

Entwicklung neuer retroviraler Vektoren für die Gentherapie der HIV-Infektion

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Marc Andreas Egelhofer
(Frankenthal/Pfalz)

Frankfurt am Main, 2004
(DF1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Schwalbe

Erstgutachter: Prof. J. Engels

Zweitgutachter: Prof. D. von Laer

Datum der Disputation: 24. März 2004

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Georg Speyer Haus in Frankfurt am Main erstellt.

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

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. D. von Laer für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit unter ihrer Anleitung meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Neben ihrer umfassenden wissenschaftlichen Betreuung unterstützte sie mich stets durch Hilfestellung in allen wissenschaftlichen und technischen Belangen sowie durch ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich auch ganz herzlich den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, Holger Martinius, Gunda Brandenburg, Roland Zahn, Patricia Schult-Dietrich, Felix Herrmann, Yvonne Fischer, Ingrid Choi, Tsanan Giroglu und Tefik Merovci für die gute Zusammenarbeit und ihre Unterstützung meiner Forschungsarbeiten durch wertvolle Anregungen, ihre stete Ansprechbarkeit, Diskussionsbereitschaft und Hilfestellung bei der Lösung von Problemen.

Besonderer Dank gelten Herrn Holger Martinius für die große Unterstützung in der Zellkultur und Frau Gunda Brandenburg für wertvolle Hinweise beim Anfertigen dieser Arbeit.

Herrn Prof. Melikyan und Herrn Prof. Cohen danke ich für ihre Einladung an das „Department of Biophysics and Physiology“ der Rush University in Chicago, IL, und die Unterstützung ihrer Arbeitsgruppe bei der Einarbeitung in die Methode der Zell-Zellfusionsassays.

Schließlich möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie für die moralische Unterstützung während der Promotionszeit danken.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung		1
<hr/>		
1.	Einleitung	3
<hr/>		
1.1	HIV und AIDS	3
1.2	Struktureller Aufbau von HIV-1	4
1.3	Der Replikationszyklus von HIV	5
1.4	Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle	8
1.5	Die klassische Form der HIV-Therapie: HAART	10
1.6	Eine neue Klasse von antiretroviralen Substanzen: Eintrittsinhibitoren	12
1.6.1	„Attachment“-Inhibitoren	12
1.6.2	Korezeptor-Antagonisten	12
1.6.3	Fusionsinhibitoren	13
1.7	Gentherapie von HIV	14
1.8	Vektoren in der Gentherapie	16
1.8.1.	Retrovirale Vektoren	17
1.8.2	Lentivirale Vektoren	18
1.9	Der retrovirale Vektor M87-Ineo zur Gentherapie der HIV-Infektion	18
1.10	Zielsetzung der Arbeit	19
2.	Material & Methoden	21
<hr/>		
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	21
2.1.2	Verwendete Kits	21
2.1.3	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	22
2.1.4	Oligonucleotide	23
2.1.5	Enzyme	24
2.1.6	Antikörper	24
2.1.7	Plasmide	25
2.1.8	Bakterien	26
2.1.9	Zelllinien	27
2.1.10.	Geräte	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Gentechnische Methoden	29
2.2.1.1	Kultivierung und Konservierung von Escherichia coli	29
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Escherichia coli	29
2.2.1.3	Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen	29

2.2.1.4	Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA-Enden mittels Phosphatasen	30
2.2.1.5	Phosphorylierung von DNA	30
2.2.1.6	Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow Polymerase	31
2.2.1.7	Gelelektrophorese von DNA	31
2.2.1.8	Isolierung von DNA aus Gelen	32
2.2.1.9	Genamplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion	32
2.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	33
2.2.1.11	Ligation von PCR-Produkten in TOPO pCR1-Vektoren	34
2.2.1.12	Herstellung kompetenter Zellen mit Escherichia coli	34
2.2.1.13	Transformation von Escherichia coli mit Plasmid-DNA	35
2.2.1.14	Sequenzierung von DNA	35
2.2.2	Zellkulturmethoden	36
2.2.2.1	Kultivierung und Konservierung von Zelllinien	36
2.2.2.2	Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren	37
2.2.2.3	Transiente Transfektion zur Produktion HIV Env pseudotypisierter lentiviraler Vektoren	37
2.2.2.4	Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen	38
2.2.2.5	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	38
2.2.2.6	FACS-Sorting	40
2.2.2.7	Infektion von Zelllinien mit HIV	40
2.2.2.8	ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen	40
2.2.2.9	„Single-round infection“ mit HIV-Pseudotypisierten Viren	41
2.2.2.10	Herstellung replikationskompetenter Viren	41
2.2.2.11	Bestimmung der Virustiter mit der TCID50-Methode	42
2.2.2.12	Bestimmung der Virustiter mittels intrazellulärer p24-Färbung	42
2.2.2.13	Zell-Zellfusionsassays	43

3. Ergebnisse 45

3.1	Strategien zur Optimierung von M87-Ineo	45
3.2	Reduktion der Immunogenität durch Substitution des flexiblen Linkers	47
3.2.1.	Klonierung der Vektorkonstrukte mit den Linkervarianten	48
3.2.2.	Einfluss des Linkertyps auf Expression und inhibitorische Wirkung des Fusionshemmers C36	49
3.3	Substitution des ΔLNGFR-Membranankers	51
3.3.1.	Klonierung des Vektorkonstruktes mit der tCD34-Transmembrandomäne	52
3.3.2.	Vergleich des Konstruktes M87/CD34-Ineo mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo	53

3.4.	Verlängerung des inhibitorischen Peptids C36_____	54
3.4.1	Klonierung des Vektorkonstruktes_____	55
3.4.2.	Vergleich der Expression und inhibitorischen Wirkung_____	56
3.4.3.	Hemmung C36-resistenter HIV-Stämme durch Verlängerung des C-Peptids_____	58
3.5	Kombinierung aller optimalen Module & Optimierung der Codon Usage_____	61
3.5.1	Klonierung der Vektorkonstrukte mit und ohne Codon Usage-Optimierung_____	63
3.5.2.	Vergleich der Expression des C-Peptides auf der Oberfläche mit den optimierten Modulen und nach Codon Usage Optimierung__	65
3.6	Optimierung der Vektorelemente_____	66
3.6.1	Klonierung der Konstrukte_____	66
3.6.2	Vergleich der Konstrukte mit dem PRE und dem optimierten Leader in ihrer Expression_____	68
3.7	Hinzufügen eines weiteren inhibitorischen Prinzips_____	69
3.7.1	Klonierung des Konstruktes mit dem RRE im 3'-Bereich des Transgens_____	70
3.7.2	Expression und Hemmwirkung der Konstrukte mit und ohne RRE-Element_____	70
3.8	Vergleich der retroviralen Konstrukte M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo_____	72
3.9	Konstruktion & Charakterisierung des Prototyp-Vektoren_____	75
3.10	Inhibitionssmechanismus der membranverankerten C-Peptide__	77
3.10.1	Inhibition des Eintritts von HIV_____	77
3.10.2	Temperatur-arretiertes Stadium (TAS)_____	79
3.10.3	Lipid-arretiertes Stadium (LAS)_____	81
4.	Diskussion _____	83
4.1	Reduktion der Immunogenität_____	84
4.2	Substitution der Transmembrandomäne_____	87
4.3	Strategien gegen die Bildung C36-resistenter HIV-Stämme_____	88
4.3.1	Verlängerung des C-Peptides_____	88
4.3.2.	Einführung eines zweiten inhibitorischen Prinzips_____	91
4.4	Kombination aller optimalen Peptid-Module und Optimierung der Codon Usage_____	92
4.6	Optimierung des Vektorrückgrats_____	93

4.7	Vergleich von Basiskonstrukt M87-Ineo und optimiertem Konstrukt M87o-RRE-Ineo	96
4.8	Mechanismus der Inhibition	97
4.9	M87o-RRE für die klinische Applikation	99
5. Literatur		101
6. Abkürzungen		114
7. Abbildungsverzeichnis		117
8. Tabellenverzeichnis		120
9. Lebenslauf		121
10. Publikationsliste		122

Zusammenfassung

An den Folgen der HIV-Infektion sind bisher mehr als 15 Millionen Menschen gestorben und die Zahl der Neuinfektionen wächst ständig. Nach Einführung der hochaktiven antiretroviralen Kombinationstherapie (HAART) 1995 konnte die HIV-Replikation im Patienten unterdrückt und der Verlauf der Krankheit verzögert werden. Aber die Bildung resistenter HIV-Stämme während der Therapie und die hohe Toxizität der Medikamente limitieren diese Erfolge.

Einen neuen Therapieansatz bietet die genetische Modifikation von T-Lymphozyten zur „intrazellulären Immunisierung“ der Zielzellen von HIV. Dabei werden die Zellen mit einem retroviralen Vektor transduziert und exprimieren ein antivirales Gen, das sie vor der HIV-Infektion schützt. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Laer wurde der retrovirale Vektor M87-Ineo entwickelt, der die Expression des membranverankerten Fusionsinhibitors C36/T20 auf der Zelloberfläche ermöglicht. Durch das Peptid sind die Zielzellen effizient vor der Infektion mit HIV geschützt (Hildinger et al., 2001). Das therapeutische Gen von M87-Ineo besteht aus dem Signalpeptid von LNGFR für die Translokation in das ER, dem inhibitorischen Peptid C36/T20, das von HIV-1 gp41 abgeleitet ist, einem flexiblen Linker sowie aus der Transmembrandomäne von LNGFR für die Verankerung in der Plasmamembran. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser retrovirale Vektor erfolgreich für die klinische Applikation zur Gentherapie der HIV-Infektion optimiert. Ziel war es, die potentielle Immunogenität des exprimierten Peptides zu minimieren, die Expression zu erhöhen sowie der Resistenzbildung entgegenzuwirken.

