute Überprüfung auf ungewollte Proliferation der Zellen wäre auch notwendig, wenn statt ausdifferenzierter T-Zellen Blutstammzellen mit den chimären Rezeptoren ausgestattet würden. Ein möglicher Sicherheitsmechanismus zur Vermeidung von unkontrollierbarem Zellwachstum ist die parallele Einbringung eines Suizidgens. Als ein solches Suizidgen eignet sich die Thymidinkinase aus *Herpes simplex*, die durch Medikamentengabe ein toxisches Produkt erzeugt, welches spezifisch diese Zellen abtötet.

Die Untersuchung der lytischen Aktivität von mit chimären Rezeptoren ausgestatteten primären T-Zellen ergab kein eindeutiges Ergebnis. Zwar konnte für alle Konstrukte, wie z.B. in Abbildung 4.26, eine Erhöhung des Anteils Propidiumiodid (PI)-positiver Zielzellen gefunden werden, jedoch waren diese erhöhten Werte gelegentlich inkonsistent bzw. war die Steigerung des Anteils toter Zielzellen nicht ausreichend, als dass mit Sicherheit von einer deutlichen, lytischen Aktivität gesprochen werden könnte. Der Grund dafür kann nicht an einer fehlenden Signalweiterleitung in den chimären Rezeptoren liegen, da die ELISA-Daten für DC-SIGN+Repeats/zeta eine deutliche Ausschüttung von IFN- γ zeigen. Möglicherweise sind die Mengen, der von den T-Zellen gebildeten chimären T-Zell-Rezeptoren hoch genug, um bei starker Stimulation IFN- γ zu bilden. Sie reichen jedoch nicht zur Aktivierung der IFN- γ Sekretion oder lytischer Aktivität bei reinem Zell-zu-Zell-Kontakt aus. Möglicherweise war auch das in dieser Arbeit verwendete Effektor- zu Zielzell Verhältnis nicht hinreichend hoch. Andere Arbeitsgruppen verwendeten teilweise höhere Effektor- zu Zielzell Verhältnisse, bei denen sie deutliche Effekte ihrer chimären Rezeptoren zeigen konnten (Maher et al., 2002; Pule et al., 2005).

Zur Untersuchung auf lytische Funktion, wurden die NK-Zelllinie NK-92 mit den chimären Rezeptoren transduziert und mit zwei verschiedenen HIV Env-exprimierenden Zielzelllinien (bzw. ihren nicht-HIV Env-exprimierenden Gegenstücken) ko-inkubiert. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Unterschied der spezifischen Lyse der Zelllinien Fly GFP-TK bzw. BJAB Env_i. Fly GFP-TK Zellen konnten spezifisch mit jedem der verschiedenen chimären T-Zell-Rezeptoren lysiert werden, während bei BJAB Env_i dies nicht sichtbar war. Jedoch war der Anteil PI-positiver BJAB Env_i Zellen, unabhängig von der HIV Env-Expression, deutlich höher als bei den Fly GFP-TK oder auch den Ausgangs-BJAB Env_i Zellen. Zumal diese

erhöhten Werte auch schon bei der Ko-Inkubation mit untransduzierten NK-92 auftraten, besteht die Möglichkeit einer endogenen lytischen Aktivität der NK-92 gegen die prä-B Zellen entstammende Zelllinie BJAB Env_i. Eine endogene lytische Aktivität vor allem gegen hämatopoetische Zelllinien, wurde bereits beschrieben (Gong et al., 1994).

Zusammenfassend konnte eine erfolgreiche Signalweiterleitung nach HIV Env Kontakt mit den chimären T-Zell-Rezeptoren bestätigt werden: sowohl die Sekretion von IFN- γ , wie auch eine lytische Aktivität gegen HIV Env-exprimierende Zellen konnte gezeigt werden. Auf Grund der oben genannten Hindernisse erfordert der Einsatz chimärer T-Zell-Rezeptoren gegen HIV Env noch einiger Optimierungen. Trotzdem erscheint nach diesen Untersuchungen die Verwendung in der HIV Therapie prinzipiell möglich und erfolgversprechend.

5.2 HIV Env als therapeutisches Gen zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms

Das kutane T-Zell Lymphom (CTCL) ist eine eher seltene Krebsform. Dabei sammeln sich maligne, CD4-positive T-Zellen unter der Haut und es entstehen charakteristische rote Flecken. In späteren Stadien bilden die Zellen Tumore unter der Haut und befallen angrenzende Lymphknoten. Dieses Krankheitsbild wird als Mycosis Fungoides bezeichnet. Kommt es zu einem Übergreifen auf das Blutsystem, spricht man von Sézary Syndrom. Obwohl diese Erkrankung in den frühen Stadien nicht sehr gefährlich ist – die mittlere Überlebenszeit beträgt mehr als 20 Jahre – verkürzt sich die Überlebenszeit in späteren Stadien erheblich. Zur Etablierung neuer Therapieansätze und Untersuchung der molekularen Eigenschaften des kutanen T-Zell Lymphoms wurde ein Maus-Modell etabliert. Dieses Modell beruht auf der Transplantation der humanen Mycosis Fungoides-Zelllinie MyLa in Nacktmäuse. Obwohl ursprünglich durch in Suspension wachsende Zellkulturzellen etabliert, erwies sich die Transplantation von Tumorfragmenten von einer Maus zur nächsten als effizienter.

Da dieses Modell nur das Tumorstadium abdeckt, eignet es sich nicht für Untersuchungen zur Entstehung des kutanen T-Zell Lymphoms oder der Progression zum Tumorstadium. Weitere Limitationen des Modells sind die unterschiedliche Wachstumsgeschwindigkeit der Tumore, da die transplantierten Fragmente nie gleich groß sind und die

arbeitsaufwändige Transplantation selbst. Andererseits wurde bis jetzt noch kein anderes Tiermodell für das menschliche CTCL publiziert.

Die momentane Behandlung von CTCL ist stadienabhängig und erfolgt in frühen Stadien vorwiegend über die Haut. Sie beinhaltet PUVA (die Gabe von Psoralen in Kombination mit UV-A Bestrahlung) oder eine topische Chemotherapie z.B. mit Mechlorethamin (Stickstofflost, chemisch verwandt mit Senfgas). Systemische Therapien beinhalten die Gabe von Retinoiden oder Interferonen. In fortgeschrittenen Stadien oder bei Resistenzen gegen topische Therapien werden häufig mehrere Wirkstoffe in Kombination verwendet. Einige neue experimentelle Therapieansätze verwenden Retinoid X Rezeptor (RXR) Retinoide, die an RXR-Elemente im Genom binden und die Genexpression modulieren oder ein Fusionsprotein aus Interleukin-2 und einem bakteriellen Toxin. CTCL-Zellen exprimieren den Interleukin-2 Rezeptor meist konstitutiv und binden das Fusionsprotein, woraufhin die Toxindomäne für eine selektive Abtötung der Tumorzellen sorgt (Foss und Whittaker, 2006).

In dieser Arbeit sollte eine therapeutische Behandlung mit retroviralen Vektoren untersucht werden. Ein temporärer Stillstand des Tumorwachstums konnte mit retroviralen Vektoren, die für ein Suizid-Gen codieren, bereits gezeigt werden, jedoch schien die Anzahl der applizierten Vektorpartikel nicht ausreichend zu sein, um einen Rückgang der Tumorgroße zu erreichen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die retroviralen Vektoren nur jeweils die infizierte Zelle abtöteten, uninfizierte Nachbarzellen jedoch am Leben blieben (Thaler et al., 2003). Daher sollte untersucht werden, ob sich durch die Verwendung des HIV Hüllproteins als therapeutisches Gen, uninfizierte Nachbarzellen ebenfalls abtöten (*bystander*-Effekt) lassen. Der *bystander*-Effekt des HIV Hüllproteins beruht darauf, dass es sich nach Expression in Zielzellen auf der Zelloberfläche befindet und dort zur Fusion mit Nachbarzellen führt, die die HIV-Rezeptoren CD4 und CXCR4 oder CCR5 tragen; so wie auch die virale Membran mit der Zielzellmembran fusioniert. Durch diesen Vorgang entstehen nicht lebensfähige Riesenzellen, so genannte Synzytien. Die Bildung von Synzytien wird bei bestimmten HIV Stämmen häufig beobachtet, die deshalb als „Synzytien-induzierend“ bezeichnet werden. Auch bei der Infektion von Zellen mit anderen Viren wurde die Bildung von Synzytien beobachtet und als neuartiger Ansatz für die Therapie von Tumorerkrankungen postuliert (Bateman et al., 2000; Higuchi et al., 2000; Galanis et al., 2001).

Die in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Vektoren bestehen aus den Gag und Pol Proteinen von MLV und tragen das Hüllprotein 89.6P von HIV, welches parallel auch als therapeutisches Gen übertragen wird. Diese MLV/HIV pseudotypisierten Vektoren haben

den gleichen Zielzelltropismus wie HIV, da dieser ausschließlich auf den Eigenschaften des Hüllproteins beruht (Thaler und Schnierle, 2001). Das heißt, sie können nur in CD4 und Ko-Rezeptor-exprimierende Zellen eindringen. Da die im Maus-Modell verwendeten MyLa Zellen CD4 und Ko-Rezeptor exprimieren, können die Vektorpartikel in diesem Modell ausschließlich Tumorzellen infizieren. Zusätzlich sind MLV-basierende Vektoren nur in der Lage, sich teilende Zellen zu infizieren. Somit ist eine präferenzielle Infektion von Tumorzellen sehr wahrscheinlich.

