

Analyse verschiedener HIV-inhibierender Gene nach retroviralem Gentransfer

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Biologie und Informatik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Sabine Fengler
aus Frankfurt am Main

Frankfurt a. M. 2005
(DF1)

Vom Fachbereich Biologie und Informatik der Johann Wolfgang Goethe-Universität
als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Osiewacz
Gutachter:	Prof. Dr. Herbert Zimmermann
Gutachter:	Prof. Dr. Klaus Cichutek

Datum der Dissertation: 28. Juni 2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das Humane Immundefizienzvirus	4
1.1.1	Das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS)	4
1.1.2	Die Familie der Retroviren	6
1.1.3	Aufbau von HIV.....	7
1.1.4	Replikationszyklus	8
1.2	Gentherapie	10
1.2.1	Vektoren für die Gentherapie.....	11
1.2.2	Gentherapie von HIV	12
1.2.2.1	RevM10	13
1.1.2.2	Membrangebundenes T20.....	14
1.1.2.3	APOBEC3G _{agm}	15
1.1.2.4	Membrangebundenes VIRIP	16
1.1.2.5	HIV-1 p6-Konstrukte	16
1.1.2.6	Zytoplasmatischer Teil des gp41	17
1.1.2.7	Transdominant-negative Gag-Mutanten	17
1.3	Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Verwendete Materialien	22
2.1.1	Plasmide	22
2.1.2	Bakterien	22
2.1.3	Zelllinien	23
2.1.4	Oligonukleotide	23
2.2	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.2.1.1	Ansetzen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR	25
2.2.1.2	Fusions-PCR.....	25
2.2.2	Reinigung von PCR-Produkten.....	26
2.2.3	Restriktion und Dephosphorylierung.....	26
2.2.4	Ligation	27
2.2.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen.....	27
2.2.6	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	27
2.2.7	Kultivierung und Lagerung von Bakterien	27
2.2.8	Herstellung von kompetenten Bakterien	28
2.2.9	Transformation von Bakterien.....	28

2.2.10	Plasmid-Präparation („Mini- und Maxi-Präp“)	29
2.2.11	Bestimmung der DNA-Konzentration	29
2.2.12	Sequenzierung	29
2.3	Proteinchemische Methoden	29
2.3.1	Herstellung von Proteinproben (Zelllysate)	29
2.3.2	Proteinbestimmung (nach Bradford)	30
2.3.3	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE	30
2.3.4	Western Blot	31
2.3.5	Nachweis von Proteinen mittels Antikörper und ECL	31
2.3.6	Nachweis der Reverse Transkriptase-Aktivität	32
2.3.7	Luciferase-Assay	32
2.4	Zellkultur	33
2.4.1	Kultivierung von Säugerzellen	33
2.4.2	Lagerung von Säugerzellen	34
2.4.2.1	Einfrieren	34
2.4.2.2	Auftauen	34
2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	34
2.4.4	Proliferations-Assay	35
2.4.5	Transfektion	35
2.4.6	Herstellung von Retroviralen Vektoren	36
2.4.7	Konzentrierung von Retroviralen Vektoren mittels Ultrazentrifugation	36
2.4.8	Transduktion	37
2.4.9	FACS	37
2.4.10	Virusanzucht	38
2.4.11	Titration	39
2.4.12	Immunperoxidase-Test	39
2.4.13	Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	40
2.4.14	Isolierung von CD4 ⁺ -Lymphozyten	40
2.4.15	Stimulierung von CD4 ⁺ -Lymphozyten	41
2.4.16	Beschichtung von Zellkulturplatten	41
2.4.17	Transduktion von CD4 ⁺ -Lymphozyten	42
2.4.18	Belastungsexperimente	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Aufbau des Testsystems	43
3.1.1	Auswahl der Zelllinie	43

3.1.2	Auswahl des Transfervektors.....	43
3.1.3	Generierung stabil-exprimierender Zelllinien	44
3.1.4	Festlegen der MOI für die Belastungsexperimente.....	49
3.2	Klonierung potentiell HIV-inhibitorischer Gene	53
3.2.1	APOBEC3G _{agm}	53
3.2.2	VIRIP (SVHM).....	57
3.3	Evaluierung verschiedener HIV-inhibierender Gene	58
3.3.1	Herstellung der stabilen Linien.....	59
3.3.2	Analyse der stabilen Zelllinien	62
3.3.2.1	Proliferation der Zellen	62
3.3.2.2	Expression der HIV-Rezeptoren	63
3.3.2.3	Expression des therapeutischen Gens	65
3.3.3	Hemmwirkung der HIV-inhibitorischen Gene	67
3.4	Wirksamkeit gegen HIV-1-Primärisolate und HIV-2	71
3.5	HIV-Hemmung in primären Zellen.....	74
3.5.1	Isolierung der CD4 ⁺ -Zellen	76
3.5.2	Transduktion	76
3.5.3	Belastungsexperimente	77
4	Diskussion	80
4.1	Warum ein Testsystem für HIV-inhibitorische Gene?	80
4.1.1	Wahl der Zelllinie und des Transfervektors	81
4.1.2	Vergleichbarkeit der stabil transduzierten Zelllinien.....	82
4.2	Evaluierung verschiedener HIV-inhibitorischer Gene.....	83
4.2.1	Die Kontrollgene	83
4.2.2	APOBEC3G _{agm}	84
4.2.3	Membrangebundenes VIRIP	85
4.2.4	Netzwerk-Gene.....	86
4.3	Wirksamkeit gegen HIV-1-Primärisolate	86
4.4	Wirksamkeit gegen HIV-2	86
4.5	HIV-Hemmung in primären Zellen.....	88
4.6	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	92
6	Literaturverzeichnis.....	94
7	Abkürzungsverzeichnis	107

1 Einleitung

1.1 Das Humane Immundefizienzvirus

1.1.1 Das erworbene Immunschwäche-Syndrom (AIDS)

Die Infektion mit dem Humanen Immundefizienzvirus (HIV) bzw. das damit assoziierte Krankheitsbild AIDS (engl.: **A**cquired **I**mmuno-**D**eficiency **S**yndrome) gehört seit einigen Jahren zu den vier häufigsten Todesursachen weltweit. Im Jahr 2004 hat das HIV den Tod von etwa 3 Millionen Menschen verursacht, etwa 40 Millionen waren Ende 2004 infiziert (www.unaids.org).

Das Krankheitsbild wurde 1981 zum ersten Mal bei mehreren homosexuellen Männern in den USA beschrieben (Brennan & Durack, 1981; Gottlieb et al., 1981). Aufgefallen war das Auftreten von ungewöhnlichen Infektionskrankheiten, die normalerweise nur bei Patienten mit angeborener Immunschwäche zu beobachten sind. Außer diesen typischen Infektionen wie die Pneumocystis carinii-Lungenentzündung und Candida-Mykosen zählen u. a. auch das Kaposi-Sarkom und bestimmte neurologische Störungen zu den AIDS-definierenden Erkrankungen (WHO, siehe Pschyrembel).

Im Jahre 1983 wurde das für AIDS verantwortliche Virus, heute allgemein als HIV-1 bezeichnet, von Luc Montagnier und Robert Gallo identifiziert (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983). Es zeigte sich, daß es wie die zuvor von Gallo entdeckten Humanen T-Zell-Leukämie-Viren (HTLV)-1 und -2 zu der Familie der Retroviren gehört. Drei Jahre später konnte ein weiteres Virus aus AIDS-Patienten isoliert werden, das etwa 40% Homologie zu HIV-1 aufweist und als HIV-2 bezeichnet wird (Barin et al., 1985; Kanki et al., 1986; Clavel et al., 1986a; Clavel et al., 1986b; Chakrabarti et al., 1987; Bock & Markovitz, 2001).

Heute unterscheidet man drei Hauptgruppen bei HIV-1 und 7 Subtypen bei HIV-2, von denen 5 allerdings nur Einzelfälle darstellen (Schim van der Loeff & Aaby, 1999). Weltweit verbreitet sind vor allem die Viren der M-(major-) Gruppe des HIV-1. Die größte Bedeutung in den Industrienationen hat der Subtyp B (Holmes, 2001). Das HIV-2 dagegen ist hauptsächlich in Westafrika zu finden, sowie in Portugal und Indien (Bock & Markovitz, 2001; Reeves & Doms, 2002). Das HIV-2 wird mit

geringerer Effektivität übertragen (Kanki et al., 1994) und zeigt bei Infizierten in der Regel eine verlängerte Latenzzeit (Blattner et al., 1997). Die eigentliche Krankheitsphase unterscheidet sich bei den beiden HI-Viren allerdings nicht.

In den folgenden Jahren wurden verwandte Retroviren auch bei einigen Affenspezies gefunden und analog zu HIV als Simiane Immundefizienzviren (SIV) benannt. Unter anderem identifizierte man ein entsprechendes Virus bei Schimpansen (SIVcpz) (Peeters et al., 1989; Huet et al., 1990; Vanden Haesevelde et al., 1996; Corbet et al., 2000), Afrikanischen Grünen Meerkatzen (SIVagm) (Allan et al., 1991; Muller et al., 1993) und Schopfmangaben (SIVsmm) (Hirsch et al., 1989).

Heute kann als gesichert gelten, daß die humanen Immundefizienzviren durch Übertragung von Affenviren auf den Menschen und anschließende Adaptation entstanden sind, wobei SIVcpz als Ursprung von HIV-1 und SIVsmm als Ursprung von HIV-2 identifiziert wurde (Chen et al., 1996; Gao et al., 1999; Hahn et al., 2000).

Die Übertragung des HI-Virus erfolgt über sexuellen Kontakt oder Blut bzw. Blutprodukte, sowie vertikal kurz vor oder während der Geburt (Modrow & Falke, 1998).

Eine akute Infektion mit HIV hat, wenn überhaupt, eine eher unspezifische Symptomatik, die schon früh als Mononukleose-ähnlich beschrieben wurde (Cooper et al., 1985). Nach dem kurzen Stadium der initialen Virämie geht die Zahl der Viren im Blut des Infizierten zunächst wieder zurück. Die folgende Latenzzeit dauert in der Regel mehrere Jahre und wird von einem langsamen aber stetigen Absinken der Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten begleitet. Die Progression in Richtung AIDS ist durch einen Anstieg der Viruslast bei gleichzeitigem rapiden Absinken der Anzahl der CD4⁺-Lymphozyten (auf unter 200 Zellen / ml) gekennzeichnet (Abb. 1.1) (Coffin et al., 1997).

Die auftretende massive Immundefizienz zeigt sich in opportunistischen Infektionen und Neoplasien und geht mit neurologischen Komplikationen einher (Tindall & Cooper, 1991; Fauci & Lane, 1991).

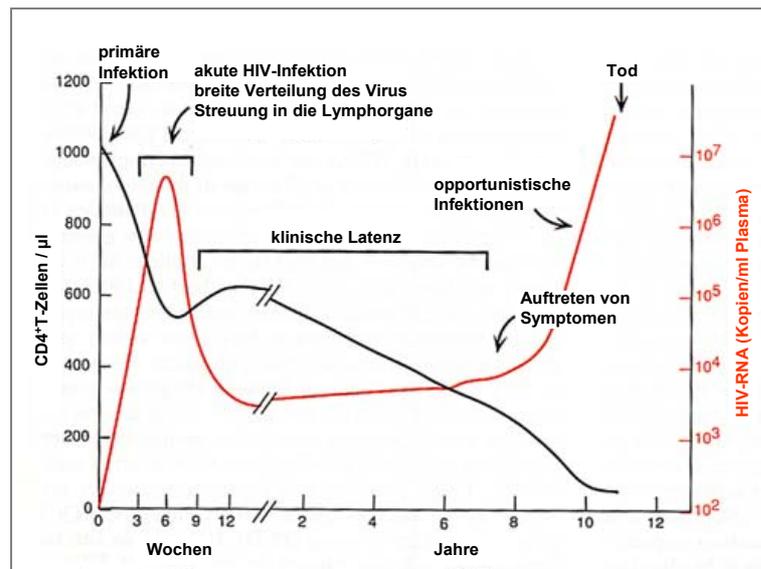


Abb. 1.1: Schematischer Verlauf der HIV-Infektion. Dargestellt sind die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen im Blut und der RNA-Kopien im Plasma. (verändert nach Coffin et al., 1997)

Trotz großer Fortschritte in der AIDS-Therapie, sowohl in bezug auf Wirksamkeit als auch Verträglichkeit, besonders durch Einführung der als HAART („Highly Active Anti-Retroviral Therapy“) bezeichneten Therapieform, ist nach wie vor weder Heilung noch Impfung möglich. Deshalb ruhen auf der Gentherapie als neuem Ansatz große Hoffnungen.

1.1.2 Die Familie der Retroviren

Die Retroviridae stellen eine Familie umhüllter RNA-Viren dar, deren namensgebendes Charakteristikum die Reverse Transkriptase ist. Dieses Enzym katalysiert das Umschreiben des RNA-Genoms in DNA und wurde 1970 erstmals beschrieben (Temin & Mizutani, 1970; Baltimore, 1970). Die ersten Vertreter der Retroviren kennt man aber schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts. Peyton Rous entdeckte 1911 ein Virus, das bei Hühnern Sarkome hervorruft und nach ihm Rous-Sarkom-Virus benannt wurde (Rous, 1911). Das erste Retrovirus, das aus menschlichem Gewebe isoliert wurde, war 1971 das zu den Spumaviren gehörende Humane Foamy Virus (Achong et al., 1971). Obwohl dieses Virus in Zellkultur Synzytienbildung induziert, konnte nie nachgewiesen werden, daß es eine Erkrankung hervorruft. 1980 beschrieb Robert Gallo das erste humanpathogene Retrovirus, das Humane T-Zell Leukämie Virus (HTLV) (Poiesz et al., 1980). Nach der aktuellen Klassifizierung des „International Committee on Taxonomy of Viruses“

(ICTV) aus dem Jahre 2002 werden die Retroviren in 7 Genera eingeteilt, von denen eines die Lentiviren darstellen (www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTV/).

1.1.3 Aufbau von HIV

Innerhalb der Retroviren gehört HIV zu den Lentiviren (lat. lentus = langsam).

Es enthält ein in zwei Kopien vorliegendes RNA-Genom, das durch reverse Transkription in provirale DNA umgeschrieben und dann ins Genom der Wirtszelle integriert wird. Auf dem komplexen RNA-Genom sind nicht nur die viralen Enzyme und Strukturproteine kodiert, sondern auch regulatorische und akzessorische Proteine. (Abb. 1.2)

Die Strukturproteine (gag) und die viralen Enzyme (pol) werden als Polyproteine synthetisiert. Die Spaltung erfolgt durch die virale Protease während der Partikelreifung. Im Gegensatz dazu wird das virale Hüllprotein (env), das zunächst ebenfalls als Polyprotein vorliegt, von zellulären Proteasen im Golgi gespalten (Frankel & Young, 1998).

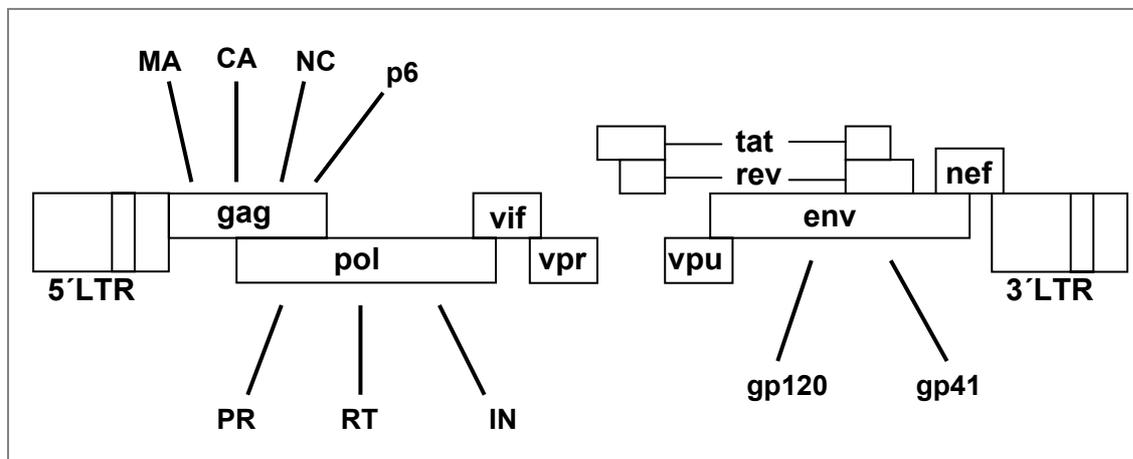


Abb. 1.2: Die genomische Struktur des HIV-1-Provirus. Dargestellt sind die Gene sowie die kodierten Proteine. Im Gegensatz zu einfachen Retroviren wie MLV besitzt HIV-1 mehrere regulatorische (Tat, Rev) und akzessorische Proteine (Vif, Vpr, Vpu, Nef). MA: Matrix-Protein; CA: Capsid-Protein; NC: Nukleocapsid-Protein; PR: Protease; RT: Reverse Transkriptase; IN: Integrase; gp120: SU („surface unit“); gp41: TM („transmembrane unit“); Die Länge der proviralen DNA beträgt etwa 9,2 kb. (verändert nach Rubbert, 2005 und Freed, 2004)

1.1.4 Replikationszyklus

Die Infektion einer Zelle beginnt mit der Adsorption eines Viruspartikels. HIV nutzt dazu in der Regel das CD4-Protein, das auf der Oberfläche von T-Helferzellen, Makrophagen und Monozyten exprimiert wird und dort im Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor an MHC-Klasse II-Proteine bindet. Der virale Bindungspartner, das gp120-Protein, liegt funktionell als trimerer Komplex vor. Durch die Anbindung des Viruspartikels erfolgt eine Konformationsänderung im gp120, wodurch die Wechselwirkung eines nun freigelegten Bereiches, des V3-Loops, mit einem Korezeptor, bei HIV meist einer der beiden Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4, ermöglicht wird. Erst durch die folgende zweite Umlagerung im env-Protein, bei der der fusogene Bereich von gp41 freigelegt wird, erfolgt die Fusion von Virus- und Zellmembran. Die Nutzung der Chemokinrezeptoren als Korezeptor ändert sich im Verlauf der HIV-Infektion charakteristisch: Die primäre HIV-Infektion erfolgt praktisch immer über Viren, deren Zelleintritt über CCR5 vermittelt wird. Diese Viren werden im Unterschied zu den später auftretenden T-Zell-tropen, die CXCR4 nutzen, als makrophagentrop bezeichnet (Freed, 2001). Bestimmte HIV-Isolate können auch weitere Chemokinrezeptoren (CCR1, CCR2b, CCR4, CCR8, V28, Bob oder Bonzo) als Korezeptoren nutzen (Berger et al., 1999; Murakami et al., 2000).

Durch die Fusion der viralen mit der Zellmembran gelangt das Viruskapsid ins Zytoplasma der Zelle, wo es den Präintegrationskomplex freisetzt. Dieser Komplex besteht aus dem viralen RNA-Genom, den Enzymen Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN), sowie dem Matrix-Protein (MA) und dem „viral protein rapid“ (Vpr). Er ist für die Bildung der doppelsträngigen Provirus-DNA durch reverse Transkription verantwortlich. Der Komplex wandert in den Zellkern, wo durch die Aktivität der Integrase die provirale DNA ins Wirtszellgenom eingebaut wird. Es konnte gezeigt werden, daß HIV-1 bevorzugt in aktive Gene integriert (Schroder et al., 2002).

Bei der Expression der viralen Gene kann eine frühe und eine späte Phase unterschieden werden. Zunächst gelangen nur mehrfach gespleißte mRNAs aus dem Zellkern in das Zytoplasma, wodurch die regulatorischen Proteine Tat und Rev gebildet werden. Rev ist in der folgenden Phase für den Export von ungespleißten und einfach gespleißten mRNAs sowie der genomischen RNA verantwortlich. Nun können im Zytoplasma die Strukturproteine und viralen Enzyme translatiert werden.

Das env-Protein gelangt während der Translation mittels einer N-terminalen Signalsequenz in das Endoplasmatische Retikulum, wo Glykosylierung und Oligomerisierung stattfinden. Anschließend erfolgt der Transport über den Golgi-Apparat zur Zellmembran, wo sich die einzelnen Virus-Bestandteile zusammenfinden, woraufhin sich unreife Partikel abschnüren. Für die Inkorporation des viralen Genoms ist eine Interaktion zwischen Verpackungssignal und Gag-Polyprotein verantwortlich. Bei der Reifung des abgeschnürten Partikels kommt es zur Spaltung des Gag- sowie des Pol-Polyproteins durch die virale Protease. Reife Viruspartikel zeigen eine typische Morphologie im elektronenmikroskopischen Bild mit kondensiertem Kapsid (Freed, 2001).

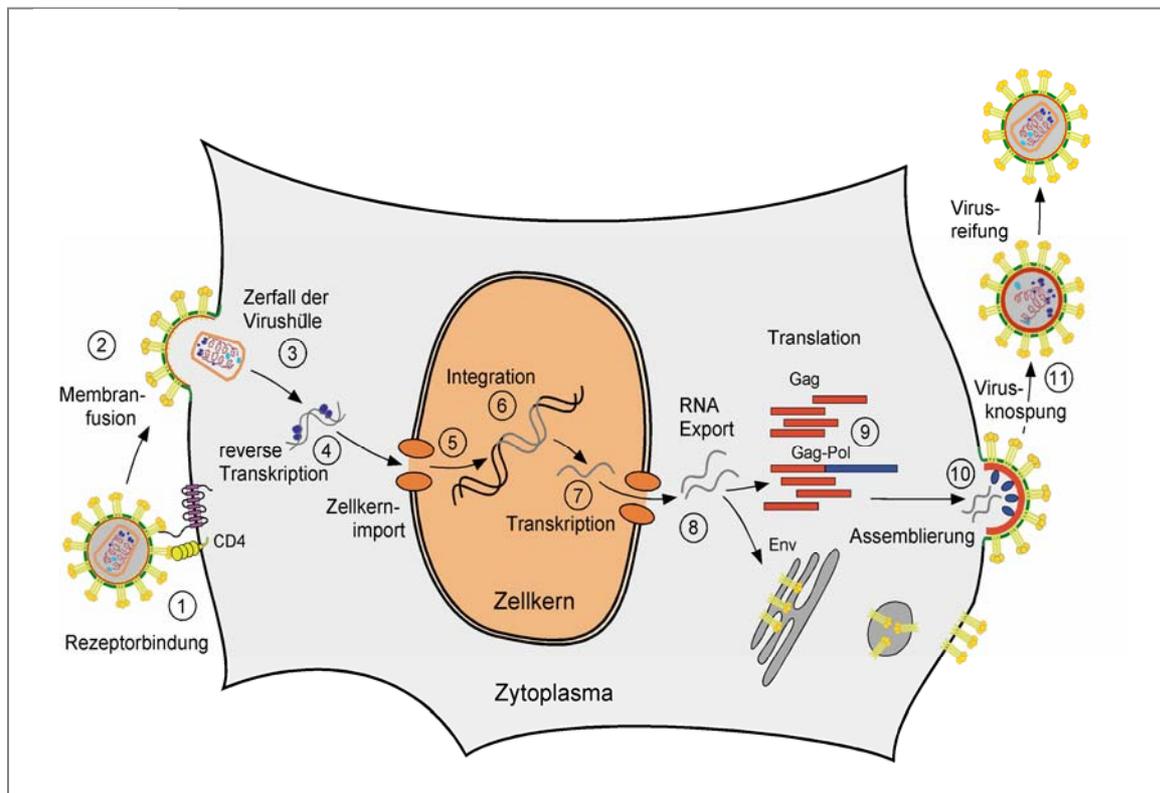


Abb. 1.3: Der Replikationszyklus von HIV. Bei der Bindung des HIV (1) wird CD4 als Haupt- und CCR5 bzw. CXCR4 als Korezeptor benutzt. Beim RNA-Export (8) gelangen zunächst nur vollständig gespleißte RNAs aus dem Zellkern heraus, auf denen die regulatorischen Proteine, u.a. Rev, kodiert sind. Mit Hilfe von Rev werden dann die einfach gespleißten und ungespleißten RNAs ins Zytoplasma transportiert. (aus Fackler & Geyer, 2002)

1.2 Gentherapie

Unter Gentherapie versteht man alle Therapieformen, mit denen man durch genetische Veränderung von Zellen des Patienten eine Heilung oder zumindest Linderung einer Krankheit zu erreichen sucht. Die Strategien für gentherapeutische Ansätze sind so vielfältig wie die Krankheiten, die behandelt werden sollen. Bei Erbkrankheiten, deren Ursache in der Regel der teilweise oder vollständige Verlust einer Genfunktion durch Mutation ist, soll dieser Mangel durch das Einbringen eines intakten Gens behoben werden. Eine andere Form der Gentherapie verwendet Gene, die spezifisch krankhaft veränderte Zellen abtöten (sogenannte Suizid-Gene), entweder durch die direkte toxische Wirkung des Genprodukts oder indem das übertragene Gen die Zellen anfällig für einen von außen zugeführten Wirkstoff macht. Solche Ansätze werden häufig in der Krebstherapie angewendet. Ebenfalls vor allem für die Behandlung von Krebs geeignet ist die genetische Veränderung der entarteten Zellen, um sie dem Immunsystem zugänglich zu machen, oder von Zellen des Immunsystems selbst, um es zu stimulieren. Eine weitere Möglichkeit, bei Infektionskrankheiten oder Krebs in das Krankheitsgeschehen einzugreifen, ist die gezielte Inhibierung der Expression eines Gens, z.B. durch eine antisense-RNA.

Prinzipiell kann man zwischen *in vivo*- und *ex vivo*-Gentherapie unterscheiden. Dabei bedeutet ersteres, daß das therapeutische Gen direkt im Patienten in die Zielzellen eingebracht wird. Bei *ex vivo*-Gentherapie werden die Zielzellen außerhalb des Körpers behandelt und anschließend zurückgegeben (Strachan & Read, 1999).

Die erste Heilung durch Gentherapie konnte 2000 in Frankreich erreicht werden (Cavazzana-Calvo et al., 2000). Mehrere Kinder, die unter der angeborenen, X-chromosomalen Immunschwäche X1-SCID („Severe Combined Immunodeficiency“) litten, wurden durch retroviralen *ex vivo*-Gentransfer behandelt. Allerdings wurde bei zweien der geheilten Kinder etwa drei Jahre später eine bestimmte Leukämieform diagnostiziert. In beiden Fällen konnte die Erkrankung auf eine Insertionsmutagenese als direkte Folge der Behandlung zurückgeführt werden (Hacein-Bey-Abina et al., 2003), wobei es zur Aktivierung eines Proto-Onkogens kam. Bei einem später erkrankten dritten Kind ist die Ursache der Leukämie noch unbekannt.

1.2.1 Vektoren für die Gentherapie

In den meisten klinische Studien zur Gentherapie werden zum Einbringen des Fremd-Gens in die jeweiligen Zielzellen retrovirale oder adenovirale Vektoren verwendet (www.wiley.co.uk/genmed/clinical/). Die Eigenschaft der Retroviren, ihr genetisches Material in das Genom der Wirtszelle stabil einzubauen, stellt dabei den größten Vorteil der von ihnen abgeleiteten Gentherapie-Vektoren dar, denn man geht davon aus, auf diesem Weg auch eine stabile Expression des therapeutischen Gens bzw. eine Übertragung auf eventuelle Tochterzellen zu erreichen. Der Vorteil der adenoviralen Vektoren hingegen liegt in den hohen Titern, die bei ihrer Herstellung erreicht werden können, sowie in der Tatsache, daß sie relativ viel genetisches Material transportieren können. Allerdings findet keine Integration statt und Transgenexpression ist nur für kurze Zeit nachweisbar (Strachan & Read, 1999).

Gerade bei retroviralen Vektoren sind einige Sicherheitsaspekte zu bedenken. Um das Risiko für die Entstehung replikationskompetenter Retroviren (RCR) durch Rekombination zu minimieren, werden die verschiedenen für die Vektorproduktion notwendigen Bestandteile heute auf mehreren verschiedenen Plasmiden kodiert (Vektoren der dritten Generation, siehe Abb. 1.4) (Danos & Mulligan, 1988). Die Information für Gag/Pol und Env liegt auf zwei getrennten Plasmiden vor, dem Verpackungs- bzw. Hüllproteinkonstrukt. Zusammen mit einem verpackbaren, d.h. mit einem zum Gag/Pol-Konstrukt passenden Verpackungssignal (Ψ) versehenen, Transferkonstrukt können in transient oder stabil gentechnisch veränderten Zellen, sogenannten Verpackungszellen, Vektorpartikel hergestellt werden (McLachlin et al., 1990).

Da der Tropismus der Vektorpartikel maßgeblich durch das Env-Protein vermittelt wird, hat die Wahl dieses Bestandteils eine immense Bedeutung. Retrovirale Vektoren lassen sich mit einer Vielzahl von Hüllproteinen pseudotypisieren, darunter auch mit denen von so weit entfernten Viren wie dem Vesikulären Stomatitis Virus (VSV). Das VSV-Hüllprotein vermittelt die Transduktion eines breiten Zielzellspektrums (Burns et al., 1993; Yee et al., 1994), während das des Gibbonaffen Leukämie Virus (GaLV) eine besonders effizienten Gentransfer von hämatopoetischen Zellen gewährleistet (Lam et al., 1996).

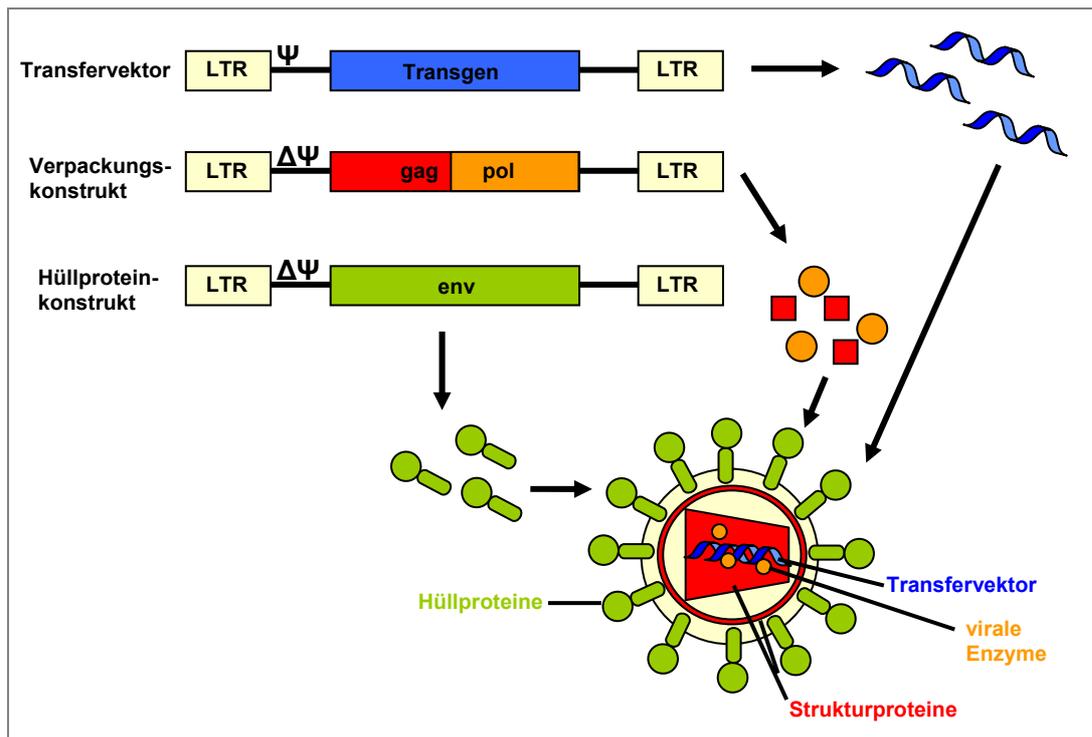


Abb. 1.4: Bestandteile eines retroviralen Vektorsystems und Aufbau eines Vektorpartikels. Der Transfervektor, der das Transgen überträgt, besitzt ein Verpackungssignal (Ψ). Beim Verpackungs- und Hüllproteinkonstrukt ist das Verpackungssignal deletiert. Sie liefern in der Verpackungszelle die Struktur- und Hüllproteine, aus denen die Vektorpartikel gebildet werden, sowie die viralen Enzyme. In das Partikel wird nur der Ψ -tragende Transfervektor verpackt.

1.2.2 Gentherapie von HIV

Der Replikationszyklus von HIV-1 besteht aus einer Vielzahl einzelner Schritte, von denen sich nahezu alle als denkbare Angriffspunkte für eine Gentherapie eignen. Für viele dieser Schritte sind verschiedene inhibitorische Gene publiziert (Lori et al., 2002, Poluri et al., 2003). Die Wirkmechanismen dieser potentiellen Therapien reichen von dominant negativen Proteinen bzw. Peptiden über Antikörperfragmente (sFv) bis zu Ribozymen und kleinen inhibitorischen RNAs (siRNA).

Besonders interessant für die HIV-Gentherapie sind antivirale Gene, die möglichst früh im Replikationszyklus ansetzen. Am effektivsten sind Inhibitoren, die bereits einen vor der Integration des Provirus liegenden Schritt verhindern, da in diesem Szenario die geschützten Zellen akkumulieren.

Zielzellen der Gentherapie der HIV-Infektion sind die $CD4^+$ -Zellen, da diese den Hauptangriffspunkt des Virus darstellen. Da die Lebensspanne dieser Zellen begrenzt ist (zwischen wenigen und etwa 500 Tagen, bei Gedächtniszellen mehrere Jahre), ist

ein weiterer Ansatz, direkt die CD34-positiven Vorläuferzellen zu behandeln (Rosenzweig et al., 1997; Scherr et al., 2002).

Im folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten HIV-inhibitorischen Gene näher beschrieben.

1.2.2.1 RevM10

Das Rev-Protein von HIV-1 spielt im Replikationszyklus des Virus eine entscheidende Rolle. Während die vollständig gespleißte mRNA, die für die das akzessorische Protein Nef und die regulatorischen Proteine Tat und Rev selbst kodiert, ohne besonderen Mechanismus aus dem Zellkern gelangt, verbleiben ungespleißte oder einfach gespleißte RNAs im Zellkern. Damit auch diese translatiert werden können und das RNA-Genom an die Zellmembran, den Ort des Abschnürens neuer Partikel, gelangt, wird ein Mechanismus benötigt, mit dessen Hilfe sie aus dem Zellkern gelangen. Ungespleißte und unvollständig gespleißte RNAs besitzen alle das Rev-responsive Element (RRE), eine im *env*-Gen befindliche RNA-Sequenz, deren Sekundärstruktur durch vier Haarnadelschleifen gekennzeichnet ist. In einer dieser Schleifen liegt die Stelle, mit der das Rev interagiert. Über diese Interaktion und weitere mit zellulären Proteinen ist Rev in der Lage, diese RNAs aus dem Zellkern auszuschleusen. Zusätzlich hat Rev Sequenzen, die für die Oligomerisierung und die Kernlokalisierung verantwortlich sind (Frankel & Young, 1998). Malim et al. (Malim et al., 1989a) führten 1989 eine Reihe von verschiedenen Mutationen in das *rev*-Gen ein, um deren Effekte zu studieren. Dabei fanden sie eine trans-dominant negative Mutante. Diese Mutante, als RevM10 bezeichnet, ist in der Lage, die Rev-Funktion und damit die Virusreplikation effektiv zu hemmen.

1.2.2.2 Membrangebundenes T20

Das HIV-1 gp41 weist zwei helikale Strukturen auf, deren Wechselwirkung für die Fusion von Virus und Zellmembran essentiell ist. Um diese Wechselwirkung zu verhindern wurden verschiedene Peptide von diesen sogenannten „heptad repeats“ abgeleitet (Wild et al., 1994; Ryu et al., 1999).

Das T20 (vormals DP178) entspricht den Aminosäuren 127-162 des C-terminalen Heptad repeat (HR2) (\Rightarrow C36; Hildinger et al., 2001) und ist seit 2003 in Deutschland als lösliches Peptid zur intramuskulären Verabreichung zugelassen. Durch Bindung an die N-helikale Region (HR1) wird die Umlagerung des gp41 in die fusogene Konformation verhindert, so daß das Virus nicht in die Zelle eindringen kann. Es stellt einen sehr aktiven Fusions-Inhibitor dar, der *in vitro* in einer Konzentration von weniger als 2 ng/ml effektiv wirkt (Kilby et al., 1998; Wild et al., 1995). Allerdings wurden sowohl in *in vitro* als auch in klinischen Studien spezifische Mutationen in einem Glycin-Isoleucin-Valin (GIV)-Motiv innerhalb von HR1 gefunden, die mit einer verminderten Suszeptibilität für T20 verbunden sind (Rimsky et al., 1998; Wei et al., 2002).