Der Linker im Basiskonstrukt M87-Ineo ist abgeleitet aus dem Gelenk des murinen Antikörpers von IgG2 und verleiht dem Hemmpeptid Flexibilität. Um die potentielle Immunogenität des exprimierten Peptides zu reduzieren, wurde der Linker des murinen Antikörpers IgG2 durch Gelenke („Hinge“) von humanen Antikörpern der IgG-Klasse ersetzt. Das Konstrukt mit der humanen „Hinge“ von IgG2 exprimierte genauso hoch wie das Basiskonstrukt und hemmte mindestens so effizient die HIV-Replikation. Durch die N-terminale Verlängerung des C-Peptides um 10 Aminosäuren konnte das Risiko der Resistenzbildung minimiert werden. Das verlängerte C-Peptid war in der Lage, HIV-Hüllproteine zu hemmen, die gegen das C36/T20-Peptid resistent sind. Das optimierte Peptid von M87o bestand somit aus dem

Membrananker von trunkiertem CD34, dem Linker von humanem IgG2 sowie aus dem verlängerten C-Peptid (C46). Weiterhin wurde ohne Verlust der Expression oder Hemmwirkung des membranverankerten C-Peptids ein RNA-Element (RRE decoy) erfolgreich als weiteres Hemmprinzip in den Vektor eingefügt, um die Bildung resistenter HIV-Stämme zu unterbinden.

Durch Einsatz eines optimierten Leaderelementes im retroviralen Vektor konnte die Expression des inhibitorischen Peptides mehr als verzehnfacht werden. Damit konnte das Peptid und dessen Hemmung erstmals auch in primären Zellen nachgewiesen werden. Der Vergleich zwischen dem Basiskonstrukt M87-Ineo und dem optimierten Konstrukt M87o-RRE-Ineo zeigte, dass die erhöhte Expression auch mit einer wesentlich verbesserten Hemmwirkung einherging. In Zell-Zellfusionsassays wurde außerdem nachgewiesen, dass die Wirkung des C-Peptids auf der Hemmung des Viruseintritts von HIV in die Zelle beruht.

Für die klinische Applikation wurde der Vektor M87o-RRE konstruiert, der die optimalen Vektorelemente und Peptidmodule enthielt, aber aus dem das Neomycin-Resistenzgen entfernt wurde. Dies führte zu einer nochmals höheren Expression des C-Peptids sowie zur weiteren Verminderung der Immunogenität des retroviralen Vektors. Das Markergen wurde ohnehin nicht mehr benötigt, da die genetisch modifizierten Zellen aufgrund der hohen Transgenexpression einfach detektiert werden konnten.

Der optimierte Vektor M87o-RRE hemmte die HIV-Replikation so effizient, dass bisher keine resistenten Stämme isoliert werden konnten. Bei Toxizitätsstudien in Maus und Rhesusmacaquen konnten keine Nebenwirkungen oder Immunogenität beobachtet werden. Durch die erfolgreiche Optimierung steht nun für die klinische Studie der Phase I der bestmögliche retrovirale Vektor zur Verfügung.

1. Einleitung

Trotz des beachtlichen Erfolgs durch die Kombinationstherapie der HIV-Infektion kann die HIV-Replikation im Patienten nicht vollständig und dauerhaft unterdrückt werden. Einen neuen therapeutischen Ansatz bietet die „intrazelluläre Immunisierung“ der Zielzellen von HIV durch Expression eines antiviralen Gens. Von Retroviren abgeleitete Vektoren sind ein ausgezeichnetes Werkzeug für den Gentransfer des antiviralen Gens und wurden bereits in klinischen Studien erfolgreich eingesetzt (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Junker et al., 1997). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Optimierung eines retroviralen Vektors für eine klinische Studie zur Gentherapie der HIV-Infektion.

1.1 HIV und AIDS

Die Immunschwäche AIDS („*acquired immunodeficiency syndrome*“) wurde erstmals 1981 beschrieben. Betroffen waren besonders homosexuelle Männer sowie Drogenabhängige, die unter ungewöhnlich schweren opportunistischen Infektionen litten. Der Weg der Übertragung deutete auf ein im Blut oder in Blutprodukten vorhandenes Virus hin. Als Auslöser für die neuartige Krankheit wurden 1983/84 Retroviren von zwei Arbeitsgruppen identifiziert und isoliert (Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984). Es wurde zunächst von Luc Montagnier als LAV („*lymphadenopathy-associated virus*“) bezeichnet, weil es zum ersten Mal aus den Lymphknoten eines Patienten mit Lymphadenopathie-Syndrom am „Institut Pasteur“ in Paris isoliert wurde. Unabhängig davon wurde in den USA das HTL-Virus III („*human t-cell leukemia virus*“) von Robert Gallo beschrieben. Nachdem feststand, dass es sich um das gleiche Virus handelte, wurde es ab 1985 als HIV („*human immunodeficiency virus*“) bezeichnet.

HIV gehört zur Familie der Retroviren und zur Unterfamilie der Lentiviren. Das Virus lässt sich in die beiden Gruppen HIV-1 und HIV-2 einteilen. HIV-2 wurde 1985 von Montagnier entdeckt und ist überwiegend in Westafrika und Indien verbreitet. HIV-1 ist hingegen weltweit zu finden, zeigt einen progressiveren Verlauf der Krankheit und gilt als stärker pathogen. Obwohl die Übertragungswege beider Viren sich gleichen, wird vermutet, dass HIV-1 effizienter übertragen wird als HIV-2. HIV-1 wurde wahrscheinlich vom

Schimpansen *Pan troglodytes* auf den Menschen übertragen (Gao et al., 1999), der mit dem sehr nah verwandten „simian immunodeficiency virus“ (SIVcpz) infiziert ist. Von HIV-2 hingegen wird vermutet, dass es von einem in Westafrika vorkommenden SIVsm abstammt, der in Mangaben vorkommt (Gao et al., 1992; Chen et al., 1997).

Seit Beginn der Epidemie wurden weltweit über 40 Millionen Menschen mit HIV infiziert und die Zahl der Neuinfektionen wächst ständig – Ende 2002 infizierten sich 5 Millionen neu mit HIV (Abb. 1.1). Fast 15 Millionen Menschen starben an den Folgen einer HIV-Infektion.

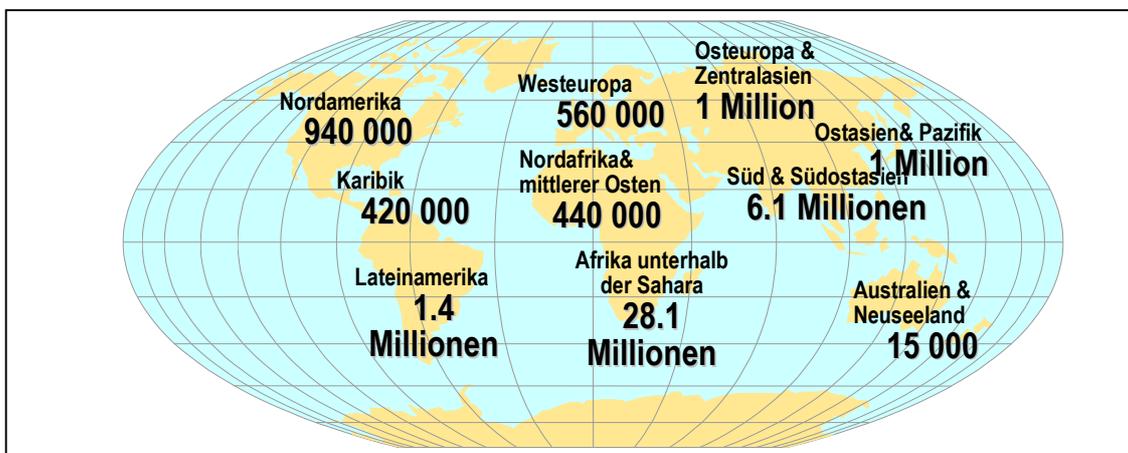


Abb. 1.1: Zahl der weltweiten Infektionen mit HIV. Über 28 Millionen von weltweit ca. 40 Millionen HIV-infizierten Personen leben in Afrika. (Daten: UNAIDS, 2001).

1.2 Struktureller Aufbau von HIV-1

Die viralen Partikel von HIV besitzen einen Durchmesser von etwa 100 nm (Abb. 1.2). Das Nucleokapsid ist von einer Hüllmembran umgeben, die von der Membran der Zielzellen abstammt. In der Virusmembran befinden sich 72 große Glycoproteinkomplexe, die aus dem in Trimeren vorliegenden Glycoproteinen (gp) gp41 und gp120 bestehen. Beide Proteine werden als gemeinsames Vorläuferprotein gp160 translatiert, das durch zelluläre Furinproteasen gespalten wird. Gp120 und gp41 sind nichtkovalent verknüpft, weshalb das gp120 spontan freigesetzt werden kann (so genanntes „shedding“). So wird das Glycoprotein gp120 sowohl im Serum als auch im lymphatischen Gewebe von HIV-Infizierten nachgewiesen. In der Innenseite der Membran befindet sich eine Schicht des Matrixproteins (p17), das über

aminoterminal angefügte Myristinsäurereste mit der Virusmembran verbunden ist und das Core des Viruskapsid umschließt. Das Kapsid ist zylindrisch angeordnet und enthält 2 Kopien der HIV RNA. Die beiden RNA-Stränge sind weder kovalent noch durch Basenpaarung miteinander verbunden und liegen in Form von Protein-Nucleinsäurekomplex vor. An der viralen positiv-strängigen RNA lagern sich die reverse Transkriptase (p66) und für die reverse Transkription als Primer fungierende tRNA an. Im Nucleokapsid befinden sich weiterhin das Enzym Integrase (p32) für den Einbau der viralen cDNA in das Wirtszellgenom sowie die Protease (p11), die für die posttranslationale Modifikation der viralen Proteine verantwortlich ist.