Zunächst wurde eine stabile Verpackungszelllinie, Fly syn Env, generiert (Abbildungen 4.34 und 4.35). Die in den Zellkulturüberstand abgegebenen Vektorpartikel wurden auf Synzytienbildung, erst bei adhärennten NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen und anschließend auch für MyLa Suspensionszellen, untersucht. In beiden Fällen konnten Synzytien gezeigt werden. Der nächste Schritt der *in vitro*-Charakterisierung der Fly syn Env Vektoren bestand im Vergleich der Wachstumsinhibition von MyLa Zellen mit GFP-TK transduzierenden Vektoren. MyLa Zellen wurden mit syn Env bzw. GFP-TK codierenden Vektorpartikeln transduziert und in regelmäßigen Abständen wurde die Zahl der lebenden Zellen bestimmt. An den Tagen 4-6 wurde allen Ansätzen Ganciclovir zugegeben, ein Stoff, der durch die *Herpes simplex* Thymidinkinase in GFP-TK zu einer toxischen Substanz umgesetzt wird. MyLa Zellen, die mit syn Env transduziert wurden, vermehrten sich nicht weiter. GFP-TK transduzierte Zellen konnten durch Ganciclovir-Gabe kurzzeitig in ihrem Wachstum gehemmt werden, vermehrten sich aber ab Tag 6 wieder. Dieses Ergebnis zeigt einen überlegenen therapeutischen Effekt der Transduktion mit syn Env Partikeln gegenüber der Transduktion mit GFP-TK *in vitro* (Abbildung 4.42).

Die Titerung der Überstände von Fly syn Env ergab 2×10^5 transduzierende Einheiten / ml auf NIH3T3 CD4/CXCR4 Zellen. Da für die Verwendung der Vektorpartikel im Maus-Experiment nur das geringe Volumen von 50 μ l appliziert werden kann, sollte die Verwendung von DC-SIGN zur Stabilisierung oder Anreicherung der Vektorpartikel untersucht werden, um eine Verbesserung des Transfers retroviraler Vektoren in die Tumorzellen zu erreichen. Zunächst wurde DC-SIGN löslich, d.h. ohne den Transmembran- und cytoplasmatischen Anteil, durch verschiedenen Zellkulturzelllinien exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt war aus der Literatur lediglich bekannt, dass auch geringste Mengen an HIV-Partikeln, die in Zellkultur T-Zellen nicht produktiv infizieren können, durch DC-SIGN-exprimierende THP und Dendritische Zellen effizient auf T-Zellen transferiert werden können (Geijtenbeek et al., 2000b). Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, dass HI-Viren bis zu vier Tage nach Bindung an DC-SIGN-exprimierende Dendritische Zellen noch Zielzellen infizieren konnten; die Viren durch DC-SIGN also stabilisiert wurden.

Die Zellkulturüberstände mit löslichem DC-SIGN sollten darauf getestet werden, ob dieser Effekt zur Stabilisierung von HIV Env-pseudotypisierten retroviralen Vektoren genutzt werden kann. Die Experimente zeigten, dass dies nicht möglich ist (Tabelle 4.39). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es sich bei der Repeat-Region von DC-SIGN um eine Tetramerisierungsdomäne handelt und die Tetramere eine höhere Affinität zum HIV Hüllprotein gp120 haben. Dieser Unterschied in der Bindung glykosylierter Proteine durch mono- und tetrameres DC-SIGN wurde bereits beschrieben (Mitchell et al., 2001). Die löslichen Proteine verfügen zwar noch über diese Region, jedoch besteht die Möglichkeit, dass lösliches DC-SIGN keine funktionalen Tetramere bildet. Die korrekte Masse der löslichen DC-SIGN Proteine wurde immer mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen überprüft. Parallel wurde von der Gruppe um Dan Littman ebenfalls die Beobachtung veröffentlicht, dass die Mischung von löslichem DC-SIGN mit viralen Vektoren nicht zu einer Erhöhung der Transduktionsrate führt (Kwon et al., 2002). Die Gruppe folgert aus ihren Beobachtungen, dass DC-SIGN auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden muss, damit eine Erhöhung der Transduktionsrate stattfindet. Weiterhin wurde mittlerweile von mehreren Gruppen publiziert, dass vor allem die beobachtete Stabilisierung der Viren eher auf eine Infektion der Dendritischen Zellen samt nachfolgender Neusynthese von Nachkommenviren beruht (Burleigh et al., 2006; Lore et al., 2005; Turville et al., 2004). Die reine *trans*-Infektion durch DC-SIGN-exprimierende Zellen, d.h. Beladung von DC-SIGN-exprimierenden Zellen, gefolgt von Wasch-Schritten und anschließende Ko-Inkubation mit Zielzellen, konnte für Dendritische Zellen (DC) und eine Reihe von B-Zelllinien, u.a. durch die genannten Gruppen, bestätigt werden. Die Gruppe von KewalRamani zeigte, dass es sich bei den von Geijtenbeek veröffentlichten THP Zellen, die auch andere Gruppen zur Untersuchung der Bindung von Pathogenen an DC-SIGN verwendet wurden, eigentlich um Raji B-Zellen handelt und die wirkliche Monozytenzelllinie THP trotz DC-SIGN-Expression nicht in der Lage zur *trans*-Infektion ist (Wu et al., 2004). Diese Gruppe vermutet, dass es zwischen B-Zellen und DC einige gemeinsame Eigenschaften gibt, die eine *trans*-Infektion erlauben, welche von anderen Zellen jedoch nicht geteilt wird. Diese Hypothese wird von unserer Beobachtung unterstützt, dass transfizierte K562 Zellen, obwohl sie deutliche Mengen DC-SIGN auf der Oberfläche tragen, nicht zur *trans*-Infektion von HIV Env pseudotypisierten retroviralen Vektoren in der Lage sind (Abbildung 4.36). Die publizierte *trans*-Infektion durch, uns von Teunis Geijtenbeek zur Verfügung gestellte, „THP DC-SIGN“ Zellen, konnte dagegen reproduziert werden. Trotzdem war auch diese Zelllinie nicht in der Lage, retrovirale Vektorpartikel anzureichern; vielmehr konnten höchstens 5% der eingesetzten Vektorpartikel auf Zielzellen übertragen werden (Abbildung 4.37). Eine Eignung von DC-SIGN zur Stabilisierung oder Anreicherung von retroviralen Vektoren konnte nicht

gezeigt werden. Daher wurden die retroviralen Vektoren für die Behandlung im Maus-Modell auf physikalischem Weg, mit Hilfe einer Zentrifuge, angereichert.

Zur Bestätigung einer verbesserten Inhibition des Tumorwachstums durch syn Env Vektorpartikel wurden Tumor-tragenden Mäusen jeweils *syn env* oder *gfp-tk* codierende Vektorpartikel appliziert. Als Kontrolle diente die Gabe der gleichen Menge PBS. Die Auswertung dieses Experiments ergab einen Parallelverlauf des Tumorwachstums zwischen GFP-TK und syn Env behandelten Tumoren. Im Vergleich zur PBS Gruppe waren die Tumorumfänge der GFP-TK und syn Env behandelten Tumoren vor allem zwischen den Tagen 7 und 10 kleiner. Ab Tag 14 konnte kein Unterschied zwischen Vektor- und PBS-behandelten Tumoren mehr gefunden werden (Abbildung 4.44).

Die bereits publizierte Verringerung des Tumorwachstums durch GFP-TK Behandlung (Thaler et al., 2003) konnte somit bestätigt werden. Eine weitergehende Verringerung der Tumorumfänge bei der Behandlung mit syn Env Vektoren durch den *bystander*-Effekt konnte nicht erreicht werden, jedoch wurden in diesem Experiment etwa viermal mehr GFP-TK Vektoren appliziert. Eine weitere Erklärung für den nur transienten Effekt der Behandlung mit retroviralen Vektoren kann auch eine schlechte Verteilung im Tumorgewebe sein. Schon in unserer Veröffentlichung wurde nur eine geringe Diffusion der retroviralen Vektoren im Tumorgewebe beschrieben (Thaler et al., 2003). Dies schränkt zum einen die Zahl der transduzierbaren Zellen ein und verhindert zum anderen eine großflächige Einbeziehung von Nachbarzellen im Fall von syn Env. Weiterhin dürfte die Anzahl an Tumorzellen um mehrere Größenordnungen über der der applizierten retroviralen Vektoren liegen, d.h. der *bystander*-Effekt müsste sehr stark sein, oder aber durch das Immunsystem unterstützt werden. Für eine Synzytienbildung, die durch Membranproteine anderer Viren induziert wurde, konnte bereits gezeigt werden, dass dadurch eine zusätzliche Aktivierung des Immunsystems ausgelöst wird und dass auf diese Weise Tumorantigene vom Immunsystem verstärkt erkannt und bekämpft werden können (Bateman et al., 2002; Linardakis et al., 2002; Errington et al., 2006). Dieser Effekt lässt sich mit dem in dieser Arbeit verwendeten Maus-Modell nicht zeigen, da die Tiere nicht über ein vollständiges Immunsystem verfügen. Die anderen fusogenen Membranglykoproteine, für die eine erfolgreiche Behandlung von Tumoren in Zellkultur bzw. im Maus-Modell bereits gezeigt werden konnte, sind das G-Protein des vesikulären Stomatitis Virus (VSV-G), eine hyperfusogene Variante des Gibbonaffen Leukämie Virus (GaLV) und die H und F Proteine des Masern Virus (Galanis et al., 2001; Fu et al., 2003; Diaz et al., 2000; Eslahi et al., 2001). Da sich mit VSV-G und GaLV ebenfalls MLV-basierende Vektorpartikel generieren lassen (Haynes et al., 2003), bzw. die Gene für diese Proteine als Transgen in retrovirale Vektoren eingebracht werden können, eignen sie sich