Um diese Resistenzbildung zu erschweren, wurde das ursprüngliche T20-Peptid N-terminal um 10 Aminosäuren verlängert (\Rightarrow C46; Egelhofer et al., 2004). Für den Gentherapie-Ansatz wurde eine membrangebundene Form dieses verlängerten T20 (STHM) entwickelt. Die Expression auf der Zelloberfläche wurde erreicht, indem das T20 N-terminal mit dem Signalpeptid des dLNGFR (verkürzte Form des low-affinity Nerve Growth Factor Receptor) und C-terminal mit der Hinge-Region des humanen IgG2 sowie der Membrandomäne von CD34 versehen wurde.

Die membrangebundene Form des T20 befindet sich gegenwärtig in der klinischen Prüfung.

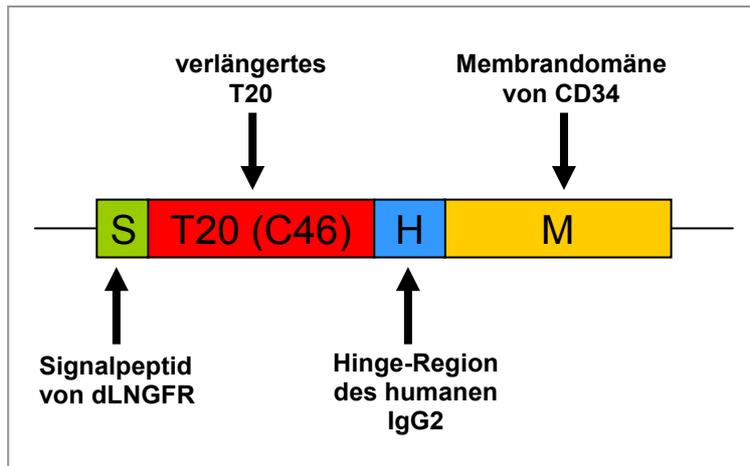


Abb. 1.5: Der Aufbau des STHM-Gens. Dargestellt sind die Bestandteile des optimierten therapeutischen Gens, das in dieser Arbeit verwendet wurde.

1.2.2.3 APOBEC3G_{agm}

Im Zuge der Aufklärung der Funktionsweise des „viralen Infektiosität-Faktors“ (Vif) von HIV-1 wurde ein zelluläres Protein identifiziert, das bei Vif-negativen HI-Viren die Bildung von infektiösen Partikeln verhindert (Sheehy et al., 2002). Solche Viren können in bestimmten T-Zelllinien, sogenannten permissiven Zelllinien, replizieren, nicht aber in nicht-permissiven T-Zelllinien sowie primären T-Zellen und Makrophagen. Für die Replikation in diesen Zellen benötigt das HIV Vif, um das „humane apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide (APOBEC)3G“, auch als CEM15 bezeichnet, zu neutralisieren (Yu et al., 2003). Bei APOBEC3G handelt es sich um eine Cytidin-Deaminase, die G-zu-A-Hypermuationen im HIV-Genom verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass dieser zelluläre Faktor in Abwesenheit von Vif in neu entstehende Virus-Partikel verpackt wird, nicht aber in Anwesenheit von Vif. Die Interaktion mit Vif führt nach gängiger Meinung zum schnellen Abbau von APOBEC3G (Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003).

Während das humane APOBEC3G durch das Vif von HIV neutralisiert wird, können die APOBEC3Gs von Afrikanischen Grünen Meerkatzen (AGM) und Rhesus-Makaken (MAC) die Replikation von HIV hemmen (Mariani et al., 2003).

1.2.2.4 Membrangebundenes VIRIP

VIRIP (Virus-Inhibitory Peptide) wurde als natürlicher HIV-Inhibitor in humanem Hämofiltrat gefunden (Münch et al., 2002). Es umfaßt die Aminosäuren 353 – 372 des Alpha-1-Antitrypsins, das selbst auch als HIV-hemmend publiziert ist (Shapiro et al., 2001; Cordelier & Strayer, 2003). Alpha-1-Antitrypsin ist ein Proteasehemmer, der die lytische Aktivität der Elastase bei der unspezifischen Immunabwehr in der Lunge begrenzt, und damit eine Schädigung des gesunden Gewebes verhindert.

In funktionellen Analysen zeigte sich, daß VIRIP ein Fusions-Inhibitor ist, der vermutlich die Funktion des gp41-Fusionspeptids stört (Münch et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde die VIRIP-Sequenz mit einer Signalsequenz sowie der Sequenz für eine Transmembrandomäne versehen, um eine Expression auf der Zelloberfläche, analog zum membrangebundenen T20, zu erreichen.

1.2.2.5 HIV-1 p6-Konstrukte

Die C-terminale Teil des HIV-1 Gag wird als p6 bezeichnet und enthält eine sogenannte L-Domäne (englisch: „late“ = spät). Diese Bezeichnung spiegelt die Tatsache wider, daß diese Domäne eine wichtige Rolle bei der Abschnürung der unreifen Viruspartikel von der Wirtszellmembran, also bei einem Vorgang in der Spätphase des Replikationszyklus, spielt. Entsprechende Domänen wurden außer in Gag-Proteinen von Retroviren auch in den Matrix-Proteinen anderer Viren wie Rhabdo- und Filoviren identifiziert (Freed, 2002). Alle diese L-Domänen beinhalten ein konserviertes Motiv, das bekanntermaßen an Interaktionen zwischen zellulären Proteinen beteiligt ist, und das essentiell für die Funktion ist. Innerhalb der bekannten L-Domänen hat man drei verschiedene Klassen gefunden: PTAP, PPXY und YXXL. HIV-p6 enthält ein PTAP-Motiv (Freed, 2002).

Die Deletion des HIV-p6 beeinträchtigt die Partikelabschnürung und –reifung (Göttlinger et al., 1991; Demirov et al., 2002). Sie bewirkte eine defekte Gag-Prozessierung, die zu morphologisch weitgehend in einem unreifen Stadium verbleibenden Partikeln führt, sowie eine Reduktion der Menge an Reverser Transkriptase und Integrase in den Virionen.

Die getesteten Konstrukte enthalten entweder ein komplettes HIV-p6 oder mehrere L-Domänen von HIV und Ebola. Durch die Expression dieser Konstrukte sollen die

zellulären Faktoren gebunden werden, so daß sie bei einer Infektion nicht mehr zur Verfügung stehen.

1.2.2.6 Zytoplasmatischer Teil des gp41

Nach der Fusion von Virus- und Zellmembran muß das in das Zytoplasma entlassene Kapsid bzw. der Prä-Integrations-Komplex in den Zellkern transportiert werden, damit dort die Integration des viralen genetischen Materials ins Wirtsgenom stattfinden kann. Dieser Transport ist für eine produktive Infektion der Zelle essentiell und hängt von der Interaktion zellulärer und viraler Proteine ab. Beteiligt an dem Prozeß sind u.a. Proteine des Zytoskeletts auf der einen und das Viruskapsid sowie der zytoplasmatische Teil (c-tail) des viralen gp41-Proteins auf der anderen Seite (Greene & Peterlin, 2002; McDonald et al., 2002; Freed, 2004). Im gentherapeutischen Ansatz sollen trunkierte c-tails in den behandelten Zellen exprimiert werden, die als Köder für die zellulären Faktoren dienen, so daß ein eindringendes Virus sich nicht dieser Transportmaschinerie bedienen kann.

1.2.2.7 Transdominant-negative Gag-Mutanten

Die Oligomerisierung von Gag-Polyprotein-Vorläufern ist notwendig für die Bildung funktioneller Virionen. Gibt man Gag-abgeleitete Peptide von außen zu (Niedrig et al., 1993) oder mutiert kritische Positionen innerhalb von Gag (von Poblitzki et al., 1993; Wagner et al., 1994; Fitzon et al., 1999), führt dies zur Freisetzung nicht-infektiöser Viren. Die Deletion der Aminosäuren 99–154 im *gag*-Leserahmen ergibt einen transdominant-negativen Phänotyp der Mutante (Smythe et al., 1994). Derartige Konstrukte sind wie der Wildtyp Rev-abhängig. Durch Humanisierung des Kodon-Gebrauchs läßt sich diese Eigenschaft verändern, so daß die mRNA auch in Abwesenheit von Rev aus dem Kern gelangt. Zudem führt die Humanisierung zu einer erhöhten Stabilität der mRNA und so zu stärkerer Expression der Gag-Mutante (Graf et al., 2000; Wagner et al., 2000). Für eine HIV-Gentherapie sind besonders auch Konstrukte interessant, die die minimalen Bereiche umfassen, die für den transdominant-negativen Effekt notwendig sind (Zabransky et al., 2002).

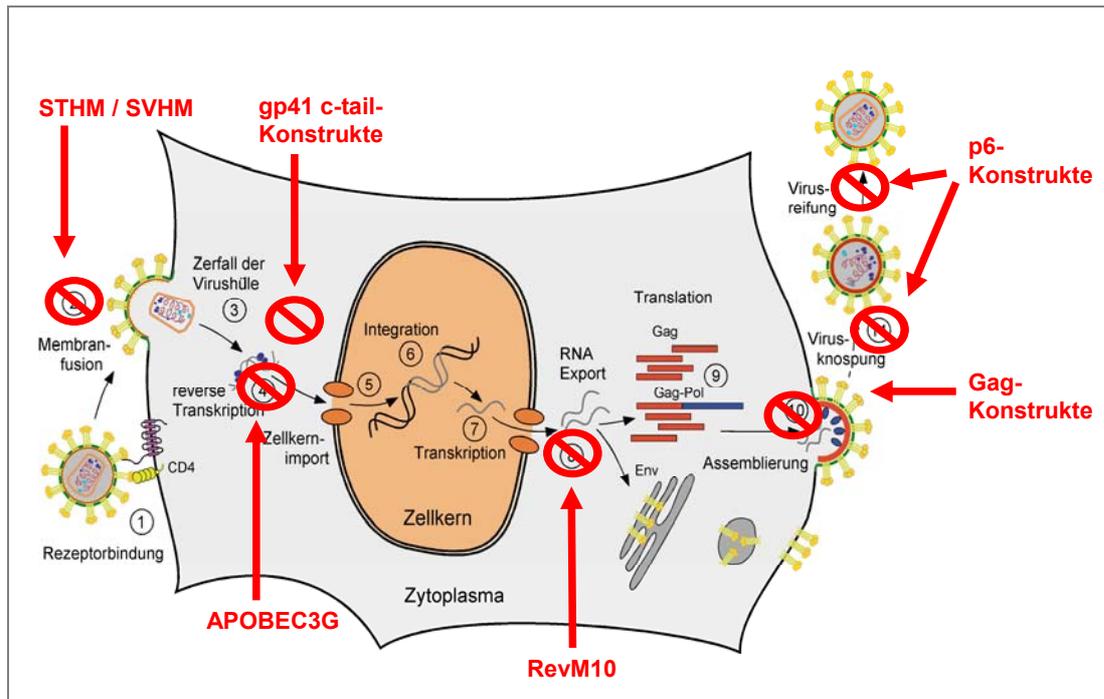


Abb. 1.6: Die Angriffspunkte der in dieser Arbeit verwendeten therapeutischen Gene im HIV-Replikationszyklus. APOBEC3G_{agm} wirkt erst bei der reversen Transkription in der Zielzelle, bezogen auf die behandelte Zelle also nach der Integration. (aus Fackler und Geyer, 2002, verändert)

Weltweit gibt es derzeit etwa 35 klinische Studien zur Gentherapie von HIV mit antiviralen Genen, sowie noch einmal annähernd die gleiche Anzahl Gentherapie-Studien zur Vakzinierung und Immuntherapie gegen HIV (Genetic Modification Clinical Research Information System (GeMCRIS), www.gemcris.od.nih.gov). Allein in den USA finden 24 klinische Studien statt, die therapeutische Gene zur HIV-Inhibition einsetzen. Alle diese Ansätze verwenden *ex vivo* veränderte primäre Blutzellen, die dem Patienten intravenös verabreicht werden. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um autologe Zellen, die mit retroviralen Vektoren behandelt werden (siehe Tab. 1.1).

Klinische Phase	Therapeutisches Gen	Behandelte Zellen	Vektor	Resistenz/Marker
I	RevM10	Autologe CD34 ⁺ (aus Knochenmark)	Retroviral, aMLVenv	-
I	RevM10 bzw. RevM10 + Tat responsives Element	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv bzw. Goldkügelchen	Neomycin-Resistenz
I / II	RevM10 + Pol-antisense	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	RevM10 + Pol-antisense	Autologe CD34 ⁺	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I / II	RevM10 + Pol-antisense	Autologe CD34 ⁺ Thy ⁺	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I / II	RevM10 + Pol-antisense	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Transdominantes Rev bzw. Fusionsprotein tRNAiMET / anti-TAR	Allogene CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	MLV, GaLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Transdominantes Rev bzw. Fusionsprotein tRNAiMET / anti-TAR oder TAR-antisense	Autologe bzw. allogene CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, GaLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Transdominantes Rev bzw. Fusionsprotein tRNAiMET / anti-TAR oder TAR-antisense	Syngene CD4 ⁺	Retroviral, aMLVenv oder GaLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Transdominantes Tat-Rev-Fusionsprotein	Autologe CD34 ⁺ (aus Nabelschnurblut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	sFv anti-gp160	Autologe CD4 ⁺	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	sFv anti-Tat	Autologe PBMC, CD8 ⁺ -depletiert	MLV, GaLVenv	ΔLNGFR
I	sFv anti-Rev	Autologe CD4 ⁺	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
II	HH-Ribozym, gegen tat gerichtet	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	HH-Ribozym, gegen tat gerichtet	Autologe CD34 ⁺	MLV, GaLVenv	Neomycin-Resistenz
II	HH-Ribozyme, gegen tat und rev gerichtet	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	HH-Ribozyme, gegen tat und rev gerichtet	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	HP-Ribozym, gegen HIV leader-Sequenz gerichtet	Autologe CD4 ⁺	Retroviral, aMLVenv	-
I	RRE-decoy	Autologe CD34 ⁺ (aus Nabelschnurblut oder Knochenmark)	Retroviral, aMLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Poly-Tar-decoy bzw. RRE-Poly-Tar-decoy	Autologe CD4 ⁺	Retroviral, aMLVenv oder GaLVenv	Neomycin-Resistenz
I	Tat-rev-antisense	Autologe CD34 ⁺	Retroviral	-
I	HIV-1env-antisense	Autologe CD4 ⁺	Lentiviral, VSV-G	-
I	Antisense: 1) tat-rev exon 2) tat-rev splice acceptor 3) tat activation response element	Autologe CD34 ⁺ (aus peripherem Blut)	HTLV-2, retrovirales env	-
I	Antisense: 1) tat-rev exon 2) tat-rev splice acceptor 3) tat activation response element	Autologe CD34 ⁺	HTLV-2, retrovirales env	-

Tab. 1.1: In den USA angemeldeten Klinischen Studien zur Genterapie von HIV, die eines oder mehrere inhibitorische Gene verwenden. aMLVenv: Hüllprotein des amphotropen MLV; sFV: Einzelkette („single chain“) des variablen Fragments eines Antikörpers; HH-Ribozym: „hammerhead“-Ribozym; HP-Ribozym: „hairpin“-Ribozym; decoy: Köder oder Kompetitor; VSV-G: Hüllprotein des Vesikulären-Stomatitis-Virus; HTLV-2: Humanes T-Zell-Leukämie-Virus-2 (GeMCRIS, Stand Ende 2004)

Bisher sind nur für wenige dieser klinischen Studien Ergebnisse veröffentlicht, durchschlagende Erfolge sind derzeit noch nicht absehbar.

1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Ein Problem für die Genterapie der HIV-Infektion ist das Fehlen eines einheitlichen Zellkultursystems zur vergleichenden Prüfung potentiell therapeutischer Gene. Bisher wurden die publizierten antiviralen Gene zum Nachweis der Wirksamkeit unter sehr unterschiedlichen Bedingungen getestet, was zu entsprechend unterschiedlichen Beurteilungen führte.

Das erste Ziel dieser Arbeit war daher die Entwicklung eines verlässlichen Vergleichssystems, das es ermöglicht, eine Aussage nicht nur über die Qualität sondern auch über die relative Quantität der HIV-inhibitorischen Wirkung von Kandidatengenen zu treffen. Dazu sollte ein Zellkultursystem etabliert werden, das sich für eine Beurteilung im Hinblick auf eine genterapeutische Anwendung eignet. Für die Belastungsexperimente wurden repräsentative HIV-1-Laborstämme und zur weiteren Annäherung an die in vivo-Situation auch Primärisolate ausgewählt.

Die Evaluierung dieses Systems sollte zunächst mit anerkannten Positiv-Kontrollen durchgeführt werden.

Die vergleichende Prüfung verschiedener potentiell therapeutischer Gene, die von drei Arbeitsgruppen in Heidelberg und Regensburg entwickelt wurden, stellte das zweite Ziel dieser Arbeit dar. Die Zusammenarbeit mit diesen Arbeitsgruppen fand in einem Netzwerk statt, das zum Ziel hatte, neue Strategien für die Genterapie der HIV-Infektion auszuarbeiten und zur Reife für die klinische Prüfung zu bringen.

Ein weiteres Ziel waren die Entwicklung zusätzlicher neuer Ansätze für die HIV-Genterapie, sowie deren Testung im Vergleich mit der Wirkung der Kontroll- und Netzwerkgene.

Daneben sollte geprüft werden, ob eine in dem standardisierten Zellkultursystem gezeigte Wirksamkeit auch in primären humanen Blutzellen nachzuvollziehen ist, und inwiefern therapeutische Gene, die für die Inhibition der HIV-1-Replikation entwickelt wurden, auch für die Gentherapie der HIV-2-Infektion eingesetzt werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Plasmide

Name	Charakterisierung	Referenz
pALF-GaLVwt	Expressionsplasmid für das Wildtyp-Hüllprotein des Gibbon ape Leukemia Virus	Stitz et al., 2000
pHIT60	Expressionsplasmid für MLV-gag/pol	Soneoka et al., 1995
M387	MLV-basierender Transfervektor (siehe Abb. 3.1)	von Laer (GSH)
NL4-3-luc	HIV _{NL4-3} -Vollängensequenz mit Frameshift-Mutationen in den <i>env</i> - und <i>vpr</i> -Genen, in die <i>nef</i> -Region wurde ein Firefly-Luciferase-Gen eingefügt	Connor et al., 1995
NL4-3-luc Δ vif	entspricht NL4-3-luc, enthält aber eine zusätzliche Frameshift-Mutation im <i>vif</i> -Gen	Mariani et al, 2003
pcDNAvif _{agm}	Expressionsplasmid für das Vif der Afrikanischen Grünen Meerkatze	Mariani et al., 2003
CM12	Expressionsplasmid für das APOBEC3G der Afrikanischen Grünen Meerkatze	Mariani et al., 2003
pMD.G	Expressionsplasmid für das Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus	Ory et al., 1996

2.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> Top 10 F'	F' $\{lacI^q$ Tn10 (Tet ^R) $\}$, <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>E.coli</i> GM2163	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx78</i> , <i>supE44</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hisG4</i> , <i>rpsL136</i> (Str ^R), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>dam13</i> , <i>Tn9</i> (Cam ^R), <i>dcm-6</i> , <i>hsdR2</i> , <i>mcrA</i> , <i>mcrB1</i> , <i>rfbD1</i>	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Charakterisierung	Referenz
PM1	Humane T-Zelllinie, Klon von HUT78-Zellen (kutanes T-Zell Lymphom)	Lusso et al., 1995
293T	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, von 293 abgeleitet, transformiert durch großes T-Antigen von SV40	DuBridge et al., 1987
C8166	Humane T-Zelllinie, trägt HTLV-1 ohne es zu exprimieren	Salahuddin et al., 1983

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von Sigma-ARK (Taufkirchen) bezogen und in Wasser gelöst, wobei sie auf eine Standardkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt wurden.

Konstruktion von M387-APOBEC3G_{agm}-HA:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
APOBEC-3G(<i>NotI</i>)for	GTCACATGTAGCGGCCGCATGAATCCTCAA
APOBEC-3G+HA(<i>EcoRI</i>)rev	GCTCGACGCGAATTCTCAAGCGTAATCTGG

Konstruktion von M387-SVHM:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
VIRIPforII	CTGGGCGGCCGCCAGATCTTTAGAGGCCATAC CCATGTCTATCCCCCGAGGTCAAGTTC
VIRIPrevII	GCACTTGCGCTCAGATCTGAAGACAAAGGGTT TGTTGAACTTGACCTCGGGGGGGATAGA
FusVirAforIII	CCCGCCCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTT TA
FusVirBrevII	CATGGGTATGGCCTCTAAAGATCTGGCGCCG CCCAGGCTCAC
FusVirCforII	AAGTTCAACAAACCCTTTGTCTTCAGATCTGAG CGCAAGTGC
FusVirDrevIII	CCGGGCCCTCACATTGCCAAAAGA

Sequenzierprimer:

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')
M387-SEQfor	GCTCGACAAAGTTAAGTAATAGTCCC
M387-SEQrev	CGGAATTGATCCCGCCCGAGAT
APO-SEQforI	CTTGGGTCAGTGGACAGCGTGAGACT
APO-SEQforII	TGTTACAAGGTGGAGCGCTCGCACA
APO-SEQforIII	CGCATCTATGATGATCAAGGAAGATG
APO-SEQrevI	TCAAGCGTAATCTGGAACATCG
APO-SEQrevII	CATCCCTGTGCAGGGTGCGCAGC

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde normalerweise das Expand High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Penzberg) verwendet. Dieses Kit enthält eine Mischung aus der Taq-DNA-Polymerase und der ebenfalls thermostabilen Pwo-DNA-Polymerase, die eine inhärente „Proofreading“-Aktivität besitzt, wodurch die Fehlerrate in den Produkten gesenkt wird.

Ein Standard-PCR-Ansatz wurde in zwei getrennten Mastermixen angesetzt, die anschließend gemischt und in einem PCR-Reaktionsgefäß in einem Thermocycler (PTC-200, MJ Research, Biozym, Hess. Oldendorf) inkubiert wurde. Nach einem initialen Aufschmelzen der DNA-Vorlage läuft die PCR durch zyklische Wiederholung der drei Schritte Aufschmelzen, Primer-Anlagerung (Annealing) und Primer-Verlängerung ab. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des durch die Primer festgelegten DNA-Fragments.

Ein Standard-PCR-Ansatz und ein Standard-PCR-Programm sah wie folgt aus:

Mastermix 1:

100 ng DNA-Vorlage
 30 pmol 5'-Primer
 30 pmol 3'-Primer
 10 µl dNTP-Mix [100 mM]
 ad 50 µl H₂O (bidest)

Mastermix 2:

10 µl 10x Puffer (Kit, enthält 15 mM MgCl₂)
 0,75 µl Enzym-Mix (⇒ 2,6 U)
 39,25 µl H₂O (bidest)

Programm:

- | | | |
|----|---------|--------|
| 1) | 94°C | 2 min |
| 2) | 94°C | 30 sec |
| 3) | 50-65°C | 30 sec |
| 4) | 72°C | 30 sec |
| 5) | 72°C | 5 min |
| 6) | 4°C | ~ |

Die für die Primer-Anlagerung zu wählende Temperatur hängt von der Schmelztemperatur der Primer ab und muß gegebenenfalls für jede PCR-Reaktion optimiert werden. Das gilt auch für die Dauer der einzelnen Schritte, die Anzahl der Zyklen und die MgCl₂-Konzentration. Normalerweise durchlief eine PCR 30 Zyklen. Für die Dauer der Primer-Verlängerung wurde als Faustregel 1 min für 1000 Basen angenommen.

2.2.1.1 Ansetzen von Restriktionsschnittstellen mittels PCR

Um APOBEC3G_{agm}-HA in den Transfervektor M387 ligieren zu können, mußten zunächst passende Schnittstellen angehängt werden. Das wurde mittels PCR bewerkstelligt. Dazu wurde das APOBEC3G_{agm}-Fragment unter Verwendung der Primer APOBEC-3G(*NotI*)for und APOBEC-3G+HA(*EcoRI*)rev von der CM12-Vorlage amplifiziert.

2.2.1.2 Fusions-PCR

Zur Konstruktion des SVHM-Gens wurde eine Fusions-PCR durchgeführt (siehe Abb. 3.12), um die Sequenz des verlängerten T20 (C46) im STHM-Konstrukt durch die des VIRIP zu ersetzen. Dazu wurde zunächst die VIRIP-Sequenz mit Hilfe überlappender Primer (VIRIPforII und VIRIPrevII, entsprechen den Primern C und D in Abb. 3.12, 65°C Annealing-Temperatur) generiert und gleichzeitig der Übergang zu den Sequenzen des Signalpeptids sowie der Hinge-Region angehängt. Das 5'-Fragment wurde mit den Primern FusVirAforIII und FusVirBrevII (entsprechen den Primern A und B in Abb. 3.12, 67°C Annealing-Temperatur) synthetisiert, das 3'-Fragment mit den Primern FusVirCforII und FusVirDrevIII (entsprechen den Primern

E und F in Abb. 3.12, 65°C Annealing-Temperatur, 2 mM MgCl₂). In beiden Fällen diente der STHM-tragende Transfervektor (M387-STHM) als DNA-Vorlage. Nach einer Reinigung der einzelnen Fragmente über ein Agarosegel wurde die eigentliche Fusions-PCR durchgeführt. Dazu wurden alle drei Fragmente zu gleichen Teilen als DNA-Vorlage eingesetzt und die Primer FusVirAforIII und FusVirDrevIII verwendet. Das PCR-Programm sah wie folgt aus:

- | | | |
|---------|--------|-------------------------------|
| 1) 94°C | 3 min | |
| 2) 94°C | 45 sec | |
| 3) 50°C | 1 min | Schritte 2) bis 4): 10 Zyklen |
| 4) 72°C | 1 min | |
| 5) 94°C | 45 sec | |
| 6) 55°C | 1 min | Schritte 5) bis 7): 25 Zyklen |
| 7) 72°C | 1 min | |
| 8) 72°C | 10 min | |
| 9) 4°C | ~ | |

2.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Zur direkten Reinigung von PCR-Produkten, bei denen keine Nebenprodukte zu erwarten waren, wurde das QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.3 Restriktion und Dephosphorylierung

Zur Vorbereitung von Plasmid-DNA für die Ligation bzw. zum Überprüfen präparierter Plasmid-DNA wurde diese mit Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die verwendeten Enzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen.

Um eine Religation der Plasmid-DNA zu verhindern, wurde anschließend eine Behandlung mit Alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal alkaline Phosphatase, CIP, NEB) durchgeführt.

2.2.4 Ligation

Um zwei DNA-Fragmente zu ligieren wurde standardmäßig folgender Ansatz verwendet:

2 µl 10xLigase-Puffer
1 µl T4-DNA-Ligase [5 U/µl]
2-10 µg DNA (beide Fragmente möglichst äquimolar)
ad 20 µl H₂O (bidest)

Die Inkubation erfolgte entweder bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 16°C über Nacht. Die T4-DNA-Ligase sowie der dazugehörige Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) bezogen.

2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Agarosegelen. Je nach Größe der zu analysierenden Fragmente wurde 0,8 – 1,5 % Agarose (Roth, Karlsruhe) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) aufgekocht. Zur späteren Detektion der DNA auf einem UV-Transilluminator (302 nm) wurde Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) zugegeben. Die Proben wurden mit 6x-Probenpuffer (15 % Glycerin; 0,1 % Xylencyanol; 0,075 % Bromphenolblau; 10 mM EDTA) versetzt und bei 80-200 V aufgetrennt. Als Größenstandards wurden die 1kb- bzw. 100bp-DNA-Ladder (NEB, Schwalbach) verwendet.

2.2.6 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte mittels des QIAEX II Agarose Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Dazu wurde zunächst die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten, dann das Gel aufgeschmolzen und die DNA an Silikat-Kügelchen gebunden. Nach mehreren Waschschritten konnte die DNA eluiert werden.

2.2.7 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Für Flüssigkulturen werden die Bakterien in LB-Medium (1,0 % Bacto-Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1,0 % NaCl), gegebenenfalls mit einem Antibiotikum zur Selektion, auf

einem Schüttler (innova[®] 4000 bzw. 4200, New Brunswick Scientific, Edison, USA) inkubiert. Die Kultivierung erfolgte normalerweise bei 37°C über Nacht, bei Plasmiden mit zwei LTR-Regionen bei 25°C für 36-60 h.

Als Nährböden wurden LB-Agar-Platten (1,5 % Agar-Agar, Merck, Darmstadt) verwendet, die normalerweise mit Antibiotikum, meist Ampicillin, versetzt waren. Auf diesen Platten gewachsene Bakterienkolonien können einige Zeit bei 4°C gelagert werden.

Zur Langzeitlagerung wurden 150 µl Glycerin (Merck, Darmstadt) mit 850 µl Bakteriensuspension gemischt und bei 80°C eingefroren.

2.2.8 Herstellung von kompetenten Bakterien

Die verwendeten *E.coli*-Stämme wurden mit Hilfe einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode vorbehandelt, um eine effiziente Aufnahme von Plasmid-DNA zu gewährleisten. Dazu wurde eine 1 ml Übernachtskultur (LB-Medium ohne Antibiotika) zum Animpfen einer 100 ml Kultur benutzt, die bei 37°C bis zu einer Dichte (OD_{550}) von 0,55 wachsen gelassen wurde. Nach fünfminütigem Kühlen auf Eis wurden die Bakterien pelletiert (6000 rpm, 4°C; Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15 % Glycerin; pH 5,8; mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert) aufgenommen. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut zentrifugiert und in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl₂; 15 % Glycerin; pH 6,5; mit KOH-Lösung eingestellt und sterilfiltriert) resuspendiert. Die aliquotierte Bakteriensuspension (à 100 µl) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.9 Transformation von Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in chemisch kompetente Bakterien eingebracht. Dazu wurde ein Aliquot der Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und nach Zugabe von 10 µl des Ligationsansatzes (bzw. etwa 50 ng eines Plasmids bei einer Retrofo) 1 h auf Eis inkubiert. Nach dem anschließenden Hitzeschock (45 sec bei 42°C) wurde 1 ml SOC-Medium (Invitrogen, Carlsbad, USA) zugegeben und die Bakterien für 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden sie auf Ampicillin-enthaltende

LB-Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin, Boehringer Mannheim) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C oder für 36-60 h bei 25 °C inkubiert.

2.2.10 Plasmid-Präparation („Mini- und Maxi-Präp“)

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit Hilfe der entsprechenden Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Für kleinere Mengen wurden 5 ml Bakterienkultur aufgearbeitet (QIAprep 8 Miniprep Kit), für größere Mengen 200 ml Bakterienkultur (Maxi-Kit, Anionenaustauschersäulen tip-500).

2.2.11 Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Konzentrationsbestimmung einer DNA-Lösung wurde die optischen Dichte bei 260 nm photometrisch gemessen. Die Konzentration berechnet sich nach folgender Formel: $c[\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$, wobei c Konzentration der DNA-Lösung, OD₂₆₀ = optische Dichte die 260 nm Wellenlänge, V = Verdünnungsfaktor und F = Multiplikationsfaktor (bei doppelsträngiger DNA = 50).

2.2.12 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma SRD (Scientific Research and Development) GmbH, Oberursel nach dem Sanger-Verfahren durchgeführt.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Proteinproben (Zelllysate)

Zur Herstellung von Zelllysaten für den Western Blot wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT), einmal mit PBS (137 mM NaCl₂; 2,7 mM KCl₂; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄) gewaschen und in Triton-Lysis-Buffer (TLB; 20 mM Tris pH 7,4; 137 mM NaCl; 10% Glycerin; 2 mM EDTA pH8; 1% TritonX-100; 50 mM Na-β-Glycerophosphat) mit Inhibitoren (Complete Mini, Roche Applied Science, Penzberg) aufgenommen (1x10⁴ Zellen pro µl TLB). Die Lyse erfolgte 30 min auf Eis.

Danach wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt und das Zellysate aliquotiert bei -80°C weggefroren.

Zur Denaturierung vor dem Auftragen auf das Gel wurden die aufgetauten Proben mit einem 4x Probenpuffer (Roti-Load, Roth, Karlsruhe) versetzt und 5 min im Wasserbad aufgeköcht.

2.3.2 Proteinbestimmung (nach Bradford)

Das Bradford-Assay (Bradford, 1976) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brillantblau in Anwesenheit von Proteinen.

Die Stammlösung (Bio-Rad, München) wurde 1:5 mit H_2O bidest verdünnt und 1 ml dieser Lösung wurde mit 5 μl Proteinlösung (in der Regel 1:10 verdünnt) versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm mittels Photometer (GeneQuantpro, Amersham, Buckinghamshire, UK) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer Eichkurve bestimmt.

2.3.3 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, modifiziert nach Laemmli, 1970) wurde zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem apparenten Molekulargewicht verwendet. Je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins wurden 10-15%ige diskontinuierliche Gele eingesetzt. Diskontinuierliche Gele bestehen aus einem niedrigprozentigem Sammelgel zur Konzentration der Proteine und einem höherprozentigem Trenngel.

Die Zusammensetzung des Trenngels für ein Mini-Gel des Trans-Blot-Systems (Bio-Rad, München) ist der folgenden Tabelle zu entnehmen. Die Acrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 30, Roth, Karlsruhe, 30 % Acrylamid mit 0,8 % Bisacrylamid) wurde mit Trenngel-Puffer (1,5 M Tris [Merck, Darmstadt]; 0,4 % TEMED; 0,4 % SDS [Serva, Heidelberg]; pH 9,0) und H_2O gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS (10 %, Ammoniumpersulfat, Gibco, Eggenstein) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, Serva, Heidelberg) gestartet.

Trenngel	10 %	12 %	14 %	15 %
Acrylamid-Stammlsg.	3,4 ml	4 ml	4,7 ml	5 ml
Trenngel-Puffer	2,5 ml			
H ₂ O (bidest)	4 ml	3,4 ml	2,7 ml	2,4 ml
10 % APS	100 µl			
TEMED	10 µl			

Für das Sammelgel (3,75 %) wurden 650 µl Acrylamid-Stammlösung mit 4,5 ml Sammelgel-Puffer (0,14 M Tris; 0,11 % TEMED; 0,11 % SDS; pH 6,8) gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von 50 µl APS (10 %) und 5 µl TEMED gestartet. Die Auftrennung der Proteinproben (normalerweise je 50 µg) erfolgte üblicherweise bei 20 mA (bei 2 Gelen 40 mA) in SDS-Laufpuffer (5x Laufpuffer: 25 mM Tris; 250 mM Glycin (Merck,Darmstadt); 0,1 % SDS). Als Standard wurde ein Marker (MagicMark, Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet, dessen Banden mit allen üblichen Zweitantikörpern nachweisbar sind.

2.3.4 Western Blot

Unter Western Blot versteht man, in Anlehnung an den Nukleinsäuretransfer nach Southern (Southern, 1975), die Übertragung von Proteinen auf eine Membran (Towbin et al., 1979). Dazu wurden die Proteine mittels ElektrobloTTings (Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad, München) auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) übertragen und dadurch immobilisiert. Der Blotting-Puffer wurde jeweils frisch aus 10x Puffer (390 mM Glycin; 480 mM Tris; 0,37 % SDS) verdünnt und dabei mit 20 % Methanol versetzt. Der Transfer wurde mit Kühlung bei 300 mA etwa 45 min durchgeführt.

2.3.5 Nachweis von Proteinen mittels Antikörper und ECL

Vor der Inkubation mit Antikörper wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran über Nacht bei 4°C mit Blocking-Puffer (TBS [0,05 M Tris; 0,15 M NaCl; pH 7,6]; 5 % Magermilchpulver [AppliChem, Darmstadt]) abgesättigt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Primär-Antikörper in TBST (TBS; 0,1 % Tween20, Roth, Karlsruhe) mit 3 % Magermilchpulver erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Nach drei WaschschrItten mit TBST mit 3 % Magermilchpulver wurde die Inkubation mit einem Meerrettich-Peroxidase („horseradish peroxidase“, HRP)-konjugierten Sekundär-

Antikörper ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Es folgten weitere drei Waschschriffe mit TBST, an die sich der Nachweis mittels Chemilumineszenz („enhanced chemiluminescence“, ECL, ECL Western Blotting Detection System, Amersham, Buckinghamshire, UK) anschloß. Die Chemilumineszenz wurde mit Hilfe spezieller Filme (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, UK) detektiert.