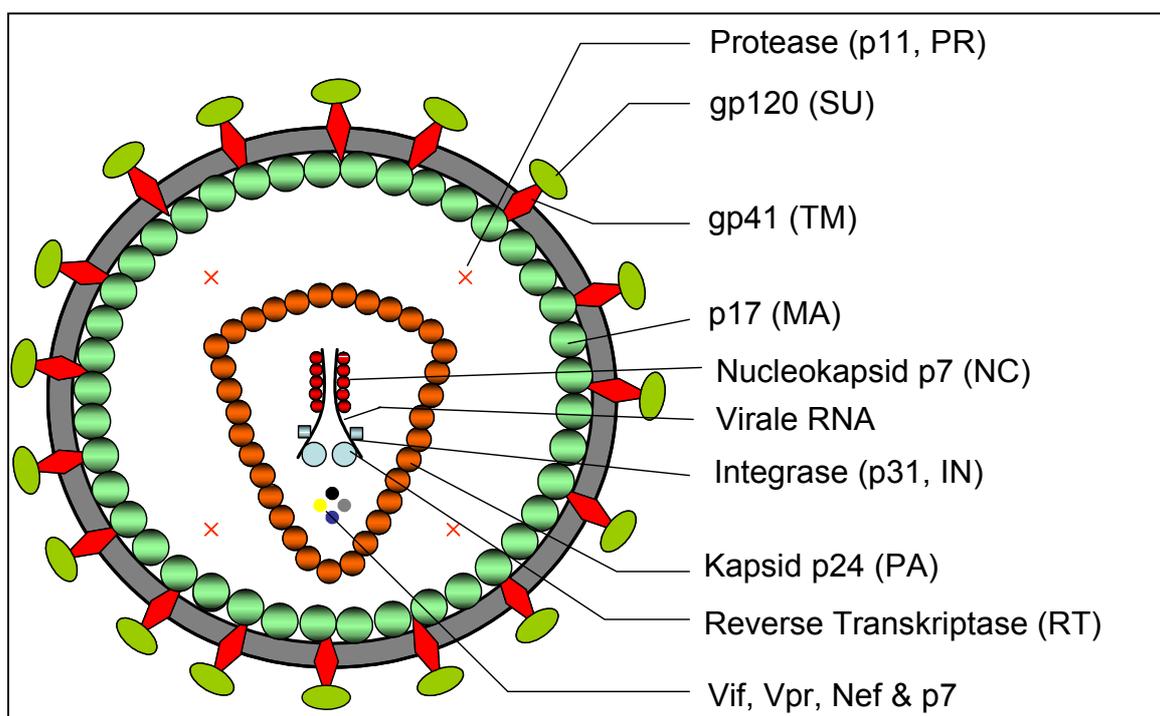


Abb. 1.2: Schematische Abbildung eines HIV-Partikels. Gezeigt sind die beiden Hüllproteine gp120 und gp41 sowie die strukturellen Proteine. Im inneren des Kapsids befindet sich die virale RNA in 2 Kopien, die als Protein-RNA-Komplexe vorliegt.

1.3 Der Replikationszyklus von HIV

Die ersten Schritte des Replikationszyklus von HIV beinhalten das Erkennen der Zielzelle und der Eintritt des Virus in die Zelle (Abb. 1.3). Dieser Prozess erfolgt durch eine koordinierte Serie von Interaktionen zwischen dem viralen Hüllprotein und den Rezeptoren auf der Zielzelle, wodurch die Fusion

von Virus- und Zellmembran vermittelt wird (die Fusion ist im Detail in Kap. 1.4 dargestellt). Das HIV-Hüllprotein ist aus den beiden Glycoproteinen gp120 und gp41 aufgebaut, die beide jeweils als Trimere vorliegen. Die Rezeptoren auf der Zielzelle, an die die gp120-Trimere binden, sind das CD4-Molekül sowie Mitglieder der Chemokin-Rezeptorfamilie CXCR4 oder CCR5 (Basmaciogullari et al., 2002, Wyatt et al., 1998). Nach der Fusion wird das virale Nukleokapsid in das Cytoplasma freigesetzt. Durch die reverse Transkriptase wird die einzelsträngige virale RNA in komplementäre DNA (cDNA) überführt und dient als Matrize für die Synthese eines zweiten Stranges. Die provirale DNA wird anschließend mit Hilfe von zellulären Proteinen der Karyopherin- α -Familie in den Nukleus transloziert (Galley et al., 1996). Durch das virale Enzym Integrase wird das genetische Material in das Genom der Wirtszelle integriert, wobei die LTR-Sequenzen („long terminal repeats“) am 5' und 3'-Ende des Genoms große Bedeutung haben (Brown et al., 1999). Die Integrase entfernt zwei Nukleotide von den beiden 3'-Enden der viralen cDNA, wodurch überhängende 5'-Enden entstehen. Die Wirtszell-DNA wird durch die Integrase so geschnitten, dass überhängende 5'-Enden entstehen. Diese Enden werden mit den 3'-Enden der proviralen DNA durch zelluläre Ligasen verbunden. Der Bereich der 5'-LTR dient nach der Integration als Promoter der viralen Gene, an die zelluläre Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B binden können. Die ersten Transkripte führen zur Synthese der frühen Gene wie Tat, Rev und Nef. Das Tat-Protein („*transactivation protein*“) bindet an die tar-Region im Bereich der LTR und stimuliert so die mRNA-Synthese und die Bildung langer Transkripte. Das Rev-Protein („*regulator of expression of virion proteins*“) interagiert mit einem cis-aktiven, 240 Basenpaare großen Element in der viralen RNA. Rev bindet an diese Haarnadel-Struktur und sorgt für den Export ungesplicerter oder einfach gesplicerter RNA aus dem Zellkern in das Cytoplasma. Das Nef-Protein übt verschiedene Funktionen aus (Fackler & Baur, 2002): Unter anderem induziert es die Synthese spezifischer Antikörper. Weiterhin ist es für die Internalisierung des CD4-Rezeptors und dessen Degradation in Lysosomen verantwortlich (Grzesiek et al., 1996; Aiken et al., 1994). Schwartz et al. (1996) zeigten, dass auch das MHC-Molekül durch Nef herunterreguliert wird und die infizierte Zelle so für das Immunsystem unerkant bleibt. Durch Blockierung bestimmter Signaltransduktionswege in der infizierten Zelle wirkt Nef außerdem anti-apoptotisch (Geleziunas et al., 2001).

Das gag/pol-Genprodukt enthält in seiner Sequenz die virale Protease, die sich autokatalytisch aus dem Polyprotein herauspaltet und die

Vorläuferproteine in die einzelnen funktionellen Proteine spaltet. Die Vorläuferproteine assoziieren in der Nähe der Plasmamembran zu unreifen Viruspartikeln. Die Hüllproteine von HIV, gp120 und gp41, werden als gp160-Vorläuferprotein synthetisiert und von einer zellulären Furinprotease gespalten. An der Innenseite der Zellmembran werden die viralen Bausteine zusammengesetzt. In der Folge kommt es zur Reifung und Freisetzung („*budding*“) der infektiösen Viren durch Spaltung der gag/pol-Vorläuferproteine und Kondensation der inneren Kernstruktur. Die Membran der Viren stammt direkt von der Membran der Wirtszelle ab. Die neu synthetisierten Viren suchen erneut eine Wirtszelle zur Infektion und der Replikationszyklus beginnt von neuem.