ebenfalls für die Untersuchung im MyLa Maus-Modell. Allerdings sind die mit Retroviren erreichbaren Titer im Vergleich mit vielen anderen Viren recht niedrig. Um höhere Titer zu erreichen, könnten daher replikationskompetente MLV/HIV verwendet werden. Solche Viren hätten den Vorteil, dass sie, zusätzlich zu einer HIV Env-abhängigen Zielzellspezifität, auch einen Tumortropismus haben, da Retroviren – im Gegensatz zu Lentiviren wie HIV – nur proliferierende Zellen infizieren können. Allerdings konnte bis jetzt noch kein replizierendes MLV/HIV Pseudotypvirus erzeugt werden (Nack und Schnierle, 2003; Steidl et al., 2004). Eine Alternative zur Verwendung replizierender MLV/HIV Pseudotypen könnte die intra-tumorale Implantation von verkapselten Verpackungszellen sein. Die Verkapselung von Zellen erlaubt die Freisetzung von Molekülen und Viren, jedoch nicht von Zellen. Somit können weder Verpackungszellen die Kapsel verlassen, noch Zellen des Immunsystems in die Kapsel eindringen (Martinet et al., 2003; Saller et al., 2002). Ein neuer Ansatz der gezielten Virusfreisetzung im Tumorgewebe wurde kürzlich von zwei Gruppen beschrieben: Cole und Kollegen beluden murine T-Zellen mit retroviralen Partikeln, welche die T-Zellen nicht infizieren können, und injizierten diese in immunkompetente, Tumor-tragende Mäuse. Da diese T-Zellen u.a. ins Tumorgewebe wanderten und sich dort die retroviralen Partikel besonders gut von den T-Zellen lösten, konnten sie mit dieser Methode spezifischen Gentransfer in Tumorzellen zeigen (Cole et al., 2005). Die Gruppe um Thorne *et al.* infizierten NKT-Zellen mit Vaccinia Virus. Diese infizierten Zellen wanderten u.a. ins Tumorgewebe und sorgten für eine Infektion der Tumorzellen. Da die verwendeten Viren Deletionen in zwei Genen hatten, deren Phänotyp in Tumorzellen komplementiert werden kann, konnten die Autoren eine Tumor-gerichtete Replikation und Lyse der Tumorzellen feststellen (Thorne et al., 2006).

Zukünftig könnten auch andere Angriffspunkte von Tumoren mit diesem Modell untersucht werden. Dazu gehören zum Beispiel Wege die Blut- und Nährstoffversorgung des Tumors dadurch einzuschränken, so dass die Neubildung von Blutgefäßen im Tumor verhindert wird (Angiogenesehemmung) (Carmeliet, 2005). Ein möglicher anderer Angriffspunkt könnte NF- κ B sein, da vor kurzem gezeigt werden konnte, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B in CTCL-Zellen konstitutiv aktiv ist (Sors et al., 2006). Durch die Verwendung von MLV/HIV pseudotypisierten Vektoren könnte man zielzellspezifisch diese Punkte, z.B. mit Virus-codierter inhibitorischer RNA (si- bzw. shRNA), angreifen und so wichtige Komponenten des Angiogenese- oder des NF- κ B-Signaltransduktionsweges in den Tumorzellen ausschalten.

6. Zusammenfassung

Die Entwicklung neuer und die Adaption bestehender Methoden ist weiterhin eine der vordringlichsten Aufgaben der Forschung zur Bekämpfung der tödlichen Infektion mit dem HI-Virus. So wurde im ersten Teil dieser Arbeit untersucht, ob die Methode der Generierung MHC-unabhängiger Immunantworten gegen Oberflächenproteine, die bereits in der experimentellen Tumorthherapie verwendet wird, für die HIV Therapie adaptiert werden kann. In dieser Arbeit war das HIV Hüllprotein Env das Zielmolekül. Der zweite Teil der Arbeit versucht, Erkenntnisse aus der HIV-Forschung für alternative Tumortherapieansätze am Beispiel des kutanen T-Zell Lymphoms zu verwenden.

Der erste Teil beschäftigt sich mit der Verwendung des Hüllproteins Env von HIV als Zielstruktur für die Generierung MHC-unabhängiger Immunantworten gegen HIV-infizierte Zellen. Hierfür wurden CD4, 5-Helix sowie zwei Varianten von DC-SIGN als HIV Env-bindende Liganden als chimäre T-Zell-Rezeptoren, zusammen mit Teilen von CD3 und CD28, in humanen Zellen exprimiert. Die Funktionalität der Konstrukte konnte gezeigt werden, ein therapeutischer Effekt *in vitro* war jedoch nicht nachweisbar.

Der zweite Teil untersucht die Verwendung des HIV Hüllproteins als therapeutischem Gen zur Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms. Die Pseudotypisierung von MLV-basierenden Vektoren mit HIV Env ermöglicht das zielzellspezifische Eindringen der Vektoren in humane CD4-positive Zellen. Aus diesen Zellen besteht auch das kutane T-Zell Lymphom (CTCL). MLV/HIV pseudotypisierte retrovirale Vektoren, die die 89.6P Variante des HIV Hüllproteins Env als therapeutisches Gen transportieren, wurden generiert und zunächst *in vitro* getestet. Das Wachstum von CTCL-Zellen konnte durch Zugabe dieser Vektorpartikel verhindert und die Zellzahl unter den Ausgangswert reduziert werden. Die Verwendung im Maus-Experiment zeigte einen vergleichbaren Erfolg wie die Verwendung der *Herpes simplex* Thymidinkinase, obwohl von syn Env nur etwa ein Viertel der Vektorpartikel appliziert wurde. Ein *bystander*-Effekt ließ sich damit also nachweisen.

Die Verwendung chimärer T-Zell-Rezeptoren für MHC-unabhängige Immunantworten gegen HIV-Reservoirs im Körper ist ein vielversprechender Therapieansatz. Neben der Verwendung HIV Env-bindender zellulärer Proteine könnte das Spektrum möglicher Liganden durch die Verwendung Subtypen-übergreifender, nicht-inhibitorischer Antikörper, erweitert werden. Dies ist möglich, da für die Immunantwort lediglich die Bindung an das Hüllprotein notwendig ist.

Zur Erhöhung des therapeutischen Effektes des retroviralen Gentransfers zur Therapie kutaner T-Zell Lymphome eignen sich hoch fusogene virale Hüllproteine, die auf diese

Weise einen noch stärkeren *bystander*-Effekt ermöglichen. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser sehr groß sein muss, solange replikationsinkompetente Vektoren verwendet werden.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
APC	Antigen präsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection (http://www.atcc.com)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
CCR5	CC-Chemokinrezeptor 5 (CD195), HIV Ko-Rezeptor
cDNA	complementary DNA
CD <i>xyz</i>	Cluster of differentiation, Nomenklatur zur standardisierten Benennung von Zelloberflächenmolekülen. Festgelegt durch die HLDA.
CMV	Cytomegalie Virus
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor 4 (CD184), HIV Ko-Rezeptor
DAPI	(2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamide
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	<u>D</u> endritic <u>C</u> ell- <u>s</u> pecific <u>I</u> CAM-3- <u>g</u> rabbing <u>n</u> on- <u>i</u> ntegrin
DMEM	Dulbecco's modified Egel's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL Plus	Enhanced Chemiluminescence Plus; Western Blot Detektionsreagenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Env	Hüllglykoprotein (engl. <i>envelope</i>)

FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FL-1 bis -3	Detektionskanäle für Fluoreszenzen im FACS
g	Erdbeschleunigung
gp120	Glykoprotein, Masse: 120 kDa (Hüllglykoprotein von HIV)
gp160	Glykoprotein, Masse: 160 kDa (Vorläufer von gp120 und gp41)
gp41	Glykoprotein, Masse: 41 kDa (Transmembranprotein von HIV)
HLDA	International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonat
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
ICAM-3	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 3
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LD	Lektindomäne
LTR	<i>long terminal repeat</i>
Man ₉ GlcNAc ₂	Oligosaccharid, bei dem neun Mannosereste an zwei N-Acetylglukosamine gebunden sind
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MESV	Mouse Embryonic Stem Cell Virus
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute(n)
MLV	Maus-Leukämie-Virus
Mo-MLV	Moloney Maus-Leukämie-Virus

MOPS	2-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPSV	Myeloproliferative Sarcoma Virus
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PKH26 bzw. -67	fluoreszierende Membranfarbstoffe
PMSF	Phenylmethylylsulfonfluorid
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RNA	Ribonukleinsäure
R-PE	R-Phycoerythrin
RT	Zimmertemperatur
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
<i>shift</i>	Verschiebung der Fluoreszenzintensität
SIV	<i>simian immunodeficiency virus</i>
SP	Signalpeptid
TAE	Tris, Acetat, EDTA (Zusammensetzung eines Puffers)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. <i>T-cell receptor</i>)
t.E.	transduzierende Einheiten
TEMED	Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>well</i>	Napf, Vertiefung, Loch
WHO	World Health Organisation
wt	Wildtyp