Die verwendeten Antikörper gegen die Tags (α -HA, α -myc, α -V3) sowie die spezifischen Antikörper gegen die HIV-Proteine Kapsid und Rev sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Quelle	Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Quelle
α -HA (Klon 12CA5)	1:5000	Roche	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham
α -myc (Klon 9E10)	1:400	Roche	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham
α -CA	1:2500	Prof. Dr. Ralf Wagner	α -rabbit-HRP	1:7500	Amersham
α -V3	1:2000	DAKO	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham
α -Rev (ARP355)	1:500	Centralised Facility for AIDS Reagents; Dr. J. Karn	α -mouse-HRP	1:7500	Amersham

2.3.6 Nachweis der Reverse Transkriptase-Aktivität

Die Menge an Reverser Transkriptase (RT) im Zellkulturüberstand wurde anhand ihrer enzymatischen Aktivität bestimmt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher RT-Test (Lenti-RT Activity Assay, Cavid Tech, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben verwendet.

2.3.7 Luciferase-Assay

Die Bestimmung der Aktivität der Firefly-Luciferase erfolgt über den Umsatz des Substrats Luciferin, das in Anwesenheit von ATP, Mg^{2+} und O^2 über das Intermediat Luciferyl-AMP zu Oxyluciferin oxidiert wird. Dabei wird Fluoreszenzlicht emittiert, das im Luminometer quantifiziert werden kann.

Die Luciferase-Aktivität wurde 48 h nach Transduktion bestimmt. Dazu wurde das Kulturmedium entfernt und durch 100 μ l frisches ersetzt. Dann wurde 100 μ l Substrat

(Luciferase Assay System, Promega, Mannheim) zugegeben und gut gemischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur (abgedunkelt!) konnte im Luminometer (Microplate Luminometer LB96V, EG&G Berthold, Bad Wildbad) gemessen werden.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte in Zellkulturflaschen (Greiner, Frickenhausen), Lochplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark) oder Wannen (Nunc, Roskilde, Dänemark) mit verschiedenen Wachstumsflächen (siehe Tabelle).

Die Zellen wurden in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Osterode) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

		Wachstumsfläche in cm ²
Zellkulturflaschen	klein	25
	mittel	75
	groß	175
Loch-Platten	6	9,6
	12	3,9
	24	1,9
	48	1,0
Wanne		632

2.4.1.1 adhärenente Zelllinien

Adhärenente Zellen wurden in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco BRL, Eggenstein) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin, komplement-inaktiviert bei 56°C für 45 min) sowie 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) unter Zugabe von Antibiotika (50 mg/ml Streptomycin, 100 Einheiten/ml Penicillin, beides Biochrom KG, Berlin) kultiviert.

In der Regel wurden die Zellen 2-3x wöchentlich im Verhältnis 1:10 passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen 1x mit PBS (137 mM NaCl₂; 2,7 mM

KCl₂; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄) gewaschen und dann mit 1mM EDTA in PBS abgelöst (mit 5 ml spülen, dann 3 ml davon verwerfen, mit dem Rest die Zellen 5 min inkubieren). Anschließend wurden die Zellen mit 8 ml Medium von der Kulturoberfläche ab gespült.

2.4.1.2 Suspensionszelllinien

Zur Kultivierung von PM1-Zellen wurde RPMI 1640 (Gibco BRL, Eggenstein), supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin, komplement-inaktiviert bei 56°C für 45 min) sowie 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) unter Zugabe von Antibiotika (50 mg/ml Streptomycin, 100 Einheiten/ml Penicillin, beides Biochrom KG, Berlin) verwendet. 2-3x pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:3 mit frischem Medium versetzt.

2.4.2 Lagerung von Säugerzellen

2.4.2.1 Einfrieren

Zur Langzeitlagerung wurden Zellen in Kulturmedium mit 20% FCS (Biochrom KG, Berlin) und 10% DMSO (Sigma, Taufkirchen) aufgenommen und in Aliquots von 1,5 ml zunächst für 2 Stunden bei -20°C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen einige Tage bei -80°C aufbewahrt, bevor sie zur endgültigen Lagerung in die Gasphase eines Flüssigstickstoff-Tanks überführt wurden.

2.4.2.2 Auftauen

Eingefrorene Zell-Aliquots wurden im 37°C-Wasserbad angetaut und vor dem vollständigen Auftauen in vorgewärmtes Kulturmedium gegeben. Adhärente Zellen wurden direkt in 12 ml Medium aufgenommen und in Kultur genommen. Am folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Suspensionszellen wurden in 20 ml Medium aufgenommen, direkt anschließend zentrifugiert (1200 rpm, 10 min, MinifugeT, Heraeus, Hanau) und in 20-30 ml Medium resuspendiert.

2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:2 bzw. 1:4 mit Trypanblau (Sigma, Taufkirchen) verdünnt und die in dem definierten Volumen einer Thoma-Zählkammer vorhandenen Zellen gezählt.

2.4.4 Proliferations-Assay

Zur Bestimmung der Proliferations-Aktivität von Zellen wurde das CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, USA) verwendet. Dieser Test mißt metabolische Aktivität anhand einer Substratumsetzung, von der auf die relative Zellzahl geschlossen werden kann. Als Substrat wird eine Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS) verwendet, das von lebenden Zellen in ein gefärbtes Formazan-Produkt umgesetzt wird.

Die Zelllinien wurden in Triplikaten für jeden Meßpunkt jeweils 1×10^3 Zellen in 100 µl Kulturmedium pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte ausgesät. Die zu messenden Kulturen wurden mit je 20 µl Reagenz versetzt und für 1h bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 490 nm gemessen (MultiskanRC, ThermoLabsystems).

2.4.5 Transfektion

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen. Bei der Lipofektion wird die DNA mit bestimmten Vesikeln, sogenannten Liposomen, komplexiert, die von den Zellen aufgenommen werden.

Die Transfektion von 293T-Zellen wurde unter Verwendung von LipofektaminPLUS[™] (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt.

Die zur Transfektion eingesetzten Zellen wurden am Vortag so ausgesät, daß sie etwa eine Konfluenz von 80 % erreichten.

Zunächst wurde die Plasmid-DNA mit LipofektaminPLUS in OptiMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Dann wurde Lipofektamin Reagenz (Invitrogen, Carlsbad, USA) in OptiMEM zugegeben und der Ansatz weitere 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit OptiMEM überschichtet. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben und diese für 4 h bei 37°C in den Zellinkubator gestellt.

Anschließend wurde der Transfektionsansatz durch frisches Kulturmedium ersetzt.

	DNA, gesamt	Lipofektamin PLUS	Lipofektamin Reagenz	OptiMEM
6-Loch-Platte	3 µg	6 µl	5 µl	2x 100 µl + 800 µl
mittlere ZKF	24 µg	48 µl	40 µl	2x 800 µl + 6,4 ml
Wanne	198 µg	396 µl	330 µl	2x 6,6 ml + 52,8 ml

2.4.6 Herstellung von Retroviralen Vektoren

Zur Herstellung von retroviralen Vektoren wurde eine Dreifach-Transfektion von 293T-Zellen mit einem Verpackungs- sowie einem Hüllprotein-Konstrukt und einem Transfervektor durchgeführt. Am Tag nach der Transfektion wurde das Kulturmedium gegen neues ausgetauscht. 48 bzw. 72 h nach der Transfektion wurde der vektorhaltige Überstand filtriert (0,45 µm Mikrofilter, Sartorius, Göttingen; Filtereinheiten: Nalgene, Rochester, USA), um Zellen und Zelltrümer zu entfernen, und entweder nativ in Aliquots von je 1 ml bei –80°C eingefroren, oder mittels UZ konzentriert.

2.4.7 Konzentrierung von Retroviralen Vektoren mittels Ultrazentrifugation

Um hochtitrige Vektorstocks zu generieren, wurden vektorhaltige Überstände einer Ultrazentrifugation unterworfen. Dazu wurden je Zentrifugenröhrchen (Beckman, Palo Alto, USA) 30 ml gefilterter Überstand mit 5 ml 20%iger Sucrose (in PBS) unterschichtet. Die Zentrifugation erfolgte bei 25000 rpm für 2 h (Optima™L-70K Ultracentrifuge, SW28-Rotor, Beckman, Palo Alto, USA). Die pelletierten Vektoren wurden anschließend in 200 µl X-Vivo-Medium (BioWhittaker Europe, Cambrex, Verviers, Belgien) aufgenommen (0,5-1 h bei 4°C lösen lassen) und in Aliquots zu 50-100 µl bei –80°C gelagert.

2.4.8 Transduktion

Zur Transduktion von adhärennten Zelllinien wurden am Vortag $1-5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und dann entweder mit 1 ml frischem, gefiltertem Vektorüberstand oder mit 1ml einer gewählten Vektorverdünnung inkubiert. Nach 4 h erfolgte ein Mediumwechsel.

Die Transduktion von Suspensionszellen wurde in einer 24-Loch-Platte durchgeführt. Dazu wurden 5×10^5 (oder bei Bedarf weniger) Zellen in vektorhaltigem Überstand unter Zugabe von 4 $\mu\text{g/ml}$ Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen) aufgenommen. Die Zellen wurden dann bei 2000rpm für 1 h bei 31°C zentrifugiert (MinifugeT, Heraeus, Hanau) und weitere 3 h bei 37°C im Zellinkubator inkubiert. Danach folgte ein Mediumwechsel.

2.4.9 FACS

2.4.9.1 Analytische Durchflußzytometrie

Zur durchflußzytometrischen Analyse von transfizierten und transduzierten Zellen wurde in der Regel der DAKO Galaxy (DAKO, Hamburg) verwendet. Einige Messungen wurden mit dem BD FACScan (Becton Dickinson, San Jose, USA) durchgeführt.

Diese Methode erlaubte sowohl eine qualitative als auch eine quantitative Aussage über die Expression des Markergens *egfp* sowie verschiedener Proteine, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind.

Für den Nachweis von EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) wurden die zu analysierenden Zellen ($\sim 1 \times 10^6$) 2x mit FACS-Waschpuffer (PBS; 1% BSA; 0,1% NaN_3) gewaschen und dann in FACS-Fixierlösung (PBS; 1% Paraformaldehyd) aufgenommen.

Die membranständigen Proteine wurden mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern nachgewiesen. Dazu wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen 1x mit FACS-Waschpuffer gewaschen und wieder in 30-50 μl FACS-Waschpuffer aufgenommen. Dann wurde der spezifische Antikörper zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei 4°C (für CCR5-Antikörper Raumtemperatur). Nach weiteren 2 Waschschrritten mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen entweder in 200 μl FACS-Fixierlösung aufgenommen, falls es sich um einen direkt-gekoppelten Antikörper handelte, oder

anderenfalls für weitere 30 min bei 4°C mit dem passenden Sekundärantikörper inkubiert, und danach erneut gewaschen und in FACS-Fixierlösung aufgenommen. Zur Analyse wurden bei Zelllinien 7000, bei primären Lymphozyten 10000 Zellen gemessen.

Die verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Antikörper	Quelle	Nachweis	Kontrolle
α-T20 (C2F5)	Centralised Facility for AIDS Reagents; Dr. H. Katinger	PE-gekoppelter Sekundär-Antikörper: α-human IgG (Sigma)	Sekundär-Antikörper (ohne Inkubation mit Primär-Antikörper)
α-human CD4	Pharmingen	direkt PE-gekoppelt	α-mouse IgG1-PE
α-human CXCR4	Pharmingen	direkt PE-gekoppelt	α-mouse IgG2a-PE
α-human CCR5	Pharmingen	direkt PE-gekoppelt	α-mouse IgG2a-PE

2.4.9.2 Zellsortierung

Die Sortierung von transduzierten PM1-Zellen erfolgte am Georg-Speyer-Haus (Frankfurt) mittels eines BD FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, USA).

Dazu wurden 1×10^7 Zellen aus Kulturen, die mindestens 5% EGFP-positive Zellen enthielten, in 500 µl PBS aufgenommen und gegebenenfalls zur Sortierung weiter verdünnt. Die sortierten Zellen wurden während der Prozedur zunächst in mit 7,5 ml gefiltertem FCS gefüllten 50 ml-Falcon-Röhrchen gesammelt, anschließend zentrifugiert und in einer 1:1-Mischung aus frischem und konditioniertem Medium aufgenommen.

2.4.10 Virusanzucht

Die HIV-1-Laborstämme wurden durch Infektion von PM1-Zellen angezüchtet. Der virushaltige Kulturüberstand wurde an verschiedenen Tagen nach Infektion geerntet und in Aliquots bei -80°C eingefroren. Die höchsten Titer wurden nach 9 Tagen gefunden.

Die HIV-1-Primärisolate wurden auf humanen PBMC vermehrt.

2.4.11 Titration

2.4.11.1 Vektoren

Die [MLV(GaLV)]-Vektoren wurden auf PM1-Zellen titriert. Dazu wurde ein Transduktion, wie in 2.4.7 für Suspensionszellen beschrieben, mit Vektorverdünnungen in verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt. Üblicherweise wurden native Überstände 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt, während von UZ-konzentrierten Vektorpräparationen 10 µl, 1 µl und 0,1µl eingesetzt wurden.

Die Analyse erfolgte nach 48 h mittels FACS.

2.4.11.2 Viren

Zur Titerbestimmung der HIV-1-Stocks wurde eine Endpunkttitration auf PM1-Zellen durchgeführt. Dazu wurden 2×10^3 Zellen mit 12 Verdünnungsstufen des Virus-Überstandes in 8 Replikaten infiziert. Die Zellen wurden in einer 96-Loch-Platte in jeweils 150 µl Kulturmedium ausgesät, bevor 50 µl Virusverdünnung zugegeben wurden. Nach einer Inkubation im Zellinkubator für eine Woche wurden die Zellen resuspendiert und auf Platten überführt, die mit Poly-L-Lysin (Sigma, Taufkirchen) beschichtet waren. Nach 1 h bei 37°C konnten die nun am Boden hafteten Zellen in einen Immunperoxidase-Test (IPA, 2.4.17) eingesetzt werden.

2.4.12 Immunperoxidase-Test

Mit Hilfe des Immunperoxidase-Assays (IPA) konnten HIV-1-infizierte Zellen durch den Nachweis der Expression viraler Proteine gezeigt werden. Dazu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit -20°C kaltem Methanol mindestens 30 min bei -20°C fixiert. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen und unspezifische Bindungsstellen durch Zugabe von Blocking-Puffer (PBS; 2 % BSA) für 1 h bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann folgte eine Inkubation mit einem gepoolten HIV-1-Serum (in Blocking-Puffer verdünnt). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit Meerrettichperoxidase-konjugiertem α -human IgG-Antikörper (Bio-Rad, München; 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt) inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten erfolgte die Zugabe der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol [Sigma, Taufkirchen] in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer [pH 5,2] und 30 µl H₂O₂). Die infizierten Zellen

konnten nach ca. 15 min anhand einer Rotfärbung identifiziert werden. Nach Fixierung mit 20 % Glycerin (in H₂O) sind die Platten unbegrenzt lagerbar.

2.4.13 Präparation humaner peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

PBMC wurden aus Citratblut von gesunden Spendern isoliert. Dazu wurden 15 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque 1077 (Sigma, Taufkirchen) vorsichtig mit 30 ml Blut überschichtet und anschließend zentrifugiert (30 min, 1300 rpm, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Dabei sedimentieren die roten Blutkörperchen und die Granulozyten, während sich die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen direkt über dem Ficoll sammeln (und so den sogenannten Lymphozytenring bilden). Das darüberliegende Plasma wurde abgenommen und zur Inaktivierung für 30 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde es mehrfach zentrifugiert (3500 rpm, 4°C, 5 min) und nach Filtration (0,45 µm, Sartorius, Göttingen) zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert. Der Lymphozytenring wurde abgenommen und in ein neues Gefäß (50 ml-Röhrchen, BD Falcon, Heidelberg) überführt. Nach zweimaligem Waschen mit 35 ml PBS (137 mM NaCl₂; 2,7 mM KCl₂; 1,5 mM KH₂PO₄; 8,1 mM Na₂HPO₄) wurden die verbliebenen Erythrozyten durch Zugabe von 10 ml 0,86 % NH₄Cl in PBS und 10 min Inkubation bei 37°C lysiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS, dann wurden die Zellen in 10 ml MACS-Puffer (PBS; 0,5 % BSA, 2mM EDTA) mit 10 % autologem Plasma aufgenommen.

2.4.14 Isolierung von CD4⁺-Lymphozyten

Die Isolierung von CD4-positiven Lymphozyten aus PBMC erfolgte mittels negativer Depletion. Dazu wurde für die magnetische Separierung (**Magnetic Cell Separation**, MACS) das CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) verwendet, das ein Antikörpergemisch aus Antikörpern gegen Oberflächenmarker aller in PBMC vorkommender Zelltypen außer den CD4⁺-Lymphozyten benutzt.

Jeweils 1x10⁷ Zellen der PBMC wurden in 40 µl MACS-Puffer aufgenommen und dann mit 10 µl Biotin-Antikörpergemisch gefärbt. Dann wurden 30 µl MACS-Puffer (PBS; 0,5 % BSA; 2mM EDTA; 10 % autologes Plasma) und 20 µl Anti-Biotin magnetische Beads zugegeben. Nach 15 min Inkubation wurde mit dem 10-20fache

Volumen MACS-Puffer gewaschen und die Zellen in 500 µl MACS-Puffer (für bis zu 1×10^8 Zellen) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zur magnetischen Separierung auf eine in einem magnetischen Feld befindliche Säule gegeben. Im Durchlauf befanden sich die angereicherten $CD4^+$ -Lymphozyten. Diese wurden in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/ml in RPMI mit 10 % autologem Plasma und 0,5 % FCS, sowie Glutamin, Antibiotika, und 200 U/ml IL-2 (Chiron, Marburg) aufgenommen.

2.4.15 Stimulierung von $CD4^+$ -Lymphozyten

Zur Stimulierung der $CD4^+$ -Lymphozyten wurden Beads verwendet, die mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 gekoppelt sind (Dynabeads[®]CD3 / Cd28 T Cell Expander, DYNAL Biotech, Hamburg). Diese Beads wurden im Verhältnis 3 Beads pro Zelle zugesetzt. Die benötigte Menge wurde zuvor mittels eines Magneten (DYNAL MPC, DYNAL Biotech, Hamburg) zweimal mit je 3 ml PBS mit 2 % Plasma gewaschen. Die Stimulierung erfolgte für 5 Tage, dann wurden die magnetischen Beads durch kräftiges Resuspendieren von den Zellen gelöst und mit Hilfe des Magneten entfernt.

2.4.16 Beschichtung von Zellkulturplatten

Zur Beschichtung von Zellkulturplatten wurde ein rekombinantes Fragment aus humanem Fibronectin (RetroNectin[®], TaKaRa, Otsu, Shiga, Japan, bezogen über BioWhittaker, Taufkirchen) verwendet. Dieses Fragment besitzt spezifische Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren als auch für hämatopoetische Zellen (Hananberg et al, 1996), was zu einer Ko-Lokalisierung auf der beschichteten Platte und damit zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz führt (Fehse et al, 1998).

Die in H_2O (bidest) angesetzte Vorratslösung (1 mg/ml) wurde in Aliquots bei $-20^\circ C$ gelagert und zur Verwendung 1:10 mit PBS (137 mM $NaCl_2$; 2,7 mM KCl_2 ; 1,5 mM KH_2PO_4 ; 8,1 mM Na_2HPO_4) verdünnt. Unbehandelte 24-Loch-Platten (BD Falcon, Taufkirchen) wurden pro Vertiefung mit 250 µl dieser Lösung überschichtet und für 2 h unter UV-Licht inkubiert (1,5 h mit offenem und 0,5 h mit geschlossenem Deckel). Nach dem Abnehmen der Lösung wurde mit 2 % BSA in PBS für 30 min abgesättigt und zweimal mit HBSS-Puffer (Hanks Buffered Saline Solution, „Hanks' Balanced Salts“, Sigma, Taufkirchen) gewaschen. Mit PBS überschichtet können die Platten bei $4^\circ C$ mehrere Monate gelagert werden.

2.4.17 Transduktion von CD4⁺-Lymphozyten

Die Transduktion primärer Lymphozyten erfolgte nach einem in einer früheren Doktorarbeit optimierten Protokoll (Schmitt, 2002). Dazu wurden die RetroNectin-beschichteten Platten für 30 min mit 500 µl vektorhaltigem Überstand bei 37°C inkubiert. Dann wurde der Überstand verworfen und je Vertiefung 5×10^5 Zellen in 500 µl X-Vivo-Medium (BioWhittaker Europe, Cambrex, Verviers, Belgien) mit 20 % FCS (bzw. 10 % FCS und 10 % Plasma), 200 U/ml IL-2 (Chiron, Marburg), 4 µg/ml Protaminsulfat (Sigma, Taufkirchen), 2 mM L-Glutamin (Biochrom KG, Berlin) sowie Antibiotika (50 mg/ml Streptomycin, 100 Einheiten/ml Penicillin, beides Biochrom KG, Berlin) gegeben. Nach Zugabe von 500 µl frischem Vektorüberstand wurde für 90 min bei 32°C zentrifugiert (1000 rpm, MinifugeT, Heraeus, Hanau) und weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Halbmediumwechsel mit Medium ohne Protaminsulfat. Die Transduktion wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt.

2.4.18 Belastungsexperimente

Für die Belastungsexperimente wurden 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Loch-Platte in 100 µl Kulturmedium ausgesät. Dabei wurde jeder Ansatz als Triplikat ausgeführt. Zur Infektion wurde 50 µl einer der gewünschten MOI entsprechenden Virusverdünnung hinzugefügt und mit den Zellen gemischt. Nach einer Inkubation für 3 h bei 37°C wurden die Zellen 3x mit frischem Kulturmedium gewaschen. Alle 2-3 Tage nach Infektion wurden die Ansätze mikroskopisch beurteilt sowie 80 µl Medium abgenommen und bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden anschließend 1:2 gesplittet und das Volumen mit frischem Kulturmedium wieder auf 150 µl aufgefüllt.

Jeweils 10 µl der Proben wurden in den RT-Test (siehe 2.3.7) eingesetzt.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden aus den jeweiligen Triplikaten Mittelwerte gebildet. Bei der Darstellung der Replikationskinetiken wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf die Einbeziehung der Fehlerbalken verzichtet.

3 Ergebnisse

3.1 Aufbau des Testsystems

3.1.1 Auswahl der Zelllinie

Für den Aufbau eines Zellkultursystems, in dem die therapeutische Wirksamkeit von Anti-HIV-Genen getestet werden soll, benötigt man eine CD4⁺-T-Zelllinie, in der ein möglichst breites Spektrum von HIV-Stämmen replizieren kann. Deshalb wurden für diese Arbeit PM1-Zellen, ein klonales Derivat der T-Zelllinie Hut78, als Basis gewählt. In dieser Zelllinie können sowohl HIV-Stämme mit unterschiedlichem Tropismus als auch Primärisolate wachsen (Lusso et al., 1995).

Vor der Verwendung für das Testsystem wurden Zellen mit hoher Expression von CD4 und der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 selektioniert (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt).

3.1.2 Auswahl des Transfervektors

Für den retroviralen Gentransfer in Gentherapiestudien werden häufig MLV-basierende Vektorsysteme verwendet. Zur effizienten Transduktion von T-Zellen werden die MLV-Partikel mit dem Hüllprotein des Gibbon ape Leukemia Virus (GaLV) pseudotypisiert. Ein solches System fand auch in der vorliegenden Arbeit Verwendung.

Als gemeinsamer Transfervektor, eine wichtige Voraussetzung für eine Vergleichbarkeit aller therapeutischen Gene im Test, wurde ein auf MLV basierendes Konstrukt von Prof. Dorothee von Laer (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt (M387, Abb. 3.1), in dem die Expression des therapeutischen Gens durch die Long Terminal Repeats (LTRs) des Myelo-Proliferativen Sarkom-Virus (MPSV) reguliert wird. Als Markergen enthält der Transfervektor ein EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein)-Gen, dessen Expression durch die IRES (Internal Ribosomal Entry Site) des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV) kontrolliert wird. Zur Stabilisierung der mRNAs wurde ein Posttranskriptionelles Regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis-Virus (wPRE) eingefügt.

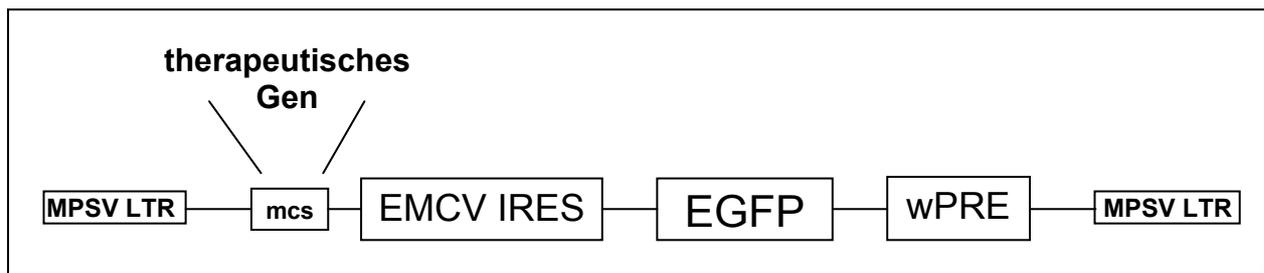


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des auf MLV basierenden Transfervektors M387. In die „multiple cloning site“ (mcs) wurden die verschiedenen therapeutischen Gene kloniert. MPSV LTR: Long Terminal Repeats des Myelo-Proliferativen Sarkom-Virus, EMCV IRES: Internal Ribosomal Entry Site des Encephalomyocarditis-Virus, EGFP: Enhanced Green Fluorescence Protein, wPRE: Posttranskriptionelles Regulatorisches Element des Woodchuck Hepatitis-Virus.

3.1.3 Generierung stabil-exprimierender Zelllinien

Die Methodik zur Generierung von Zelllinien, die stabil ein HIV-inhibitorisches Gen exprimieren, wurde zunächst mit den Positiv-Kontrollen, d.h. den Transfervektoren, die ein transdominant-negatives Rev (RevM10) bzw. das membrangebundene T20 (STHM) enthalten, und der Negativ-Kontrolle, dem leeren Transfektor M387, etabliert. Mit dem im folgenden beschriebenen Protokoll konnten stabil hoch-exprimierende PM1-Linien hergestellt werden, die reproduzierbare Ergebnisse in Belastungsversuchen lieferten.

Zunächst wurden durch Transfektion von 293T-Zellen mit einem MLV-Verpackungskonstrukt (pHIT60) und einem GaLV-Hüllprotein-Konstrukt (pALF-GaLVwt) sowie dem entsprechenden Transfektor, der ein Kontroll- oder ein potentiell HIV-inhibitorisches Gen enthielt, transiente Verpackungszellen hergestellt. Die in diesen Verpackungszellen generierten [MLV(GaLV)]-Vektorpartikel wurden dann zur Transduktion von PM1-Zellen verwendet (Abb. 3.2). Dabei wurde eine MOI („multiplicity of infection“, gibt das Verhältnis von infektiösen Partikeln zu Zellen an) von 1 verwendet, um die Gefahr von Mehrfachintegrationen zu verringern. 3-10 Tage später wurden die EGFP-exprimierenden Zellen mittels FACS selektioniert.

Nach der Kultivierung der sortierten Zellen für 2-4 Wochen wurden sie zunächst auf Reinheit im Hinblick auf Markergen-Expression untersucht. In einigen Fällen mußte eine zweite Sortierung angeschlossen werden, um auf einen Wert von über 95% EGFP-positiven Zellen zu kommen. Dieses Limit wurde gesetzt, um eine

höchstmögliche Vergleichbarkeit von Zelllinien, die therapeutische Gene mit unterschiedlichen Wirkmechanismen exprimieren, zu erreichen.

Desweiteren wurden die Zellen auf proliferative Aktivität (MTS-Assay, siehe Material und Methoden) und Expression des therapeutischen Gens sowie der HIV-Rezeptoren untersucht, bevor sie in Belastungsexperimente eingesetzt wurden.

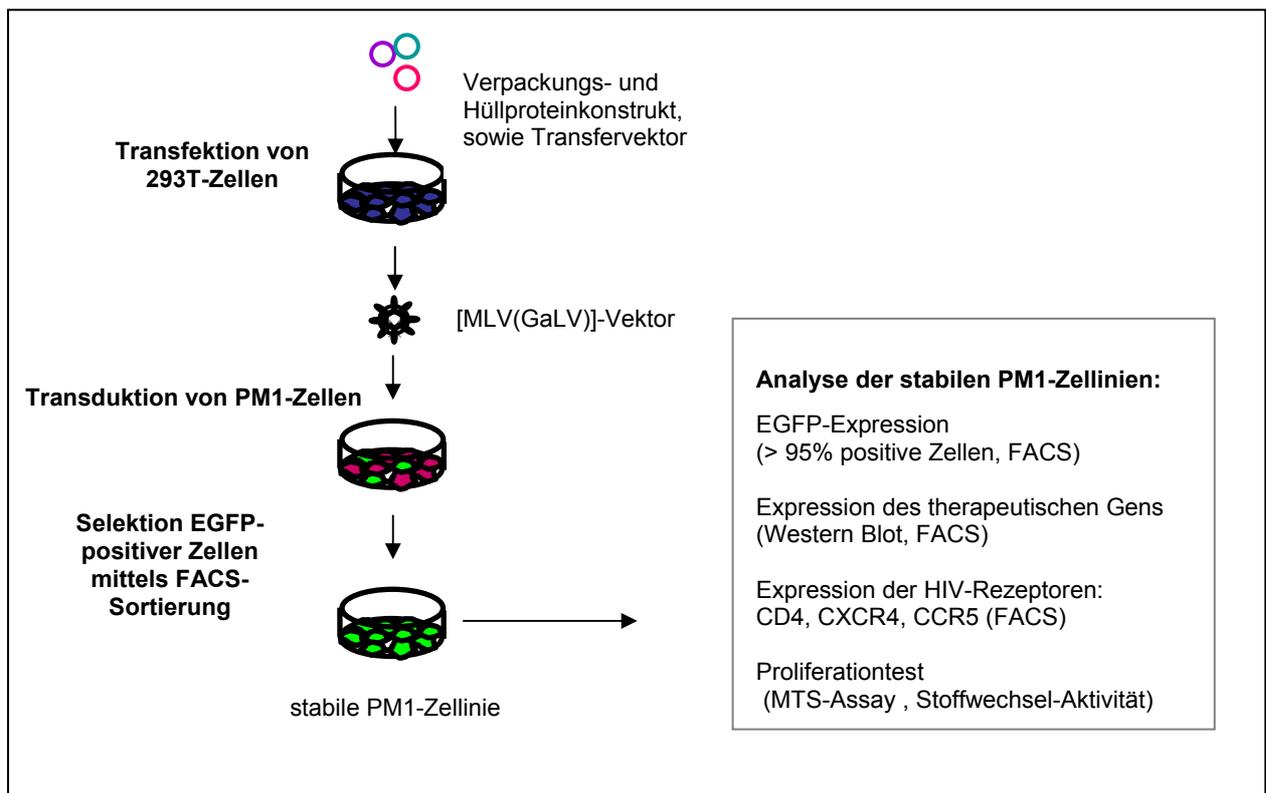


Abb. 3.2: Schema der Herstellung und Analyse der stabilen PM1-Zelllinien. Durch Triple-Transfektion wurden transiente 293T-Verpackungszellen generiert, die [MLV(GaLV)]-Vektorpartikel herstellen. Mit diesen Vektoren wurden PM1-Zellen transduziert (MOI = 1). Durch Selektion wurden stabile Zelllinien mit über 95% EGFP-positiven Zellen erhalten. Diese wurden dann auf verschiedene Parameter (siehe Kasten) untersucht.

In Tab. 3.1 sind die für die drei Kontrollen erreichten Vektortiter sowie Transduktionseffizienzen und Reinheit der EGFP-positiven Zellen nach Sortierung zusammengefasst. Die Ergebnisse wiesen nur geringe Schwankungen auf und die Anreicherung der Marker-positiven Zellen war nach einer Sortierung über dem gesetzten Limit. Der Erfolg der Sortierung ist in Abb. 3.3 anhand der FACS-Kurven für die PM1-Zellen nach Transduktion und nach Sortierung dargestellt.

Transfer-vektor	Titer / ml	PM1 nach Transduktion	PM1 nach Sortierung
M387	$3,4 \times 10^5$	45 %	98,4 %
RevM10	$3,0 \times 10^5$	39 %	98,4 %
STHM	$3,3 \times 10^5$	34 %	97,4 %

Tab. 3.1: Titer der [MLV(GaLV)]-Vektorpräparationen und Anteil der EGFP-positiven Zellen nach der Transduktion und nach der Sortierung.

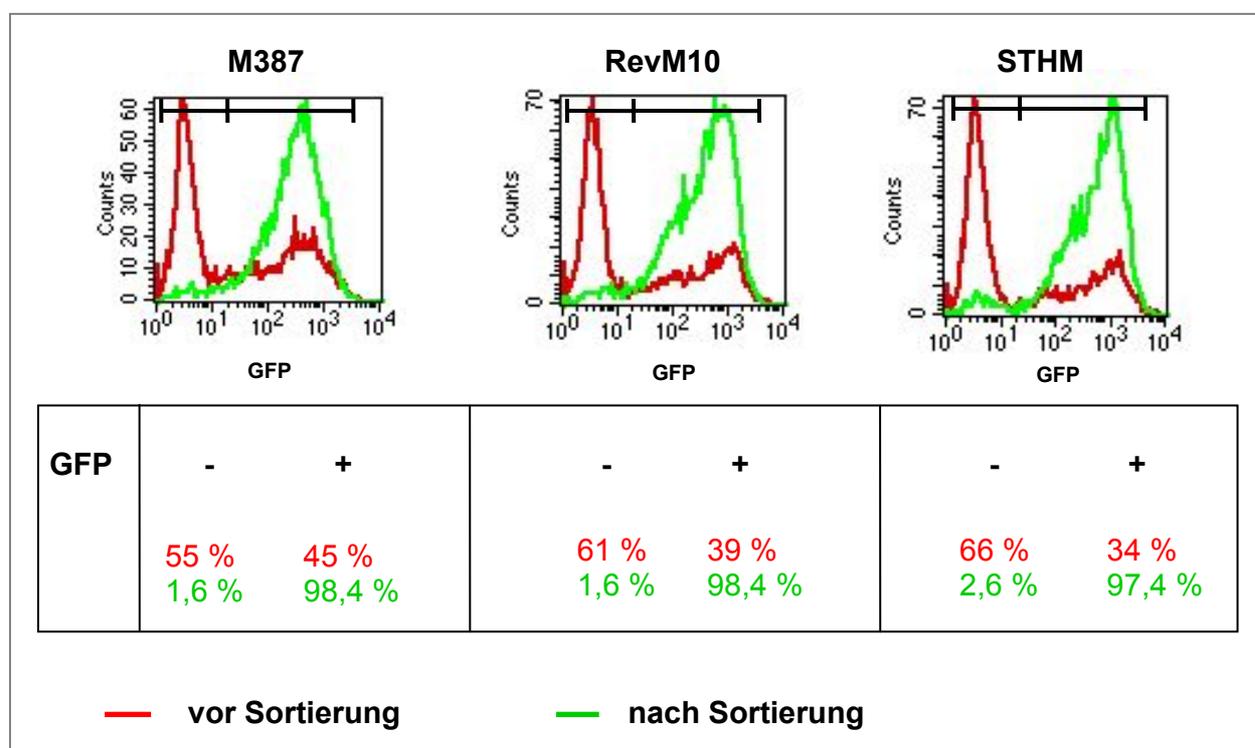


Abb. 3.3: Anreicherung EGFP-positiver Zellen für die PM1-Kontrolllinien. In rot sind die Zellen vor der Sortierung dargestellt, in grün nach der Sortierung. Die als EGFP-negativ bzw. -positiv gewerteten Bereiche sind durch Balken angegeben. In der Tabelle sind die jeweiligen Anteile EGFP-negativer und -positiver Zellen in Prozent aufgeführt.

Weiterhin wurde die Vergleichbarkeit der PM1-Zelllinien in bezug auf ihr Proliferationsverhalten untersucht. Dazu wurde ein Test verwendet, der die Stoffwechselaktivität mißt (MTS-Assay). Die damit erstellten Wachstumskurven für die Kontrollzelllinien zeigen keine wesentlichen Abweichungen von dem Verhalten der parentalen PM1-Zellen (Abb. 3.4). Während die Zellen der Negativ-Kontrolle, PM1-Zellen in Medium ohne FCS, nicht proliferierten und schnell abstarben, zeigten

die Zellen in vollständigem Kulturmedium bis Tag 5 Proliferation. Das Abknicken der Kurven zwischen Tag 5 und 6 markiert den Beginn der Absterbephase.