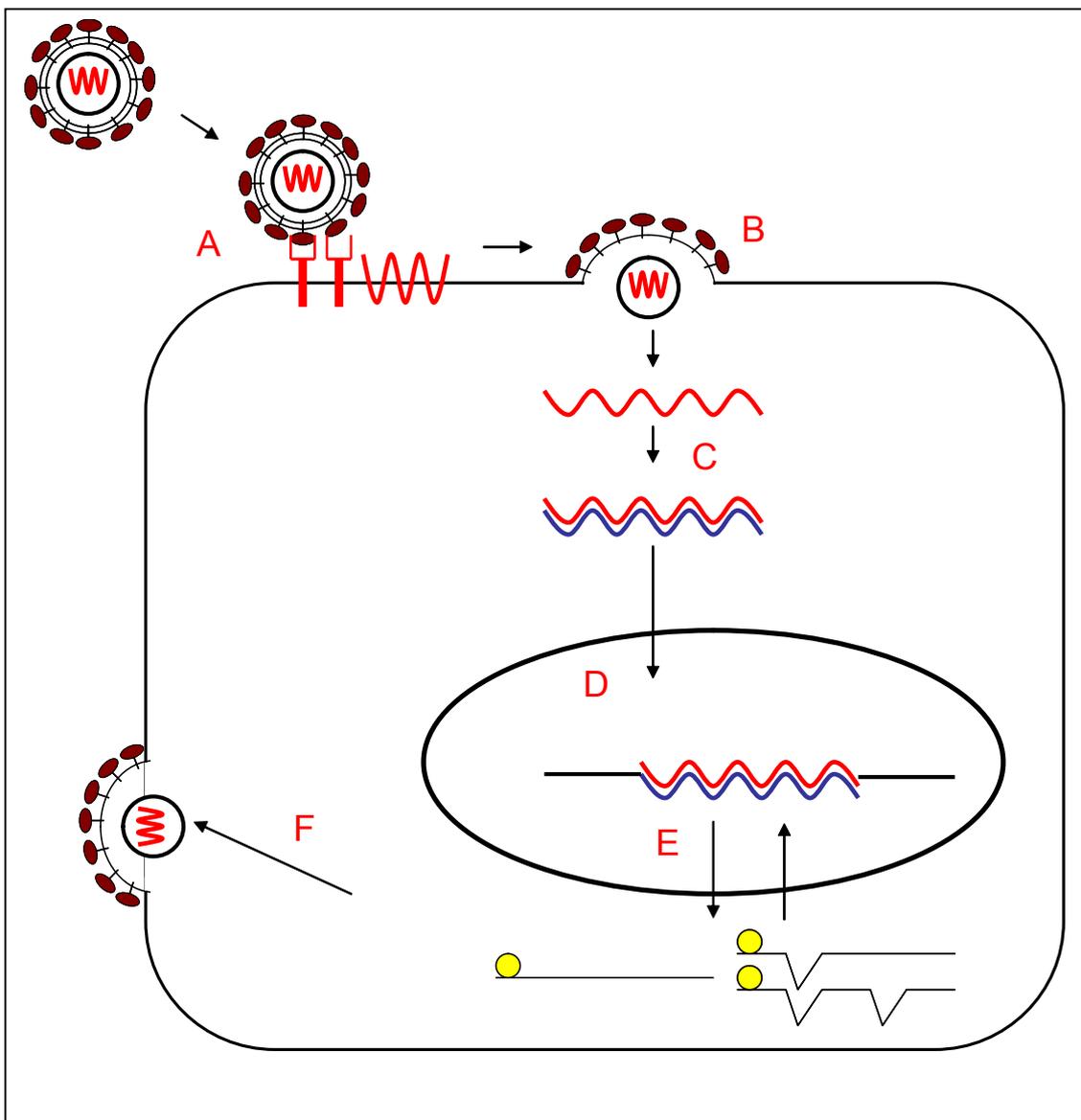


Abb. 1.3: Der Replikationszyklus von HIV. **(A)** Bindung des HIV-Partikels an den CD4-Rezeptor und Chemokincorezeptor **(B)** „Uncoating“ des Kapsids **(C)** Reverse Transkription der viralen RNA **(D)** Transport der viralen DNA in den Zellkern und Integration in das Wirtszellgenom **(E)** Translation der frühen Gene wie Tat, Rev und Nef kodiert über mehrfach gespleitete mRNA. Rev verstärkt den Export ungespleiteter RNA **(F)** Zusammenlagerung, Knospung und Freisetzung neuer HIV-Partikel.

1.4 Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle

Der erste Schritt der Infektion ist die Bindung des Glycoproteins gp120 an den zellulären CD4-Rezeptor auf der Zielzelle. Dies führt im gp120 zu konformationellen Änderungen, wodurch es mit dem jeweiligen Chemokinrezeptor CXCR4 oder CCR5 interagieren kann (Rizutto et al., 2000; Berger et al., 1999). Das gp41 vermittelt die Fusion von Virus- und Zellmembran und ist strukturell verwandt mit anderen Hüllproteinen wie Influenza und MLV (Hughson, 1997). Die Ektodomäne von gp41 besteht aus dem N-terminalen Fusionspeptid, das aufgrund seiner hydrophoben Aminosäuren in die Membran der Zielzelle inserieren kann, und aus zwei 4,3 hydrophoben (heptad) repeats (Abb. 1.4; Gallaher et al., 1989). Die N-terminalen Helices (HR1) formieren das innere helikale Trimer, während außen sich antiparallel die C-terminalen Repeats (HR2) so formieren, dass sie sich in drei hydrophobe Bindungstaschen auf der Oberfläche des Trimers hineinfügen. Durch Falten der beiden trimeren Peptide in ein Sechs-Helix-Bündel („*coiled coil*“) werden Virus- und Zellmembran in die unmittelbare Nähe gebracht (Abb. 1.5; Chan et al., 1997; Tan et al., 1997). Es gibt Hinweise, dass durch Bildung der *coiled coil*-Struktur freie Energie freigesetzt wird, wodurch die Energiebarriere für die Fusion der viralen und Zellmembran überwunden wird (Lu et al., 2001; Melikyan et al., 2000). Peptide, die von diesen Helices abgeleitet sind, verhindern die Fusion von Virus- und Zellmembran (vgl. Kap.1.5.3).

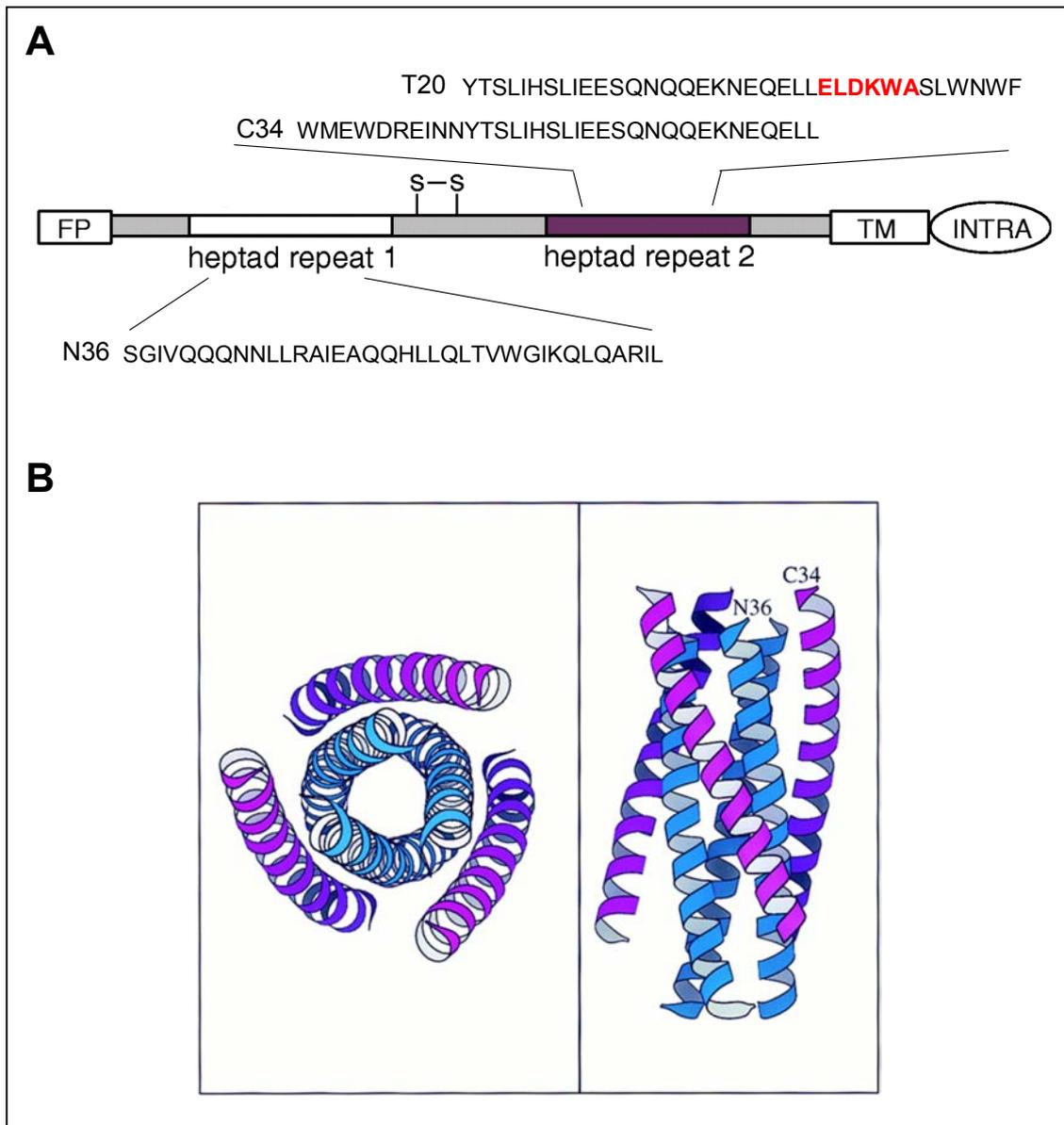


Abb. 1.4: Struktureller Aufbau des gp41-Moleküls und Ableitung der inhibitorischen Peptide. **(A)** Das gp41-Molekül besteht aus dem hydrophoben Fusionspeptid (FP), das in die Membran inseriert, den beiden Leuzin-Zipper-ähnlichen Motiven („heptad repeat“ 1 und 2), der Transmembrandomäne sowie einem cytoplasmatischen Schwanz. Peptide wie C34 und T20 sind von diesen heptad repeats abgeleitet und hemmen die Fusion von HIV-1 mit der Zielzelle. **(B)** Kristallstruktur des N36/C34-Komplexes. Die N-terminalen Helices des HR1 bilden ein inneres Trimer (blau), das von 3 Helices des HR2 umschlossen wird (lila) und bei der Fusion das so genannte „Sechs-Helix-Bündel“ bildet.