Sequenzen der Primer:

	5'/3' Primer	Sequenz (5' -> 3')	Tm	Kommentare
BGH rev Sequenzierprimer	5'	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	56°C	Standard BGH rev Primer z.B. für pSecTag2
pcDNA3.1 rev Sequenzierprimer	3'	CAA CAG ATG GCT GGC AAC TA	57,3°C	BGH rev funktioniert nicht in pcDNA3.1
DC-SIGN seq. Sequenzierprimer	3'	GGA AGA CTG CAG CTG TAG	56°C	bindet kurz nach Ende Repeats (f.l.) bp 907-924 in pcDNA DC-SIGN
DC-SIGN V351G #1 Mutageneseprimer	5'	GCC CAA CAA CG <u>G</u> TGG GGA GGA AG	67,8°C	für site-directed mutagenesis
DC-SIGN V351G #2 Mutageneseprimer	3'	CTT CCT CCC CA <u>C</u> CGT TGT TGG GC	67,8°C	für site-directed mutagenesis
SIGN#1 PCR-Primer	5'	ATT TAG GCC CAG CCG <u>GCC</u> TGC CAC CCC TGT CCC TGG GAA TG	>75°C	<i>Sfi</i> I-site; Anfang von DC-SIGN CRD
SIGN/CD28#2 PCR-Primer	3'	CAT AAC TTC AAT T <u>G</u> C <u>GGC CGC</u> AGC AGG AGG GGG GTT TGG G	>75°C	<i>Not</i> I-site; Ende von DC-SIGN CRD und Anfang von CD28 TM
SIGN/CD28#3 PCR-Primer	5'	CCC TCC TGC T <u>G</u> C <u>GGC</u> <u>CGC</u> AAT TGA AGT TAT GTA TCC TC	74,9°C	<i>Not</i> I-site; Ende von DC-SIGN CRD und Anfang von CD28 TM
CD28/zeta#4! PCR-Primer	3'	TAT TAG GAT CCG GAG CGA TAG GCT GCG AAG	69,5°C	<i>Bam</i> HI-site; Ende von CD28TM und Anfang von CD3zeta
CD28/zeta#5 PCR-Primer	5'	ATT ATG GAT CCA GAG TGA AGT TCA GCA GGA GCG C	70,7°C	<i>Bam</i> HI-site; Ende von CD28TM und Anfang von CD3zeta (cytopl.)
zeta#6 PCR-Primer	3'	TAT TAC TCG AGT TAG CGA GGG GGC AGG GCC TG	73,3°C	<i>Xho</i> I-site; Ende von CD3zeta (cytopl.)
NotI/c-myc#1 Oligo	5'	<u>GGC CGC</u> AGA ACA AAA ACT CAT CTC AGA AGA AGA TCT <u>GGC</u>	72,6°C	c-Myc Epitop (komplett, für 9E10) flankiert von <i>Not</i> I-Überhängen (<i>kursiv</i> , <u>unterstr.</u>)
NotI/c-myc#2 Oligo	3'	<u>GGC CGC</u> CAG ATC TTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC <u>TGC</u>	72,6°C	c-Myc Epitop (komplett, für 9E10) flankiert von <i>Not</i> I-Überhängen (<i>kursiv</i> , <u>unterstr.</u>)
SacII-EcoRI-CD4Sign.Pept	5'	ATA ACC GCG GGA ATT <u>CAT</u> GAA CCG GGG AGT CCC TTT TAG	73,7°C	5' PCR-Primer für CD4Signalpeptid+CD4; <i>Sac</i> II <i>kursiv</i> , <i>Eco</i> RI <u>unterstrichen</u> ; für CD4/zeta Konstrukte
3'NotI-extracell-CD4	3'	ATA AGC GGC CGC TGG CTG CAC CGG GGT GGA CC	>75°C	3' PCR-Primer für extrazellulären CD4-Teil; <i>Not</i> I <u>unterstrichen</u> ; für CD4/zeta Konstrukte
CD8hinge-5'NotI	5'	CTA GAA <u>GCG GCC GCT</u> GAA C	61°C	5' PCR-Primer für huCD8hinge mit 5' <i>Not</i> I site
CD8hinge-3'Sall-NotI	3'	ACT TGT TGC GGC CGC <u>GTC GAC</u> ATC CAG CCC CCT CGT GTG	>75°C	3' PCR-Primer für huCD8hinge mit <i>Not</i> I (<i>kursiv</i>) und <i>Sal</i> I (<u>unterstrichen</u>) sites
F-4218/M387 fwd	5'	GCT CCG CCA CTG TCC GAG	62,8°C	5' Sequenzierprimer für Vektoren pMP71 und pMP71eGFP; bindet an bp 1299-1316
5-Helix 5Prime	5'	AAC TTT AAG AGG CCC <u>AGC CGG CCA</u> TGC AAT TAT TGT CTG	72,6°C	5' PCR-Primer für 5-Helix mit <i>Sfi</i> I-site (<u>unterstrichen</u>)
5-Helix 3Prime	3'	GTG GTG GTG GGC <u>GGC</u> <u>CGC</u> GCC ACC AGC TAG	>75°C	3' PCR-Primer für 5-Helix mit <i>Not</i> I-site (<u>unterstrichen</u>)
CYTU	5'	GTG TCC AAG CTT CCC AGC TCC ATA A		5'PCR Primer für DC-SIGN +Repeats

Aminosäuresequenz c-myc tag (für Antikörper 9E10):

Glu (E) - Gln (Q) - Lys (K) - Leu (L) - Ile (I) - Ser (S) - Glu (E) - Glu (E) - Asp (D) - Leu (L)

Zur Generierung von chimären T-Zell Rezeptoren wurden folgende Fragmente verwendet:

	Bereich des wt Proteins	Swiss-Prot Nummer
CD3zeta	aa 52 – 164	P20963
CD 28	aa 114 – 220	P10747
CD4	aa 1 – 396	P01730
DC-SIGN Lektindomäne	aa 253 – 404	Q9NNX6
DC-SIGN gesamt Extrazell.	aa 64 – 404	Q9NNX6
CD8 hinge	aa 117 – 178	P01732

5-Helix wurde in voller Länge verwendet. Die Sequenz wurde von Root *et al.* publiziert (Root et al., 2001).

8. Literaturverzeichnis

1. **Alvarez, C. P., F. Lasala, J. Carrillo, O. Muniz, A. L. Corbi, and R. Delgado.** 2002. C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cellular entry by Ebola virus in cis and in trans. *J. Virol.* **76**:6841-6844.
2. **Alvarez-Vallina, L.** 2001. Genetic approaches for antigen-selective cell therapy. *Curr. Gene Ther.* **1**:385-397.
3. **Appelmelk, B. J., I. van Die, S. J. van Vliet, C. M. Vandenbroucke-Grauls, T. B. Geijtenbeek, and Y. van Kooyk.** 2003. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol* **170**:1635-9.
4. **Arruda, V. R., H. H. Stedman, T. C. Nichols, M. E. Haskins, M. Nicholson, R. W. Herzog, L. B. Couto, and K. A. High.** 2005. Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model. *Blood* **105**:3458-3464.
5. **Ausubel, F. M., R. Beut, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1988. *Current Protocols in Molecular Biology.* John Wiley & Son, New York.
6. **Bachmann, B. J.** 1983. Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 7. *Microbiol. Rev.* **47**:180-230.
7. **Banchereau, J. und R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-252.
8. **Baribaud, F., S. Pohlmann, and R. W. Doms.** 2001. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission. *Virology* **286**:1-6.
9. **Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautquet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier.** 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-871.
10. **Bateman, A., F. Bullough, S. Murphy, L. Emiliusen, D. Lavillette, F. L. Cosset, R. Cattaneo, S. J. Russell, and R. G. Vile.** 2000. Fusogenic membrane glycoproteins as a novel class of genes for the local and immune-mediated control of tumor growth. *Cancer Res.* **60**:1492-1497.
11. **Bateman, A. R., K. J. Harrington, T. Kottke, A. Ahmed, A. A. Melcher, M. J. Gough, E. Linardakis, D. Riddle, A. Dietz, C. M. Lohse, S. Strome, T. Peterson, R. Simari, and R. G. Vile.** 2002. Viral fusogenic membrane glycoproteins kill solid tumor cells by nonapoptotic mechanisms that promote cross presentation of tumor antigens by dendritic cells. *Cancer Res.* **62**:6566-6578.
12. **Baumann, J. G., D. Unutmaz, M. D. Miller, S. K. Breun, S. M. Grill, J. Mirro, D. R. Littman, A. Rein, and V. N. KewalRamani.** 2004. Murine T cells potently restrict human immunodeficiency virus infection. *J. Virol.* **78**:12537-12547.
13. **Berkhout, B., K. Verhoef, G. Marzio, B. Klaver, M. Vink, X. Zhou, and A. T. Das.** 2002. Conditional virus replication as an approach to a safe live attenuated human immunodeficiency virus vaccine. *J. Neurovirol.* **8 Suppl 2**:134-137.
14. **Bevec, D., M. Dobrovnik, J. Hauber, and E. Bohnlein.** 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene

transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:9870-9874.