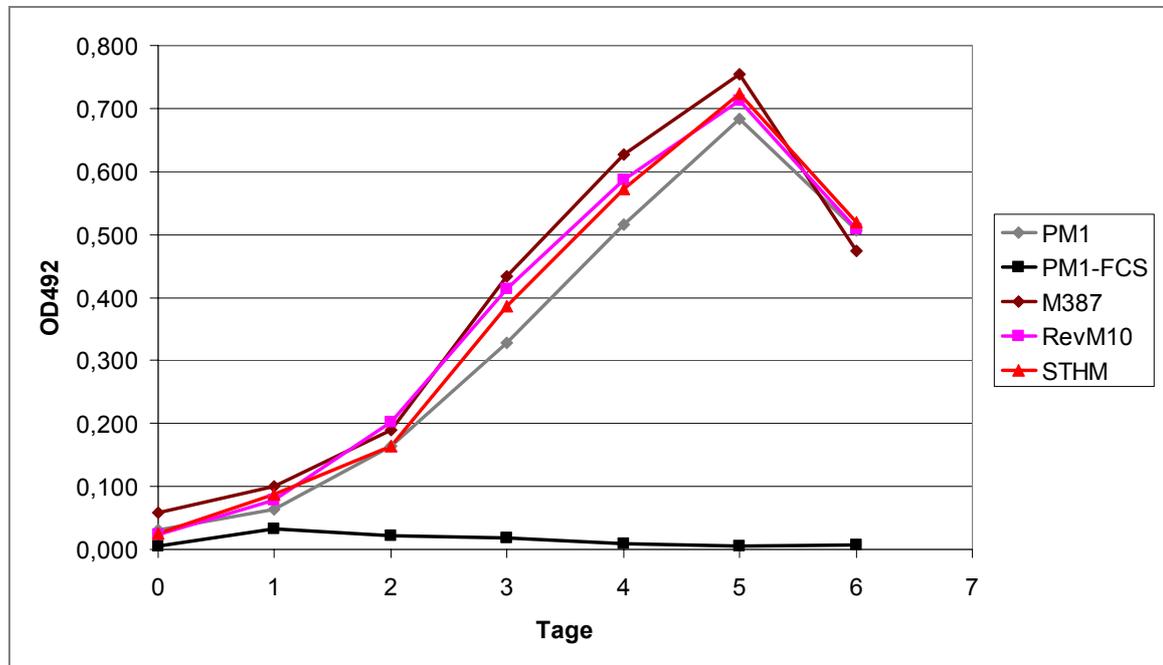


Abb. 3.4: **Proliferation der PM1-Kontrolllinien.** Die an Tag 0 ausgesäten Zellen wurden täglich in einem MTS-Assay analysiert, der mittels Substratumsatz die Stoffwechselaktivität mißt. Anhand der gemessenen OD_{492} läßt sich auf die Proliferationsaktivität schließen. Als Positiv-Kontrolle dienten untransduzierte PM1-Zellen. Die Negativ-Kontrolle (PM1-FCS) sind PM1-Zellen, die in Medium ohne FCS gehalten wurden. Jeder Meßpunkt wurde als Triplikat aufgenommen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Auf die Angabe der in allen Fällen geringen Standardabweichungen wurde in dieser Darstellung aufgrund der weitgehend ähnlichen Werte zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

Eine weitere Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der stabilen Zelllinien ist die ähnliche Expression der HIV-Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, daß in allen Linien über 90% der Zellen CD4 auf der Oberfläche exprimieren (Tab. 3.2). Der Nachweis der Korezeptoren ist experimentell schwieriger, da sie relativ schnell internalisiert werden. Die CXCR4-Expression ließ sich dennoch auf einem relativ hohen Anteil der Zellen nachweisen. CCR5 hingegen konnte auf der Zelloberfläche kaum gezeigt werden. Allerdings reichen schon geringe Mengen dieses Korezeptors für eine Infektion aus, so sind z. B. Individuen, die heterozygot für die CCR5 Δ 32-Deletion sind, mit HIV infizierbar (O'Brien & Moore, 2000), obwohl mittels FACS auf ihren Zellen kein CCR5 nachweisbar ist.

Rezeptoren Zelllinien	CD4	CXCR4	CCR5
PM1	98,5	36,7	0,3
M387	95,1	24,8	0,7
RevM10	95,6	38,5	1,3
STHM	91,2	36,2	1,2

Tab. 3.2: Expression des HIV-Rezeptors CD4 und der Korezeptoren. Die Zellen wurden mit PE-gekoppelten Antikörper gegen die Rezeptoren angefärbt und im FACS analysiert. Angegeben ist der jeweilige Anteil angefärbter Zellen in Prozent.

Das wichtigste Kriterium für die Qualität der stabilen Linien ist der Nachweis der Expression des jeweiligen therapeutischen Gens. In Abb. 3.5 ist diese Expression in den Kontroll-Zelllinien gezeigt. In A wurde RevM10 in der sortierten PM1-Zelllinie und in transfizierten 293T-Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Rev (ARP355, Dr. J. Karn, Centralised Facility for AIDS Reagents) nachgewiesen. Die Bande für RevM10 sollte auf gleicher Höhe wie der Wildtyp laufen (13kDa), da die Mutation zu gering ist, um ein verändertes Laufverhalten zu begründen (Malim et al, 1989). Im verwendeten Gelsystem allerdings liegt die Bande etwas höher bei 20 kDa. Wie zu erwarten ist die Expression in transfizierten Zellen stärker als in den stabilen Zelllinien.

Die Expression des STHM wurde mit Hilfe eines gegen das T20 entsprechende Epitop des gp41 gerichteten Antikörpers (C2F5) im FACS nachgewiesen. Die Diskrepanz zwischen über 95 % EGFP-positiven Zellen und lediglich knapp 45 % Antikörper-angefärbten Zellen läßt sich dadurch erklären, daß der verwendete Antikörper nur relativ schwach bindet (Dorothee von Laer, persönliche Mitteilung).

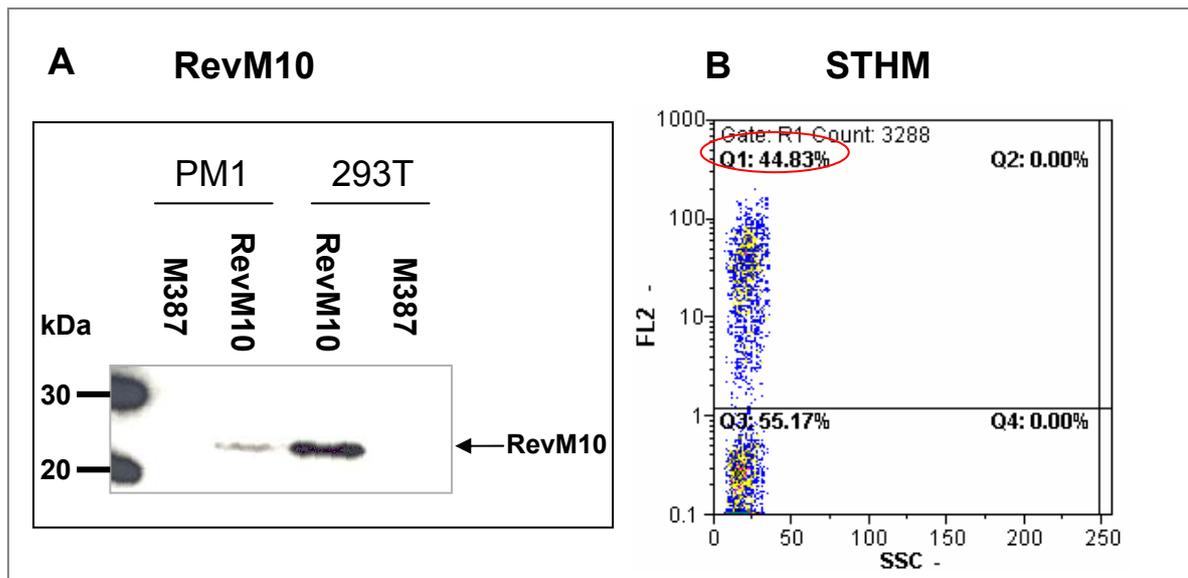


Abb. 3.5: Nachweis der Expression von RevM10 und STHM in den PM1-Zelllinien. A: α -Rev-Western Blot mit Lysaten der stabilen PM1-Zelllinien und transfizierten 293T-Zellen, als Negativ-Kontrolle der Vektor ohne therapeutisches Gen (M387); B: FACS-Analyse der stabilen PM1-STHM-Linie nach Anfärbung mit dem an T20 bindenden Antikörper C2F5 und einem PE-gekoppelten Zweitantikörper.

3.1.4 Festlegen der MOI für die Belastungsexperimente

Für die Belastungsexperimente wurden drei HIV-1-Laborstämme mit unterschiedlichem Korezeptor-Tropismus ausgesucht (Tab. 3.3). Diese Viren wurden auf PM1-Zellen angezogen. An verschiedenen Tagen nach Infektion wurden Viruspräparationen hergestellt und Aliquots auf PM1-Zellen titriert. Die höchsten Titer wiesen die Präparationen von Tag 9 nach Infektion auf. Diese Viruspräparationen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

HIV-1-Stamm	Tropismus	Titer (TCID ₅₀ /ml)
NL4-3	CXCR4	$3,3 \times 10^5$
JRFL	CCR5	$7,5 \times 10^5$
D117II	dualtrop	$5,4 \times 10^3$

Tab. 3.3: Tropismus der HIV-1-Stämme und Titer der verwendeten Viruspräparationen. Die Titer sind als TCID₅₀ („Tissue Culture Infecting Dose“, Bestimmung der Virusverdünnung, die 50% einer Anzahl von Ansätzen infizieren kann) pro ml angegeben.

Zur Festlegung einer Virusbelastung, die geeignet erscheint, bei der Aufnahme einer Replikationskinetik nicht nur eine Ja/Nein-Aussage bezüglich der Wirksamkeit des zu testenden therapeutischen Gens zu treffen sondern ein möglichst breites Spektrum an Abstufungen zu zeigen, wurden verschiedene MOI zur Infektion eingesetzt.

Für diese ersten Untersuchungen wurden PM1-Zelllinien verwendet, die von Prof. Dorothee von Laer (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurden und eine ältere Version des Transfervektors mit (M87D) bzw. ohne (MPI_{neo}) das therapeutische Gen STHM (membrangebundenes T20-Peptid) und einer Neomycin-Resistenz als Markergen enthalten.

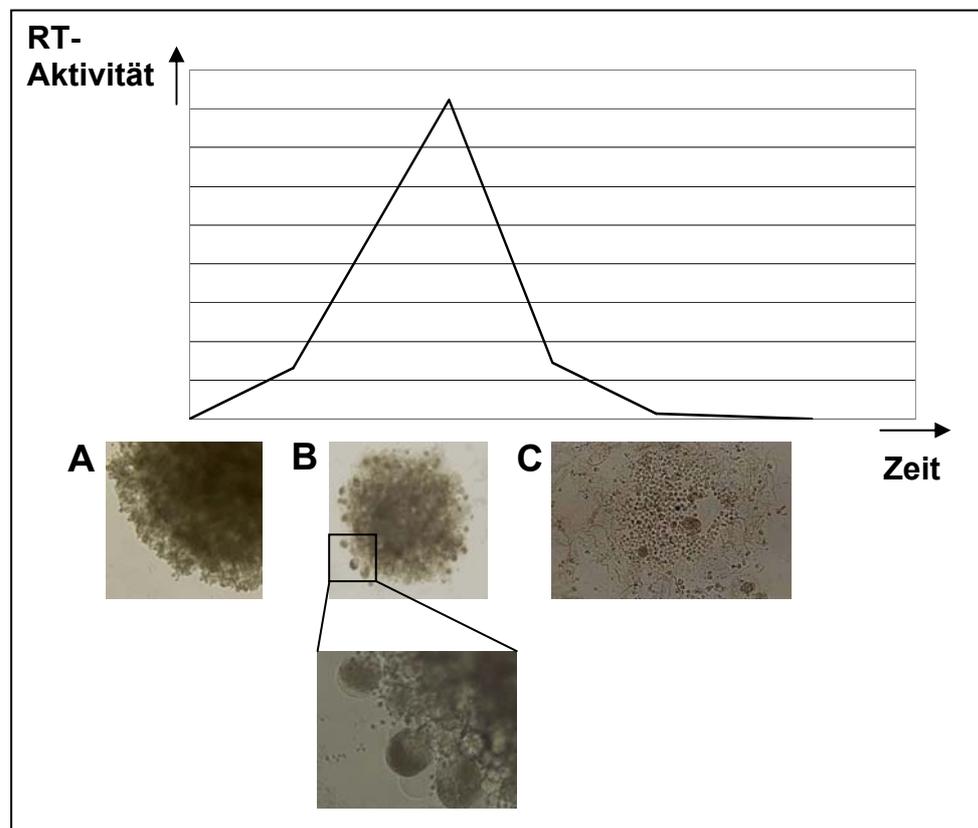


Abb. 3.6: Typischer Verlauf einer HIV-1-Infektion von PM1-Zellen.

Nach Infektion der gesunden Zellen (A) entwickeln sich im Zuge der massiven Virusvermehrung, die als Anstieg der Reversen Transkriptase-Aktivität gemessen werden kann, Synzytien (B). Infolge der zytopathischen Effekte sterben die Zellen ab, wodurch es wiederum zu einer Abnahme der Virusreplikation kommt. Nach etwa 7-14 Tagen Kulturdauer (abhängig von der eingesetzten Virusmenge) sind alle Zellen abgestorben (C).

Die Virusreplikation in den infizierten Kulturen wurde durch Bestimmung der Aktivität der Reversen Transkriptase verfolgt. Dazu wurde ein kommerziell erhältlicher RT-Test (Lenti-RT™ Activity Assay, Cavid Tech) verwendet.

In Zelllinien verursacht HIV sogenannte zytopathische Effekte („cytopathic effects“, CPE), die als Synzytienbildung erkennbar werden. Deshalb wurde die Virusreplikation zusätzlich mittels mikroskopischer Beurteilung der Zellen überwacht. In Abb. 3.6 ist der typische Verlauf einer Infektion von PM1-Zellen mit HIV-1 anhand dieser beiden Kriterien dargestellt.

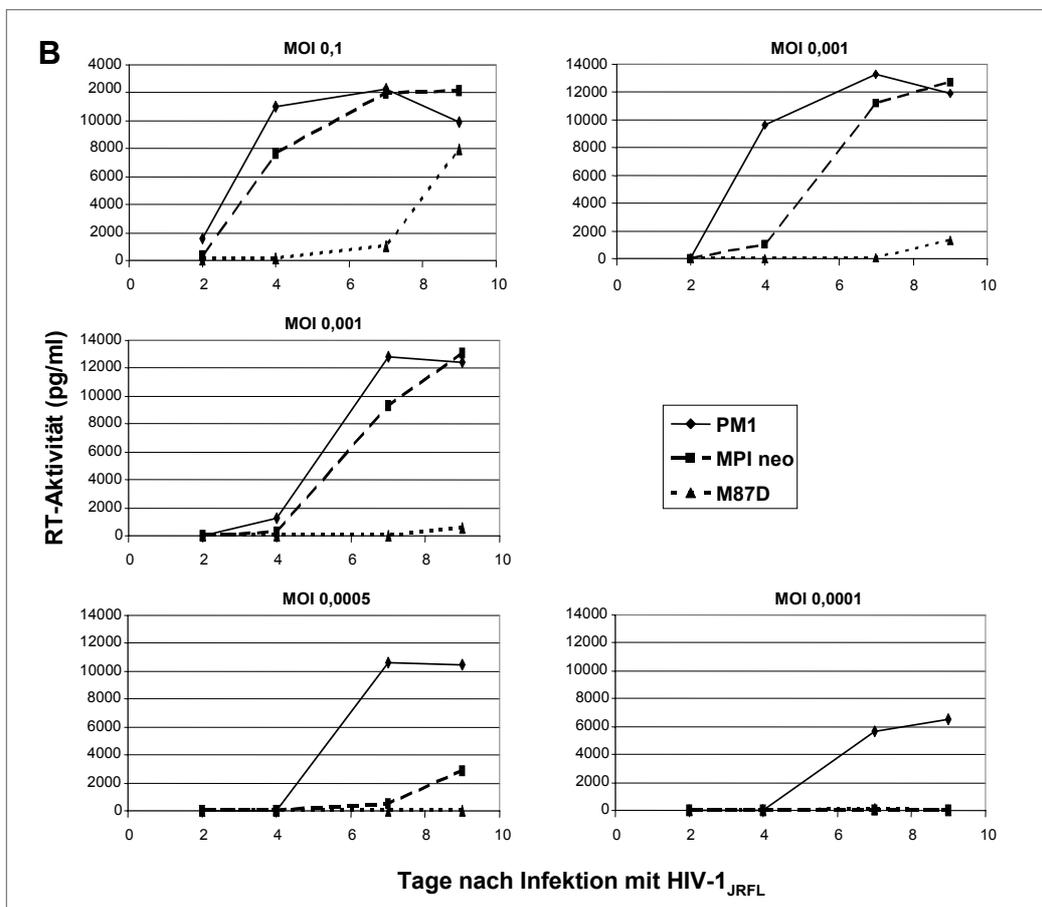
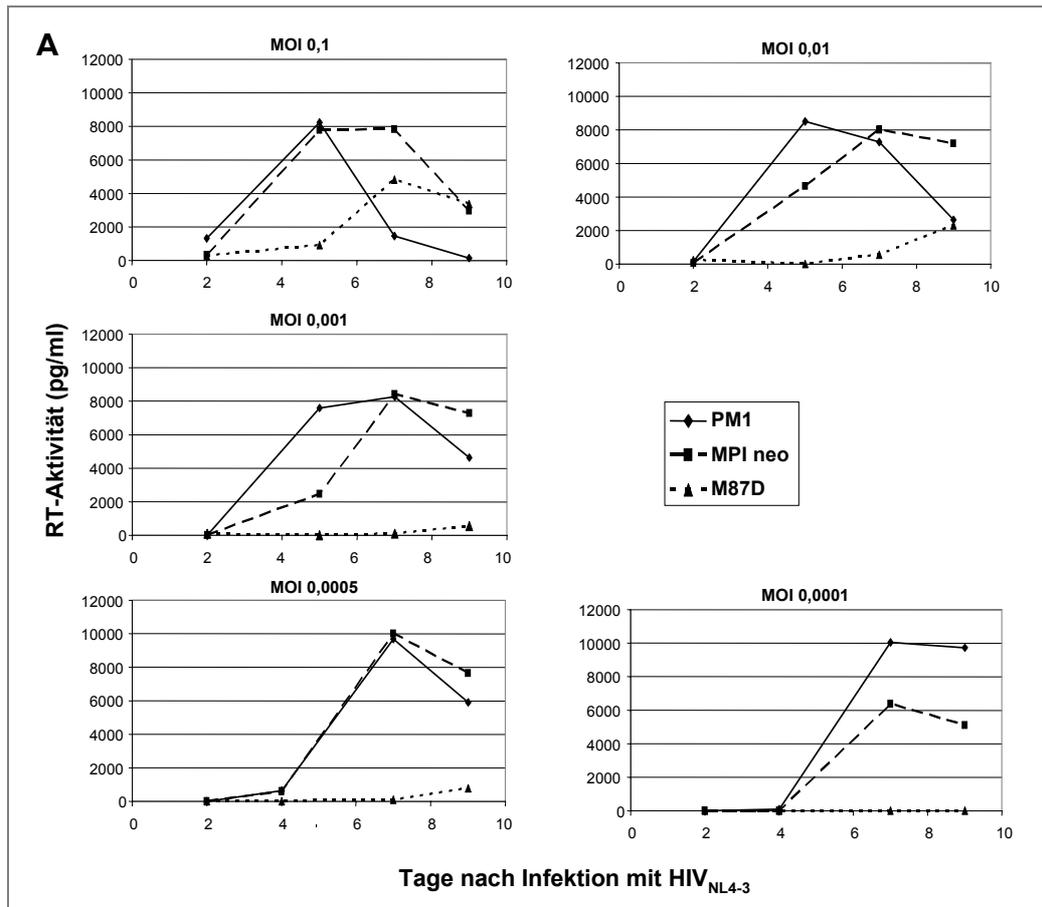
Untransduzierte und mit M87D (STHM, membrangebundenem T20) bzw. MPI_{neo} (leerer Vektor) stabil transduzierte PM1-Zellen wurden mit den drei verschiedenen HIV-1-Laborstämmen mit MOI's zwischen 0,1 und 0,0001 für HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{JRFL} bzw. 0,01 und 0,00001 für HIV-1_{D117II} infiziert. Diese Belastungsexperimente wurden in 96-Loch-Platten in Triplikaten mit jeweils 2×10^4 Zellen pro Ansatz durchgeführt. Die Replikationskinetik wurde mittels Bestimmung der RT-Aktivität über einen Zeitraum von 9 Tagen aufgenommen.

Die Positiv-Kontrolle M87D zeigte im Vergleich mit untransduzierten PM1-Zellen und der Kontrolllinie, die den leeren Vektor enthält, einen verzögerten Anstieg der Virusreplikation. Dieser Hemmeffekt wurde um so deutlicher je niedriger die eingesetzte MOI war (Abb. 3.7 A und B). MOI's unter 0,001 gewährleisteten allerdings keine zuverlässige Infektion aller Kulturen, weshalb sie für weitere Experimente nicht in Frage kamen.

Für die Belastungsexperimente mit NL4-3 und JRFL wurde daher im folgenden eine MOI von 0,001 verwendet.

Für die D117II-Virusstocks (Tab. 3.3) wurden MOI's zwischen 0,01 und 0,00001 untersucht. Ab einer MOI von 0,0001 wurden auch hier nicht alle Ansätze zuverlässig infiziert. Allerdings zeigte die Kurve für die Positiv-Kontrolle M87D bei einer MOI von 0,001 schon nach 7 Tagen einen Anstieg der RT-Aktivität (Abb. 3.7 C), weshalb für den D117II-Stamm eine MOI von 0,0005 für die weiteren Belastungsexperimente gewählt wurde.

In allen Fällen bestätigte die mikroskopische Begutachtung der Zellen die Ergebnisse der Bestimmung der RT-Aktivität.



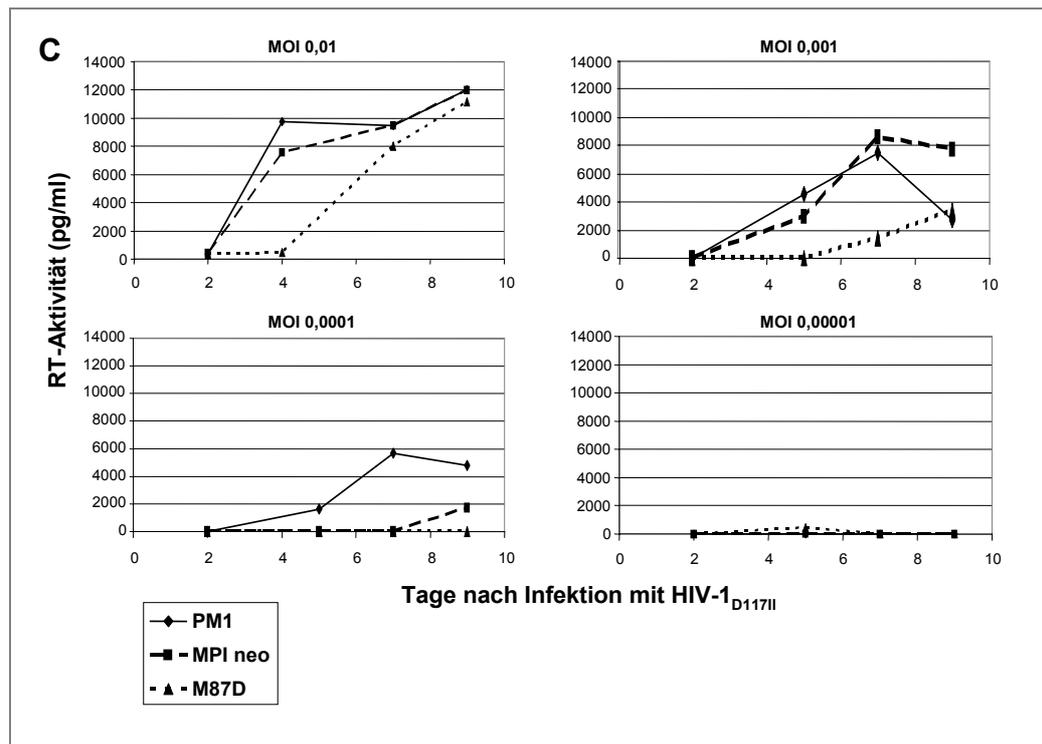


Abb. 3.7: Einfluß der MOI auf den Verlauf der RT-Aktivität im Überstand von mit HIV-1 infizierten PM1-Kulturen. Nicht-transduzierte (PM1) sowie mit einem leeren (MPI neo) bzw. STHM-übertragenden Transfervektor (M87D) transduzierte PM1-Zellen wurden mit der angegebenen MOI HIV-1_{NL4-3} (A), HIV-1_{JRFL} (B) oder HIV-1_{D117II} (C) infiziert. An den angegebenen Tagen wurden Proben des Überstandes genommen und die RT-Aktivität als Maß für die Virusreplikation bestimmt.

3.2 Klonierung potentiell HIV-inhibitorischer Gene

3.2.1 APOBEC3G_{agm}

Das DNA-Editing-Enzym APOBEC3G ist in der Lage, das Genom von Retroviren zu mutieren und so die Infektiosität von Viruspartikeln zu vermindern (Gu et al., 2003). Das vom HIV-1 kodierte Protein Vif allerdings kann das humane APOBEC3G binden und damit neutralisieren. Mit APOBEC3G aus Affen hingegen kann Vif nicht interagieren (Mariani et al., 2003), weshalb man hier einen hemmenden Effekt auf das HIV beobachten kann.

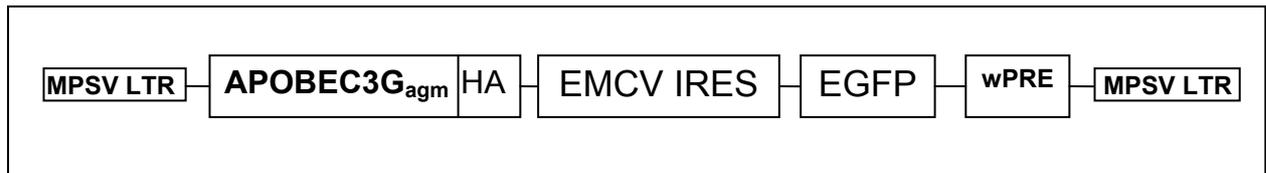


Abb. 3.8: Der APOBEC3G_{agm}-übertragende Transfervektor. In die mcs des M387-Plasmids wurde die Sequenz des APOBEC3G_{agm} mit HA-tag ligiert.

Um dieses Prinzip für eine gentherapeutische Verwendung zu testen, wurde ein mit HA-tag versehenes APOBEC3G aus Afrikanischen Grünen Meerkatzen (CM12), das von Carsten Münk (PEI) zur Verfügung gestellt wurde, in den Transfervektor M387 ligiert (Abb. 3.8). Dazu wurden mittels PCR zwei Restriktionsschnittstellen an die APOBEC3G_{agm}-HA-Sequenz angefügt, eine *NotI*-Schnittstelle am 5'-Ende und eine *EcoRI*-Schnittstelle am 3'-Ende. Dadurch konnte das Gen gerichtet in die mcs des Transfervektors inseriert werden.

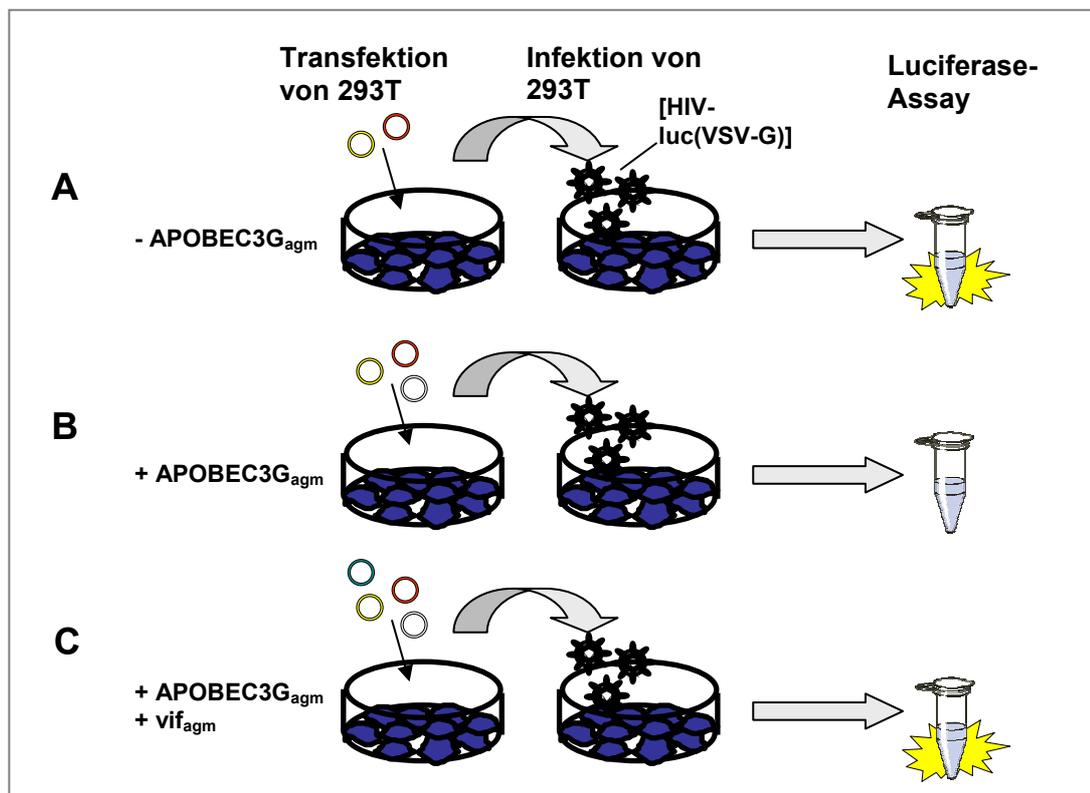


Abb. 3.9: Das Prinzip des APOBEC-Funktionstests. A: Durch Kotransfektion eines HIV- Δ env-Konstruktes, das ein Luciferase-Gen enthält, mit einem VSV-G-Expressionskonstrukt werden Vektorpartikel hergestellt ([HIV-luc(VSV-G)]), die anschließend zur Infektion von 293T-Zellen verwendet werden. Luciferase-Aktivität zeigt infektiöse Partikel an. B: Werden die Vektoren in Anwesenheit eines funktionellen APOBEC3G_{agm} hergestellt, ist die Luciferase-Aktivität reduziert, was die verminderte Infektiosität zeigt. C: Zusätzliche Kotransfektion eines vif_{agm}-Expressionskonstruktes unterdrückt den Effekt des APOBEC3G_{agm} (Mariani et al., 2003).

Drei der erhaltenen M387-APOBEC_{3G}_{agm} Klone, die ein Insert der richtigen Länge trugen, wurden ausgewählt, sequenziert und in einem „single round“-Infektionssystem auf ihre HIV-inhibitorische Wirkung getestet. In Abb. 3.9 ist das Prinzip dieses Luciferase-Testsystems dargestellt, die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 gezeigt.

Es zeigte sich, daß nur einer der drei getesteten M387-APOBEC3G_{agm}-Klone, nämlich Klon #14, in der Lage war, die Luciferase-Expression in den Zielzellen, d.h. deren Transduktion, zu verhindern. Als Positiv-Kontrolle diente das parentale APOBEC3G_{agm}-Expressionskonstrukt CM12. Die beiden anderen M387-APOBEC3G_{agm}-Klone konnten die Luciferase-Expression nicht (Klon #15) oder nur um etwa 50 % (Klon #13) im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, einem leeren Vektor (pcDNA) anstelle eines APOBEC3G_{agm}-Konstrukts, hemmen. Wurde ein Expressionskonstrukt für das Vif des SIV_{agm} kotransfiziert, konnte der Hemmeffekt des Klons #14 rückgängig gemacht werden.

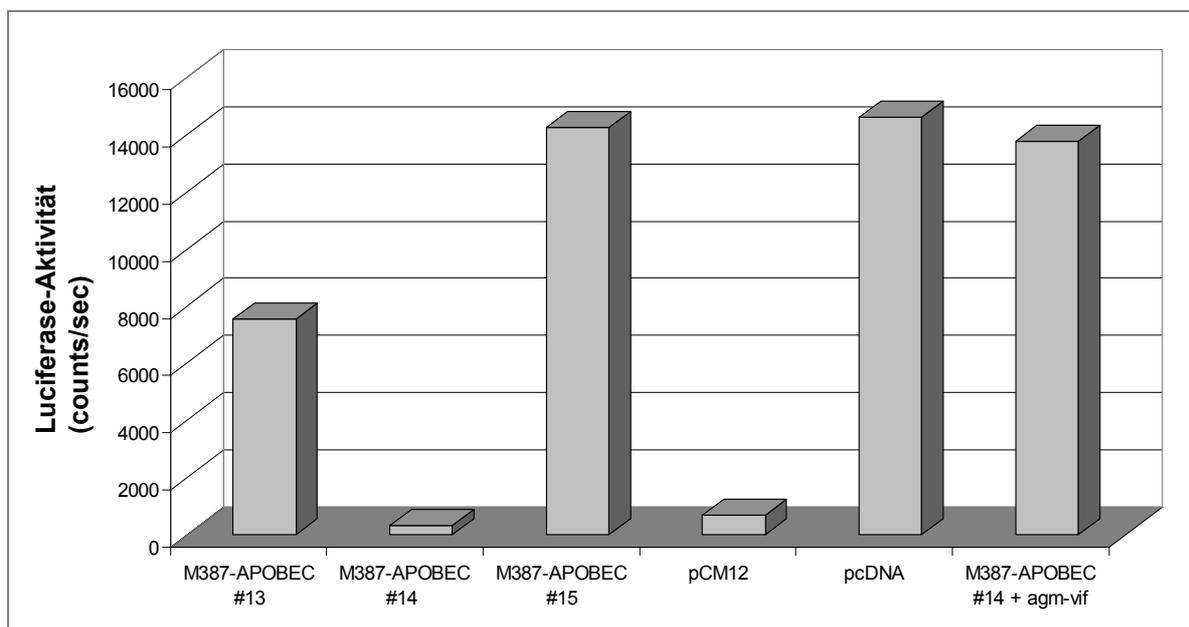


Abb. 3.10: Luciferase-Aktivität in 293T-Zielzellen. Die zur Transduktion eingesetzten [HIV-1-Luciferase(VSV-G)]-Vektoren wurden in Gegenwart einer der drei M387-APOBEC3G_{agm}-Klone bzw. des APOBEC3G_{agm} enthaltenden Ursprungskonstrukts pCM12 als Positiv- sowie des leeren pcDNA-Vektors als Negativ-Kontrolle generiert. Zusätzliche Zugabe eines Expressions-Konstruktes für das Vif des SIV_{agm} verhinderte den Hemmeffekt.

Die Ergebnisse des Luciferase-Tests erklären sich durch die Auswertung der Sequenzierungen der drei M387-APOBEC3G_{agm}-Klone. Hier konnte festgestellt werden, daß nur der Klon #14 eine korrekte APOBEC3G_{agm}-Sequenz enthält. Klon #13 und #15 tragen Punktmutationen, die im Fall von Klon #13 zu einem Aminosäure-Austausch von Prolin zu Glutamin und im Fall von Klon #15 zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen (Abb. 3.11).

Für die Generierung stabiler PM1-Zelllinien und die weitere Testung wurde folglich Klon #14 eingesetzt.