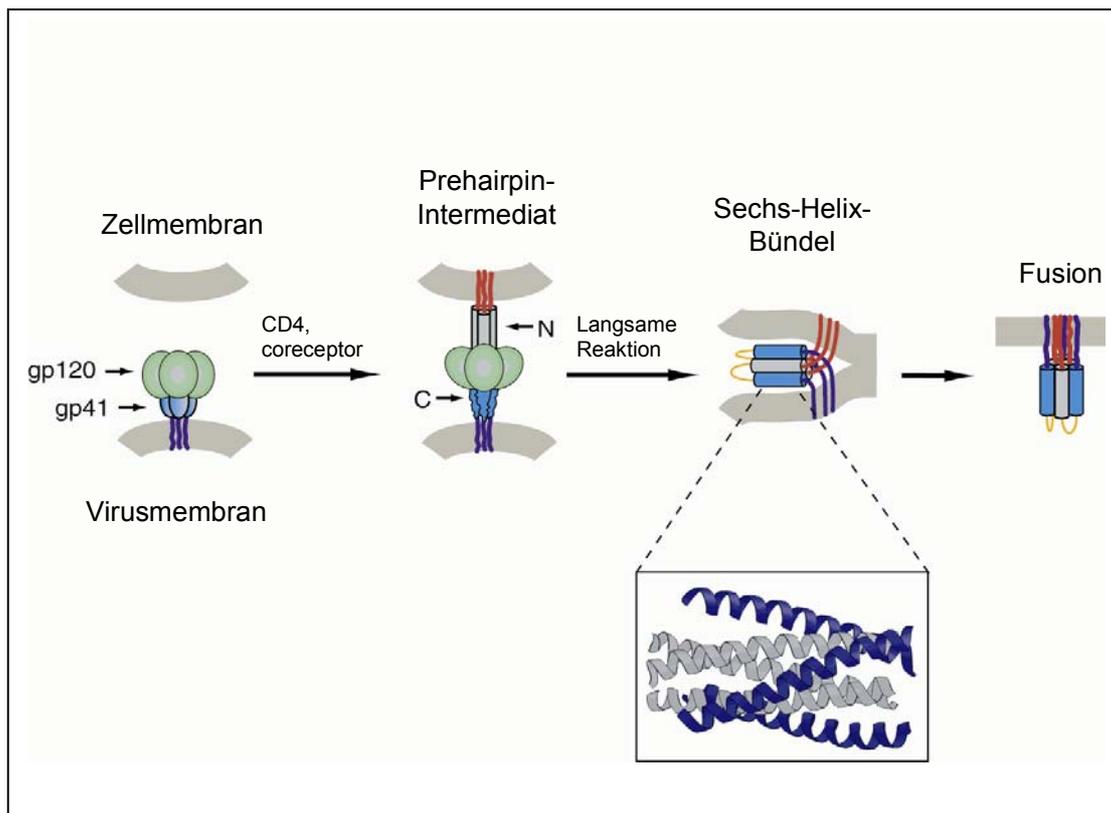


Abb. 1.5: Modell der Membranfusion. Nach Interaktion von gp120 mit dem CD4-Rezeptor und einem der Chemokinrezeptoren kommt es zu konformationellen Änderungen, bei der das Fusionspeptid von gp41 (rot) exponiert wird und die Membran der Zielzelle penetriert. Die beiden Helices (N, C) liegen als Trimere vor und bilden bei der Fusion das Sechshelix-Bündel (Kasten).

1.5 Die klassische Form der HIV-Therapie: HAART

Für die antivirale Therapie sind eine Reihe von Hemmsubstanzen entwickelt worden. Ziel ist es dabei, die Viruslast im Blut so effizient und so lange wie möglich zu senken und für eine Rekonstitution des Immunsystems zu sorgen. Die Viruslast wird über die Kopienzahl der viralen RNA pro Milliliter angegeben und ist ein Maß für die Höhe der HIV-Replikation im Blut. Die Zahl der CD4⁺-Zellen zeigt, wie stark das Immunsystem durch HIV bereits geschädigt worden ist. Die chronische Phase der Infektion liegt bei einer Konzentration von >200 CD4⁺ Zellen pro µl Blut und dieser Wert sollte bei einer effizienten Therapie möglichst lange beibehalten werden. Ein Unterschreiten dieser Schwelle markiert das Ende der chronischen Phase und den Beginn des AIDS-Stadiums.

In der konventionellen Therapie der HIV-Infektion wurden nucleosidische und nicht-nucleosidische Hemmsubstanzen entwickelt, die sich in drei Gruppen einordnen lassen. Die Nucleosid-Analoga binden kompetitiv zu natürlichen Nucleotiden an die reverse Transkriptase und sorgen bei der DNA-Synthese für einen Kettenabbruch (NRTI). Beispiele sind das Azidothymidin (AZT, Zidovudine, GlaxoSmithKline) oder Didesoxycytosin (ddC, Zalcitabine, Hofman-La Roche). Eine zweite Gruppe sind die „Nicht-nucleosidischen Inhibitoren der reversen Transkriptase“ (NNRTI) – sie binden direkt an die funktionellen Domänen und bewirken Veränderungen im katalytischen Zentrum der reversen Transkriptase (Campiani et al., 2002). Zu diesen Hemmstoffen gehören Nevirapin (Boehringer Ingelheim) oder Delaviridin (Pharmacia Upjohn). Die dritte Gruppe bilden die Protease-Inhibitoren (PI), die die Prozessierung der viralen Vorläuferproteine Gag und Pol verhindern. Es handelt sich um synthetische Peptid-Analoga, die um das aktive Zentrum der viralen Protease kompetitieren (Saquinavir, Roche; Indinavir, Merck; De Clercq, 2002).

Seit 1995 werden Kombinationen von mindestens drei verschiedenen antiretroviralen Substanzen eingesetzt, so dass mehrere voneinander unabhängige Funktionen der Virusreplikation gleichzeitig angegriffen werden. Monotherapien zeigten nur kurzfristig eine Wirkung, weil sich hier sehr schnell Resistenzen von HIV gegen die Therapeutika bilden. Mit Hilfe der so genannten „hochaktiven antiretroviralen Therapie“ (HAART) kann die Viruslast im peripheren Blut unter die Nachweisgrenze abgesenkt werden. Die eingesetzten Medikamente wirken zudem synergistisch, wodurch eine Reduktion der Dosis und somit auch der Nebenwirkungen erreicht wird. Inzwischen wird auch diskutiert HAART bereits vor Beginn von AIDS einzusetzen (Thorner et al., 2003). Durch die Behandlung mit HAART wurde die Lebenserwartung erhöht, dennoch können Resistenzen bei HIV auftreten, die durch Mutationen in der Protease oder reversen Transkriptase entstehen. Außerdem bewirkt die antiretrovirale Therapie diverse Nebenwirkungen wie periphere Lipodystrophie oder Diabetes mellitus (Barbaro et al., 2003; Holstein et al., 2001).

1.6 Eine neue Klasse von antiretroviralen Substanzen: Eintrittsinhibitoren

Für eine verbesserte antivirale Therapie müssen neue Therapieansätze verfolgt und neue Medikamente entwickelt werden. Eine neue Gruppe von antiviralen Substanzen sind die so genannten Eintrittsinhibitoren („entry inhibitors“). Sie hemmen die Fusion von Virus und Zielzelle und stören damit einen der ersten Schritte in der HIV-Replikation (Cammack et al., 2001). Die Eintrittsinhibitoren werden in drei Gruppen eingeteilt.

1.6.1 „Attachment“-Inhibitoren

Die erste Gruppe bilden die „Attachment“-Inhibitoren, welche die Bindung von HIV an den CD4-Rezeptor verhindern. Hierzu gehört beispielsweise das PRO-542 (Trkola et al., 2001). Es bindet an das gp120 und verhindert so das Andocken von HIV an die CD4⁺ Zelle. Es ist ein Fusionsprotein aus IgG2 und CD4 und war in einer Studie der klinischen Phase I/II gut verträglich. Es reduzierte die Viruslast im Patienten nach mehreren Infusionen (Jacobson et al., 2000). Nachteil hierbei ist die Applikationsform, da es als Protein nicht oral bioverfügbar ist. Ein anderes Beispiel eines „Attachment“-Inhibitors ist das BMS-806, das spezifisch an das gp120-Molekül bindet und somit die Interaktion des Hüllproteins mit dem CD4-Rezeptor unterbindet. Aufgrund der direkten Bindung an das gp120 ist die Hemmung unabhängig vom verwendeten Korezeptor, doch verschiedene Virusisolate sind unterschiedlich empfindlich auf die Substanz. Dies lässt eine rasche Resistenzbildung erwarten.

1.6.2 Korezeptor-Antagonisten

Die Korezeptor-Antagonisten verhindern die Bindung an den Korezeptoren CXCR4 oder CCR5. Ein CCR5-Rezeptor-Antagonist ist das SCH-C (Strizki et al., 2001), das eine starke *in vitro*-Aktivität gegen zahlreiche Virusisolate zeigt. Es ist ein kleines Molekül, das oral eingenommen werden kann und über eine Halbwertszeit von 6 Stunden verfügt. *In vitro* hat es je nach Virusisolat eine IC₅₀ von 0.4 bis 9 nM. Wirksamer und besser verträglich soll das SCH-D sein, das noch 2003 in einer klinischen Studie der Phase I getestet werden soll. Inzwischen sind aber HIV-Stämme beschrieben, die gegen SCH-H und

andere CCR5-Analoga kreuzresistent sind. Weitere Korezeptor-Antagonisten sind das PRO 140 (α CCR5-Antikörper; Trkola et al., 2001) und das Bicyclam AMD3100, das an den CXCR4-Rezeptor bindet. (Labrosse et al., 1998; Donzella et al., 1998 ; De Clercq et al., 1992).