15. **Bird, R. E., K. D. Hardman, J. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S. M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, and M. Whitlow.** 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* **242**:423-426.
16. **Birnboim, H. C. und J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.
17. **Bitton, N., G. Gorochov, P. Debre, and Z. Eshhar.** 1999. Gene therapy approaches to HIV-infection: immunological strategies: use of T bodies and universal receptors to redirect cytolytic T-cells. *Front Biosci.* **4**:D386-D393.
18. **Boyer, H. W. und D. Roulland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
19. **Brooks, D. G., S. G. Kitchen, C. M. Kitchen, D. D. Scripture-Adams, and J. A. Zack.** 2001. Generation of HIV latency during thymopoiesis. *Nat. Med.* **7**:459-464.
20. **Burleigh, L., P. Y. Lozach, C. Schiffer, I. Staropoli, V. Pezo, F. Porrot, B. Canque, J. L. Virelizier, F. Arenzana-Seisdedos, and A. Amara.** 2006. Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells. *J. Virol.* **80**:2949-2957.
21. **Carmeliet, P.** 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-936.
22. **Centers for Disease Control and Prevention.** 1992. 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition of AIDS among adolescents and adults. *MMWR Recomm Rep* **41(RR-17)**:1-19.
23. **Chun, T. W., L. Carruth, D. Finzi, X. Shen, J. A. DiGiuseppe, H. Taylor, M. Hermankova, K. Chadwick, J. Margolick, T. C. Quinn, Y. H. Kuo, R. Brookmeyer, M. A. Zeiger, P. Barditch-Crovo, and R. F. Siliciano.** 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* **387**:183-188.
24. **Clavel, F., D. Guetard, F. Brun-Vezinet, S. Chamaret, M. A. Rey, M. O. Santos-Ferreira, A. G. Laurent, C. Dauguet, C. Katlama, C. Rouzioux, and .** 1986. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* **233**:343-346.
25. **Cole, C., J. Qiao, T. Kottke, R. M. Diaz, A. Ahmed, L. Sanchez-Perez, G. Brunn, J. Thompson, J. Chester, and R. G. Vile.** 2005. Tumor-targeted, systemic delivery of therapeutic viral vectors using hitchhiking on antigen-specific T cells. *Nat. Med.* **11**:1073-1081.
26. **Colmenares, M., A. Puig-Kroger, O. M. Pello, A. L. Corbi, and L. Rivas.** 2002. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**:36766-36769.
27. **Crum, N. F., R. H. Riffenburgh, S. Wegner, B. K. Agan, S. A. Tasker, K. M. Spooner, A. W. Armstrong, S. Fraser, and M. R. Wallace.** 2006. Comparisons of causes of death and mortality rates among HIV-infected persons: analysis of the pre-, early, and late HAART (highly active antiretroviral therapy) eras. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **41**:194-200.
28. **Curtis, B. M., S. Scharnowske, and A. J. Watson.** 1992. Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**:8356-8360.

29. **Dalgleish, A. G., P. C. Beverley, P. R. Clapham, D. H. Crawford, M. F. Greaves, and R. A. Weiss.** 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* **312**:763-767.
30. **Daniel, M. D., F. Kirchhoff, S. C. Czajak, P. K. Sehgal, and R. C. Desrosiers.** 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**:1938-1941.
31. **Darzynkiewicz, Z., X. Li, and J. Gong.** 1994. Assays of cell viability: discrimination of cells dying by apoptosis. *Methods Cell Biol.* **41**:15-38.
32. **Deng, H. K., D. Unutmaz, V. N. KewalRamani, and D. R. Littman.** 1997. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature* **388**:296-300.
33. **Diaz, R. M., A. Bateman, L. Emiliusen, A. Fielding, D. Trono, S. J. Russell, and R. G. Vile.** 2000. A lentiviral vector expressing a fusogenic glycoprotein for cancer gene therapy. *Gene Ther.* **7**:1656-1663.
34. **Dobbeling, U., R. Dummer, E. Laine, N. Potoczna, J. Z. Qin, and G. Burg.** 1998. Interleukin-15 is an autocrine/paracrine viability factor for cutaneous T-cell lymphoma cells. *Blood* **92**:252-8.
35. **Doranz, B. J., J. Rucker, Y. Yi, R. J. Smyth, M. Samson, S. C. Peiper, M. Parmentier, R. G. Collman, and R. W. Doms.** 1996. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* **85**:1149-1158.
36. **Engels, B., H. Cam, T. Schuler, S. Indraccolo, M. Gladow, C. Baum, T. Blankenstein, and W. Uckert.** 2003. Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* **14**:1155-68.
37. **Errington, F., A. Bateman, T. Kottke, J. Thompson, K. Harrington, A. Merrick, P. Hatfield, P. Selby, R. Vile, and A. Melcher.** 2006. Allogeneic tumor cells expressing fusogenic membrane glycoproteins as a platform for clinical cancer immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **12**:1333-1341.
38. **Eshhar, Z., T. Waks, G. Gross, and D. G. Schindler.** 1993. Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the gamma or zeta subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**:720-724.
39. **Eslahi, N. K., S. Muller, L. Nguyen, E. Wilson, N. Thull, A. Rolland, and F. Pericle.** 2001. Fusogenic activity of vesicular stomatitis virus glycoprotein plasmid in tumors as an enhancer of IL-12 gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **8**:55-62.
40. **Etemad-Moghadam, B., D. Rhone, T. Steenbeke, Y. Sun, J. Manola, R. Gelman, J. W. Fanton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. K. Axthelm, N. L. Letvin, and J. Sodroski.** 2001. Membrane-fusing capacity of the human immunodeficiency virus envelope proteins determines the efficiency of CD⁺ T-cell depletion in macaques infected by a simian-human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **75**:5646-5655.
41. **Finney, H. M., A. D. Lawson, C. R. Bebbington, and A. N. Weir.** 1998. Chimeric receptors providing both primary and costimulatory signaling in T cells from a single gene product. *J. Immunol.* **161**:2791-2797.
42. **Fisher, K. J., H. Choi, J. Burda, S. J. Chen, and J. M. Wilson.** 1996. Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* **217**:11-22.
43. **Foss, F. und S. Whittaker.** 2006. CTCL: the most common type of primary cutaneous lymphoma: introduction. *Semin. Oncol.* **33**:S1-S2.

44. **Fu, X., L. Tao, A. Jin, R. Vile, M. K. Brenner, and X. Zhang.** 2003. Expression of a fusogenic membrane glycoprotein by an oncolytic herpes simplex virus potentiates the viral antitumor effect. *Mol. Ther.* **7**:748-754.
45. **Galanis, E., A. Bateman, K. Johnson, R. M. Diaz, C. D. James, R. Vile, and S. J. Russell.** 2001. Use of viral fusogenic membrane glycoproteins as novel therapeutic transgenes in gliomas. *Hum. Gene Ther.* **12**:811-821.
46. **Gao, F., E. Bailes, D. L. Robertson, Y. Chen, C. M. Rodenburg, S. F. Michael, L. B. Cummins, L. O. Arthur, M. Peeters, G. M. Shaw, P. M. Sharp, and B. H. Hahn.** 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* **397**:436-441.
47. **Gardner, M. B. und P. A. Luciw.** 1989. Animal models of AIDS. *FASEB J.* **3**:2593-2606.
48. **Geijtenbeek, T. B., A. Engering, and Y. van Kooyk.** 2002a. DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol* **71**:921-31.
49. **Geijtenbeek, T. B., D. J. Krooshoop, D. A. Bleijs, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, V. Grabovsky, R. Alon, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000a. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**:353-7.
50. **Geijtenbeek, T. B., D. S. Kwon, R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, J. Middel, I. L. Cornelissen, H. S. Nottet, V. N. KewalRamani, D. R. Littman, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2000b. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97.
51. **Geijtenbeek, T. B., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor.** 2000c. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**:575-85.
52. **Geijtenbeek, T. B., G. C. van Duijnhoven, S. J. van Vliet, E. Krieger, G. Vriend, C. G. Figdor, and Y. van Kooyk.** 2002b. Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *J Biol Chem* **277**:11314-20.
53. **Geller, A. I. und X. O. Breakefield.** 1988. A defective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science* **241**:1667-1669.
54. **Giri, M., K. E. Ugen, and D. B. Weiner.** 2004. DNA vaccines against human immunodeficiency virus type 1 in the past decade. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**:370-389.
55. **Gong, J. H., G. Maki, and H. G. Klingemann.** 1994. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* **8**:652-658.
56. **Greene, J. L., G. M. Leytze, J. Emswiler, R. Peach, J. Bajorath, W. Cosand, and P. S. Linsley.** 1996. Covalent dimerization of CD28/CTLA-4 and oligomerization of CD80/CD86 regulate T cell costimulatory interactions. *J. Biol. Chem.* **271**:26762-26771.
57. **Gross, G., T. Waks, and Z. Eshhar.** 1989. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**:10024-10028.
58. **Guest, R. D., R. E. Hawkins, N. Kirillova, E. J. Cheadle, J. Arnold, A. O'Neill, J. Irlam, K. A. Chester, J. T. Kemshead, D. M. Shaw, M. J. Embleton, P. L. Stern, and D. E. Gilham.** 2005. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J. Immunother.* **28**:203-211.
59. **Hacein-Bey-Abina, S., F. Le Deist, F. Carlier, C. Bouneaud, C. Hue, J. P. de Villartay, A. J. Thrasher, N. Wulffraat, R. Sorensen, S. Dupuis-Girod, A. Fischer, E. G. Davies,**