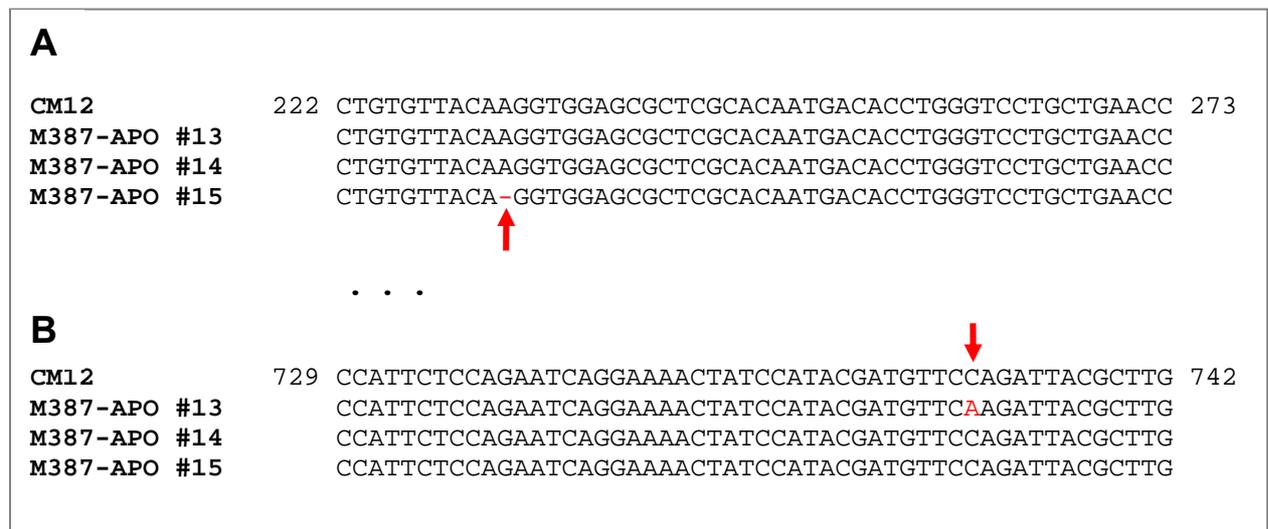


Abb. 3.11: Sequenzvergleich der drei M387-APOBEC3G_{agm}-Klone mit der parentalen CM12-Sequenz. Gezeigt sind die Bereiche, in denen sich die Punktmutationen (siehe rote Pfeile) befinden. A: Klon #15 weist eine Deletion der Base 232 auf, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserasters kommt. B: Bei Klon #13 hat ein Basenaustausch an Position 731 stattgefunden, wodurch sich das für Prolin kodierende Triplet CCA zu CAA, das für Glutamin kodiert, veränderte.

3.2.2 VIRIP (SVHM)

Das als VIRIP (Virus-Inhibitory Peptide) bezeichnete Peptid wurde in humanem Hämofiltrat gefunden und stellt die Aminosäuren 377-396 des Alpha-1-Antitrypsins (Accession No. P01009), eines natürlich vorkommenden Hemmers von körpereigenen Proteinasen wie Elastase, dar. Zugabe von VIRIP ins Zellkulturmedium bewirkt eine Hemmung der HIV-Replikation in Zelllinien und primären Zellen, indem es die Fusion der Virus- mit der Zellmembran verhindert (Münch et al, 2002). Die Aminosäure-Sequenz des Peptids wurde von Prof. Dr. Frank Kirchhoff (Abteilung Virologie, Universitätsklinikum, Ulm) zur Verfügung gestellt.

Da das Fusion-inhibierende Peptid T20 als membrangebundene Form (STHM) Zellen wirksam vor dem Eintritt des HIV schützt, lag die Überlegung nahe, VIRIP für den gentherapeutischen Ansatz ebenfalls auf der Zellmembran zu exprimieren. Dazu wurde in dem M387-STHM-Konstrukt die T20 kodierende Sequenz gegen die VIRIP kodierende mittels Fusions-PCR ausgetauscht (Abb. 3.12). Die Nukleotid-Sequenz für VIRIP wurde der Sequenz des Alpha-1-Antitrypsins (Accession No. K01396) entnommen und umfaßt die Basen 1148 bis 1207.

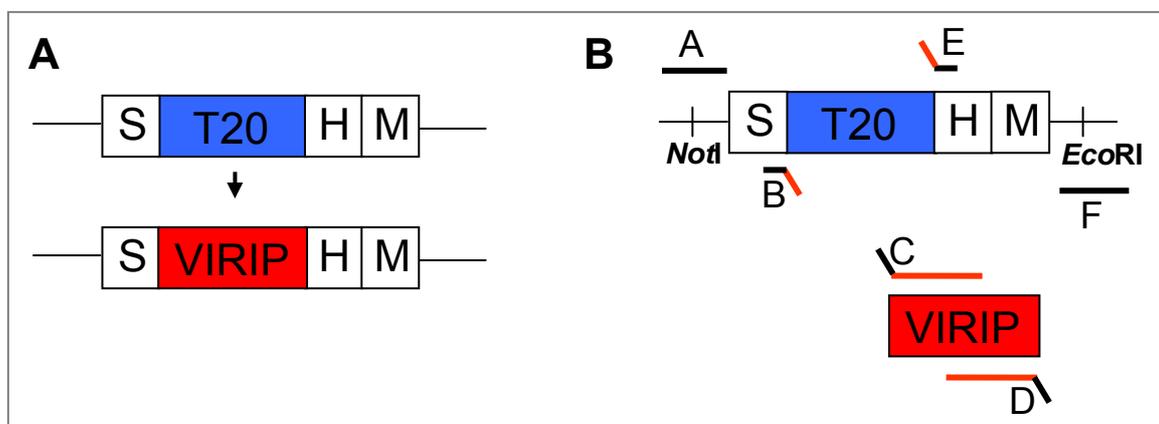


Abb. 3.12: Klonierungsstrategie für das SVHM-Konstrukt. A: Im STHM-Konstrukt befindet sich die T20 kodierende Sequenz hinter der eines Signalpeptids (S), daran schließt sich eine Hinge-Region (H) und eine Membran-Domäne (M) an. Die T20 kodierende Sequenz sollte gegen die VIRIP kodierende ausgetauscht werden. B: Strategie der Fusions-PCR zum Austausch der Sequenzen. Mit den Primern A und B bzw. E und F wurden die T20 flankierenden Bereiche, die jeweils eine zur Klonierung geeignete Restriktionsschnittstelle 5' (*NotI*) bzw. 3' (*EcoRI*) vom therapeutischen Gen besaßen, mit einem direkten Übergang in die VIRIP-Sequenz (in rot dargestellte Anteile der Primer) versehen. Mit den überlappenden Primern C und D wurde die VIRIP-Sequenz synthetisiert und gleichzeitig die Übergänge zu den Bereichen S und H angehängt. In einer abschließenden PCR-Reaktion mit den Primern A und F und allen vorher synthetisierten Fragmenten als Template wurde das vollständige SVHM generiert. Mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen wurde SVHM in den Vektor M387 ligiert.

Nach erfolgreicher Fusions-PCR und anschließender Rückklonierung wurden mehrere Klone des M387-SVHM durch Sequenzierung überprüft. Der Klon #11 wurde ausgewählt und zum Herstellen einer stabilen PM1-Zelllinie verwendet.

3.3 Evaluierung verschiedener HIV-inhibierender Gene

Nachdem das Zellkultursystem zur Evaluierung der Wirksamkeit von antiviralen Genen für die Gentherapie der HIV-Infektion zur Verfügung stand, konnte es im folgenden auf verschiedene therapeutische Gene angewendet werden. Außer den beiden oben beschriebenen Genen APOBEC3G_{agm} und SVHM (membrangebundenes VIRIP) wurden verschiedene potentiell inhibitorische Gene von drei Arbeitsgruppen aus Heidelberg und Regensburg getestet. Die Kooperation mit diesen Gruppen fand innerhalb eines HIV-Netzwerks statt, dessen Ziel die Entwicklung neuer HIV-inhibitorischer Gene war. Das in der vorliegenden Arbeit entwickelte Zellkultursystem diente zur Referenztestung dieser Gene. Die Konstrukte wurden bereits im M387-Transfervektor inseriert zur Testung übergeben.

Zur Testung zur Verfügung gestellt wurden von PD Dr. Barbara Müller (Hygiene-Institut, Abteilung Virologie, Universität Heidelberg) zwei p6-late-domain-Konstrukte, von PD Dr. Matthias Dittmar (Hygiene-Institut, Abteilung Virologie, Universität Heidelberg) zwei Konstrukte mit Fragmenten des c-tail von gp41 und von PD Dr. Ralf Wagner (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Regensburg) drei transdominant-negative Gag-Konstrukte. Die Produkte der Gene sowie die putativen Wirkmechanismen sind in Tab. 3.4 zusammengefaßt.

Gen	Produkt	Mechanismus	Angriffspunkt
RevM10	transdominant-negatives HIV-1 Rev-Protein	bindet an das virale Rev und hält es im Kern zurück	Genexpression, nach der Integration
STHM	membrangebundenes T20-Peptid	verhindert Fusion des Virus mit der Zellmembran	Fusion, vor dem Viruseintritt
APOBEC3G_{agm}	APOBEC3G-Protein der Afrikanischen Grünen Meerkatze, mit HA-tag	mutiert das Virus-Genom während der reversen Transkription	Bildung infektiöser Partikel, nach der Integration
SVHM	membrangebundenes VIRIP	verhindert Fusion des Virus mit der Zellmembran	Fusion, vor dem Viruseintritt
L4	komplettes p6-Protein, mit myc-tag	dient als Köder für die zellulären Bindungspartner der L-Domäne	Partikelabschnürung und -reifung, nach der Integration
L6	je zwei L-Domänen aus HIV-1 p6 und Ebola-Virus, abwechselnd angeordnet, mit myc-tag		
9/1	gp41 c-tail-Fragment, mit myc-tag	verhindert den Transport des Virus-Kapsids bzw. des Prä-Integrations-Komplexes innerhalb der Zelle	Transport-mechanismen, vor der Integration
9/2	gp41 c-tail-Fragment, mit eingefügten Palmitylierungsstellen und myc-tag		
TDwtΔ2	transdominant-negatives HIV-1 Gag-Fragment, wildtyp, HIV-1 Rev-abhängig	interferiert mit der Assemblierung und der Reifung der Virionen	Virus-Assemblierung und -Reifung, nach der Integration
TDsgΔ2	transdominant-negatives HIV-1 Gag-Fragment, humanisiert		
L2GAL2-V3	minimales HIV-1 Gag-Fragment, mit V3-tag		

Tab. 3.4: Die getesteten HIV-inhibitorischen Gene und ihr Angriffspunkt innerhalb des HIV-1-Replikationszyklus. Bei allen getesteten Genprodukten handelt es sich um Proteine bzw. Peptide, die an verschiedenen Stellen des viralen Replikationszyklus ansetzen.

3.3.1 Herstellung der stabilen Linien

Zunächst wurden [MLV(GaLV)]-Vektorüberstände mit den jeweiligen Transfervektoren hergestellt und mit einer MOI von 1 zur Transduktion von PM1-Zellen eingesetzt. Danach wurden die EGFP-exprimierenden Zellen 1-2 mal sortiert. Die Zelllinien wurden vor und nach der Sortierung im FACS untersucht, um die Anreicherung der Marker-positiven Zellen zu überprüfen und darzustellen. Abb. 3.13 zeigt diese Anreicherung für die verschiedenen Zelllinien.

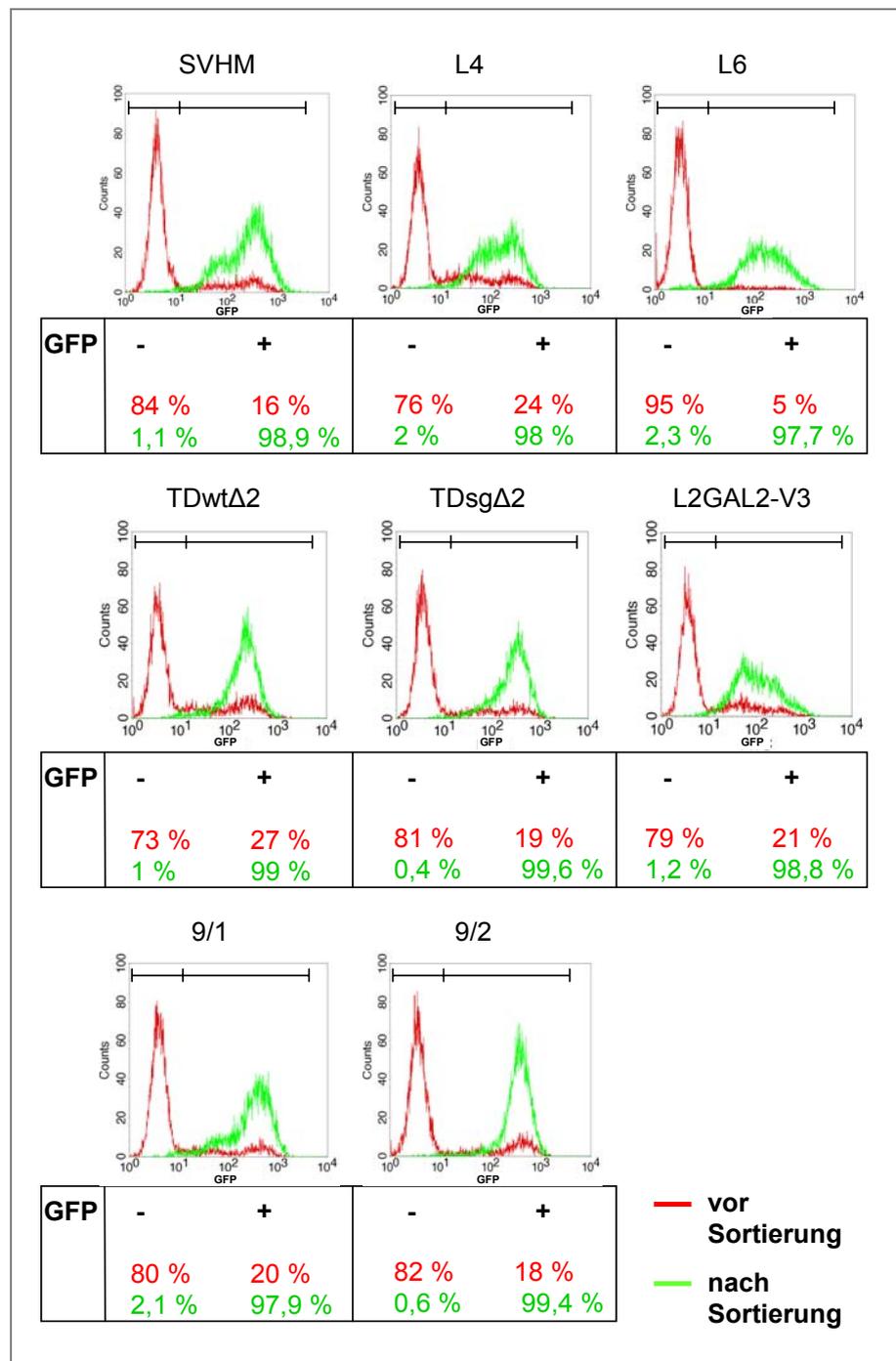


Abb. 3.13: Anreicherung EGFP-positiver Zellen. PM1-Zellen wurden mit [MLV(GaLV)]-Vektoren, die den jeweiligen Transfervektor (Tab. 3.4) übertrugen, transduziert. Die Zellen wurden direkt nach der Transduktion (rot) sowie nach 1-2 Sortierungen (grün) auf EGFP-Expression untersucht. Die jeweiligen Anteile EGFP-negativer und -positiver Zellen in Prozent sind in der Tabelle aufgeführt. Die als negativ bzw. positiv gewerteten Bereiche sind durch einen unterteilten Balken angedeutet.

Für die APOBEC3G_{agm}-Linie sind die Ergebnisse von zwei aufeinanderfolgenden Sortierungen gezeigt (Abb. 3.14).

Bei der zweiten Sortierung wurden die hoch- und niedrigexprimierenden Zellpopulationen getrennt sortiert. Die hochexprimierenden Zellen wurden für die Belastungsexperimente verwendet.

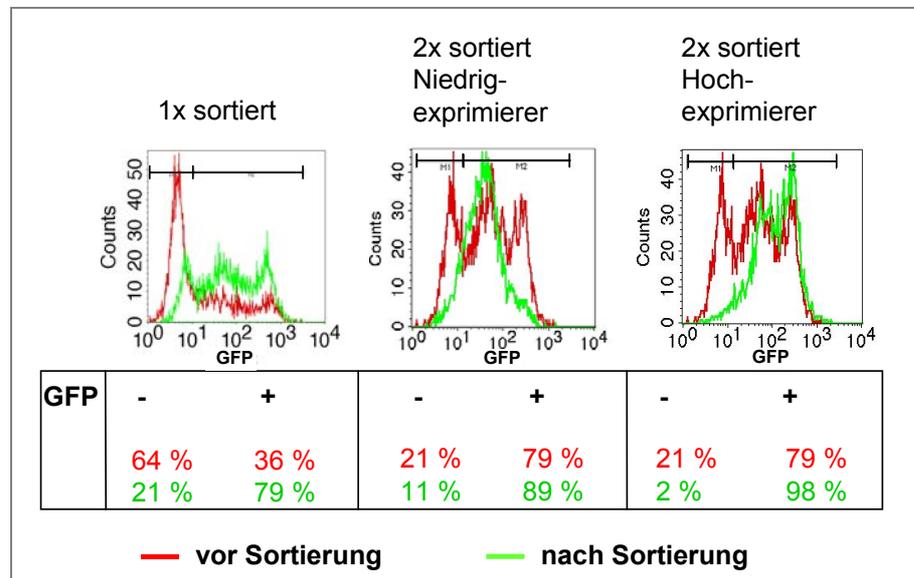


Abb. 3.14: EGFP-Anreicherung nach einer bzw. zwei Sortierungen der APOBEC3G_{agm}-Zellen. In rot sind die Anteile EGFP-positiver Zellen vor der jeweiligen Sortierung, in grün danach angegeben. Bei der zweiten Sortierung wurden die niedrig- und hochexprimierenden Populationen voneinander getrennt. Die jeweiligen Anteile EGFP-negativer und -positiver Zellen in Prozent sind in der Tabelle aufgeführt. Die als negativ bzw. positiv gewerteten Bereiche sind durch einen unterteilten Balken angedeutet.

In Tab. 3.5 ist die erreichte EGFP-Anreicherung durch FACS-Sortierung für alle PM1-Zelllinien in % positive Zellen zusammengefaßt. Alle hergestellten Zelllinien konnten auf mindestens 97% EGFP-positive Zellen gesortet werden und erreichten somit das gesetzte Limit von über 95%

Transfervektor	Titer / ml	Anteil EGFP-positiver Zellen		
		direkt nach Transduktion	nach 1.Sortierung	nach 2.Sortierung
APOBEC3G_{agm}	2,9 x 10 ⁵	36 %	79 %	98 % / 89 %
SVHM	3,2 x 10 ⁵	16 %	98,9 %	
L4	4,6 x 10 ⁴	24 %	98 %	
L6	4,6 x 10 ⁴	5 %	69 %	97,7 %
9/1	3,3 x 10 ⁵	20 %	97,9 %	
9/2	1,3 x 10 ⁵	18 %	82 %	99,4 %
TDwtΔ2	3,3 x 10 ⁴	27 %	75 %	99 %
TDsgΔ2	3,0 x 10 ⁴	19 %	79 %	99,6 %
L2GAL2-V3	9,8 x 10 ⁴	21 %	75 %	98,8 %

Tab. 3.5: **Überblick über die Herstellung der verschiedenen stabilen Linien.** Für jeden Transfervektor ist der Titer der Vektorpräparation und der Anteil EGFP-positiver Zellen direkt nach der Transduktion sowie nach 1-2 Sortierungen angegeben. Fett gedruckt sind die Anteile an EGFP-positiven Zellen in den PM1-Zelllinien, die in den Belastungsexperimenten verwendet wurden. Für APOBEC3G_{agm} ist daneben auch der Wert für die EGFP-niedrigexprimierende Zelllinie angegeben.

3.3.2 Analyse der stabilen Zelllinien

3.3.2.1 Proliferation der Zellen

Da die Virusreplikation wesentlich von den Zellen abhängt, in denen sie stattfindet, muß in einem Vergleichssystem sichergestellt sein, daß alle stabilen PM1-Linien in vergleichbarem Maße proliferieren. Dazu wurde mit uninfizierten Zellen für alle Linien eine Wachstumskurve erstellt. Der verwendete Test zeigt metabolische Aktivität anhand einer Substratumsetzung, von der auf die relative Zellzahl geschlossen werden kann. Keine der hergestellten Zelllinien zeigte einen deutlich von den Kontrollen abweichenden Kurvenverlauf (Abb. 3.15). Die Expression des eingebrachten therapeutischen Gens hatte also in keinem Fall einen nennenswerten Einfluß auf die Proliferationsfähigkeit der hergestellten Zelllinien. Ein direkter zytotoxischer Effekt eines der Genprodukte kann also ausgeschlossen werden. Somit bestehen auch in dieser Hinsicht keine Bedenken gegen die Vergleichbarkeit der hergestellten PM1-Zelllinien.

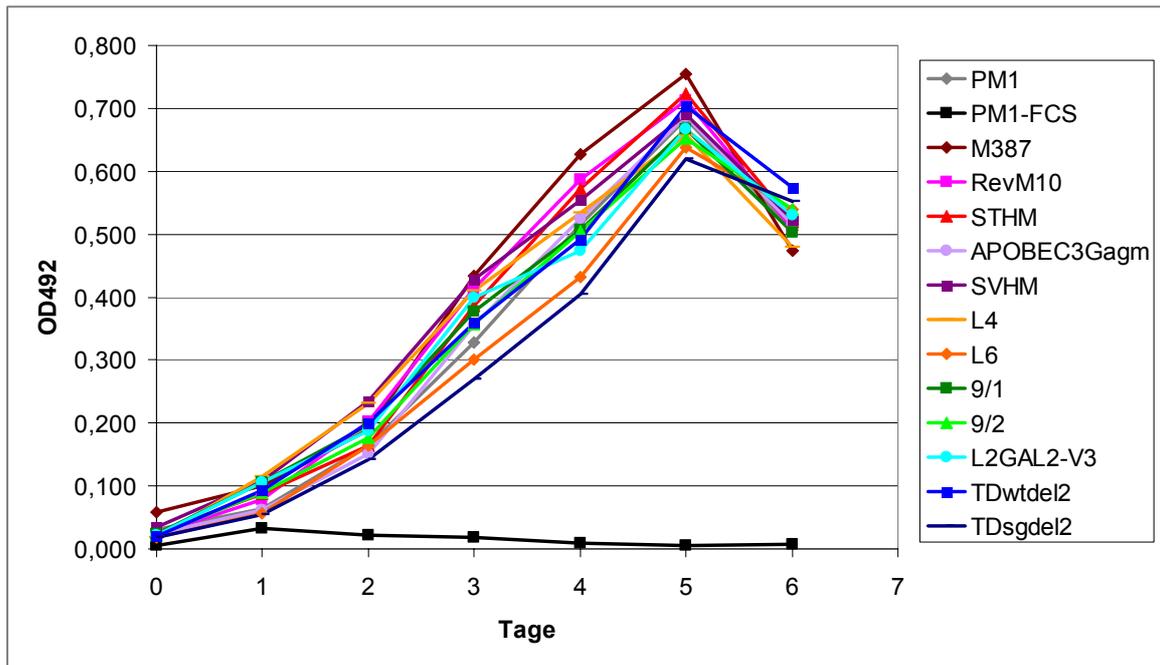


Abb. 3.15: Proliferative Aktivität der hergestellten PM1-Zelllinien. Die an Tag 0 ausgesäten Zellen wurden nach täglich in einen MTS-Assay untersucht, der mittels Substratumsatz die Stoffwechselaktivität mißt. Anhand der gemessenen OD₄₉₂ läßt sich auf die Proliferationsaktivität schließen. Als Positiv-Kontrolle dienen untransduzierte PM1-Zellen. Die Negativ-Kontrolle (PM1-FCS) sind PM1-Zellen, die in Medium ohne FCS gehalten wurden. Jeder Meßpunkt wurde als Triplikat aufgenommen. Gezeigt ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Auf die Angabe der in allen Fällen geringen Standardabweichungen wurde in dieser Darstellung aufgrund der weitgehend ähnlichen Werte zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

3.3.2.2 Expression der HIV-Rezeptoren

Um zu zeigen, daß eventuelle Unterschiede der Zelllinien in den HIV-Belastungsexperimenten nicht auf Unterschiede in der Expression bzw. Lokalisation der HIV-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurde diese untersucht. Das geschah durch Anfärben von CD4, CXCR4 und CCR5 mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper und anschließender FACS-Analyse. Da intakte Zellen angefärbt wurden, zeigte diese Untersuchung den Anteil der Zellen, die die Rezeptoren auf der Oberfläche tragen, wo diese für das HIV erreichbar sind. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.6 dargestellt. In allen Fällen zeigten über 90% der Zellen eine CD4-Expression. Die Korezeptoren waren nur auf einem Teil der Zellen nachweisbar, im Fall von CCR5 sogar nur auf 0,3 – 1,6 %. Das dürfte zum Teil darauf zurückzuführen sein, daß die Korezeptoren während der Färbung relativ schnell internalisiert werden,

wobei schon gebundener Antikörper mit ins Zellinnere gelangt, wo er nicht mehr detektierbar ist. Der Anteil der CXCR4-exprimierenden Zellen schwankt in den verschiedenen Zelllinien relativ stark. Er reicht von etwa 25 - 60 %, wobei hier die TDwt Δ 2-Linie mit knapp 17% etwas aus dem Rahmen fällt. In den später dargestellten HIV-Belastungsexperimenten (Abb. 3.17 und 3.18) wurde deutlich, daß auch dieser Prozentsatz für eine normale Infizierbarkeit ausreicht. In keinem Fall konnte eine Korrelation von niedriger Korezeptorexpression und Hemmwirkung beobachtet werden.

Rezeptoren Zelllinien	CD4	CXCR4	CCR5
PM1	98,5	36,7	0,3
M387	95,1	24,8	0,7
RevM10	95,6	38,5	1,3
STHM	91,2	36,2	1,2
APOBEC3G _{agm}	92,6	53,5	0,7
SVHM	95,5	28,4	1,0
L4	99,5	54,4	0,3
L6	99,3	34,5	0,4
9/1	99,5	45,3	1,6
9/2	99,3	39,3	1,1
TDwt Δ 2	99,5	16,9	0,3
TDsg Δ 2	99,2	34,1	0,7
L2GAL2-V3	99,2	61,6	0,6

Tab. 3.6: **Expression von CD4 und den HIV-Korezeptoren CCR5 und CXCR4 auf den stabilen PM1-Zelllinien.** Die Zellen wurden in Einzelfärbungen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die Rezeptoren markiert und anschließend mittels FACS analysiert. Der Anteil der markierten Zellen ist in Prozent angegeben. Die Anfärbung der Korezeptoren, besonders von CCR5, ist erschwert durch die relativ schnelle Internalisierung während der Färbung.

3.3.2.3 Expression des therapeutischen Gens

Um eine Aussage über die Wirkung eines therapeutischen Gens treffen zu können, ist der Nachweis seiner Expression in der stabilen Zelllinie unerlässlich. Für die getesteten Gene konnte dieser Nachweis über Western Blot-Analyse von Zelllysaten geschehen. Als Kontrollen wurden Lysate von transfizierten 293T-Zellen eingesetzt. Die Expression von SVHM konnte nicht überprüft werden, da ein spezifischer Antikörper nicht erhältlich war.

Die Expression des APOBEC3G_{agm} wurde mit Hilfe des angefügten HA-tags nachgewiesen (Abb. 3.16 A). Die Bande läuft bei etwa 42 kDa, sowohl in 293T-Zellen, die mit dem Ursprungskonstrukt CM12 (Carsten Münk, PEI) als auch in solchen, die mit dem auf M387 basierenden Konstrukt transfiziert waren. In den PM1-Zelllinien findet sich die entsprechende Bande sowohl in den einmal sortierten als auch noch stärker in den hochexprimierenden zweimal sortierten Zellen. In der niedrigexprimierenden Zelllinie konnte keine Expression gezeigt werden.

Die Late-Domain-Konstrukte L4 und L6 konnten mit einem gegen den myc-tag gerichteten Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.16 B). Wiederum zeigten sich in den als Kontrolle transfizierten 293T-Zellen erwartungsgemäß stärkere Signale als in den sortierten PM1-Zelllinien.

Der Nachweis der Genprodukte der transdominant-negativen Gag-Konstrukte, entweder mit einem spezifischen Antikörper gegen ein Kapsid-Epitop (TDwt Δ 2 und TDsg Δ 2, Abb. 3.16 C) oder im Falle von L2GAL2-V3 mit einem Antikörper gegen den V3-tag (Abb. 3.16 D), gelang nur für TDsg Δ 2 und L2GAL2-V3. Die Bande für TDwt Δ 2, die in den transfizierten 293T-Zellen vorhanden war, konnte in der stabilen PM1-Zelllinie nicht wiedergefunden werden (Abb. 3.16 C). Das war zu erwarten, da die Expression dieses Konstrukts Rev-abhängig ist.

Da die transdominant-negativen gp41-Konstrukte mit einem myc-tag versehen sind, konnte ihre Expression in den stabilen PM1-Zelllinien mit dem entsprechenden Antikörper gezeigt werden (Abb. 3.16 E).

Insgesamt konnte in allen stabilen Linien mit Ausnahme der VIRIP- und der TDwt Δ 2-Linie die Expression des jeweiligen therapeutischen Gens nachgewiesen werden.

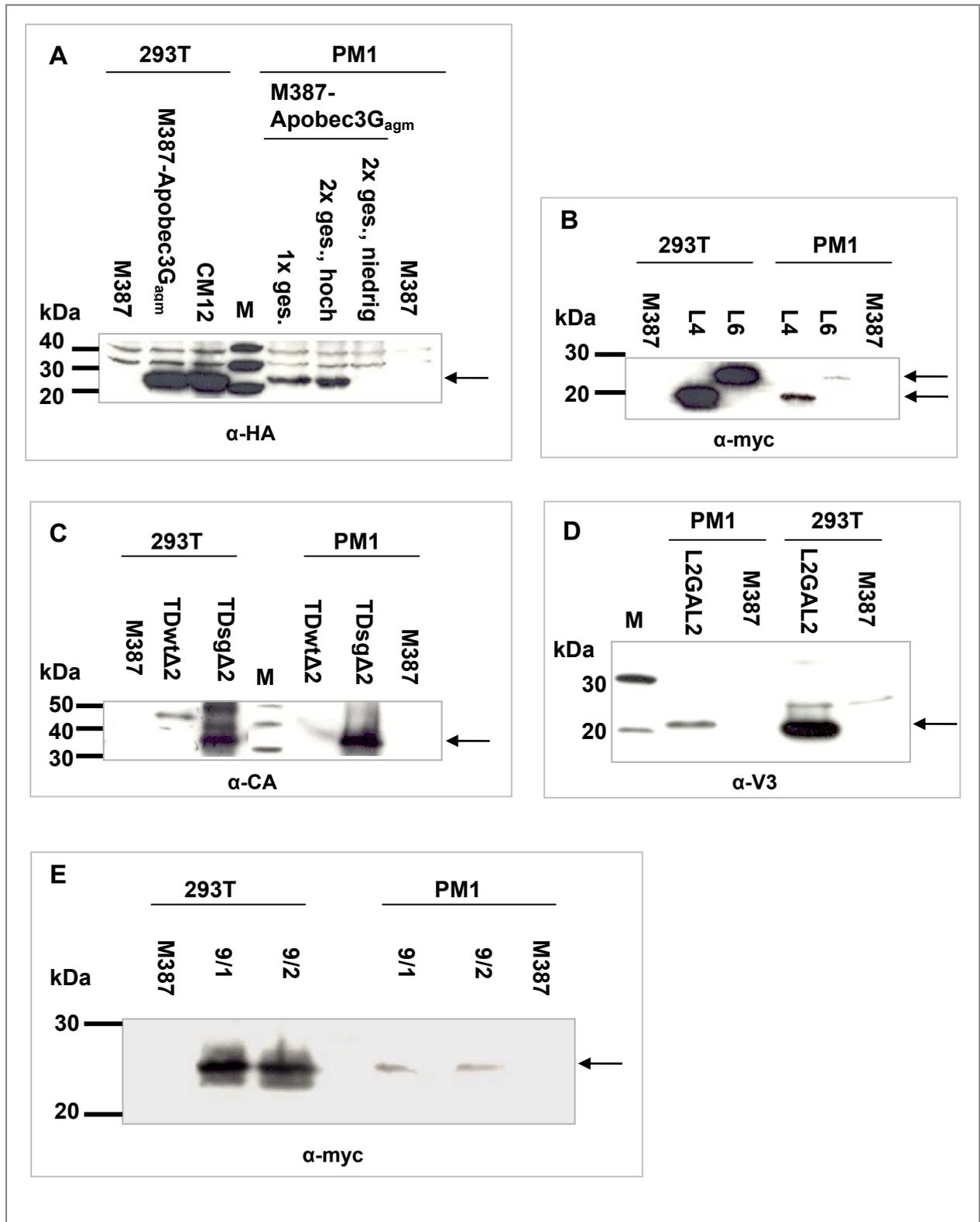


Abb. 3.16: Nachweis der Expression der therapeutischen Gene. Lysate der stabilen Zelllinien bzw. transfizierter 293T-Zellen wurden in Western Blots mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die spezifischen Banden sind mit Pfeilen markiert. M387: Vektor ohne therapeutisches Gen; CM12: APOBEC3G_{agm}-Ursprungskonstrukt; 2x ges., niedrig: EGFP-niedrig-exprimierende Zelllinie nach der 2. Sortierung; 2x ges., hoch: EGFP-hoch-exprimierende Zelllinie nach der 2. Sortierung; M: Molekulargewichtsmarker; α-HA, α-myc und α-V3: Antikörper gegen die entsprechenden Tags; α-CA: Antikörper gegen HIV-1 Kapsid

3.3.3 Hemmwirkung der HIV-inhibitorischen Gene

Zur Aufnahme der Replikationskinetiken wurden die verschiedenen stabilen PM1-Zelllinien parallel aufgetaut und kultiviert, bevor sie mit den drei HIV-1-Stämmen (siehe Tab. 3.3) in Triplikaten infiziert wurden. Dazu wurden 2×10^4 Zellen pro Ansatz in 96-Loch-Platten ausgesät. Die Infektion wurde mit der zuvor festgelegten MOI von 0,001 für HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{JRFL} bzw. 0,0005 für HIV-1_{D117II} durchgeführt. Alle 2-3 Tage erfolgte eine mikroskopische Begutachtung sowie die Ernte von Zellkulturüberstand zur Analyse der RT-Aktivität als Marker für die Virusreplikation. Das Experiment wurde zweimal mit der gesamten Anzahl der Zelllinien durchgeführt, wobei die Relationen zwischen den Replikationskinetiken innerhalb eines Versuchsansatzes weitgehend identisch waren. Allerdings gab es im Vergleich der beiden Experimente Variationen sowohl in der absoluten Höhe der maximalen RT-Aktivität als auch beim Zeitpunkt, zu dem dieses Maximum erreicht wurde. Deshalb wurden die beiden unabhängigen Experimente getrennt ausgewertet und keine Mittelwerte gebildet. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die Ergebnisse zudem getrennt dargestellt für APOBEC3G_{agm} und SVHM (Abb. 3.17) und die Netzwerkgene (Abb. 3.18), jeweils im Vergleich mit den Kontrollen.

Zur Beurteilung der Ergebnisse ist nicht nur die maximale Höhe der RT-Aktivität und eine Verschiebung der Kurve von Interesse sondern auch der Kurvenverlauf. Im Falle einer unvollständigen Hemmung ergibt sich u.U. eine abgeflachte Kurve, die dafür über mehrere Tage auf einen konstanten Niveau verbleibt. Im Gegensatz zu ungeschützten Zellen, die relativ schnell infiziert werden und absterben, was zu einem steilen Anstieg gefolgt von einem ebenso steilen Abfall der RT-Aktivität führt, sind in einer Kultur mit unvollständiger Hemmung über längere Zeit lebende Zellen vorhanden, die zumindest ein gewisses Maß an Virusreplikation gewährleisten können.

Aufgrund der beobachteten Infektionsverläufe in den unterschiedlichen Zelllinien wurde die Wirkung der inhibitorischen Gene in 5 Kategorien (kein Schutz - schwache, mittlere und starke Hemmung - vollständiger Schutz) eingeteilt.

In der Negativ-Kontrolle (M387, Vektor ohne therapeutisches Gen) ergab sich für alle drei verwendeten HIV-1-Stämme eine Replikationskinetik, die einen typischen Infektionsverlauf für ungeschützte Zellen (vgl. Abb. 3.6) widerspiegelt. Dabei wurde

zwischen Tag 5 und 7 nach Infektion die maximale RT-Aktivität festgestellt. Ein derartiger Kurvenverlauf bedeutet also: „kein Schutz vor HIV-Infektion“.

Die STHM-Zelllinien stellte die Positiv-Kontrolle dar. Im beobachteten Zeitraum wurde praktisch keine Replikation der verwendeten Virusstämme festgestellt. Dies wurde als „vollständiger Schutz“ bezeichnet.