1.6.3 Fusionsinhibitoren

Die Fusion von HIV-1 mit der Zielzelle findet über die Ausbildung eines Sechs-Helix-Bündels statt. Die N-terminalen heptad repeats (HR1) sind dabei von besonders wichtiger Bedeutung, was auch Mutationsstudien zeigen konnten (Weng & Weiss, 1998; Weng et al., 2000). Daher ist das HR1 ein interessantes Ziel zur Entwicklung neuer Therapeutika (Bewley et al., 2002). Synthetische lösliche Peptide, die von der Aminosäuresequenz des heptad repeat 2 abgeleitet sind, wie beispielsweise das C34 und T20, binden an das N-terminale heptad repeat und können so die Fusion von Zielzelle und HIV-1 verhindern (Abb. 1.4). Sie binden an die N-terminalen hydrophoben Helices der pre-Hairpin-Struktur und verhindern die Ausbildung eines Sechs-Helix-Bündels und damit auch der Fusion von Virus und Zellmembran (Abb. 1.5). Als erster Fusionsinhibitor wurde das T20 im März 2003 in den USA und im Mai in Europa zugelassen. T20 besteht aus 36 Aminosäuren (643-678 von gp160) und muss subkutan gespritzt werden, weil es als Peptid nicht oral bioverfügbar ist. *In vitro* hemmen diese C-Peptide sowohl Labor- als auch Primärisolate mit einer IC_{50} von 1.7 ng/ml (Wild et al., 1992; Wild et al., 1994). In einer ersten Studie wurde es als Monotherapie in verschiedenen Dosen verabreicht. Bei einer optimalen Dosis von zweimal 100 mg täglich wurde die Viruslast um zwei Logstufen gesenkt (Kilby et al., 1998). In der klinischen Studie der Phase III wurde den Patienten zweimal je 90 mg täglich in Kombination mit optimaler HAART gegeben. Nachteil der Behandlung mit dem Peptid T20 ist eine sehr niedrige Halbwertszeit von 2 Stunden im Serum. Daher sind große Peptidmengen pro Patient notwendig. Dies verursacht wiederum extrem hohe Kosten der Therapie. Ein weiteres Problem stellt die subkutane Verabreichungsform dar, weil das Peptid oral nicht bioverfügbar ist.

1.7 Gentherapie von HIV

Eine Alternative zur konventionellen antiviralen Therapie stellt die Gentherapie dar (Blaese et al., 1995). Bei der somatischen Gentherapie werden dem Patienten Zellen entnommen und genetisch so manipuliert, so dass sie ein therapeutisches, antivirales Gen exprimieren. Die so geschützten Zellen werden expandiert und dem Patienten reinfundiert. Grundsätzlich basieren die verschiedensten Gentherapieansätze der HIV-Infektion auf zwei Strategien:

1. Eliminierung HIV-Infizierter Zellen
2. Schützen der Zielzellen bzw. deren Vorläuferzellen vor einer Infektion mit antiviralen Genen

1. Um HIV-infizierte Zellen zu eliminieren sind eine Reihe von Wegen erforscht worden. Beispiele sind die Induktion des Zelltodes infizierter Zellen mit Caspasen (Vocero-Akbani et al., 1999) oder die Erhöhung der Immunantwort auf infizierte Zellen durch „genetische Vakkzinierung“. Dabei werden Zellen mit einem Gen ausgestattet, das die Immunantwort auf HIV-infizierte Zellen verstärkt (Galpin et al., 1994). Mitsuyasu et al. (2000) beschrieben $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen, die mit einem retroviralen Vektor transduziert wurden, der für ein $CD4$ - ζ chimäres Protein kodierte. Das Protein bestand aus dem extrazellulären Bereich und der Transmembrandomäne des $CD4$ -Rezeptors von HIV und wurde mit dem cytoplasmatischen Teil einschließlich der Aktivierungsdomänen der Zeta-Kette (ζ) fusioniert. Die MHC-unabhängige Natur dieses chimären Rezeptors erlaubte die spezifische Erkennung des HIV-Partikels und HIV-infizierter Zellen durch $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen (Roberts et al., 1994). Die Infusion der genetisch modifizierten Zellen führten bei den Patienten zu einer reduzierten Viruslast sowie zur erhöhten Anzahl an $CD4^+$ Zellen.

2. Zum Schutz der $CD4^+$ Zielzellen werden Lymphozyten oder hämatopoetische Stammzellen entnommen und *ex vivo* mit einem antiviralen Gen ausgestattet. Nach genetischer Modifikation und Expansion von etwa 10 Tagen werden dann die Zellen dem Patienten wieder reinfundiert. Dieser Weg wird auch als "intrazelluläre Immunisierung" bezeichnet. Die Hemmwirkung kann dabei von RNA-Elementen oder Proteinen ausgeübt werden. Proteine haben den Nachteil potentiell immunogen zu wirken, dafür können sie durch

Sekretion auch auf nicht-transduzierte Zellen wirken, was auch als "bystander effect" bezeichnet wird. Ein Beispiel hierfür ist das sCD4, das den Eintritt von HIV in die Zielzelle verhindert und mit dem gp120-Molekül interagiert (Morgan et al., 1990; Morgan et al., 1994). Zur Inhibition von HIV stehen außerdem einige dominant-negative Mutanten viraler Proteine wie Tat und Rev zur Verfügung (Bonyhadi et al., 1997; Woffendin et al., 1994).

Als antivirale RNAs dienen Antisense-RNAs (Vandendriessche et al., 1995), Ribozyme (Klebba et al., 2000) oder kleine RNA-Fragmente, die viralen RNA-Elementen entsprechen und mit diesen kompetitieren (Sullenger et al., 1990). Als neueren Ansatz werden 21 bis 23 Basenpaare große RNA-Fragmente eingesetzt (siRNA), die mit spezifische Sequenzen der viralen RNA hybridisieren und zur Spaltung der mRNA führen (Capodici et al., 2002).

Ein weiteres Beispiel für antivirale RNAs ist das so genannte RRE-decoy. Die Bindestelle von Rev, das RRE, befindet sich auf der viralen mRNA im Bereich des Env-kodierenden Bereichs. Die retrovirale Expression eines 41 Basenpaar großen Fragmentes stammend aus diesem RRE kompetitiert mit der viralen RNA und hemmt so den Export dieser aus dem Zellkern. Dadurch werden späte Gene nicht mehr in ausreichendem Maße hergestellt und damit die HIV-Replikation gestört (Bahner et al., 1996).

Im Gegensatz zur konventionellen Therapie ist bei der Gentherapie die Wahl des Gens von entscheidender Bedeutung – die Zahl der transduzierten Zellen ist im Vergleich zu den insgesamt vorhandenen 10^{11} CD4⁺ Zielzellen gering. Die somatische Gentherapie kann nur dann erfolgreich sein, wenn das antivirale Gen den transduzierten Zellen einen entscheidenden Selektionsvorteil gegenüber nicht-transduzierten Zellen verleiht und dadurch *in vivo* sich anreichern.

Die verschiedenen antiviralen Gene greifen zu unterschiedlichen Stadien der Virusreplikation ein und können dementsprechend in drei Gruppen unterteilt werden (von Laer & Brandenburg, 2001):

- Zur Klasse I gehören Gene, die frühe Schritte der HIV-Replikation vor Integration der viralen cDNA inhibieren und die Infektion der Zielzelle so verhindern. Dies sind beispielsweise die Eintrittsinhibitoren wie T20, reverse Transkriptase- (Shaheen et al., 1996) oder Integrase-Hemmer (Levy-Mintz et al., 1996).

- Die zweite Klasse der antiviralen Gene hemmen die Produktion viraler RNA oder viraler Proteine und reduzieren so die Menge an produziertem Virus in der Zelle und den cytopathischen Effekt. Beispiele für ein Klasse II-Gen sind das RRE-decoy oder transdominantes Rev (Woffendin et al., 1994)
- In der Klasse III sind Gene, die nur die Zahl produzierter infektiöser Partikel senken. Der cytopathische Effekt bleibt bei solchen antiviralen Genen erhalten. Zu einem Klasse III-Gen gehört beispielsweise das „transdominante“ Gag (Trono et al., 1989). Die Expression einer transdominanten Gag-Mutante stört den Zusammenbau der Viruspartikel von HIV (Inubushi et al. 1998; Cara et al. 1998) und reduziert so die Zahl infektiöser Partikel.

Klasse II und Klasse III antivirale Gene hemmen somit zwar die Produktion neuer Viren, sie verhindern jedoch nicht die Integration des HIV-Provirus in das Genom der Wirtszelle. Zellen mit dem Provirusgenom, die jedoch aufgrund der genetischen Modifikation keine Viren produzieren, sind vergleichbar mit „latent“ infizierten Zellen. Sie können eine sehr lange Lebensdauer aufweisen und produzieren noch toxische Genprodukte von HIV wie das Tat-Protein (Kolson et al., 1994). Außerdem wird der Schritt der reversen Transkription nicht gehemmt – ein Schritt, bei dem die meisten Resistenzmutationen im HIV-Genom entstehen.