- W. Kuis, L. Leiva, and M. Cavazzana-Calvo.** 2002. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **346**:1185-1193.
60. **Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, M. P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C. S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J. I. Cohen, B. G. de Saint, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L. E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T. H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo.** 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**:415-419.
 61. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
 62. **Hanna, S. L., C. Yang, S. M. Owen, and R. B. Lal.** 2002. Variability of critical epitopes within HIV-1 heptad repeat domains for selected entry inhibitors in HIV-infected populations worldwide [corrected]. *Aids* **16**:1603-1608.
 63. **Harada, Y., M. Tokushima, Y. Matsumoto, S. Ogawa, M. Otsuka, K. Hayashi, B. D. Weiss, C. H. June, and R. Abe.** 2001. Critical requirement for the membrane-proximal cytosolic tyrosine residue for CD28-mediated costimulation in vivo. *J. Immunol.* **166**:3797-3803.
 64. **Haynes, B. F., J. Fleming, E. W. St Clair, H. Katinger, G. Stiegler, R. Kunert, J. Robinson, R. M. Scearce, K. Plonk, H. F. Staats, T. L. Ortel, H. X. Liao, and S. M. Alam.** 2005. Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science* **308**:1906-1908.
 65. **Haynes, C., O. Erlwein, and B. S. Schnierle.** 2003. Modified envelope glycoproteins to retarget retroviral vectors. *Curr Gene Ther* **3**:405-10.
 66. **Hermonat, P. L. und N. Muzyczka.** 1984. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**:6466-6470.
 67. **Higuchi, H., S. F. Bronk, A. Bateman, K. Harrington, R. G. Vile, and G. J. Gores.** 2000. Viral fusogenic membrane glycoprotein expression causes syncytia formation with bioenergetic cell death: implications for gene therapy. *Cancer Res.* **60**:6396-6402.
 68. **Hildinger, M., K. L. Abel, W. Ostertag, and C. Baum.** 1999. Design of 5' untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J. Virol.* **73**:4083-4089.
 69. **Hildinger, M., M. T. Dittmar, P. Schult-Dietrich, B. Fehse, B. S. Schnierle, S. Thaler, G. Stiegler, R. Welker, and D. von Laer.** 2001. Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* **75**:3038-42.
 70. **Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, and P. R. Johnson.** 1989. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* **339**:389-92.
 71. **Hombach, A., C. Heuser, M. Gerken, B. Fischer, K. Lewalter, V. Diehl, C. Pohl, and H. Abken.** 2000. T cell activation by recombinant FcepsilonRI gamma-chain immune receptors: an extracellular spacer domain impairs antigen-dependent T cell activation but not antigen recognition. *Gene Ther* **7**:1067-75.
 72. **Hombach, A., A. Wiczarkowicz, T. Marquardt, C. Heuser, L. Usai, C. Pohl, B. Seliger, and H. Abken.** 2001. Tumor-specific T cell activation by recombinant immunoreceptors: CD3 zeta signaling and CD28 costimulation are simultaneously required for efficient IL-2 secretion and can be integrated into one combined CD28/CD3 zeta signaling receptor molecule. *J Immunol* **167**:6123-31.

73. **Hu, D. J., T. J. Dondero, M. A. Rayfield, J. R. George, G. Schochetman, H. W. Jaffe, C. C. Luo, M. L. Kalish, B. G. Weniger, C. P. Pau, C. A. Schable, and J. W. Curran.** 1996. The emerging genetic diversity of HIV. The importance of global surveillance for diagnostics, research, and prevention. *JAMA* **275**:210-216.
74. **Irving, B. A. und A. Weiss.** 1991. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathways. *Cell* **64**:891-901.
75. **Janeway, C. A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik.** 2001. Immunobiology. Garland Publishing, New York and London.
76. **Johnson, R. P., J. D. Lifson, S. C. Czajak, K. S. Cole, K. H. Manson, R. Glickman, J. Yang, D. C. Montefiori, R. Montelaro, M. S. Wyand, and R. C. Desrosiers.** 1999. Highly attenuated vaccine strains of simian immunodeficiency virus protect against vaginal challenge: inverse relationship of degree of protection with level of attenuation. *J. Virol.* **73**:4952-4961.
77. **Kaufman, D., L. I. Gordon, D. Variakojis, W. A. Caro, R. Marder, M. Jumbelic, and H. H. Roenigk, Jr.** 1987. Successfully treated Hodgkin's disease followed by mycosis fungoides: case report and review of the literature. *Cutis* **39**:291-296.
78. **Keppler, O. T., F. J. Welte, T. A. Ngo, P. S. Chin, K. S. Patton, C. L. Tsou, N. W. Abbey, M. E. Sharkey, R. M. Grant, Y. You, J. D. Scarborough, W. Ellmeier, D. R. Littman, M. Stevenson, I. F. Charo, B. G. Herndier, R. F. Speck, and M. A. Goldsmith.** 2002. Progress toward a human CD4/CCR5 transgenic rat model for de novo infection by human immunodeficiency virus type 1. *J Exp Med* **195**:719-36.
79. **Kestler, H. W., III, D. J. Ringler, K. Mori, D. L. Panicali, P. K. Sehgal, M. D. Daniel, and R. C. Desrosiers.** 1991. Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-662.
80. **Kilby, J. M. und J. J. Eron.** 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *N. Engl. J. Med.* **348**:2228-2238.
81. **Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Aلدredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag.** 1998. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* **4**:1302-1307.
82. **Kim, E. J., S. Hess, S. K. Richardson, S. Newton, L. C. Showe, B. M. Benoit, R. Ubriani, C. C. Vittorio, J. M. Junkins-Hopkins, M. Wysocka, and A. H. Rook.** 2005. Immunopathogenesis and therapy of cutaneous T cell lymphoma. *J. Clin. Invest* **115**:798-812.
83. **Koff, W. C., P. R. Johnson, D. I. Watkins, D. R. Burton, J. D. Lifson, K. J. Hasenkrug, A. B. McDermott, A. Schultz, T. J. Zamb, R. Boyle, and R. C. Desrosiers.** 2006. HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. *Nat. Immunol.* **7**:19-23.
84. **Korber, B., M. Muldoon, J. Theiler, F. Gao, R. Gupta, A. Lapedes, B. H. Hahn, S. Wolinsky, and T. Bhattacharya.** 2000. Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* **288**:1789-1796.
85. **Kruger, U., T. Pfeiffer, and V. Bosch.** 1996. Generation of lymphocyte cell lines coexpressing CD4 and wild-type or mutant HIV type 1 glycoproteins: implications for HIV type 1 Env-induced cell lysis. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**:783-92.
86. **Kuwana, Y., Y. Asakura, N. Utsunomiya, M. Nakanishi, Y. Arata, S. Itoh, F. Nagase, and Y. Kurosawa.** 1987. Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**:960-968.

87. **Kwon, D. S., G. Gregorio, N. Bitton, W. A. Hendrickson, and D. R. Littman.** 2002. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity*. **16**:135-144.
88. **Lemey, P., O. G. Pybus, B. Wang, N. K. Saksena, M. Salemi, and A. M. Vandamme.** 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**:6588-6592.
89. **Linardakis, E., A. Bateman, V. Phan, A. Ahmed, M. Gough, K. Olivier, R. Kennedy, F. Errington, K. J. Harrington, A. Melcher, and R. Vile.** 2002. Enhancing the efficacy of a weak allogeneic melanoma vaccine by viral fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumor cell-tumor cell fusion. *Cancer Res.* **62**:5495-5504.
90. **Lindemann, D., M. Bock, M. Schweizer, and A. Rethwilm.** 1997. Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins. *J Virol* **71**:4815-20.
91. **Lore, K., A. Smed-Sorensen, J. Vasudevan, J. R. Mascola, and R. A. Koup.** 2005. Myeloid and plasmacytoid dendritic cells transfer HIV-1 preferentially to antigen-specific CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* **201**:2023-2033.
92. **Lorin, C., L. Mollet, F. Delebecque, C. Combredet, B. Hurtrel, P. Charneau, M. Brahic, and F. Tangy.** 2004. A single injection of recombinant measles virus vaccines expressing human immunodeficiency virus (HIV) type 1 clade B envelope glycoproteins induces neutralizing antibodies and cellular immune responses to HIV. *J. Virol.* **78**:146-157.
93. **Maher, J., R. J. Brentjens, G. Gunset, I. Riviere, and M. Sadelain.** 2002. Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* **20**:70-5.
94. **Martinet, O., N. Schreyer, E. D. Reis, and J. M. Joseph.** 2003. Encapsulation of packaging cell line results in successful retroviral-mediated transfer of a suicide gene in vivo in an experimental model of glioblastoma. *Eur. J. Surg. Oncol.* **29**:351-357.
95. **Masiero, S., C. Del Vecchio, R. Gavioli, G. Mattiuzzo, M. G. Cusi, L. Micheli, F. Gennari, A. Siccardi, W. A. Marasco, G. Palu, and C. Parolin.** 2005. T-cell engineering by a chimeric T-cell receptor with antibody-type specificity for the HIV-1 gp120. *Gene Ther.* **12**:299-310.
96. **Mellors, J. W., A. Munoz, J. V. Giorgi, J. B. Margolick, C. J. Tassoni, P. Gupta, L. A. Kingsley, J. A. Todd, A. J. Saah, R. Detels, J. P. Phair, and C. R. Rinaldo, Jr.** 1997. Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann. Intern. Med.* **126**:946-954.
97. **Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson, and M. V. Eiden.** 1991. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* **65**:2220-4.
98. **Mitchell, D. A., A. J. Fadden, and K. Drickamer.** 2001. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J. Biol. Chem.* **276**:28939-28945.
99. **Mitsuyasu, R. T., P. A. Anton, S. G. Deeks, D. T. Scadden, E. Connick, M. T. Downs, A. Bakker, M. R. Roberts, C. H. June, S. Jalali, A. A. Lin, R. Pennathur-Das, and K. M. Hege.** 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**:785-793.
100. **Modrow, S. und D. Falke.** 1997. *Molekulare Virologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