Die RevM10-exprimierenden Zellen zeigten eine um mehrere Tage verzögerte Replikationskurve, wobei die maximale RT-Aktivität nicht nur später erreicht wurde sondern auch in verminderter Höhe auftrat. Dieser Kurvenverlauf stellt eine „mittlere Hemmung“ dar.

Es fällt auf, daß der dualtrope Stamm HIV-1_{D117II} stärker gehemmt wurde als die beiden anderen.

In der APOBEC3G_{agm}-Zelllinie wurden die verschiedenen HIV-1-Laborstämme in unterschiedlichem Ausmaß inhibiert. Für HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{D117II} konnte eine komplette Hemmung wie bei der STHM-Linie beobachtet werden. Für HIV-1_{JRFL} allerdings ergab sich eine verzögerte und abgeflachte Replikationskurve. Diese Ergebnisse lassen sich als „starke Hemmung“ zusammenfassen.

Bei Betrachtung der RT-Aktivitäten in den mit den Netzwerk-Genen hergestellten Zelllinien ist nur bei der TDsgΔ2-Linie eine signifikante Inhibition erkennbar. Während HIV-1_{NL4-3} in dieser Linie etwa im gleichen Maß gehemmt wird wie durch RevM10, konnte bei HIV-1_{JRFL} eine klar inhibierende Wirkung nur in einem der beiden Experimente festgestellt werden. Bei Verwendung von HIV-1_{D117II} ergab sich keine Verzögerung der Virusreplikation, aber eine leichte Verminderung der maximalen RT-Aktivität. Nach Erreichen des Maximums fiel die Kurve nicht, wie es als Folge des raschen Absterbens der Kultur in nicht geschützten Zellen zu beobachten ist, direkt wieder ab. Für die TDsgΔ2-Linie kann zusammenfassend eine „schwache Hemmung“ festgestellt werden.

In allen anderen Netzwerk-Linien (L4, L6, 9/1, 9/2, L2GAL2-V3 und TDwt Δ 2) sowie in der SVHM-Linie konnten trotz geringer Variationen in den Replikationskinetiken keine signifikanten Hemmeffekte festgestellt werden. Diese Zelllinien müssen als „nicht geschützt“ betrachtet werden.

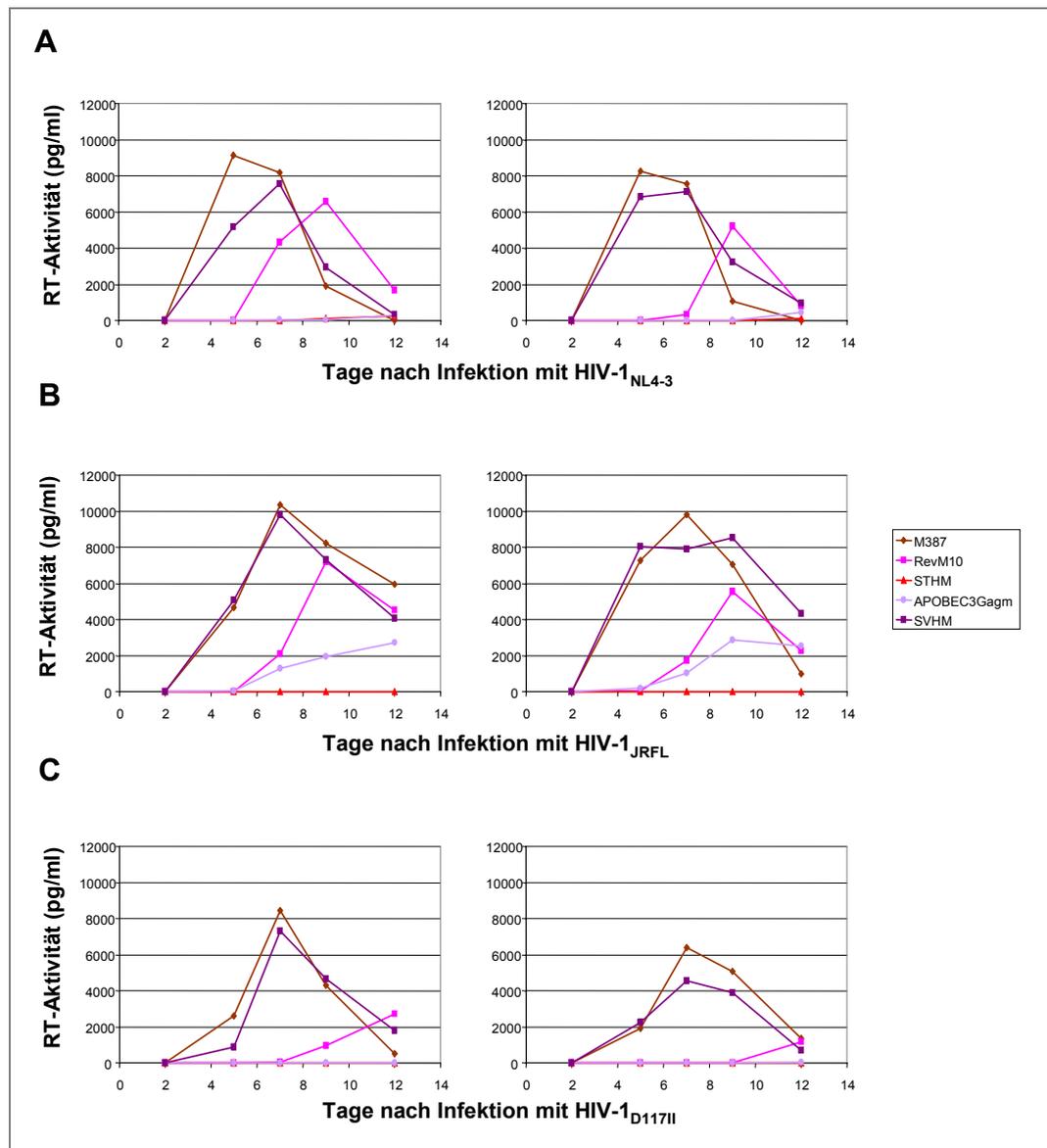


Abb. 3.17: Replikationskinetik in den APOBEC3G_{agm}- und SVHM-Zelllinien nach Infektion mit den drei verschiedenen HIV-1-Laborstämmen. Die PM1-Zelllinien wurden mit einer MOI von 0,001 (HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{JRFL}) bzw. 0,0005 (HIV-1_{D117II}) infiziert. Alle 2-3 Tage wurden Proben des Überstandes zur Bestimmung der RT-Aktivität genommen. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente.

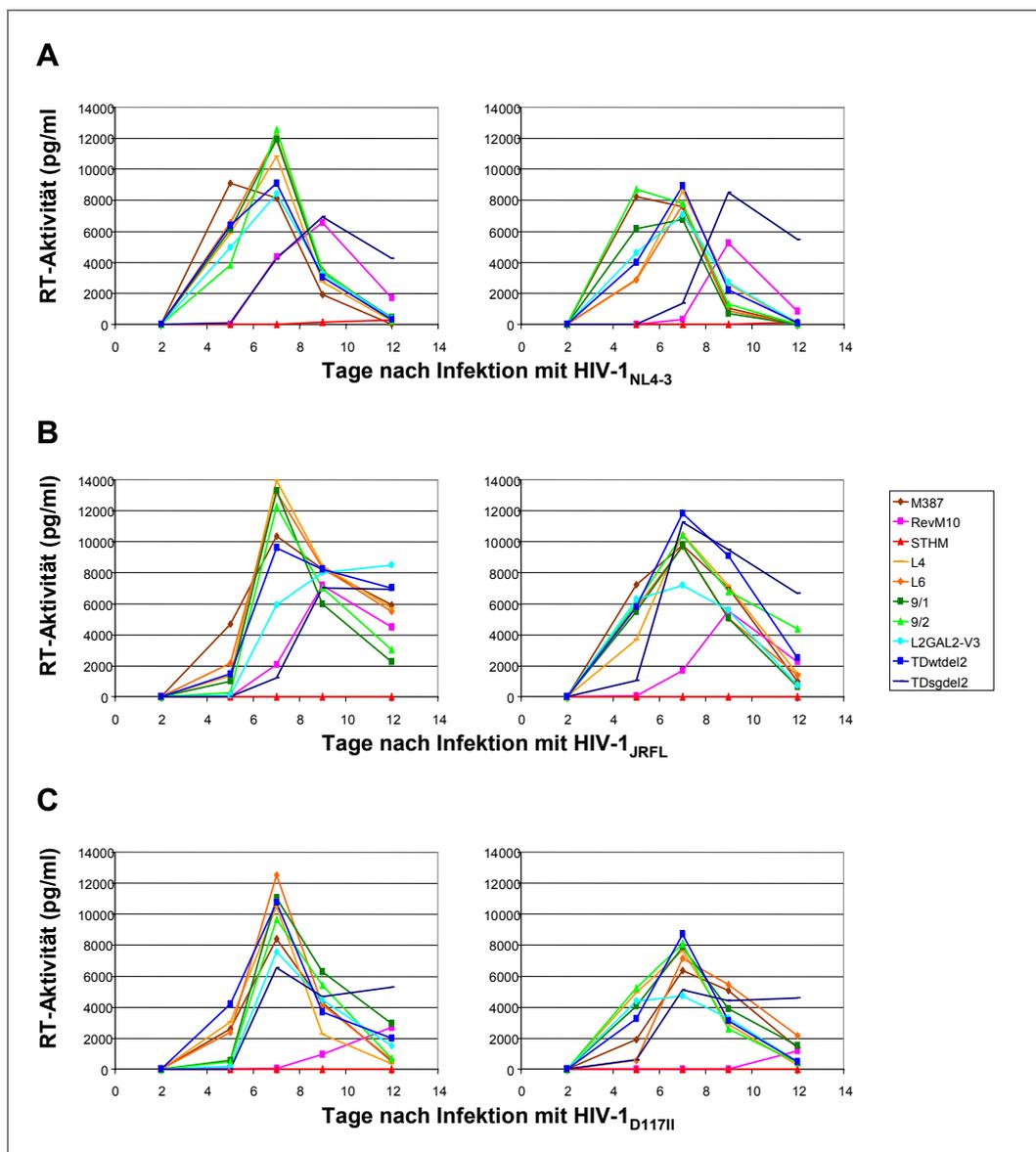


Abb. 3.18: Replikationskinetik in den Netzwerk-Zelllinien nach Infektion mit den drei verschiedenen HIV-1-Laborstämmen. Die PM1-Zelllinien wurden mit einer MOI von 0,001 (HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{JRFL}) bzw. 0,0005 (HIV-1_{D117II}) infiziert. An den angegebenen Tagen wurden Proben des Überstandes genommen und die RT-Aktivität bestimmt. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente.

In allen durchgeführten Experimenten bestätigte das mikroskopische Bild der Zellen die RT-Werte. Hohe RT-Aktivität bedeutete in allen Fällen auch massive zytopathische Effekte, abfallende Replikationskurven spiegelten sich im Absterben der betreffenden Kultur. Geschützte Zelllinien zeigten entsprechend weder RT-Aktivität noch CPE.

3.4 Wirksamkeit gegen HIV-1-Primärisolate und HIV-2

Analog zu den HIV-1-Laborstämmen wurden auch Infektionen mit zwei HIV-1-Primärisolaten (P63 und P66, Dr. Albrecht Werner, Paul-Ehrlich-Institut) sowie mit dem HIV-2-Laborstamm UC-1 durchgeführt. Dabei wurden HIV-1-Primärisolate mit eindeutiger Korezeptornutzung gewählt. Das Isolat P63 wurde aus dem Blut eines mit HAART behandelten asymptomatischen Patienten gewonnen und anschließend als CXCR4-tropes Virus identifiziert. Das Isolat P66 hingegen ist CCR5-trop und wurde aus dem Blut eines Patienten ohne antiretrovirale Behandlung angezüchtet (Holtkamp et al., 2000). Für alle Belastungsexperiment wurde eine MOI von 0,001 verwendet.

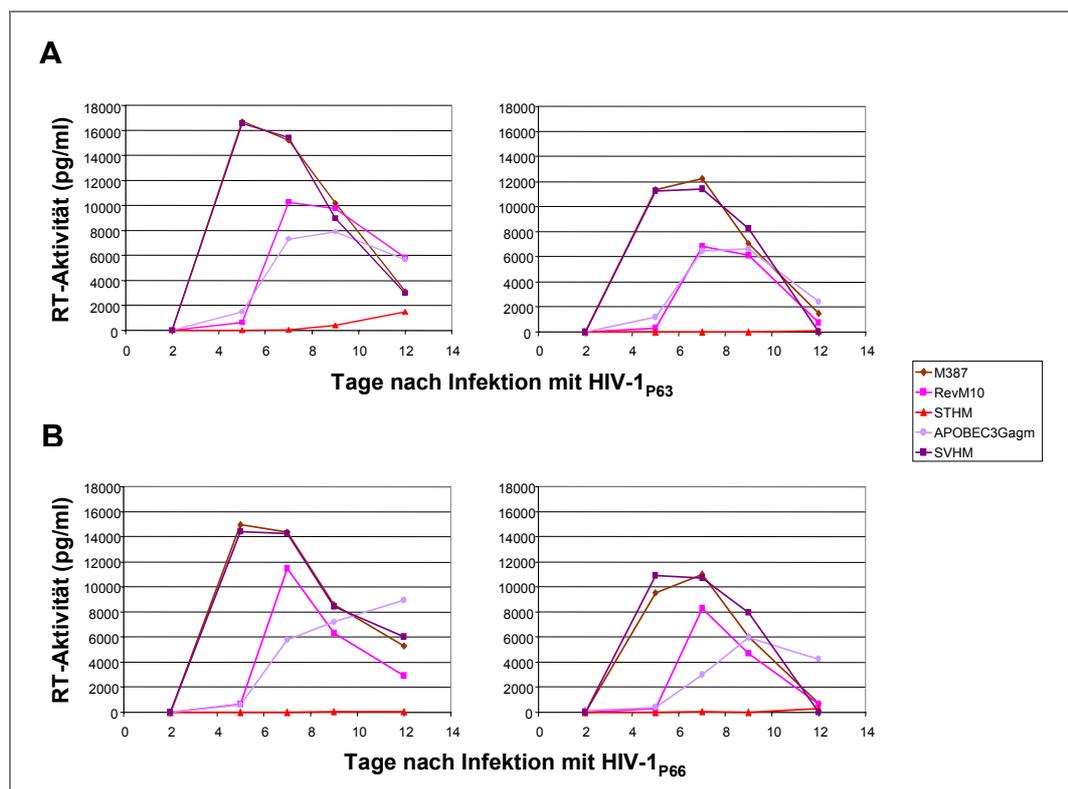


Abb. 3.19: Replikationskinetik in den Kontroll- sowie den APOBEC3G_{agm}- und SVHM-Zelllinien nach Infektion mit den HIV-1-Primärisolaten P63 (A) und P66 (B). Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente. Infiziert wurde an Tag 0 mit einer MOI von 0,001.

Für die Negativ-Kontrolle (M387, Vektor ohne therapeutisches Gen) und die anderen Zelllinien, die keinen Schutz gegen die HIV-1-Laborstämme zeigten (SVHM, L4, L6, 9/1, 9/2, L2GAL2-V3, TDwt Δ 2), konnte auch nach Infektion mit dem beiden HIV-1-Primärisolaten keine Hemmwirkung beobachtet werden.

Der durch STHM vermittelte „vollständige Schutz“ blieb weitgehend erhalten. Nur in einem Experiment mit HIV-1_{P63} zeigten sich ab Tag 9 nach Infektion eine deutliche RT-Aktivität.

Die „mittlere Hemmung“ in der RevM10-Linie, die für die Laborstämme festgestellt wurde, konnte auch für die Primärisolate reproduziert werden.

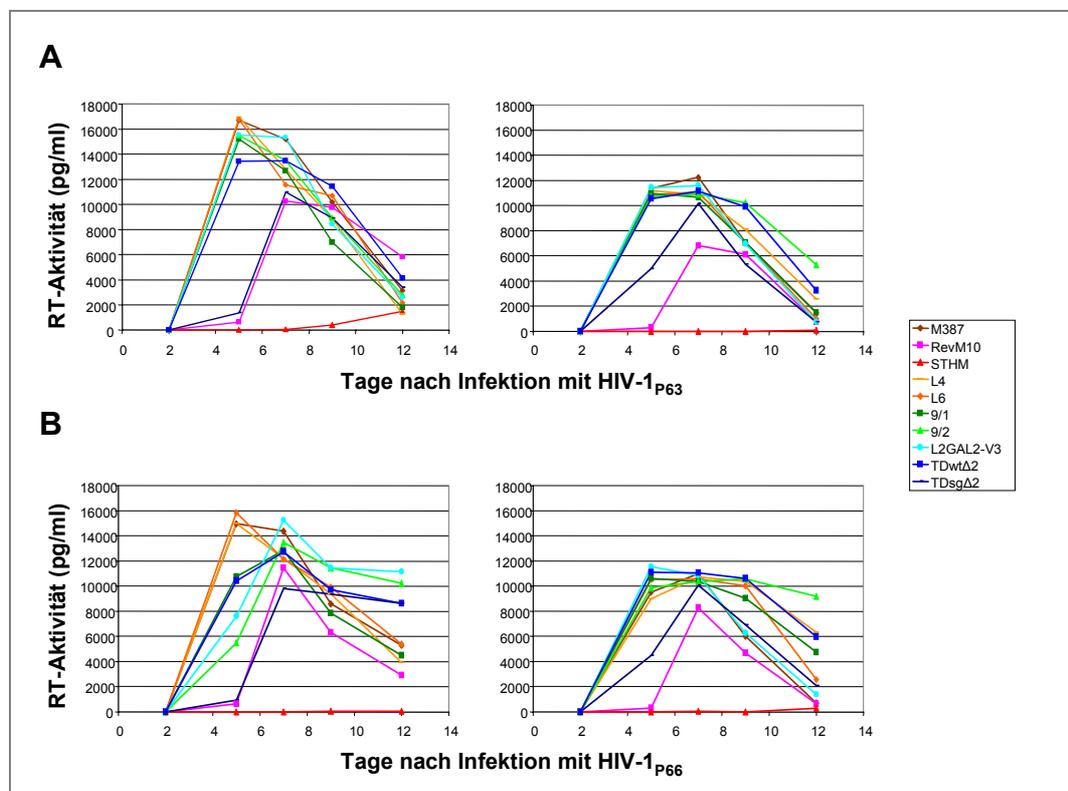


Abb. 3.20: Replikationskinetik in den Netzwerk-Zelllinien nach Infektion mit den HIV-1-Primärisolaten P63 und P66. Es sind zwei unabhängige Experimente gezeigt.

Die Wirkung von TDsg Δ 2 kann auch in diesen Experimenten als „schwache Hemmung“ bezeichnet werden. In einem Experiment war die Inhibition mit der in der RevM10-Linie vergleichbar, im zweiten war sie deutlich geringer.

Der einzige signifikante Unterschied zwischen den Ergebnissen für die HIV-1-Laborstämme und denen für die Primärisolate ergab sich in der APOBEC3G_{agm}-Linie. Statt der zuvor beobachteten „starken Hemmung“ konnte bei Verwendung der

Primärisolate nur eine mittlere, mit RevM10 vergleichbare Inhibition festgestellt werden. Dabei fiel auf, daß das CCR5-trope Isolat P66 deutlich besser gehemmt wurde.

Auch bei der Verwendung von Primärisolaten konnte beobachtet werden, daß sich der Verlauf der RT-Aktivität im mikroskopischen Bild der Zellen widerspiegelt.

Um eine mögliche Hemmung der Replikation von HIV-2 durch eines der therapeutischen Gene zu testen, wurden die hergestellten PM1-Zelllinien wiederum in zwei unabhängigen Experimenten mit dem HIV-2-Laborstamm UC-1 infiziert. Auch für diese Versuche wurde eine MOI von 0,001 verwendet.

Wiederum zeigte die Negativ-Kontrolle (M387, Vektor ohne therapeutisches Gen) den typischen Verlauf einer HIV-Infektion ungeschützter Zellen. Auch in allen anderen Zelllinien, die keinen Schutz gegen HIV-1 aufwiesen (SVHM, L4, L6, 9/1, 9/2, L2GAL2-V3, TDwt Δ 2), konnte auch keine Hemmung des HIV-2-Laborstammes festgestellt werden.

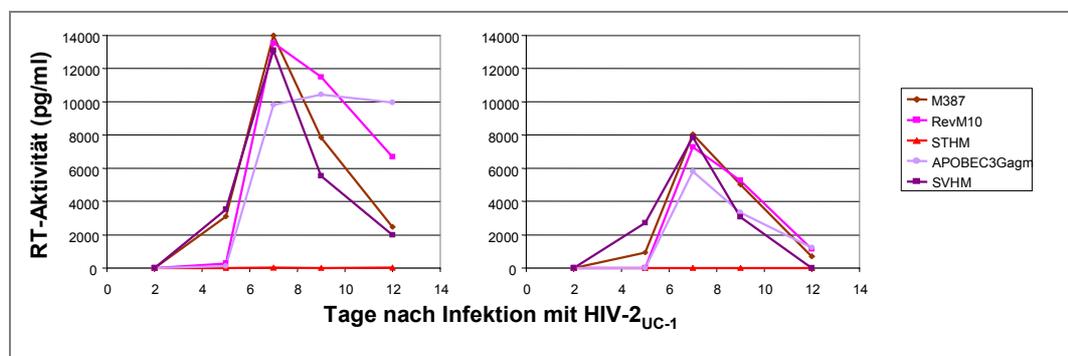


Abb. 3.21: Replikationskinetik in den Kontroll- sowie den APOBEC3G_{agm}- und SVHM-Zelllinien nach Infektion mit HIV-2_{UC-1}. Gezeigt sind zwei unabhängige Experimente. Infiziert wurde an Tag 0 mit einer MOI von 0,001.

STHM vermittelte wie schon gegen HIV-1 auch gegen HIV-2 einen vollständigen Schutz. Die Hemmung durch TDsg Δ 2 kann bei HIV-2 sogar als eher etwas stärker als bei HIV-1 bezeichnet werden. Interessanterweise zeigte RevM10, im Gegensatz zu der Situation bei HIV-1, keinerlei Hemmwirkung von HIV-2.

Ebenso konnte durch das bei HIV-1 effektiv inhibierende Gen APOBEC3G_{agm} nach Infektion mit HIV-2 keine Inhibition beobachtet werden.

Insgesamt muß dabei bedacht werden, daß nur ein HIV-2-Stamm getestet wurde.

Die Beurteilung der zytopathischen Effekte korrespondierte auch nach Infektion mit HIV-2_{UC-1} mit der RT-Aktivität.

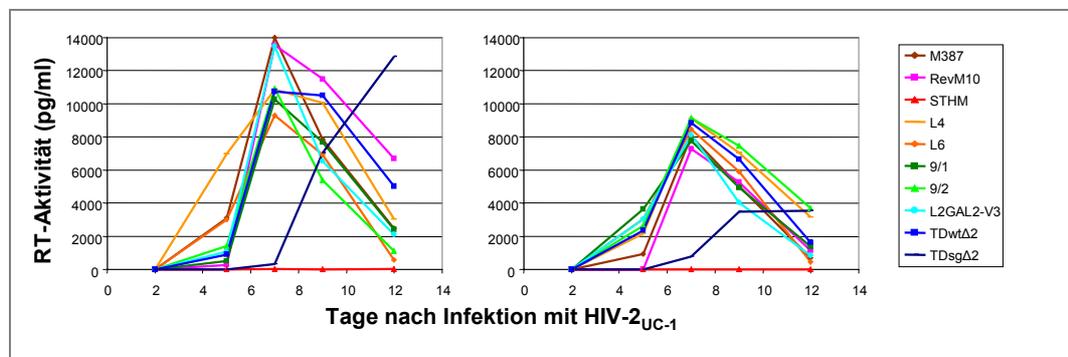


Abb. 3.22: Replikationskinetik in den Netzwerk-Zelllinien nach Infektion mit HIV-2_{UC-1}. Nach Infektion mit einer MOI von 0,001 wurden alle 2-3 Tage Proben des Überstandes zur Bestimmung der RT-Aktivität genommen. Dargestellt sind zwei unabhängige Experimente.

3.5 HIV-Hemmung in primären Zellen

Um prinzipiell zu prüfen, ob die in den PM1-Zelllinien gezeigten Effekte auch in primären humanen Lymphozyten nachvollziehbar sind, wurden CD4⁺-T-Zellen mit den Kontrollvektoren M387 (Vektor ohne therapeutisches Gen), RevM10 und STHM transduziert und HIV-1-Belastungsexperimente durchgeführt.

Die Situation in primären Zellen unterscheidet sich grundlegend von der in Zelllinien, da es kaum möglich ist, die Versuche zu standardisieren. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang sind die Unterschiede, die die Zellen verschiedener Spender hinsichtlich ihrer Transduzierbarkeit und Infizierbarkeit aufweisen. Zudem haben primären Lymphozyten nur eine begrenzte Lebensdauer in Kultur, was eine Selektion der EGFP-positiven Zellen mittels FACS schwierig macht. Daher ist man gezwungen mit den im jeweiligen Experiment erreichten Transduktionseffizienzen weiterzuarbeiten. Man hat also zum einen das Problem, daß ein erheblicher Anteil der in die Belastungsexperimente eingesetzten Zellen nicht transduziert ist, und zum

anderen, daß der Anteil der transduzierten Zellen in den zu vergleichenden Kulturen u.U. merklich differiert. In der vorliegenden Arbeit wurden mit nativen Vektorüberständen Transduktionseffizienzen von knapp über 40 % erreicht. Aber auch mit höheren MOI's, ermöglicht durch Vektor-Konzentrierung mittels Ultrazentrifugation, konnten diese Ergebnisse nicht wesentlich verbessert werden.

Bei der HIV-Infektion der primären CD4⁺-Lymphozyten zeigt sich auch noch ein weiterer Unterschied zu den PM1-Zelllinien, denn die für diese festgelegten MOI's sind zu gering, um in der Negativ-Kontrolle eine ausreichende Virusreplikation zu erreichen. Zudem sind Vorversuche zur Bestimmung der optimalen MOI wiederum aufgrund der kurzen Lebensdauer der primären Zellen nicht durchführbar.

Angesichts dieser Probleme war in primären Zellen von vorneherein kein valider Vergleich der inhibitorischen Gene zu erwarten. Die Fragestellung war vielmehr, ob sich die im standardisierten Zellkultursystem beobachteten Tendenzen bestätigen lassen.

Da in primären Lymphozyten in der Regel keine zytopathischen Effekte zu beobachten sind, konnte der Verlauf der Virusreplikation nicht im mikroskopischen Bild verfolgt werden.

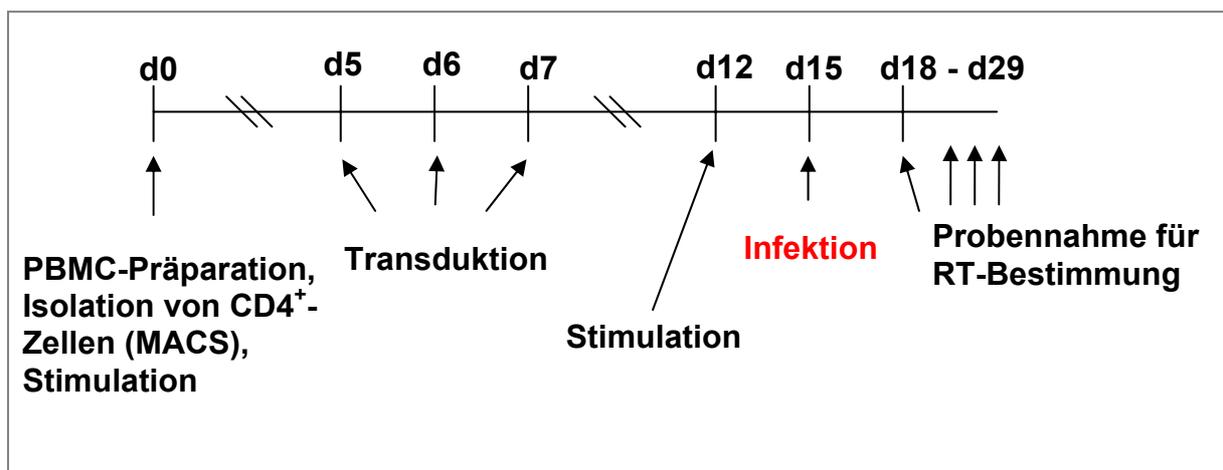


Abb. 3.23: Zeitlicher Ablauf des Versuchs. Die an Tag 0 isolierten CD4⁺-Zellen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen transduziert und an Tag 15 mit den drei HIV-1-Laborstämmen infiziert.

3.5.1 Isolierung der CD4⁺-Zellen

Zur Untersuchung der Hemmwirkung potentiell therapeutischer Gene in primären Lymphozyten wurden zunächst PBMC („peripheral blood mononuclear cells“) mittels Gradienten-Zentrifugation aus humanem Blut gereinigt. Durch Anfärben mit einer Antikörpermischung und anschließender Bindung eines mit magnetischen Beads gekoppelten Sekundärantikörpers wurden alle nicht CD4⁺-Zellen mittels MACS aus den PBMC entfernt (Negativ-Depletion). Auf diese Weise wurde die Beeinflussung der Zellen durch die Reinigungsprozedur möglichst gering gehalten.

Danach wurden die Zellen 5 Tage mit magnetischen Beads, die mit CD3- und CD28-Antikörpern gekoppelt waren, stimuliert.

3.5.2 Transduktion

Für die Transduktion von primären CD4⁺-Zellen wurde ein optimiertes Protokoll, das im Rahmen einer früheren Dissertation im Labor etabliert worden war (Schmitt, 2002), verwendet. Dazu wurden zunächst Retronectin-beschichtete 24-Loch-Platten mit vektorhaltigem Überstand vorinkubiert, dann wurden die Zellen mit neuem Überstand in diese Platte gegeben und 1,5 h zentrifugiert. Dann wurde der Überstand gegen frischen ausgetauscht und erneut 1,5 h zentrifugiert. Nach weiteren 3 h bei 37°C im Brutschrank erfolgte ein Halbmediumwechsel. Die Transduktion erfolgte an den Tagen 5, 6 und 7 nach Isolation. Vier Tage nach der letzten Transduktion konnte die Effizienz anhand des Anteils der EGFP-exprimierenden Zellen durch Analyse im FACS bestimmt werden.

Die im folgenden gezeigten Transduktionen wurden mit einer MOI von 3 x 2,2 unter Verwendung nativer vektorhaltiger Überstände (Titer siehe Tab. 3.7) durchgeführt.

Die erzielten Transduktionseffizienzen sind in Tab. 3.7 zusammengefaßt.

	Transgen		
	M387	RevM10	STHM
Titer / ml	2,5 x 10 ⁶	4,4 x 10 ⁵	8,2 x 10 ⁵
Spender 1	28 %	30 %	40 %
Spender 2	25 %	27 %	41 %

Tab. 3.7: Titer der verwendeten [MLV(GaLV)]-Vektorpräparationen und Transduktionseffizienzen auf den CD4⁺-Zellen. Die Zellen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils mit einer MOI von 2,2 transduziert. Die Bestimmung der Titer und Transduktionseffizienzen erfolgte anhand der Expression des Markergens EGFP.

3.5.3 Belastungsexperimente

Die HIV-Belastungsexperimente mit den transduzierten CD4⁺-Zellen wurden analog zu denen mit Zelllinien durchgeführt, wobei mehrere MOI's verwendet wurden.

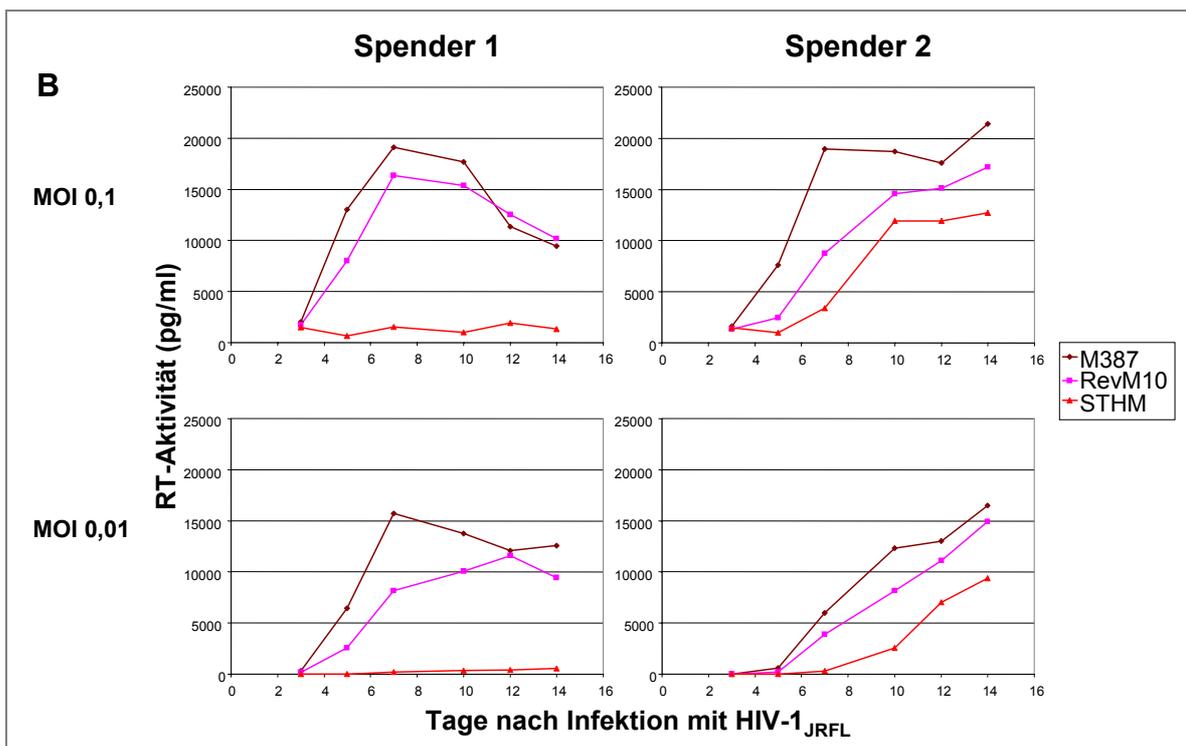
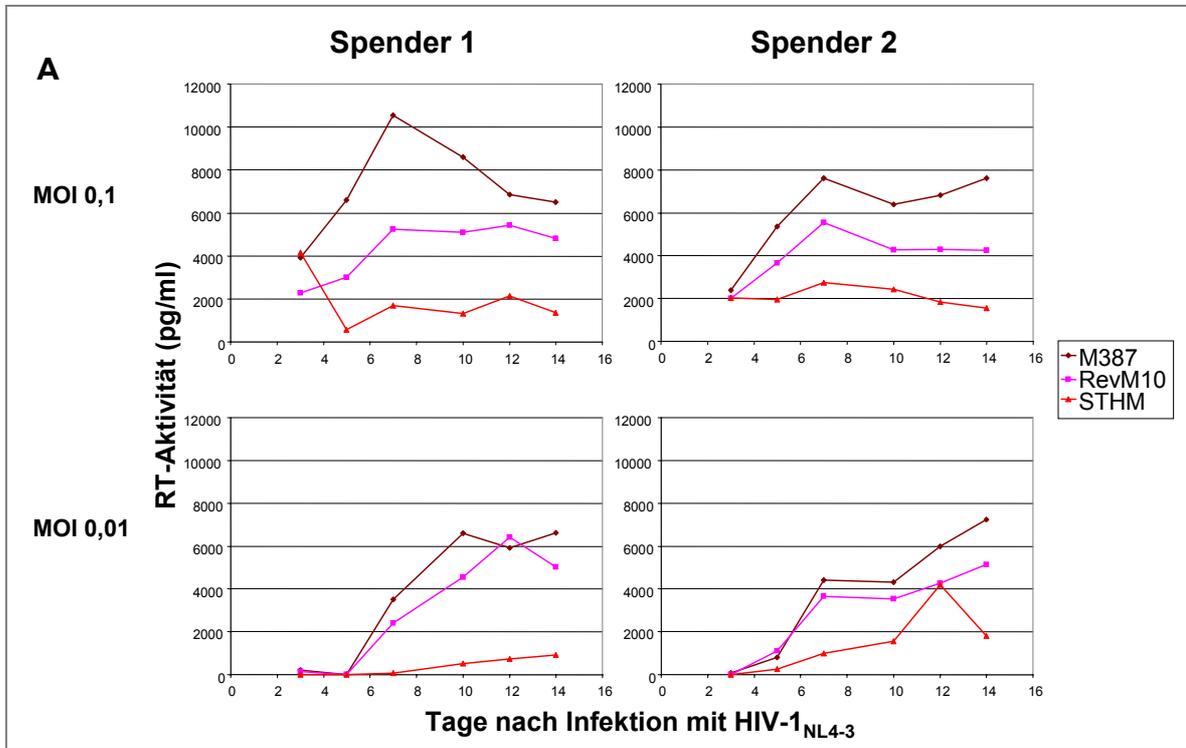
Alle 2-3 Tage wurden Proben des Überstandes zur Bestimmung der RT-Aktivität genommen.