Die mathematische Modellierung und die Computersimulation ergaben, dass nur Gene, die früher Schritt des Replikationszyklus inhibieren (Klasse I-Gene), genetisch modifizierten Zellen einen effektiven Schutz vor der HIV-Infektion bieten und einen Selektionsvorteil vorweisen (von Laer et al., in Vorbereitung).

1.8 Vektoren in der Gentherapie

Die Übertragung therapeutischer Gene in die gewünschten Zielzellen erfolgt mit Hilfe von Gentransfer-Vehikeln, die als Vektoren bezeichnet werden. Idealerweise sollten Vektoren folgende Eigenschaften haben:

- Eine hohe Effizienz des Gentransfers
- Hohe Selektivität, so dass nur die gewünschten Zielzellen transduziert werden
- Eine für den therapeutischen Effekt notwendige und dauerhafte Expression des Transgens ermöglichen
- Sicher sein und keine Nebenwirkungen in der Zelle verursachen

Viren sind hocheffiziente Gentransfer-Vehikel, aus denen virale Vektoren entwickelt worden sind. Viren haben im Laufe der Evolution sehr effiziente Mechanismen entwickelt, um ihr genetisches Material in die Zelle einzuschleusen. Die am häufigsten von Viren abgeleiteten Vektoren sind neben den Adenoviren die Retroviren.

1.8.1. Retrovirale Vektoren

Retrovirale Vektoren sind meist vom „Murinen Leukämievirus“ (MLV) abgeleitet und wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Fehse et al., 1998). Die Vektoren integrieren ihr genetisches Material in das Genom der Zielzellen. Die damit verbundene stabile Expression macht retrovirale Vektoren zum häufigsten Genvehikel.

Bei den Retroviren wurden die kodierenden Bereiche durch das therapeutische Transgen ersetzt. Die rekombinanten Vektoren, die als einzige noch das Verpackungssignal Ψ und die „Long terminal repeats“ (LTR) besitzen, werden mit Helferplasmiden in Verpackungszellen exprimiert. Zu dem retroviralen Vektor werden zwei weitere Plasmide eingesetzt: Ein Plasmid kodiert für Gag und Pol und ein weiteres das Env-Protein. Dieses 3-Plasmidsystem hat zugleich mehrere Vorteile:

Die Expression retroviraler Strukturgene in der Zielzelle sind nicht mehr notwendig und jedes gewünschte therapeutische Transgen kann eingesetzt werden, wobei eine Größengrenze von 10 kb limitierend ist. Zum anderen können derartige Viruspartikel die Zellen nur einmal infizieren. Die Viren sind replikationsinkompetent, da im Vektor Strukturgene nicht mehr vorhanden sind. Dies macht die Gentherapie sicherer, weil eine unkontrollierte Ausbreitung der Viren im Körper des Patienten ausgeschlossen werden kann. Ein weiterer Vorteil liegt in der Möglichkeit, das Env-Hüllprotein durch heterologe Hüllproteine auszutauschen. Dabei lässt sich durch Verwendung eines anderen Hüllproteins der Tropismus für die entsprechenden Zielzellen erweitern oder einengen (Pseudotypisierung).

Ein Nachteil der MLV-basierten retroviralen Vektoren ist jedoch, dass sie nur sich teilende Zellen transduzieren können. Die Zellkernmembran muss sich auflösen, damit die cDNA des viralen Genoms sich in die des Wirtszellgenoms einschleusen kann (Lewis & Emerman, 1994; Lieber et al., 2000). Weiterhin besteht das Risiko der Insertionsmutagenese im Wirtsgenom, bei der Proto-Onkogene aktiviert werden könnten.

1.8.2 Lentivirale Vektoren

Die von Lentiviren abgeleiteten Vektoren können im Gegensatz zu den onkoretroviralen Vektoren auch ruhende Zellen transduzieren (Naldini, 1992). Analog zu den onkoretroviralen Vektoren wurden noch die das Genom flankierenden LTRs sowie die Verpackungssequenz erhalten (Connolly, 2002). Darüber hinaus haben die lentiviralen Vektoren mit 18 kb eine höhere Verpackungskapazität. Der Import der cDNA nach der reversen Transkription in den Zellkern erfolgt über zelluläre Kernimportproteine (Gallay et al., 1996, Lewis & Emerman, 1994). Dennoch ergeben sich noch Nachteile bei der Verwendung lentiviraler Vektoren: So fehlen als größtes Problem stabile Verpackungszelllinien für die Vektorproduktion im größeren Maßstab. Außerdem besteht das Risiko der Bildung von replikationskompetenten Lentiviren bei der Vektorproduktion. Ähnlich wie bei onkoretroviralen Vektoren besteht auch bei Lentiviren das Risiko der Insertionsmutagenese unter Aktivierung von Proto-Onkogenen. Weiterhin bestehen Bedenken hinsichtlich der Interaktion der Gene des Lentiviruses mit anderen retroviralen Elementen in der Zelle des Patienten, wie bei der HIV-Infektion.

1.9 Der retrovirale Vektor M87-Ineo zur Gentherapie der HIV-Infektion

Das lösliche Peptid T20 besitzt *in vivo* eine sehr kurze Halbwertszeit von zwei Stunden, so dass große Mengen des synthetisch hergestellten Peptides für die antivirale Therapie benötigt wird. Durch die systemische Applikation wird das Peptid bereits beim Transport im Blut durch Proteasen abgebaut. Bei einer Gentherapie mit dem retroviralen Vektor M87-Ineo wird dieses Problem umgangen und das Hemmpeptid am eigentlichen Wirkungsort auf der Oberfläche der T-Zelle produziert. Hildinger et al. (2001) zeigten, dass die Expression dieses Fusionshemmers auf der Oberfläche der T-Zellen den Eintritt von HIV äußerst effizient inhibierte. Das Konstrukt M87-Ineo inhibierte alle untersuchten HIV-Stämme, wobei die Hemmwirkung spezifisch für HIV-Hüllproteine war. Es wird angenommen, dass das Peptid die Fusion von Virus- und Zellmembran inhibiert, indem es kompetitiv an die fusionsaktive Form von gp41 bindet.

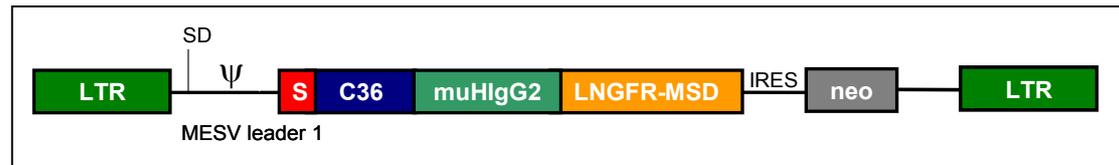


Abb. 1.6: Architektur des retroviralen Vektors M87-Neo. Das therapeutische Transgen besteht aus dem Signalpeptid von LNGFR (S), dem inhibitorischen Peptid (C36), dem Linker (muHlgG2) und dem Membrananker von LNGFR (LNGFR-MSD). Über eine polio-IRES vermittelte Translation wird das Neomycin-Resistenzgen exprimiert.

Zur membranverankerten Expression wurde N-terminal vor dem C36 das Signalpeptid von LNGFR fusioniert, das für die Translokation des Proteins in das Endoplasmatische Reticulum (ER) verantwortlich ist. Am C-Terminus wurde für eine erhöhte Flexibilität ein Linker des „Gelenks“ von murinen IgG2 sowie zur Verankerung die Transmembrandomäne von LNGFR hinzugefügt (Abb. 1.6). Zur Selektion transduzierter Zellen wurde mit Hilfe der „internal ribosomal entry site“ (IRES) von polio das Neomycin-Resistenzgen exprimiert.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Seit Beginn der Epidemie starben weltweit fast 15 Millionen Menschen an den Folgen einer HIV-Infektion und die Zahl der Neuinfektionen wächst ständig. Zwar wurde durch die medikamentöse Kombinationstherapie (HAART) eine Kontrolle der Virusreplikation und damit auch eine längere Überlebenszeit der Patienten erreicht. Aber die Bildung resistenter HIV-Stämme während der Therapie und die hohe Toxizität der Medikamente limitieren die Erfolge von HAART. Einen neuen Ansatz bietet daher die genetische Modifikation von T-Lymphozyten zur „intrazellulären Immunisierung“ der Zielzellen von HIV. Durch Expression eines antiviralen Gens der Klasse I sind die Zielzellen vor der HIV-Infektion geschützt und erhalten so einen Überlebensvorteil, der zur Akkumulation der genetisch modifizierten Zellen führen kann. Zur „intrazellulären Immunisierung“ gegen die HIV-Infektion wurde der retrovirale Vektor M87-Neo entwickelt, der die Expression des Fusionsinhibitors C36/T20 auf der Zelloberfläche ermöglicht (Hildinger et al., 2001). Mit diesem Vektor konnte nachgewiesen werden, dass die Oberflächenexpression des C-Peptids die Replikation von HIV effizient hemmte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung des retroviralen Vektors M87-Ineo für die klinische Applikation zur Gentherapie der HIV-Infektion. Im Mittelpunkt standen dabei die Reduzierung der Immunogenität des exprimierten Peptides, die Erhöhung der Expression sowie die Entwicklung von Strategien zur Prävention der Resistenzbildung.