101. **Morgenstern, J. P. und H. Land.** 1990. Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* **18**:3587-96.
102. **Moritz, D. und B. Groner.** 1995. A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta- chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* **2**:539-46.
103. **Morrissey, D. V., J. A. Lockridge, L. Shaw, K. Blanchard, K. Jensen, W. Breen, K. Hartsough, L. Machemer, S. Radka, V. Jadhav, N. Vaish, S. Zinnen, C. Vargeese, K. Bowman, C. S. Shaffer, L. B. Jeffs, A. Judge, I. MacLachlan, and B. Polisky.** 2005. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **23**:1002-1007.
104. **Muhlebach, M. D., I. Schmitt, S. Steidl, J. Stitz, M. Schweizer, T. Blankenstein, K. Cichutek, and W. Uckert.** 2003. Transduction efficiency of MLV but not of HIV-1 vectors is pseudotype dependent on human primary T lymphocytes. *J. Mol. Med.* **81**:801-810.
105. **Myskowski, P. L.** 1991. Cutaneous T-cell lymphoma and human immunodeficiency virus. The spectrum broadens. *Arch. Dermatol.* **127**:1045-1047.
106. **Nack, U. und B. S. Schnierle.** 2003. Replacement of the murine leukemia virus (MLV) envelope gene with a truncated HIV envelope gene in MLV generates a virus with impaired replication capacity. *Virology* **315**:209-16.
107. **Ott, M. G., M. Schmidt, K. Schwarzwaelder, S. Stein, U. Siler, U. Koehl, H. Glimm, K. Kuhlcke, A. Schilz, H. Kunkel, S. Naundorf, A. Brinkmann, A. Deichmann, M. Fischer, C. Ball, I. Pilz, C. Dunbar, Y. Du, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, U. Luthi, M. Hassan, A. J. Thrasher, D. Hoelzer, C. von Kalle, R. Seger, and M. Grez.** 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Med.* **12**:401-409.
108. **Pascual, J., A. Torrelo, J. L. Teruel, C. Bellas, R. Marcen, and J. Ortuno.** 1992. Cutaneous T cell lymphomas after renal transplantation. *Transplantation* **53**:1143-1145.
109. **Pear, W. S., G. P. Nolan, M. L. Scott, and D. Baltimore.** 1993. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:8392-6.
110. **Perelson, A. S., A. U. Neumann, M. Markowitz, J. M. Leonard, and D. D. Ho.** 1996. HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science* **271**:1582-1586.
111. **Pinthus, J. H., T. Waks, V. Malina, K. Kaufman-Francis, A. Harmelin, I. Aizenberg, H. Kanety, J. Ramon, and Z. Eshhar.** 2004. Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J. Clin. Invest* **114**:1774-1781.
112. **Pohlmann, S., F. Baribaud, B. Lee, G. J. Leslie, M. D. Sanchez, K. Hiebenthal-Millow, J. Munch, F. Kirchhoff, and R. W. Doms.** 2001. DC-SIGN interactions with human immunodeficiency virus type 1 and 2 and simian immunodeficiency virus. *J. Virol.* **75**:4664-4672.
113. **Pohlmann, S., J. Zhang, F. Baribaud, Z. Chen, G. J. Leslie, G. Lin, A. Granelli-Piperno, R. W. Doms, C. M. Rice, and J. A. McKeating.** 2003. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J. Virol.* **77**:4070-4080.
114. **Poznansky, M., A. Lever, L. Bergeron, W. Haseltine, and J. Sodroski.** 1991. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J. Virol.* **65**:532-536.

115. **Protzer, U., M. Nassal, P. W. Chiang, M. Kirschfink, and H. Schaller.** 1999. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**:10818-10823.
116. **Pule, M. A., K. C. Straathof, G. Dotti, H. E. Heslop, C. M. Rooney, and M. K. Brenner.** 2005. A chimeric T cell antigen receptor that augments cytokine release and supports clonal expansion of primary human T cells. *Mol. Ther.* **12**:933-941.
117. **Puoti, M. e. al.** 2006. Liver-related mortality in the HAART era in a cohort of HIV infected patients: incidence, risc factors and impact of HAART. Amsterdam.
118. **Reimann, K. A., J. T. Li, R. Veazey, M. Halloran, I. W. Park, G. B. Karlsson, J. Sodroski, and N. L. Letvin.** 1996. A chimeric simian/human immunodeficiency virus expressing a primary patient human immunodeficiency virus type 1 isolate env causes an AIDS-like disease after in vivo passage in rhesus monkeys. *J. Virol.* **70**:6922-6928.
119. **Riley, J. L. und C. H. June.** 2005. The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* **105**:13-21.
120. **Root, M. J. und D. H. Hamer.** 2003. Targeting therapeutics to an exposed and conserved binding element of the HIV-1 fusion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5016-21.
121. **Root, M. J., M. S. Kay, and P. S. Kim.** 2001. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* **291**:884-8.
122. **Rowland-Jones, S. L., T. Dong, K. R. Fowke, J. Kimani, P. Krausa, H. Newell, T. Blanchard, K. Ariyoshi, J. Oyugi, E. Ngugi, J. Bwayo, K. S. MacDonald, A. J. McMichael, and F. A. Plummer.** 1998. Cytotoxic T cell responses to multiple conserved HIV epitopes in HIV-resistant prostitutes in Nairobi. *J. Clin. Invest* **102**:1758-1765.
123. **Rusconi, S., A. Scozzafava, A. Mastrolorenzo, and C. T. Supuran.** 2004. New advances in HIV entry inhibitors development. *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* **4**:339-355.
124. **Russell, D. W. und A. D. Miller.** 1996. Foamy virus vectors. *J. Virol.* **70**:217-222.
125. **Saller, R. M., S. Indraccolo, V. Coppola, G. Esposito, J. Stange, S. Mitzner, A. Amadori, B. Salmons, and W. H. Gunzburg.** 2002. Encapsulated cells producing retroviral vectors for in vivo gene transfer. *J Gene Med* **4**:150-60.
126. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY.
127. **Schmitz, J. E., M. J. Kuroda, S. Santra, V. G. Sasseville, M. A. Simon, M. A. Lifton, P. Racz, K. Tenner-Racz, M. Dalesandro, B. J. Scallon, J. Ghayeb, M. A. Forman, D. C. Montefiori, E. P. Rieber, N. L. Letvin, and K. A. Reimann.** 1999. Control of viremia in simian immunodeficiency virus infection by CD8+ lymphocytes. *Science* **283**:857-860.
128. **Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**:628-33.
129. **Sors, A., F. Jean-Louis, C. Pellet, L. Laroche, L. Dubertret, G. Courtois, H. Bachelez, and L. Michel.** 2006. Down-regulating constitutive activation of the NF-kappaB canonical pathway overcomes the resistance of cutaneous T-cell lymphoma to apoptosis. *Blood* **107**:2354-2363.
130. **Sparacio, S., U. Zeilfelder, T. Pfeiffer, T. Henzler, and V. Bosch.** 2000. Membrane fusion between retroviral particles: host-range extension and vaccine prospects. *Virology* **271**:248-52.

131. **Steidl, S., S. Schule, M. D. Muhlebach, J. Stitz, K. Boller, K. Cichutek, and M. Schweizer.** 2004. Genetic engineering of onco/lentivirus hybrids results in formation of infectious but not of replication-competent viruses. *J Gen Virol* **85**:665-78.
132. **Stevenson, F. K., C. H. Ottensmeier, P. Johnson, D. Zhu, S. L. Buchan, K. J. McCann, J. S. Roddick, A. T. King, F. McNicholl, N. Savelyeva, and J. Rice.** 2004. DNA vaccines to attack cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **101 Suppl 2**:14646-14652.
133. **Stevenson, M.** 2003. HIV-1 pathogenesis. *Nat. Med.* **9**:853-860.
134. **Stitz, J., C. J. Buchholz, M. Engelstadter, W. Uckert, U. Bloemer, I. Schmitt, and K. Cichutek.** 2000. Lentiviral vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**:16-20.
135. **Su, S. V., P. Hong, S. Baik, O. A. Negrete, K. B. Gurney, and B. Lee.** 2004. DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3. *J. Biol. Chem.* **279**:19122-19132.
136. **Sutter, G. und B. Moss.** 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:10847-51.
137. **Tassaneetrithep, B., T. H. Burgess, A. Granelli-Piperno, C. Trumfheller, J. Finke, W. Sun, M. A. Eller, K. Pattanapanyasat, S. Sarasombath, D. L. Birx, R. M. Steinman, S. Schlesinger, and M. A. Marovich.** 2003. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J. Exp. Med.* **197**:823-829.
138. **Thaler, S., A. M. Burger, T. Schulz, B. Brill, A. Bittner, P. A. Oberholzer, R. Dummer, and B. S. Schnierle.** 2004. Establishment of a mouse xenograft model for mycosis fungoides. *Exp. Dermatol.* **13**:406-412.
139. **Thaler, S., A. M. Burger, T. Schulz, and B. S. Schnierle.** 2003. MLV/HIV-pseudotyped vectors: a new treatment option for cutaneous T cell lymphomas. *Mol Ther* **8**:756-61.
140. **Thaler, S. und B. S. Schnierle.** 2001. A packaging cell line generating CD4-specific retroviral vectors for efficient gene transfer into primary human T-helper lymphocytes. *Mol Ther* **4**:273-9.
141. **Thorne, S. H., R. S. Negrin, and C. H. Contag.** 2006. Synergistic antitumor effects of immune cell-viral biotherapy. *Science* **311**:1780-1784.
142. **Turville, S. G., J. J. Santos, I. Frank, P. U. Cameron, J. Wilkinson, M. Miranda-Saksena, J. Dable, H. Stossel, N. Romani, M. Piatak, Jr., J. D. Lifson, M. Pope, and A. L. Cunningham.** 2004. Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells. *Blood* **103**:2170-2179.
143. **Tuyp, E., A. Burgoyne, T. Aitchison, and R. MacKie.** 1987. A case-control study of possible causative factors in mycosis fungoides. *Arch. Dermatol.* **123**:196-200.
144. **Uherek, C., B. Groner, and W. Wels.** 2001. Chimeric antigen receptors for the retargeting of cytotoxic effector cells. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**:523-534.
145. **Uphoff, C. C., S. M. Gignac, and H. G. Drexler.** 1992. Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *J. Immunol. Methods* **149**:43-53.
146. **Verhoef, K., G. Marzio, W. Hillen, H. Bujard, and B. Berkhout.** 2001. Strict control of human immunodeficiency virus type 1 replication by a genetic switch: Tet for Tat. *J Virol* **75**:979-87.
147. **Wainberg, M. A.** 2004. HIV-1 subtype distribution and the problem of drug resistance. *Aids* **18 Suppl 3**:S63-S68.