Die Replikationskinetiken in den mit dem Kontrollvektor (M387, Vektor ohne therapeutisches Gen) transduzierten primären Zellen zeigten einen deutlich anderen Verlauf als in der entsprechenden PM1-Zelllinie (Abb. 3.24). Statt einer rasch ansteigenden und dann ebenfalls schnell abfallenden Kurve ergaben sich wesentlich flachere Verläufe, obwohl wesentlich höhere MOI's für eine effektive Infektion nötig waren. Zudem stiegen die RT-Aktivität nach Infektion mit dem CCR5-tropen HIV-1_{JRFL} und vor allem dem dualtropen HIV-1_{D117II} auf deutlich höhere Werte an als in den Zelllinien.

Trotz starker donorabhängiger Unterschiede konnten insgesamt die gleichen Tendenzen festgestellt werden wie zuvor in den Zelllinien. Allerdings war die inhibierende Wirkung von RevM10 nur schwach ausgeprägt und hauptsächlich nach Infektion mit HIV-1_{NL4-3} bei einer MOI von 0,1 zu sehen. Die Hemmung durch STHM war, vor allem bei Spender 1, wesentlich deutlicher. Eine annähernd komplette Hemmung konnte allerdings nur nach Infektion mit HIV-1_{JRFL} bei einer MOI von 0,01 beobachtet werden.

Im Falle der Infektion mit dem dualtropen HIV-1_{D117II} konnten nur mit deutlich niedrigeren MOI's als bei den anderen beiden HIV-1-Stämmen Hemmwirkungen beobachtet werden (Abb. 3.24 C).

Die HIV-inhibitorische Wirkung von STHM, und in geringerem Umfang auch die von RevM10, konnte also trotz der genannten Schwierigkeiten tendenziell bestätigt werden.



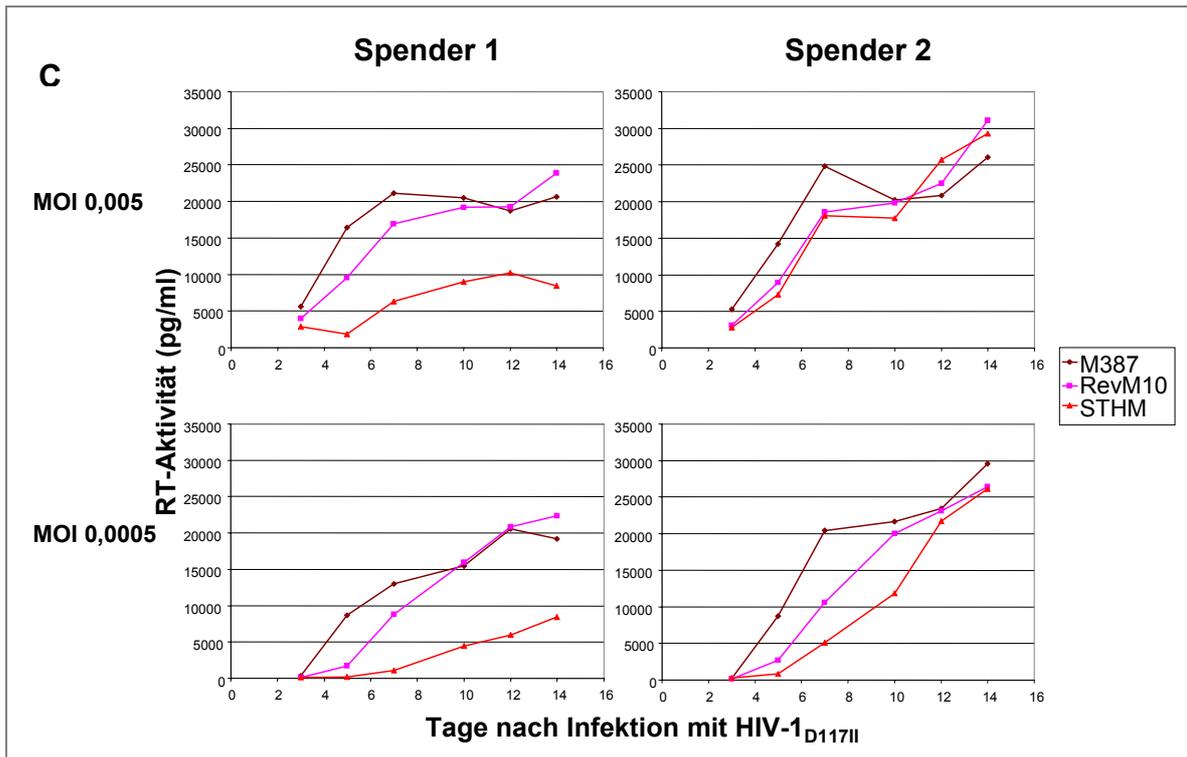


Abb. 3.24: Replikationskinetik in transduzierten CD4⁺-Zellen von zwei Spendern nach Infektion mit den drei HIV-1-Laborstämmen. Gezeigt sind für jeden Spender jeweils zwei verschiedene MOI's pro Virusstamm. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt. Auf die Darstellung der Standardabweichungen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Warum ein Testsystem für HIV-inhibitorische Gene?

Obwohl die nach wie vor nicht gelösten Probleme der konventionellen HIV-Therapie schon vor einigen Jahren die Idee der Gentherapie aufwarfen und eine Vielzahl von potentiell therapeutischen Genen veröffentlicht wurden, gab es bislang keine einheitliche Methode ihrer Evaluierung. Zum Nachweis der Wirksamkeit HIV-inhibitorischer Gene wurde in der Vergangenheit in fast jeder Publikation ein anderes System verwendet. In einigen Fällen wurde das Expressionskonstrukt für das therapeutische Gen mit einem für ein Reportervirus kodierenden Plasmid (z.B. pNL4-3-luc, Paul et al., 2003) oder einem HIV-Vollängen-Konstrukt (z.B. Yu et al., 1993; Habu et al., 2005) kotransfiziert. In anderen Untersuchungen wurden mit verschiedenen Vektoren (retroviral oder SV40-basierend) transduzierte oder stabil transfizierte Zellen mit replikationskompetentem Virus infiziert, wobei eine Reihe verschiedene humane T-Zelllinien wie SupT1-, Hut78- oder Jurkat-Zellen sowie unterschiedliche HIV-1-Laborstämme, z.B. HIV-1_{NL4-3}, HIV-1_{SF2} oder HIV-1_{III_B}, verwendet wurden. Die zur Infektion eingesetzten MOIs variierten teilweise auch bei Verwendung desselben Virusstamm um mehrere Zehner-Potenzen (z.B. Mautino & Morgan, 2002; Cordelier et al., 2003a; Hotchkiss et al., 2004; Tewari et al., 2003). Ein weiterer Ansatz war die Transduktion latent HIV-infizierter Zellen und anschließender Untersuchung der Virusreplikation nach Reaktivierung (Li et al., 2000). Besonders deutlich wird die Beliebigkeit solcher Studien bei Betrachtung des folgenden Falles: Für ein Antikörperfragment (sFv) gegen die HIV-1-Integrase wurde eine komplette Hemmung von HIV-1_{NL4-3} beschrieben. Die angegebene MOI mußte allerdings nachträglich um gut 3 Zehner-Potenzen nach unten korrigiert werden, ohne daß die Autoren ihre Ergebnisse neu bewerteten (Levy-Mintz et al., 1996, Erratum 2001).

Das in dieser Arbeit entwickelte Vergleichssystem orientiert sich an dem angestrebten Gentherapie-Ansatz und erreicht in diesem Rahmen seine Vergleichbarkeit durch ein daran angepaßtes einheitliches Protokoll, sowohl für den Gentransfer als auch für den eigentlichen Test der Wirksamkeit. Dazu gehören Belastungsexperimente mit verschiedenen Viren bei erprobten und definierten MOIs. Natürlich ermöglicht dieses Zellkultursystem nur den Vergleich der Hemmwirkung und damit eine Vorauswahl erfolversprechender Gene für die Klinik. Dabei umfaßt

das System nur die Gentherapie-Ansätze, die nach dem Prinzip der „intrazellulären Immunisierung“ (Baltimore, 1988) funktionieren. Alle Ansätze, die versuchen durch Stimulierung des Immunsystems therapeutisch oder prophylaktisch einzugreifen, können auf diesem Weg nicht getestet werden. Zudem können in einem Zellkultursystem nur unzureichend die Verhältnisse in einem Patienten nachgestellt werden. So sind in der *in vivo*-Situation zwar ebenfalls niedrige MOIs zu erwarten aber auch ein sehr viel ungünstigeres Verhältnis von Zellen, die das therapeutische Gen exprimieren, zu unbehandelten Zellen.

4.1.1 Wahl der Zelllinie und des Transfervektors

Als verlässliche Vergleichsmöglichkeit für potentiell HIV-inhibitorische Gene benötigt man ein einheitliches Zellkultursystem. Neben einer geeigneten T-Zelllinie ist die Wahl des Transfervektors ausschlaggebend. Beides sollte eine gute Expression des therapeutischen sowie des Markergens gewährleisten. Ein weiteres Kriterium für die Verwendung einer Zelllinie ist ihre Infizierbarkeit. In vielen T-Zelllinien können nur bestimmte HIV-1-Laborstämme und in der Regel keine HIV-1-Primärisolate replizieren (Lusso et al., 1995). Das gilt sowohl für die oft benutzten Jurkat-, SupT1- und Molt-3- sowie Molt-4-Zellen als auch für Hut78-Zellen. Von letzteren wurde ein klonales Derivat identifiziert, das Suszeptibilität für ein außergewöhnlich breites Spektrum von Laborstämmen und Primärisolaten aufweist (Lusso et al, 1995). Diese als PM1 bezeichnete Zelllinie ermöglicht zudem eine hohe Proteinexpression (von Laer, persönliche Mitteilung). Daher wurden in dieser Arbeit PM1-Zellen verwendet.

Bei der Wahl des Transfervektors bot sich ein MLV-basierendes Konstrukt an, da entsprechende Plasmide in den meisten Gentherapie-Ansätzen für die Behandlung der HIV-Infektion Verwendung finden. In dieser Arbeit wurde ein Konstrukt benutzt, in dem das Markergen EGFP auf einer mRNA mit dem therapeutischen Gen liegt und durch eine vorgeschaltet IRES translatiert wird. Auf diese Weise kann man davon ausgehen, daß eine EGFP-positive Zelle auch das therapeutische Gen exprimiert. Zudem besitzt dieser Transfervektor virale LTRs als Promotor, die sich besonders gut für die Verwendung in hämatopoetischen Zellen eignen. Ein vergleichbarer Transfervektor wird zur Zeit auch in der klinischen Prüfung des membrangebundenen T20-Peptids benutzt (von Laer, persönliche Mitteilung).

4.1.2 Vergleichbarkeit der stabil transduzierten Zelllinien

Die Vergleichbarkeit der stabil mit den therapeutischen Genen transduzierten PM1-Zelllinien wurde anhand verschiedener Parameter untersucht. Zunächst wurde festgelegt, daß in allen Linien mindestens 95% der Zellen das Markergen EGFP exprimieren müssen, um eine verlässliche Aussage über die Hemmwirkung der inhibitorischen Gene treffen zu können. In allen in dieser Arbeit hergestellten stabilen Zelllinien wurde ein Anteil von über 97% erreicht. Auch die Expression des therapeutischen Gens wurde nachgewiesen, wobei allerdings auf eine Quantifizierung verzichtet wurde. Zum einen ist es kaum möglich, eine Normierung für alle denkbaren inhibitorischen Genprodukte wie Proteine, Peptide und RNAs zu entwickeln. Zum anderen können die wirksamen Konzentrationen bei den teilweise sehr verschiedenen Wirkmechanismen stark unterschiedlich sein. Auch Art und Weise des Nachweises stellt ein mögliches Problem für die Vergleichbarkeit dar, denn nicht jedes Genprodukt läßt sich mit der gleichen Methode nachweisen. Auch in den Fällen, in denen der Nachweis mittels Western Blot möglich ist, werden doch verschiedene Antikörper verwendet, deren unterschiedliche Bindungseigenschaften einen quantitativen Vergleich nicht zulassen. Zudem zeigt ein Nachweis im Western Blot nur die Expression, nicht aber die Lokalisation eines Proteins, die für die Wirksamkeit ebenfalls von Bedeutung ist.

Ein Weg, eine größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, wäre die Verwendung von Zellklonen, bei denen jeweils der Transfervektor an der gleichen Stelle des Genoms inseriert hat. Das ist aber einerseits experimentell sehr aufwendig und entspricht andererseits auch nicht der Situation im Rahmen einer Gentherapie. Dort wird wie auch in dem in dieser Arbeit entwickelten Zellkultursystem eine Zellpopulation mit verschiedenen, zufälligen Integrationsstellen erzeugt.

Die Vergleichbarkeit des Systems orientiert sich also an der tatsächlichen klinischen Anwendung und wurde durch den einheitlichen Gentransfer sowie durch die Überprüfung weiterer Parameter, die die HIV-Replikation beeinflussen, wie die Expression der HIV-Rezeptoren und die Teilungsrate der Zellen, erzielt. Bei den hergestellten stabilen Zelllinien konnte anhand dieser Kriterien eine gute Vergleichbarkeit untereinander gezeigt werden.

4.2 Evaluierung verschiedener HIV-inhibitorischer Gene

Die erzielten Ergebnisse zur Hemmwirkung der potentiell therapeutischen Gene auf die HIV-1-Laborstämme zeigten in allen Fällen eine hohe Reproduzierbarkeit. Obwohl sich die unabhängigen Experimente in den absoluten Meßwerten leicht unterscheiden konnten, blieb ihre Aussage über Qualität und relative Quantität der HIV-inhibitorischen Wirkung gleich.

4.2.1 Die Kontrollgene

Die transdominant-negative Rev-Mutante RevM10 ist seit ihrer Veröffentlichung (Malim et al., 1989a) ein allgemein akzeptiertes HIV-inhibitorisches Gen, das seine Wirkung in verschiedenen Studien gezeigt hat (Bevec et al., 1992; Escaich et al., 1995; Plavec et al., 1997; Bonyhadi et al., 1997). Aus diesem Grund wurde es als Positiv-Kontrolle für das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem gewählt. Wie erwartet konnte eine deutliche Verzögerung der Virusreplikation festgestellt werden. Noch wesentlich größer war allerdings die Wirkung des STHM-Gens (membrangebundene, verlängerte Form des T20-Peptids [C46]), das innerhalb der ersten 12 Tage eine praktisch vollständige Hemmung der verwendeten HIV-1-Laborstämme vermittelte. Das lösliche T20-Peptid ist seit 2003 als HIV-Medikament auf dem deutschen Markt zugelassen und auch die membrangebundene Form befindet sich gegenwärtig in der klinischen Prüfung (von Laer, persönliche Mitteilung). Interessanterweise sind zwar mehrere Mutationen bekannt, die eine Resistenz gegen T20 vermitteln (Rimsky et al., 1998; Sista et al., 2004), aber gegen die membrangebundene, verlängerte Form resistente Viren konnten bisher nicht identifiziert werden (von Laer, persönliche Mitteilung). T20 stellt eine völlig neue Klasse innerhalb der HIV-Therapeutika dar, da es der erste zugelassene Fusionshemmer ist. Es setzt also an einem sehr frühen Punkt der Virusreplikation an und verhindert die Infektion der geschützten Zelle. Man geht davon aus, daß sich im Fall solcher HIV-inhibitorischer Gene, die vor der Integration wirken, geschützte Zellen *in vitro* und *in vivo* anreichern, während ungeschützte sterben. In der für die ersten Experimente zur MOI-Festlegung verwendeten nicht sortierten Zelllinie konnte dieser Effekt *in vitro* nachvollzogen werden. Zunächst war eine leichte Verzögerung der Virusreplikation feststellbar. Nach einer Kulturdauer von etwa 2-3 Wochen nach Infektion hatten sich die Kulturen wieder erholt. Die nun hochgewachsenen Zellen

zeigten keine Anzeichen einer HIV-Infektion mehr und Kulturüberstand, der auf frische ungeschützte PM1-Zellen gegeben wurde, war nicht mehr infektiös (im Ergebnisteil nicht gezeigt).

Daten über die Situation *in vivo* nach der Rückgabe von *ex vivo*-transduzierten Zellen sind derzeit noch nicht verfügbar. Die Anreicherung der durch STHM geschützten Zellen im Patienten hängt natürlich von der Reaktion des Immunsystems sowie der Fähigkeit der zurückgegebenen Zellen ab, nach der *in vitro*-Kultivierung zu repopulieren.

4.2.2 APOBEC3G_{agm}

Auch das APOBEC3G-Protein aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (APOBEC3G_{agm}) zeigte eine große Effektivität gegenüber den HIV-1-Laborstämmen. Das bestätigt nicht nur den inhibitorischen Effekt, der in einem „single-round“-Infektionssystem unter Verwendung eines HIV-1-Reportervirus gezeigt wurde (Mariani et al., 2003), sondern weist die Wirkung nun auch in einem replikativen Testsystem nach retroviralem Gentransfer nach.

Beim Menschen besteht die APOBEC-Familie aus APOBEC1, der Aktivitäts-induzierten Deaminase („activation induced deaminase“, AID) sowie APOBEC2 und -3 (Espinosa et al., 1994; Muto et al., 2000). APOBEC3 zeigt antivirale Aktivität nicht nur gegen Retroviren, sondern auch gegen Hepatitis B-Viren (Turelli et al., 2004). Während es im Mausgenom nur ein APOBEC3-Gen gibt (Mariani et al., 2003), besitzen Primaten mehrere Formen, die als APOBEC3A - G bezeichnet werden (Jarmuz et al., 2002). Man vermutet, daß diese durch mehrere Genduplikationen entstandenen Formen eine evolutionär jüngere Entwicklung darstellen (Zhang & Webb, 2004). Das APOBEC3G wurde 2002 als HIV-inhibitorisches Protein identifiziert, dessen viraler Gegenspieler das Vif-Protein ist (Sheehy et al., 2002). Bindet Vif an APOBEC3G, wird dieses verstärkt abgebaut und an der Inkorporation in Virionen gehindert. Diese Interaktion hängt davon ab, aus welcher Spezies die Proteine stammen. Das humane APOBEC3G wird ebenso wie das Schimpansen-Protein vom Vif des HIV-1 neutralisiert. Das APOBEC3G von Afrikanischen Grünen Meerkatzen und Makaken hingegen ist wie auch das APOBEC3 der Maus in der Lage die Replikation von HIV-1 zu hemmen (Mariani et al., 2003; Yu et al., 2003; Harris et al., 2003). Vergleicht man die Sequenzen der APOBEC3Gs, findet man eine Übereinstimmung von 95% zwischen dem humanen und dem Schimpansen-Protein.

Die von Afrikanischen Grünen Meerkatzen und Makaken zeigen eine geringere Identität von 77 bzw. 75% mit dem humanen APOBEC3G (Yu et al., 2003). Für eine Gentherapie mit APOBEC3G_{agm} müßte, wie bei jedem anderen Gentherapie-Ansatz, die Immunogenität dieses Affenproteins im humanen System untersucht werden, da möglicherweise eine Immunreaktion gegen die behandelten T-Zellen stattfinden könnte. Es wäre also durchaus sinnvoll, sich die Tatsache zunutze zu machen, daß nur eine einzige Aminosäure des humanen APOBEC3G-Proteins geändert werden muß, um die Neutralisierung durch das HIV-1-Vif zu verhindern (Xu et al., 2004). Nach Austausch des Asparagins 128 im humanen Protein gegen ein Lysin, wie es im APOBEC3G der Afrikanischen Grünen Meerkatze vorkommt, ist das humanen APOBEC3G in der Lage die HIV-1-Replikation zu inhibieren (Xu et al., 2004).

4.2.3 Membrangebundenes VIRIP

Das SVHM-Gen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Replikation von HIV-1-Laborstämmen. Allerdings konnte der Nachweis der Genexpression mangels eines spezifischen Antikörpers nicht geführt werden. Es ist also durchaus möglich, daß keine bzw. keine ausreichende Expression stattfindet oder das Protein nicht an die Zellmembran gelangt. Letzteres könnte verlässlich nur mit einem spezifischen Antikörper getestet werden, da ein tag nur an den intrazellulären Teil des SVHM-Konstrukt angehängt werden könnte. Das VIRIP selbst verliert seine Wirksamkeit, wenn es am C-Terminus modifiziert wird (Kirchhoff, persönliche Mitteilung). Eine intrazelluläre Markierung für eine FACS-Analyse ist allerdings experimentell schwierig und liefert oft nur unzureichende Ergebnisse.

Bedenkt man jedoch, daß das T20-Peptid auf die gleiche Weise auf der Zelloberfläche exprimiert wird und die Sequenz des SVHM-Gens auf Richtigkeit überprüft wurde, kann man davon ausgehen, daß die Expression ähnlich gut funktionieren sollte. Die wahrscheinlichste Erklärung für die fehlende Wirksamkeit ist daher wohl, daß sich VIRIP in membrangebundener Form nicht zur HIV-Hemmung eignet. Möglicherweise ist es nur als freies Peptid wirksam, so daß für eine gentherapeutische Verwendung ein anderes Expressionsprinzip notwendig wäre, mit dem eine Sezernierung des VIRIP erreicht wird.

4.2.4 Netzwerk-Gene

Von den Netzwerk-Genen zeigte nur das transdominant-negative Gag-Konstrukt TDsg Δ 2 eine deutliche HIV-inhibierende Wirkung. Allerdings konnte keine Expression von TDwt Δ 2 in den stabilen Linien nachgewiesen werden, da das TDwt Δ 2-Konstrukt im Gegensatz zu dem humanisierten TDsg Δ 2 Rev-abhängig ist. Der Nachweis hätte also in infizierten Zellen stattfinden müssen. Eine abschließende Aussage über die Expression ist so nicht möglich. Für die übrigen Netzwerk-Gene muß man davon ausgehen, daß sie sich für eine Anwendung in einem momentan üblichen Gentherapieansatz, wie er in dem in dieser Arbeit entwickelten System nachgestellt wird, nicht eignen. Möglicherweise hängt ihre Wirkung von einer in diesem Szenario nicht zu erreichenden Expressionsstärke ab.

4.3 Wirksamkeit gegen HIV-1-Primärisolate

Nach Infektion mit den HIV-1-Primärisolaten P63 und P66 zeigten sich in den stabilen PM1-Zelllinien weitgehend dieselben Hemmeffekte wie schon nach Infektion mit den HIV-1-Laborstämmen. Die einzige Ausnahme bildete die APOBEC3G_{agm}-Linie. Hier war die Hemmung der Virusreplikation bei der Verwendung von Primärisolaten zwar immer noch deutlich, aber vermindert. Sie lag nur noch im Bereich der RevM10-Linie. Eine Erklärung für den verminderten Hemmeffekt könnte sein, daß die Primärisolate eine höhere Variabilität im Vif-Gen aufweisen als die Laborstämmen, die molekulare Klone darstellen. Es besteht also eine gewisse Wahrscheinlichkeit für das Vorhandensein von Vif-Varianten, die auch mit dem APOBEC3G aus Afrikanischen Grünen Meerkatzen interagieren können. Eine zweite mögliche Erklärung könnte in einer stärkeren Expression von Vif in den nicht an Laborbedingungen angepaßten Primärisolaten liegen.

4.4 Wirksamkeit gegen HIV-2

Obwohl die Verbreitung von HIV-2 im Gegensatz zu der von HIV-1 kein epidemisches Ausmaß erreicht, was wohl auf die geringere Infektiosität zurückzuführen ist (Kanki et al., 1994), stellt auch HIV-2 ein Problem dar. Man findet HIV-2 hauptsächlich in Westafrika, aber auch in Indien, Portugal und einigen anderen Ländern (Bock & Markovitz, 2001; Reeves & Doms, 2002). Die gängigen HIV-

Therapien wurden gegen den in den USA und Europa vorherrschenden HIV-1-Subtyp B entwickelt und auch die klinischen Erfahrungen beschränken sich hauptsächlich auf die Behandlung der HIV-1-Infektion. Die Wirksamkeit der Medikamente gegen Viren, die nicht der HIV-1 Gruppe M angehören, oder gar gegen HIV-2, das nur etwa 40 % Homologie zu HIV-1 aufweist (Chakrabarti et al., 1987; Bock & Markovitz, 2001), ist nur wenig untersucht. Für bestimmte Wirkstoffe ist bekannt, daß sie sich nur sehr eingeschränkt oder gar nicht für die Behandlung von HIV-2 eignen. So weist HIV-2 eine natürliche Resistenz gegen die üblichen Nicht-Nukleosidartigen RT-Hemmer (NNRTI) auf (Parkin & Schapiro, 2004; Witvrouw et al., 2004). Darum war es von Interesse, die Wirksamkeit potentiell gentherapeutischer Ansätze gegen HIV-2 zu testen.

Es zeigte sich eine komplette Hemmung in der STHM-Linie, aber keine signifikant verzögerte Virusreplikation in der RevM10- und der APOBEC3G_{agm}-Linie. Die Hemmung durch STHM war in diesem Ausmaß nicht unbedingt zu erwarten, denn für Viren, die das Hüllprotein des HIV-2 tragen, wurde eine 20 - 100fache Reduktion der Suszeptibilität für T20 beobachtet (Whitcomb et al., 2003; Witvrouw et al., 2004). Bei einem Vergleich von 15 HIV-2-Sequenzen, darunter auch die des in dieser Arbeit verwendete Stammes HIV-2_{UC-1}, wurde in allen Fällen eine Mutation von zwei Aminosäuren innerhalb eines im Heptad Repeat 1 (HR1, Interaktionspartner des T20) des gp41 gelegenen Motivs gefunden (Poveda et al., 2004), das schon zuvor bei HIV-1 als kritisch für die Suszeptibilität für T20 identifiziert wurde (Sista et al., 2004).

Obwohl die Rev-Proteine von HIV-1 und HIV-2 sich in ihrer Funktion entsprechen und eine weitgehend gemeinsame Domänenstruktur aufweisen (Malim et al., 1989b; Dillon et al., 1991; Garrett & Cullen, 1992), scheint die auf HIV-1-Rev transdominant-negativ wirkende Mutante RevM10 keinen Einfluß auf HIV-2-Rev zu haben. Dieses Ergebnis bestätigt eine Arbeit, in der beschrieben wird, daß RevM10 keinen transdominant-negativen Effekt auf SIV_{mac} hat (Berchtold et al., 1994). SIV_{mac} wiederum ist praktisch identisch mit SIV_{simm}, dem Ursprung des HIV-2.

Aufgrund dieser starken Homologie konnte durchaus auch erwartet werden, daß APOBEC3G_{agm} kaum Wirkung auf die Replikation von HIV-2 zeigte, denn es ist bekannt, daß das SIV_{mac}-Vif ein breites Spektrum an APOBEC3G-Proteinen, darunter das aus Afrikanischen Grünen Meerkatzen, neutralisieren kann (Yu et al., 2003). Allerdings zeigen die Daten aus der Literatur, daß verschiedene HIV-2-

Stämme unterschiedlich auf APOBEC3G reagieren (Reddy et al., 1995; Kawamura et al., 1998; Ribeiro et al., 2005). Bei Stamm HIV-2_{ROD} zum Beispiel beobachtet man in H9-Zellen, die stabil APOBEC3G exprimieren, keinen Unterschied in der Virusreplikation zwischen dem Wildtyp- und dem *vif*-deletierten Virus (Ribeiro et al., 2005).

Auch bei der Verwendung von HIV-2 zur Infektion der stabilen Linien konnte für die Netzwerkene nur bei dem Gag-Konstrukt TDsgΔ2 eine Hemmwirkung festgestellt werden. Da das *gag*-Gen bei HIV-1 und HIV-2 relativ stark konserviert ist (Kanki, 1991), war das nicht unerwartet.

Für die Gentherapie der HIV-2-Infektion kommen also nur zwei der Gene, für die eine inhibitorische Wirkung auf HIV-1 festgestellt werden konnte, in Frage, nämlich STHM und TDsgΔ2.

4.5 HIV-Hemmung in primären Zellen

Um sich zusätzlich zu dem standardisierten System in stabilen Zelllinien der Gentherapie-Situation weiter anzunähern, wurde die HIV-Hemmung in primären Zellen untersucht. Dazu wurden CD4-positive Zellen isoliert und transduziert, bevor sie mit den HIV-1-Laborstämmen infiziert wurden.

Die Transduktionseffizienz war für diesen Test ausschlaggebend, denn im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung ist ein kritischer Punkt, daß die Zellen möglichst kurz und schonend in Kultur gehalten werden. Eine Sortierung der Zellen kommt also kaum in Frage. Allerdings ist ein verlässlicher Vergleich verschiedener Gene mit unterschiedlichem Wirkmechanismus ohne Sortierung nicht möglich, denn auch mit relativ hohen MOI konnten nicht mehr als knapp über 40% EGFP-positive Zellen erreicht werden. Ein standardisiertes System, wie es mit stabilen Zelllinien in dieser Arbeit entwickelt wurde, ist mit primären Zellen also nicht ohne weiteres zu realisieren, zumal man es auch immer mit Spender-abhängigen Unterschieden u.a. in Transduzierbarkeit und Infizierbarkeit der Zellen zu tun hat. Ein Beispiel für ein solches Problem ist die bei Kaukasiern vorkommende CCR5-Δ32-Mutation, die bei homozygoten Personen die Lymphozyten unempfindlich für eine Infektion mit einem CCR5-tropen Virus macht (Dean et al., 1996; Liu et al., 1996; Samson et al., 1996). Deshalb wurden die Spender in dieser Arbeit auf die CCR5-Expression untersucht.

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten konnte für STHM zumindest in den Zellen eines Spenders eine deutliche Hemmwirkung gezeigt werden. In den Zellen des zweiten Spenders ist diese Wirkung wesentlich geringer ausgeprägt. Für RevM10 konnte kaum HIV-Inhibition beobachtet werden.

Die Darstellung von HIV-inhibitorischer Wirkung potentiell therapeutischer Gene ist also prinzipiell auch in primären CD4⁺-Lymphozyten möglich. Allerdings können aufgrund der genannten Probleme keine aussagekräftigen Ergebnisse erwartet werden.

4.6 Ausblick

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Zellkultursystem steht nun eine reproduzierbare und aussagekräftige Vergleichsmöglichkeit verschiedener potentiell therapeutischer Gene für eine Gentherapie-Anwendung zur Verfügung. Dieses System stellt natürlich keinen Ersatz für Tierversuche oder gar klinische Prüfungen dar, kann aber durch eine verlässliche und anwendungsorientierte Evaluierung im Vorfeld von Nutzen sein. Da die Prüfung der Effektivität in primären Zellen nicht standardisierbar ist, stellt der Test erfolversprechender Gene in einem Tiermodell den nächsten Schritt dar. Üblicherweise werden solche *in vivo*-Experimente in einem Affenmodell unter Verwendung eines sogenannten SHIV (Hybridvirus aus SIV und HIV) durchgeführt. Mäuse, ein in anderen Bereichen weit verbreitetes Modellsystem für viele Erkrankungen, kommen zunächst nicht in Frage, da sie nicht produktiv mit HIV infizierbar sind (Smith, 2002). Denkbar ist allerdings die Verwendung von SCID (**S**evere **C**ombined **I**mmuno-**D**eficiency)-Mäusen, die durch Implantation von humanem Gewebe mit einem menschlichen, für die HIV-Infektion anfälligen zellulären Immunsystem ausgestattet wurden (McCune et al., 1988; Namikawa et al., 1988; Rabin et al., 1996; Touraine et al., 2003). Die Übertragbarkeit der Ergebnisse solcher Tierversuche auf den Menschen ist allerdings in beiden Fällen nur bedingt gegeben. Zudem ist besonders das Affenmodell auch ethisch bedenklich, weshalb eine geeignete Vorauswahl der therapeutischen Gene, wie sie mit Hilfe des entwickelten Zellkultursystems möglich ist, zur Begrenzung des Tierverbrauchs von großer Bedeutung ist.

Im Hinblick auf das aus der konventionellen Therapie bekannte Problem der Resistenzbildung, die bei einer Monotherapie besonders ausgeprägt ist, ist es

sinnvoll, auch für einen gentherapeutischen Ansatz mehrere inhibitorische Strategien zu kombinieren. Der limitierende Faktor in diesem Zusammenhang ist die Kapazität des verwendeten Vektorsystems bzw. die Effektivität der Proteinexpression, wenn man versucht, mehr als zwei Gene mit einem Transfektor zu übertragen. Geeignete bicistronische Transfektoren stehen allerdings zur Verfügung, wie auch der in dieser Arbeit verwendete M387, mit denen zumindest zwei der getesteten Gene kombiniert werden könnten. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Arbeit bietet sich für einen solchen Ansatz eine Kombination aus STHM und APOBEC3G_{agm} an. Besonders interessant daran ist, daß man damit zwei verschiedene Schritte innerhalb des viralen Replikationszyklus angreift.

Denkt man an eine Gentherapie der HIV-2-Infektion wäre eine Kombination aus STHM und dem transdominant-negativen Gag-Konstrukt TDsgΔ2 sinnvoll, da diese beiden Gene im Gegensatz zu APOBEC3G_{agm} auch dieses Virus inhibieren können. Eine Vielzahl weiterer HIV-inhibitorischer Gene ist publiziert und könnte nun im direkten Vergleich mit den Kontrollgenen RevM10 und STHM getestet werden. Die zur Verfügung stehenden gentherapeutischen Strategien fassen nicht nur virale Bestandteile sondern gerade in den letzten Jahren auch vermehrt zelluläre Faktoren ins Auge. Ein interessanter zellulärer Angriffspunkt ist z.B. der Korezeptor CCR5, der für eine Infektion eine entscheidende Rolle spielt. Da man weiß, daß der Verlust dieses Chemokin-Rezeptors auf der Zelloberfläche keine negativen Auswirkungen hat, gleichzeitig aber einen effektiven Schutz vor einer HIV-Infektion darstellt (O'Brien & Moore, 2000), wurde mit verschiedenen Techniken, z.B. mittels spezifischer siRNA, versucht, die CCR5-Expression zu hemmen (Martinez et al., 2002; Qin et al., 2002; Lee et al., 2003; Cordelier, et al., 2003b).

Im Jahre 2004 wurde die Identifizierung des Proteins Trim5 α publiziert, das die molekulare Grundlage eines zuvor als Lv1 bezeichneten HIV-Blocks in Affenzellen darstellt (Stremlau et al, 2004). Es konnte gezeigt werden, daß Trim5 α von Rhesusaffen und Afrikanischen Grünen Meerkatzen HIV-1 hemmen kann (Yap et al, 2004). Da diese Hemmung schon vor der Reversen Transkription stattfindet (Stremlau et al, 2004) ist Trim5 α ein weiteres interessantes Kandidatengen für die HIV-Gentherapie. Wie schon bei APOBEC3G konnte auch für Trim5 α gezeigt werden, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure im humanen Protein dieses dazu befähigt HIV zu hemmen (Yap et al, 2005).

Weiterhin hat man festgestellt, daß ein weiteres APOBEC3-Gen von Primaten einen inhibitorischen Effekt auf Retroviren hat (Zheng et al., 2004). Dieses als APOBEC3F bezeichnete Gen besitzt eine große Sequenz-Homologie zu APOBEC3G. Es ist denkbar, auch dieses Protein aus der Afrikanischen Grünen Meerkatze in der Gentherapie der HIV-Infektion einzusetzen.

Weitere Anwendungen für das vorgestellte Zellkultursystem wären die Prüfung der Wirksamkeit therapeutischer Gene gegen zusätzliche HIV-1-Stämme weniger verbreiteter Subtypen der Gruppe M oder aus den Gruppen N und O und die Analyse von Resistenzmutanten. So konnten in Zusammenarbeit mit Dr. Carsten Münk in einer APOBEC3G_{agm}-exprimierenden T-Zelllinie durch mehrmaliges Passagieren resistente Viren erzeugt werden, die Mutationen im vif-Gen aufwiesen (nicht gezeigt). Dieses Beispiel der Selektion spezifischer vif-Mutanten zur Funktionsanalyse von vif zeigt, daß das in dieser Arbeit entwickelte Zellkultursystem nicht nur die Evaluierung HIV-inhibitorischer Gene erlaubt, sondern auch viele weitergehende Untersuchungen ermöglicht.