148. **Walker, R. E., C. M. Bechtel, V. Natarajan, M. Baseler, K. M. Hege, J. A. Metcalf, R. Stevens, A. Hazen, R. M. Blaese, C. C. Chen, S. F. Leitman, J. Palensky, J. Wittes, R. T. Davey, Jr., J. Falloon, M. A. Polis, J. A. Kovacs, D. F. Broad, B. L. Levine, M. R. Roberts, H. Masur, and H. C. Lane.** 2000. Long-term in vivo survival of receptor-modified syngeneic T cells in patients with human immunodeficiency virus infection. *Blood* **96**:467-474.
149. **Weiss, R. A.** 2001. Gulliver's travels in HIVland. *Nature* **410**:963-967.
150. **Westwood, J. A., M. J. Smyth, M. W. Teng, M. Moeller, J. A. Trapani, A. M. Scott, F. E. Smyth, G. A. Cartwright, B. E. Power, D. Honemann, H. M. Prince, P. K. Darcy, and M. H. Kershaw.** 2005. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**:19051-19056.
151. **Whitney, J. B. und R. M. Ruprecht.** 2004. Live attenuated HIV vaccines: pitfalls and prospects. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **17**:17-26.
152. **Whittemore, A. S., E. A. Holly, I. M. Lee, E. A. Abel, R. M. Adams, B. J. Nickoloff, L. Bley, J. M. Peters, and C. Gibney.** 1989. Mycosis fungoides in relation to environmental exposures and immune response: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**:1560-1567.
153. **Willemsen, R. A., R. Debets, P. Chames, and R. L. Bolhuis.** 2003. Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. *Hum. Immunol.* **64**:56-68.
154. **Wu, L., T. D. Martin, M. Carrington, and V. N. KewalRamani.** 2004. Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* **318**:17-23.
155. **Zhu, T., B. T. Korber, A. J. Nahmias, E. Hooper, P. M. Sharp, and D. D. Ho.** 1998. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* **391**:594-597.

Publikationen

Schulz T and Schnierle B: Cell type-specific delivery of fusogenic membrane glycoproteins for the treatment of cutaneous T cell lymphomas. 2006 *Manuskript in Vorbereitung*

Thaler S, Burger A, **Schulz T**, Brill B, Bittner A, Oberholzer P, Dummer R. and Schnierle B: Establishment of an animal model for Mycosis Fungoides. *Exp Dermatol* 2004: 13 406-412.

Thaler S, Burger A, **Schulz T** and Schnierle B: MLV/HIV pseudotyped vectors: a new treatment option for cutaneous T cell lymphomas. *Mol Ther* 2003: 8 (5) 756-761.

Vortrag

- 2004** *Arbeitsgemeinschaft dermatologische Forschung AG Kutane Lymphome, Mannheim*
Schulz, T. und Schnierle B.: Maus-Modell für kutane T-Zell Lymphome. Vortrag

Präsentationen und Vorträge bei wissenschaftlichen Meetings

- 2003** *Jahrestagung Gesellschaft für Virologie, Berlin*
Schulz T and Schnierle B: MLV/HIV vectors as tools to study DC-SIGN function

Gesellschaft für Virologie 1. Meeting AK Virale Vektoren, Zeilitzheim
Schulz T, Thaler S, Burger A, Bittner A, Schnierle B: MLV/HIV pseudotyped vectors: a new treatment option for cutaneous T cell lymphomas
- 2004** „Joint Meeting“ der Gesellschaft für Virologie und Società Italiana di Virologia, Tübingen
Schulz T, Thaler S, Burger A, Bittner A, Schnierle B: MLV/HIV pseudotyping allows targeting of retroviral vectors to CD4+ cells

Gesellschaft für Virologie 2. Meeting AK Virale Vektoren & 11. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gentherapie, Frankfurt am Main
Schulz T and Schnierle B: Chimeric T-cell receptors directed against the envelope protein of human immunodeficiency virus (HIV) to target cytotoxic effector cells to HIV infected cells

Schulz T, Thaler S, Burger A, Dummer R, Schnierle B: MLV/HIV pseudotyped vectors: a new treatment option for cutaneous T cell lymphomas
- 2005** *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover*
Schulz, T and Schnierle B: Chimeric T-cell receptors directed against the envelope protein of human immunodeficiency virus (HIV) to target cytotoxic effector cells to HIV infected cells
- 2006** *Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, München*
Schulz, T and Schnierle B: Chimeric T-cell receptor zeta chains directed against the HIV envelope protein to target cytotoxic effector cells to HIV infected cells

Auszeichnungen

Gewährung einer Reisekostenbeihilfe zur International Flow Cytometry School 2003 in München durch den Boehringer Ingelheim Fonds.

Danksagungen

Diese Arbeit wurde im Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main begonnen und im Paul-Ehrlich-Institut, Langen abgeschlossen.

Ich möchte PD Dr. Barbara Schnierle für die Überlassung des Themas und die große Unterstützung danken. Vielen Dank für die Mühe, die Arbeit Korrektur zu lesen! Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz danken, die sich freundlicherweise bereit erklärte, meine Betreuung seitens der Johann Wolfgang Goethe-Universität zu übernehmen.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen im Georg-Speyer-Haus und im Paul-Ehrlich-Institut danke ich für die nette Arbeitsatmosphäre und Unterstützung. Hier möchte ich auch ganz besonders Katja Sliva danken, die parallel mit mir ihre Doktorarbeit in der Gruppe von Barbara Schnierle durchgeführt hat. Vielen Dank für die Tipps und die guten Diskussionen!

... und selbstverständlich für den witzigen „Kleinkrieg“ ☺

Ganz besonders bedanke ich mich bei Alexandra Bittner, Melanie Kremer, Yolanda Martinez-Fernandez und Yasemin Süzer, die durch ihre gute Laune und interessante Gesprächsthemen jeden Tag fröhlich und abwechslungsreich gestaltet haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich keiner anderer Hilfsmittel als der angegebenen bedient habe. Entlehnungen aus anderen Schriften sind als solche kenntlich gemacht.

Frankfurt am Main, _____

Thomas Schulz

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Thomas Schulz
Geboren 22. August 1975 in Frankfurt am Main
Familienstand ledig

Schulbildung

1982 – 1986 Heinrich-Kromer-Grundschule in Frankfurt am Main
1986 – 1995 Wöhlergymnasium in Frankfurt am Main
Abitur in den Fächern Englisch, Chemie, Geschichte und Biologie

Wehrdienst

Juli 1995 – Juli 1996 Grundwehrdienst in Kastellaun/Hunsrück mit freiwilliger
3-monatiger Verlängerung für einen Auslandseinsatz

Erhalt von Auszeichnungen durch die NATO und das Bundesverteidigungsministerium für die
Teilnahme am deutschen Kontingent der Friedenssicherungskräfte im früheren Jugoslawien
(GECONIFOR)

Studium

Oktober 1996 – Januar 2002 Biologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Oktober 1998 Diplom-Vorprüfung in den Fächern Botanik, Chemie, Physik und
Zoologie
März 2001 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Genetik, Mikrobiologie
April 2001 – Januar 2002 Diplomarbeit im Fach Genetik
Arbeitsgruppe PD Dr. Barbara Schnierle im Georg-Speyer-Haus
Frankfurt am Main
Januar 2002 Abschluss als Diplom-Biologe
Februar 2002 – Oktober 2004 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe PD Dr. Barbara Schnierle im
Georg-Speyer-Haus Frankfurt am Main
Seit Oktober 2004 Fortsetzung meiner Doktorarbeit im Paul-Ehrlich-Institut Langen
Abteilung Virologie, geleitet von PD Dr. Gerd Sutter,
Arbeitsgruppe von PD Dr. Barbara Schnierle

Frankfurt am Main, 29. August 2006