5 Zusammenfassung

Ein gentherapeutischer Ansatz für die Behandlung der HIV-Infektion ist die „intrazelluläre Immunisierung“ von CD4⁺-Zellen, die den Hauptangriffspunkt des HI-Virus darstellen. Potentiell therapeutische Gene zur Hemmung der HIV-Replikation sind in großer Zahl und für praktisch jeden Schritt des Replikationszyklus des Virus publiziert. Ein Problem war allerdings bisher das Fehlen eines einheitlichen und reproduzierbaren Vergleichssystems zur Identifizierung erfolgversprechender Gene für Studien im Tiermodell und in der Klinik.

In dieser Arbeit wurde ein solches auf die Gentherapie abgestimmtes Zellkultursystem entwickelt, das auf stabilem Transfer von HIV-inhibitorischen Genen durch retrovirale Transduktion von T-Zellen und Belastungsversuchen mit replikationsfähigen Viren beruht. Dazu wurden auf Basis der humanen T-Zelllinie PM1 Zelllinien etabliert, die das Markergen *egfp* sowie ein therapeutisches Gen stabil exprimieren. Für den Gentransfer wurden [MLV(GaLV)]-Vektoren verwendet, die sich für die Transduktion von hämatopoetischen Zellen besonders eignen.

Mit Hilfe der etablierten HIV-inhibitorischen Gene RevM10 und STHM (membrangebundenes T20) wurden Methoden zur Generierung dieser stabilen Zelllinien optimiert. Um eine höchstmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen, müssen die Voraussetzungen für eine HIV-Replikation in allen Zelllinien in gleicher Weise gegeben sein. Deshalb wurden Zelllinien bei mit praktisch gleicher Zellteilungsrate und HIV-Rezeptorexpression etabliert. Die unterschiedliche Hemmwirkung der Kontrollgene konnte so in Belastungsexperimenten mit drei verschiedenen, repräsentativen HIV-1-Laborstämmen reproduzierbar gezeigt werden.

Das erarbeitete Zellkultursystem wurde dann zur Evaluierung verschiedener Gene eingesetzt. Zunächst wurden zwei neue Ansätze für die HIV-Gentherapie getestet. Die hohe Wirksamkeit von APOBEC3G_{agm} gegen HIV-1, die zuvor in einem „single-round“-Infektionssystem gezeigt worden war, konnte bestätigt werden. Der Versuch, das als natürlicher HIV-Inhibitor in humanem Hämofiltrat gefundene Peptid VIRIP auf der Zelloberfläche zu exprimieren, bewirkte hingegen keine HIV-Hemmung.

Zusätzlich wurden mehrere potentiell therapeutische Gene getestet, die von Kooperationspartnern im Rahmen eines HIV-Netzwerkes entwickelt worden waren. Für die humanisierte transdominant-negative Gag-Mutante TDsgΔ2 konnte eine HIV-Hemmwirkung nachgewiesen werden, während weder die Wildtyp-Mutante TDwtΔ2

noch das minimale Gag-Fragment L2GAL2-V3 eine signifikante Wirkung zeigten. Für die beiden HIV-1 p6-Konstrukte L4 und L6 war eine HIV-Hemmung ebensowenig wie für die gp41 c-tail-Konstrukte 9/1 und 9/2 feststellbar.

In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich die Hemmwirkung der unterschiedlichen Gene gegen HIV-1-Primärisolate im wesentlichen der gegen die Laborstämme entspricht. Nach Infektion der Zelllinien mit HIV-2 wurde wie erwartet die Virusreplikation nur durch STHM und TDsg Δ 2 gehemmt.

Schließlich wurde getestet, ob sich die Hemmeffekte auch in primären humanen Lymphozyten nachvollziehen lassen. Obwohl aufgrund der in diesen Zellen niedrigen erreichbaren Transduktionseffizienzen und einer starken Donorabhängigkeit keine Standardisierung möglich war, konnte gezeigt werden, daß es prinzipiell möglich ist, Hemmeffekte sichtbar zu machen.

6 Literaturverzeichnis

- Achong, B. G., P. W. Mansell, M. A. Epstein, and P. Clifford. 1971.** An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 46:299-307.
- Allan, J. S., M. Short, M. E. Taylor, S. Su, V. M. Hirsch, P. R. Johnson, G. M. Shaw, and B. H. Hahn. 1991.** Species-specific diversity among simian immunodeficiency viruses from African green monkeys. *J. Virol.* 65:2816-2828.
- Baltimore, D. 1970.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 226:1209-1211.
- Baltimore, D. 1988.** Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* 335:395-396.
- Barin, F., S. M'Boup, F. Denis, P. Kanki, J. S. Allan, T. H. Lee, and M. Essex. 1985.** Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of west Africa. *Lancet* 2:1387-1389.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dautet, 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.
- Berchtold, S., J. Ries, U. Hornung, and C. Aepinus. 1994.** Exchange of functional domains between Rev proteins of HIV-1 and SIVmac239 results in a dominant negative phenotype. *Virology* 204:436-441.
- Berger, E. A., P. M. Murphy, and J. M. Farber. 1999.** Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 17:657-700.
- 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.
- Blattner, W. A., T. R. O'Brien, and N. E. Mueller. 1997.** Retroviruses - Human Immunodeficiency Virus, pp. 713-783 In Evans AS and Kaslow RA [eds.], *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. Plenum Medical Book Company, New York.
- Bock, P. J. and D. M. Markovitz. 2001.** Infection with HIV-2. *AIDS* 15 Suppl 5:S35-S45.
- Bonyhadi, M. L., K. Moss, A. Voytovich, J. Auten, C. Kalfoglou, I. Plavec, S. Forestell, L. Su, E. Bohnlein, and H. Kaneshima. 1997.** RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 71:4707-4716.

- Bradford, M. M. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brennan, R. O. and D. T. Durack. 1981.** Gay compromise syndrome. *Lancet* 2:1338-1339.
- Burns, J. C., T. Friedmann, W. Driever, M. Burrascano, and J. K. Yee. 1993.** Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:8033-8037.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, B. G. de Saint, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist, and A. Fischer. 2000.** Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288:669-672.
- Chakrabarti, L., M. Guyader, M. Alizon, M. D. Daniel, R. C. Desrosiers, P. Tiollais, and P. Sonigo. 1987.** Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 328:543-547.
- Chen, Z., P. Telfier, A. Gettie, P. Reed, L. Zhang, D. D. Ho, and P. A. Marx. 1996.** Genetic characterization of new West African simian immunodeficiency virus SIVsm: geographic clustering of household-derived SIV strains with human immunodeficiency virus type 2 subtypes and genetically diverse viruses from a single feral sooty mangabey troop. *J. Virol.* 70:3617-3627.
- Clavel, F., M. Guyader, D. Guetard, M. Salle, L. Montagnier, and M. Alizon. 1986a.** Molecular cloning and polymorphism of the human immune deficiency virus type 2. *Nature* 324:691-695.
- 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 . 1986b.** Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 233:343-346.
- Coffin, J. M., S. H. Hughes, and H. E. Varmus. 1997.** *Retroviruses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Connor, R. I., B. K. Chen, S. Choe, and N. R. Landau. 1995.** Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology* 206:935-944.
- Cooper, D. A., J. Gold, P. Maclean, B. Donovan, R. Finlayson, T. G. Barnes, H. M. Michelmores, P. Brooke, and R. Penny. 1985.** Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion. *Lancet* 1:537-540.

- Corbet, S., M. C. Muller-Trutwin, P. Versmisse, S. Delarue, A. Ayouba, J. Lewis, S. Brunak, P. Martin, F. Brun-Vezinet, F. Simon, F. Barre-Sinoussi, and P. Mauclore. 2000.** env sequences of simian immunodeficiency viruses from chimpanzees in Cameroon are strongly related to those of human immunodeficiency virus group N from the same geographic area. *J. Virol.* 74:529-534.
- Cordelier, P. and D. S. Strayer. 2003.** Conditional expression of alpha1-antitrypsin delivered by recombinant SV40 vectors protects lymphocytes against HIV. *Gene Ther.* 10:2153-2156.
- Cordelier, P., M. A. Zern, and D. S. Strayer. 2003a.** HIV-1 proprotein processing as a target for gene therapy. *Gene Ther.* 10:467-477.
- Cordelier, P., B. Morse, and D. S. Strayer. 2003b.** Targeting CCR5 with siRNAs: using recombinant SV40-derived vectors to protect macrophages and microglia from R5-tropic HIV. *Oligonucleotides.* 13:281-294.
- Danos, O. and R. C. Mulligan. 1988.** Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85:6460-6464.
- Dean, M., M. Carrington, C. Winkler, G. A. Huttley, M. W. Smith, R. Allikmets, J. J. Goedert, S. P. Buchbinder, E. Vittinghoff, E. Gomperts, S. Donfield, D. Vlahov, R. Kaslow, A. Saah, C. Rinaldo, R. Detels, and S. J. O'Brien. 1996.** Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-1862.
- Demirov, D. G., J. M. Orenstein, and E. O. Freed. 2002.** The late domain of human immunodeficiency virus type 1 p6 promotes virus release in a cell type-dependent manner. *J. Virol.* 76:105-117.
- Dillon, P. J., P. Nelbock, A. Perkins, and C. A. Rosen. 1991.** Structural and functional analysis of the human immunodeficiency virus type 2 Rev protein. *J. Virol.* 65:445-449.
- DuBridge, R. B., P. Tang, H. C. Hsia, P. M. Leong, J. H. Miller, and M. P. Calos. 1987.** Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell Biol.* 7:379-387.
- Egelhofer, M., G. Brandenburg, H. Martinius, P. Schult-Dietrich, G. Melikyan, R. Kunert, C. Baum, I. Choi, A. Alexandrov, and D. von Laer. 2004.** Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* 78:568-575.
- Escaich, S., C. Kalfoglou, I. Plavec, S. Kaushal, J. D. Mosca, and E. Bohnlein. 1995.** RevM10-mediated inhibition of HIV-1 replication in chronically infected T cells. *Hum. Gene Ther.* 6:625-634.

- Espinosa, R., III, T. Funahashi, C. Hadjiagapiou, M. M. Le Beau, and N. O. Davidson. 1994.** Assignment of the gene encoding the human apolipoprotein B mRNA editing enzyme (APOBEC1) to chromosome 12p13.1. *Genomics* 24:414-415.
- Fauci, A. S. and H. C. Lane. 1991.** The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), pp. 1402-1410 *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill, New York.
- Fitzon, T., B. Leschonsky, K. Bieler, C. Paulus, J. Schroder, H. Wolf, and R. Wagner. 2000.** Proline residues in the HIV-1 NH₂-terminal capsid domain: structure determinants for proper core assembly and subsequent steps of early replication. *Virology* 268:294-307.
- Frankel, A. D. and J. A. Young. 1998.** HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* 67:1-25.
- Freed, E. O. 2001.** HIV-1 replication. *Somat. Cell Mol. Genet.* 26:13-33.
- Freed, E. O. 2002.** Viral late domains. *J. Virol.* 76:4679-4687.
- Freed, E. O. 2004.** HIV-1 and the host cell: an intimate association. *Trends Microbiol.* 12:170-177.
- Gallo, R. C., P. S. Sarin, E. P. Gelmann, M. Robert-Guroff, E. Richardson, V. S. Kalyanaraman, D. Mann, G. D. Sidhu, R. E. Stahl, S. Zolla-Pazner, J. Leibowitch, and M. Popovic. 1983.** Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-867.
- 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 troglodytes*. *Nature* 397:436-441.
- Garrett, E. D. and B. R. Cullen. 1992.** Comparative analysis of Rev function in human immunodeficiency virus types 1 and 2. *J. Virol.* 66:4288-4294.
- Geyer, M. and O. Fackler. 2002.** Der Aktivität des Nef-Proteins auf der Spur. *Neue Strategien für die Bekämpfung von HIV. Biologie in unserer Zeit* 32:90-100.
- Gottlieb, M. S., R. Schroff, H. M. Schanker, J. D. Weisman, P. T. Fan, R. A. Wolf, and A. Saxon. 1981.** *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 305:1425-1431.
- Gottlinger, H. G., T. Dorfman, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1991.** Effect of mutations affecting the p6 gag protein on human immunodeficiency virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88:3195-3199.
- Graf, M., A. Bojak, L. Deml, K. Bieler, H. Wolf, and R. Wagner. 2000.** Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for Rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression. *J. Virol.* 74:10822-10826.

- Greene, W. C. and B. M. Peterlin. 2002.** Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy. *Nat. Med.* 8:673-680.
- Habu, Y., N. Miyano-Kurosaki, M. Kitano, Y. Endo, M. Yukita, S. Ohira, H. Takaku, M. Nashimoto, and H. Takaku. 2005.** Inhibition of HIV-1 gene expression by retroviral vector-mediated small-guide RNAs that direct specific RNA cleavage by tRNase ZL. *Nucleic Acids Res.* 33:235-243.
- 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.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, and P. M. Sharp. 2000.** AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science* 287:607-614.
- Hanahan, D. 1983.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
- Harris, R. S., K. N. Bishop, A. M. Sheehy, H. M. Craig, S. K. Petersen-Mahrt, I. N. Watt, M. S. Neuberger, and M. H. Malim. 2003.** DNA deamination mediates innate immunity to retroviral infection. *Cell* 113:803-809.
- 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.* 75:3038-3042.
- 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* 339:389-392.
- Holmes, E. C. 2001.** On the origin and evolution of the human immunodeficiency virus (HIV). *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 76:239-254.
- Holtkamp, N., A. Otteken, S. Findhammer, V. Miller, R. Kurth, and A. Werner. 2000.** Unexpected coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates from viremic patients under highly active antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis.* 181:513-521.
- Hotchkiss, G., C. Maijgren-Steffensson, and L. Ahrlund-Richter. 2004.** Efficacy and mode of action of hammerhead and hairpin ribozymes against various HIV-1 target sites. *Mol. Ther.* 10:172-180.
- Huet, T., R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, and S. Wain-Hobson. 1990.** Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 345:356-359.

- Jarmuz, A., A. Chester, J. Bayliss, J. Gisbourne, I. Dunham, J. Scott, and N. Navaratnam. 2002.** An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* 79:285-296.
- Kanki, P. J., F. Barin, S. M'Boup, J. S. Allan, J. L. Romet-Lemonne, R. Marlink, M. F. McLane, T. H. Lee, B. Arbeille, F. Denis, and . 1986.** New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* 232:238-243.
- Kanki, P. J. 1991.** Biologic features of HIV-2. An update. *AIDS Clin. Rev.* 17-38.
- Kanki, P. J., K. U. Travers, S. MBoup, C. C. Hsieh, R. G. Marlink, A. Gueye-NDiaye, T. Siby, I. Thior, M. Hernandez-Avila, J. L. Sankale, and . 1994.** Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343:943-946.
- Kawamura, M., R. Shimano, T. Ogasawara, R. Inubushi, K. Amano, H. Akari, and A. Adachi. 1998.** Mapping the genetic determinants of human immunodeficiency virus type 2 for cell tropism and replication efficiency. *Arch. Virol.* 143:513-521.
- Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, 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.
- Laemmli, U. K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lam, J. S., M. E. Reeves, R. Cowherd, S. A. Rosenberg, and P. Hwu. 1996.** Improved gene transfer into human lymphocytes using retroviruses with the gibbon ape leukemia virus envelope. *Hum. Gene Ther.* 7:1415-1422.
- Lee, M. T., G. A. Coburn, M. O. McClure, and B. R. Cullen. 2003.** Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J. Virol.* 77:11964-11972.
- Levy-Mintz, P., L. Duan, H. Zhang, B. Hu, G. Dornadula, M. Zhu, J. Kulkosky, D. Bizub-Bender, A. M. Skalka, and R. J. Pomerantz. 1996.** Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* 70:8821-8832. **Erratum: 2001.** *J. Virol.* 75: 1092-1093
- Li Y, Starr SE, Lisziewicz J, and Ho WZ. 2000.** Inhibition of HIV-1 replication in chronically infected cell lines and peripheral blood mononuclear cells by retrovirus-mediated antitarget gene transfer. *Gene Ther.* 7:321-328.
- Liu, R., W. A. Paxton, S. Choe, D. Ceradini, S. R. Martin, R. Horuk, M. E. MacDonald, H. Stuhlmann, R. A. Koup, and N. R. Landau. 1996.** Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 86:367-377.

- Lori, F., P. Guallini, L. Galluzzi, and J. Lisziewicz. 2002.** Gene therapy approaches to HIV infection. *Am. J. Pharmacogenomics.* 2:245-252.
- Lusso, P., F. Cocchi, C. Balotta, P. D. Markham, A. Louie, P. Farci, R. Pal, R. C. Gallo, and M. S. Reitz, Jr. 1995.** Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* 69:3712-3720.
- Malim, M. H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B. R. Cullen. 1989a.** Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell* 58:205-214.
- Malim, M. H., S. Bohnlein, R. Fenrick, S. Y. Le, J. V. Maizel, and B. R. Cullen. 1989b.** Functional comparison of the Rev trans-activators encoded by different primate immunodeficiency virus species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:8222-8226.
- Mariani, R., D. Chen, B. Schrofelbauer, F. Navarro, R. Konig, B. Bollman, C. Munk, H. Nymark-McMahon, and N. R. Landau. 2003.** Species-specific exclusion of APOBEC3G from HIV-1 virions by Vif. *Cell* 114:21-31.
- Martinez, M. A., A. Gutierrez, M. Armand-Ugon, J. Blanco, M. Parera, J. Gomez, B. Clotet, and J. A. Este. 2002.** Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 16:2385-2390.
- Mautino, M. R. and R. A. Morgan. 2002.** Enhanced inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by novel lentiviral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 envelope antisense RNA. *Hum. Gene Ther.* 13:1027-1037.
- McCune, J. M., R. Namikawa, H. Kaneshima, L. D. Shultz, M. Lieberman, and I. L. Weissman. 1988.** The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-1639.
- McDonald, D., M. A. Vodicka, G. Lucero, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, M. Emerman, and T. J. Hope. 2002.** Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J. Cell Biol.* 159:441-452.
- McLachlin, J. R., K. Cornetta, M. A. Eglitis, and W. F. Anderson. 1990.** Retroviral-mediated gene transfer. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 38:91-135.
- Modrow, S. and D. Falke. 1998.** *Molekulare Virologie*, 1. korrigierter Nachdruck ed. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Muller, M. C., N. K. Saksena, E. Nerrienet, C. Chappey, V. M. Herve, J. P. Durand, P. Legal-Campodonico, M. C. Lang, J. P. Digoutte, A. J. Georges, and . 1993.** Simian immunodeficiency viruses from central and western Africa: evidence for a new species-specific lentivirus in tantalus monkeys. *J. Virol.* 67:1227-1235.

- Murakami, T. and N. Yamamoto. 2000.** Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.* 72:412-417.
- Muto, T., M. Muramatsu, M. Taniwaki, K. Kinoshita, and T. Honjo. 2000.** Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* 68:85-88.
- Münch, J., L. Stänker, D. Willbold, S. Pöhlmann, O. Rosorius, R. H. Stauber, T. Stangler, E. Bucci, K. Adermann, P. Kreutzmann, W.-G. Forssmann, and F. Kirchhoff. 2002.** A natural 20-residue C-proximal fragment of alpha-1-Antitrypsin is a potent HIV-1 fusion-inhibitor, pp. 236 GfV Jahrestagung, Erlangen.
- Namikawa, R., H. Kaneshima, M. Lieberman, I. L. Weissman, and J. M. McCune. 1988.** Infection of the SCID-hu mouse by HIV-1. *Science* 242:1684-1686.
- Niedrig, M., H. P. Harthus, M. Broker, R. Meloen, H. Gelderblom, and G. Pauli. 1993.** Characterization of murine monoclonal antibodies directed against the submembrane protein p17 of HIV-1. *Hybridoma* 12:431-439.
- O'Brien, S. J. and J. P. Moore. 2000.** The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* 177:99-111.
- Ory, D. S., B. A. Neugeboren, and R. C. Mulligan. 1996.** A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:11400-11406.
- Parkin, N. T. and J. M. Schapiro. 2004.** Antiretroviral drug resistance in non-subtype B HIV-1, HIV-2 and SIV. *Antivir. Ther.* 9:3-12.
- Paul, C. P., P. D. Good, S. X. Li, A. Kleihauer, J. J. Rossi, and D. R. Engelke. 2003.** Localized expression of small RNA inhibitors in human cells. *Mol. Ther.* 7:237-247.
- Peeters, M., C. Honore, T. Huet, L. Bedjabaga, S. Ossari, P. Bussi, R. W. Cooper, and E. Delaporte. 1989.** Isolation and partial characterization of an HIV-related virus occurring naturally in chimpanzees in Gabon. *AIDS* 3:625-630.
- Plavec, I., M. Agarwal, K. E. Ho, M. Pineda, J. Auten, J. Baker, H. Matsuzaki, S. Escaich, M. Bonyhadi, and E. Bohnlein. 1997.** High transdominant RevM10 protein levels are required to inhibit HIV-1 replication in cell lines and primary T cells: implication for gene therapy of AIDS. *Gene Ther.* 4:128-139.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 1980.** Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77:7415-7419.
- Poluri, A., M. van Maanen, and R. E. Sutton. 2003.** Genetic therapy for HIV/AIDS. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 3:951-963.

- Poveda, E., B. Rodes, C. Toro, and V. Soriano. 2004.** Are fusion inhibitors active against all HIV variants? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 20:347-348.
- Pschyrembel. 1998.** *Klinisches Wörterbuch*, 258. Auflage ed. Walter de Gruyter, Berlin.
- Qin, X. F., D. S. An, I. S. Chen, and D. Baltimore. 2003.** Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:183-188.
- Rabin, L., M. Hincenbergs, M. B. Moreno, S. Warren, V. Linquist, R. Datema, B. Charpiot, J. Seifert, H. Kaneshima, and J. M. McCune. 1996.** Use of standardized SCID-hu Thy/Liv mouse model for preclinical efficacy testing of anti-human immunodeficiency virus type 1 compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:755-762.
- Reddy, T. R., G. Kraus, O. Yamada, D. J. Looney, M. Suhasini, and F. Wong-Staal. 1995.** Comparative analyses of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and HIV-2 Vif mutants. *J. Virol.* 69:3549-3553.
- Reeves, J. D. and R. W. Doms. 2002.** Human immunodeficiency virus type 2. *J. Gen. Virol.* 83:1253-1265.
- Ribeiro, A. C., Maia e Silva, M. Santa-Marta, A. Pombo, J. Moniz-Pereira, J. Goncalves, and I. Barahona. 2005.** Functional analysis of Vif protein shows less restriction of human immunodeficiency virus type 2 by APOBEC3G. *J. Virol.* 79:823-833.
- Rimsky, L. T., D. C. Shugars, and T. J. Matthews. 1998.** Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* 72:986-993.
- Rosenzweig, M., D. F. Marks, D. Hempel, J. Lisziewicz, and R. P. Johnson. 1997.** Transduction of CD34+ hematopoietic progenitor cells with an antitumor gene protects T-cell and macrophage progeny from AIDS virus infection. *J. Virol.* 71:2740-2746.
- Rous, P. 1911.** A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13:397-411.
- Rubbert, A. 2005.** Pathophysiologie der HIV-Infektion, In C. Hoffmann, J. Rockstroh, and B. S. Kamps [eds.], *HIV.NET* 2005.
- Ryu, J. R., B. S. Jin, M. J. Suh, Y. S. Yoo, S. H. Yoon, E. R. Woo, and Y. G. Yu. 1999.** Two interaction modes of the gp41-derived peptides with gp41 and their correlation with antimembrane fusion activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265:625-629.
- Salahuddin, S. Z., P. D. Markham, F. Wong-Staal, G. Franchini, V. S. Kalyanaraman, and R. C. Gallo. 1983.** Restricted expression of human T-cell leukemia-lymphoma virus (HTLV) in transformed human umbilical cord blood lymphocytes. *Virology* 129:51-64.

- Samson, M., F. Libert, B. J. Doranz, J. Rucker, C. Liesnard, C. M. Farber, S. Saragosti, C. Lapoumeroulie, J. Cognaux, C. Forceille, G. Muyldermans, C. Verhofstede, G. Burtonboy, M. Georges, T. Imai, S. Rana, Y. Yi, R. J. Smyth, R. G. Collman, R. W. Doms, G. Vassart, and M. Parmentier. 1996.** Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 382:722-725.
- Scherr, M., K. Battmer, U. Blomer, B. Schiedlmeier, A. Ganser, M. Grez, and M. Eder. 2002.** Lentiviral gene transfer into peripheral blood-derived CD34+ NOD/SCID-repopulating cells. *Blood* 99:709-712.
- Schim van der Loeff MF and P. Aaby. 1999.** Towards a better understanding of the epidemiology of HIV-2. *AIDS* 13 Suppl A:S69-S84.
- Schmitt, I. 2002.** Optimierung des CD4-spezifischen Gentransfers in primäre humane T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Hinblick auf die Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS, Dissertation. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt/Main.
- Schroder, A. R., P. Shinn, H. Chen, C. Berry, J. R. Ecker, and F. Bushman. 2002.** HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell* 110:521-529.
- Shapiro, L., G. B. Pott, and A. H. Ralston. 2001.** Alpha-1-antitrypsin inhibits human immunodeficiency virus type 1. *FASEB J.* 15:115-122.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, J. D. Choi, and M. H. Malim. 2002.** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature* 418:646-650.
- Sheehy, A. M., N. C. Gaddis, and M. H. Malim. 2003.** The antiretroviral enzyme APOBEC3G is degraded by the proteasome in response to HIV-1 Vif. *Nat. Med.* 9:1404-1407.
- Sista, P. R., T. Melby, D. Davison, L. Jin, S. Mosier, M. Mink, E. L. Nelson, R. DeMasi, N. Cammack, M. P. Salgo, T. J. Matthews, and M. L. Greenberg. 2004.** Characterization of determinants of genotypic and phenotypic resistance to enfuvirtide in baseline and on-treatment HIV-1 isolates. *AIDS* 18:1787-1794.
- Smith, S. M. 2002.** HIV vaccine development in the nonhuman primate model of AIDS. *J. Biomed. Sci.* 9:100-111.
- Smythe, J. A., D. Sun, M. Thomson, P. D. Markham, M. S. Reitz, Jr., R. C. Gallo, and J. Lisziewicz. 1994.** A Rev-inducible mutant gag gene stably transferred into T lymphocytes: an approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:3657-3661.
- 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.* 23:628-633.

- Southern, E. M. 1975.** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- 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.
- Strachan, T. and A. Read. 1999.** Gene therapy and other molecular genetic-based therapeutic approaches, *Human Molecular Genetics 2*. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford.
- Stremlau, M., C. M. Owens, M. J. Perron, M. Kiessling, P. Autissier, and J. Sodroski. 2004.** The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848-853.
- Temin, H. M. and S. Mizutani. 1970.** RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 226:1211-1213.
- Tewari, D., A. L. Notkins, and P. Zhou. 2003.** Inhibition of HIV-1 replication in primary human T cells transduced with an intracellular anti-HIV-1 p17 antibody gene. *J. Gene Med.* 5:182-189.
- Tindall, B. and D. A. Cooper. 1991.** Primary HIV infection: host responses and intervention strategies. *AIDS* 5:1-14.
- Touraine, J. L., K. Sanhadji, and R. Sembeil. 2003.** Gene therapy for human immunodeficiency virus infection in the humanized SCID mouse model. *Isr. Med. Assoc. J.* 5:863-867.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76:4350-4354.
- Turelli, P., B. Mangeat, S. Jost, S. Vianin, and D. Trono. 2004.** Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303:1829.
- Vanden Haesevelde, M. M., M. Peeters, G. Jannes, W. Janssens, G. G. van der, P. M. Sharp, and E. Saman. 1996.** Sequence analysis of a highly divergent HIV-1-related lentivirus isolated from a wild captured chimpanzee. *Virology* 221:346-350.
- von Poblitzki, A., R. Wagner, M. Niedrig, G. Wanner, H. Wolf, and S. Modrow. 1993.** Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation. *Virology* 193:981-985.
- Wagner, R., L. Deml, H. Fliessbach, G. Wanner, and H. Wolf. 1994.** Assembly and extracellular release of chimeric HIV-1 Pr55gag retrovirus-like particles. *Virology* 200:162-175.

- Wagner, R., M. Graf, K. Bieler, H. Wolf, T. Grunwald, P. Foley, and K. Uberla. 2000.** Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus: implications for the safety of lentiviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 11:2403-2413.
- Wei, X., J. M. Decker, H. Liu, Z. Zhang, R. B. Arani, J. M. Kilby, M. S. Saag, X. Wu, G. M. Shaw, and J. C. Kappes. 2002.** Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:1896-1905.
- Whitcomb, J. M., N. T. Parkin, C. Chappey, N. S. Hellmann, and C. J. Petropoulos. 2003.** Broad nucleoside reverse-transcriptase inhibitor cross-resistance in human immunodeficiency virus type 1 clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 188:992-1000.
- Wild, C., T. Greenwell, D. Shugars, L. Rimsky-Clarke, and T. Matthews. 1995.** The inhibitory activity of an HIV type 1 peptide correlates with its ability to interact with a leucine zipper structure. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11:323-325.
- Wild, C. T., D. C. Shugars, T. K. Greenwell, C. B. McDanal, and T. J. Matthews. 1994.** Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91:9770-9774.
- Witvrouw, M., C. Pannecouque, W. M. Switzer, T. M. Folks, E. De Clercq, and W. Heneine. 2004.** Susceptibility of HIV-2, SIV and SHIV to various anti-HIV-1 compounds: implications for treatment and postexposure prophylaxis. *Antivir. Ther.* 9:57-65.
- Xu, H., E. S. Svarovskaia, R. Barr, Y. Zhang, M. A. Khan, K. Strebel, and V. K. Pathak. 2004.** A single amino acid substitution in human APOBEC3G antiretroviral enzyme confers resistance to HIV-1 virion infectivity factor-induced depletion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:5652-5657.
- Yap, M. W., S. Nisole, C. Lynch, and J. P. Stoye. 2004.** Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:10786-10791.
- Yee, J. K., T. Friedmann, and J. C. Burns. 1994.** Generation of high-titer pseudotyped retroviral vectors with very broad host range. *Methods Cell Biol.* 43 Pt A:99-112.
- Yu, M., J. Ojwang, O. Yamada, A. Hampel, J. Rapaport, D. Looney, and F. Wong-Staal. 1993.** A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:6340-6344.
- Yu, Q., N. R. Landau, and R. König. 2003.** Vif and the Role of Antiviral Cytidine Deaminases in HIV-1 Replication, HIV Database Review Articles.
- Zabransky, A., E. Hunter, and M. Sakalian. 2002.** Identification of a minimal HIV-1 gag domain sufficient for self-association. *Virology* 294:141-150.

- Zhang, J. and D. M. Webb. 2004.** Rapid evolution of primate antiviral enzyme APOBEC3G. *Hum. Mol. Genet.* 13:1785-1791.
- Zheng, Y. H., D. Irwin, T. Kurosu, K. Tokunaga, T. Sata, and B. M. Peterlin. 2004.** Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J. Virol.* 78:6073-6076.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
agm	Afrikanische Grüne Meerkatze
AID	Aktivitätsinduzierte Deaminase
AIDS	“Acquired Immuno-Deficiency Syndrome”
APOBEC3G	“apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3G”
APS	Ammoniumpersulfat
Bob	“Brother of Bonzo“, Chemokinrezeptor
Bonzo	Chemokinrezeptor der CC-Familie
BSA	Bovines Serum-Albumin
CA	Kapsid-Protein
CD	“Cluster of Differentiation”
CIP	“Calf Intestine Phosphatase“
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	“Enhanced Chemi-Luminescence”
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	“Enhanced Green Fluorescent Protein“
EMCV	Encephalomyocarditis-Virus
Env	retrovirales Hüllprotein
<i>env</i>	“envelope“, für das retrovirale Hüllprotein kodierendes Gen
FACS	“Fluorescence Activated Cell Sorter”
FCS	Fötale Kälberserum
Gag	Genprodukt des <i>gag</i> -Gens
<i>gag</i>	“group-specific antigens“, für die inneren Strukturproteine kodierendes Gen
GaLV	Gibbonaffen Leukämie Virus
gp	Glykoprotein
h	Stunde

HAART	“Highly Active Anti-Retroviral Therapy“
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR1	N-terminales Heptad repeat des gp41
HR2	C-terminales Heptad repeat des gp41
HTLV	Humanes T-Zell Leukämie Virus
IN	Integrase
IRES	“Internal Ribosomal Entry Site“
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani
LTR	“Long Terminal Repeat“
Luc	Luciferase
M	molar
MA	Matrix-Protein von HIV
mA	Milli-Ampere
MACS	“magnetic cell sorting“, magnetische Zellsortierung
MLV	Murines Leukämie Virus
MOI	“multiplicity of infection“
MPSV	Myelo-Proliferatives Sarkom-Virus
mRNA	“messenger RNA“
NC	Nucleokapsid-Protein
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBMC	“peripheral blood mononuclear cells“, mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	“phosphate buffered saline“
PCR	“polymerase chain reaction“, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
<i>pol</i>	„polymerase“, für die viralen Enzyme kodierendes Gen
Pol	Genprodukt des <i>pol</i> -Gens
PR	Protease
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	“revolutions per minute”, Umdrehungen pro Minute
RRE	“Rev responsive element”
RT	Reverse Transkriptase
SCID	“Severe Combined Immunodeficiency“
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	“small inhibitory RNA“
SIV	Simianes Immundefizienzvirus
smm	Schopfmangabe
STHM	membrangebundenes, verlängertes T20
SVHM	membrangebundenes VIRIP
TCID ₅₀	“tissue culture infectious dose 50%“
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
VSV-G	Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis Virus
wPRE	“woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element”
Ψ	Verpackungssignal

Danksagung

Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich an erster Stelle für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung am Paul-Ehrlich-Institut in Langen unter besten Arbeitsbedingungen anzufertigen.

Prof. Dr. Herbert Zimmermann danke ich für die freundliche, fachübergreifende Betreuung von universitärer Seite.

PD Dr. Matthias Schweizer, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand, gilt mein Dank für seine fachliche Betreuung, Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Dr. Silke Schüle danke ich für ihre beständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung, Dr. Carsten Münk für die Bereitstellung des APOBEC3G_{agm} und die hilfreichen und interessanten Diskussionen.

Sylvia Raupp gilt mein Dank für die experimentelle Unterstützung, insbesondere bei der Virusanzucht und den Belastungsversuchen.

Den Teilnehmern des HIV-Netzwerkes, besonders Prof. Dr. Dorothee von Laer danke ich für das zur Verfügung gestellte Material.

Tefik Merovci danke ich für die freundliche Hilfe beim Sortieren der Zellen.

Herzlich danken möchte ich allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung 6, die sowohl fachlich als auch menschlich eine große Bereicherung für mich waren.

Für seine außergewöhnliche Hilfsbereitschaft, insbesondere bei der Bewältigung von Computerproblemen, danke ich Matthias Hamdorf.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, ohne deren Unterstützung weder das Studium noch diese Arbeit möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sabine Fengler
Geburtsdatum	11.09.1976
Geburtsort	Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1982 – 1986	Grundschule (Käthe-Kollwitz-Schule, Frankfurt/M.)
1986 – 1992	Gymnasium (Helene-Lange-Schule, Frankfurt/M.)
1992 – 1995	Gymnasiale Oberstufe, Abschluß: Abitur (Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt/M.)

Hochschulausbildung

1995 – 2000	Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/M., Hauptfach: Zoologie
01/2000 – 09/2000	Diplomarbeit mit dem Thema „ <i>Klonierung und funktionelle Charakterisierung neuer Mitglieder der E-NTPDase-Familie</i> “, angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Zimmermann im Arbeitskreis Neurochemie des Zoologischen Instituts der Johann Wolfgang Goethe-Universität
11/2000 – 05/2001	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Humangenetischen Institut des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
ab 06/2001	Promotion mit dem Thema „ <i>Analyse verschiedener HIV-inhibierender Gene nach retroviralem Gentransfer</i> “, angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Cichutek in der Abteilung „Medizinische Biotechnologie“ am Paul-Ehrlich-Institut in Langen

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorgelegte Dissertation über „*Analyse verschiedener HIV-inhibierender Gene nach retroviralem Gentransfer*“ selbständig angefertigt habe und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 14.03.2005

Sabine Fengler