Der murine Linker, der dem Hemmpeptid Flexibilität verleiht, wurde gegen verschiedene Sequenzen humanen Ursprungs ausgetauscht, um die Immunogenität des exprimierten Peptids zu reduzieren. Dazu wurden Sequenzen der Gelenke humaner Antikörper der IgG-Klasse als Linker verwendet. Um die Expression des Peptids zu erhöhen, wurde die Transmembrandomäne von LNGFR ausgetauscht und ein optimierter Leader in den retroviralen Vektor eingesetzt. Das inhibitorische Peptid selbst wurde verlängert sowie ein RNA-Element als weiteres Hemmprinzip in den Vektor implementiert. Der Austausch der einzelnen Elemente wurde auf ihre Funktionalität hin in der Zellkultur getestet. Dabei wurden insbesondere die Höhe der Expression sowie die inhibitorische Wirkung untersucht. Für die klinische Applikation sollte anschließend ein Vektor kloniert und getestet werden, der alle optimierten Peptidmodule und Vektorelemente enthält und das Hemmpeptid mit möglichst hohem Niveau exprimiert.

2. Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

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

Plastikwaren und Filtersysteme wurden von BD (Heidelberg), Greiner (Frickenhausen), Costar (Bodenheim), Sarstedt (Nürnbrecht), und Millipore (Eschborn) verwendet. Medien, Antibiotika und Zusätze für die Zellkultur wurden von BioWhittaker (Verviers, Belgien) oder Gibco BRL (Eggenstein) bezogen.

Für die PCR wurden Oligonucleotide von Carl Roth (Karlsruhe), MWG Biotech GmbH (Ebersberg) und Thermo Hybaid (Ulm) verwendet. Molekulargewichtsmarker und DNA-Restriktionsenzyme sowie deren Puffer wurden von New England Biolabs (Schwalbach) geliefert.

2.1.2 Verwendete Kits

Tabelle 2.1: Verwendete Kits in der Molekularbiologie

Kit	Firma
Rneasy-Kit zur RNA-Isolierung	Qiagen, Hilden
E.Z.N.A Cycle-Pure Kit Aufreinigung von PCR-Produkten	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Niederlande
JETquick Plasmid miniprep Spin Kit	Genomed, Bad Oeynhausen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Lösungen und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Puffer und Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar sterilisiert, bei Hitzeinstabilität steril filtriert oder bereits steril bezogen.

Tab. 2.2: Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml in Wasser
DNA-Ladepuffer	0.05% Bromphenolblau, 0.05% Xylene, 15% Ficoll Typ 400 in 20 ml Wasser
Kanamycin	60 mg/ml in sterilem Wasser
LB-Medium	10 g Trypton / Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml H ₂ O und autoklaviert
LB-Ampicillin für Platten	10 g Trypton /Peton aus Casein 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Agar-Agar ad 1000 ml H ₂ O pH 7.0 mit 5 M NaOH und autoklaviert hinzufügen von 40 mg/ml Ampicillin kurz vor gießen der Platten
50 xTAE	Tris 1220 g, Essigsäure 285.5 g, EDTA (0.5 M) 500ml, H ₂ O ad 5 l, einstellen des pH auf 8.0
10x TBE	Tris 540 g, Borsäure 270 g, EDTA (0.5 M) 200ml, H ₂ O ad 5 l einstellen des pH auf 8.0
TE	Tris (pH 8) 10mM, EDTA (pH8) 1mM in deionisiertem Wasser

2.1.4 Oligonucleotide

Tab. 2.3: Verwendete Oligonucleotide

Name	Primer-Sequenz
CD34-R	5'-AATATGTCGACTCATGGTTCTAGTTCCAGCC-3'
Higg1A	5'-ACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTG GGGGACCGCTCATCCTGTCTATTGCT-3'
Higg1B	5'-TGGGCACGGTGGGCATGTGTGAGTTTTGTCACAAGA TTTGGGCTCAGATCTAAACCAATTCCACA-3'
hlgG2-CD34-F	5'-GAGTGCCACCGTGCCCAGCACCTGTGGCAGG ACCGCTGATTGCACTGGTCACCTC-3'
hlgG2-T20-R	5'-AATATTCCGGACTCATGGTTCTAGTTCCAGC-3'
Higg2A	5'-AGTGCCACCGTGCCCAGCACCTGTGGCAGGA CCGCTCATCCCTGTCTATTGCT-3'
Higg2B	5'-TGCTGGGCACGGTGGGCACTCGACACAACATTTGC GCTCAGATCTAAACCAATTCCACA-3'
Higg4A	5'-ATGCCCATCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGG GACCACTCATCCCTGTCTATTGCTC-3'
Higg4B	5'-GTGCTGGGCATGATGGGCATGGGGGACCATATTTG GACTCAGATCTAAACCAATTCCACA-3'
M87-F1241	5'-CCTACATCGTGACCTGGG-3'
M87-F1289	5'-GCCACCGCGCGCGCCTAGGACGGGCCGCGCCTG-3'
M87-N+2F	5'-TCTTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTAC ACTAGCTTAATACTCC-3'
M87-N+1R	5'-TCTTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTAC ACTAGCTTAATACTCC-3'
M87-R1911	5'-GTGCGTCTAAGTTACGGGAAG-3'
M104-DTV-F	5'-GCCAGACAATTATTGTCTGATACAGTGCAGCAGCAG AACAATTTG-3'
M104-DTV-R	5'-CAAATTGTTCTGCTGCTGCACTGTATCAGACAATAA TTGTCTGGC-3'
M104-SIM-F	5'-GCCAGACAATTATTGTCTAGTATAATGCAGCAGCAG AACAATTTG-3'
M104-SIM-R	5'-CAAATTGTTCTGCTGCTGCATTATACTAGACAATAAT TGTCTGGC-3'
M165-F1629	5'-GGAATTAGATAAATGGGCAAG-3'
M165-R1629	5'-CTTGCCCATTTATCTAATTCC-3'

M171-F632-BstXI	5'-AATTACCACCGCGGTGGGACTCACTATAGGGCGAA TTG-3'
M171-R1116-Sall	5'-AATTAGTCGACGCT GGAGCTCTCCGGATCAG-3'
M176-S-PRE-qcF1910	5'-CGTCGACCTGCAGGCTAGCAAGCTGGGCTGCAG-3'
M176-S-PRE-qcR1910	5'-CTGCAGCCCAGCTTGCTAGCCTGCAGGTCGACG-3'
RRE-HindIII-F	5'-AGCTTCACTATGGGCGCAGTGTCATTGACGCTGAC GGTACAGGCCA-3'
RRE-HindIII-R	5'-AGCTCTGGCCTGTACCGTCAGCGTCAATGACACTG CGCCCATAGTGA-3'

2.1.5 Enzyme

Tab. 2.4: Verwendete Enzyme und Hersteller

DNA Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Pfx</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	BD, Heidelberg
DNA-Ligase & 10X Ligasepuffer	New England Biolabs
Klenow-Fragment von <i>E. coli</i> DNA-Polymerase	Fermentas, Heidelberg
T4-Polynucleotidkinase	New England Biolabs, Schwalbach
Alkalische Shrimp Phosphatase & 10X Puffer	Roche Diagnostics, Mannheim
Alkalische Phosphatase (CIP)	New England Biolabs, Schwalbach

2.1.6 Antikörper

- Z α HlgG-PE: Phycoerythrin-gekoppelter Antikörper aus Ziegen – bindet spezifisch gegen die F_c-Region von löslichen humanen Antikörpern (Jackson Immunoresearch, USA)
- α gp41 C2F5: monoklonaler humaner Antikörper, der das Epitop ELDKWA im „heptad repeat“ 2 von HIV-1 gp41 erkennt (Muster et al., 1993; Buchschacher, 1994).

- EVA365: anti-p24 gag Antikörper, gegen HIV-1 gag p24, Aminosäuren 253-282 (Hinkula et al., 1990)
- EVA366: anti-p24 gag Antikörper, gegen HIV-1 gag p24, Aminosäuren 273-302 (Hinkula et al., 1990)
- G α MlgG: β -Galactosidase-konjugierter Antikörper aus Ziege, bindet spezifisch gegen die F_c-Region von löslichen murinen Antikörpern (Caltag, Hamburg)

2.1.7 Plasmide

Tab. 2.5: Verwendete Plasmide und Vektoren

Name	Verwendungszweck	Referenz
M23	Klonierungsplasmid pBluescript für Umklonierungen und Insertion von phosphorylierten PCR-Produkten	Stratagene, Heidelberg
M51	Retroviraler Vektor, der nur das Neomycin-Resistenzgen enthält.	von Laer et al., 1998
M56a	Retroviraler Vektor mit dem optimierten MP71-Leader und als Insert dem Markergen GFP	Schambach et al., 2000
M57	Helferplasmid zur Expression von <i>gagpol</i> für die Produktion retroviraler Partikel	Beyer et al., 2001
M104	Plasmid zur Rev-abhängigen Expression des HIV _{HxB2} Env	M. Dittmar, Universität Heidelberg
M107	Lentiviraler Vektor mit dem Markergen GFP	Dull et al., 1998
M130	Helferplasmid zur Expression des Hüllproteins vom <i>Gibbon ape leukemia virus</i> (GALV Env) zur Pseudotypisierung retroviraler Partikel	Stitz et al., 2000
M136	Retroviraler Vektor mit einem MP-1-Leader und dem nicht-optimierten Transgen. Im 5'-Bereich befindet sich ein verändertes RRE-Element	H. Martinius, Georg Speyer Haus, Frankfurt/Main
M150	Retroviraler Vektor mit dem trunkierten CD34 (tCD34), das zur Klonierung der Transmembrandomäne verwendet wurde.	K. Junker, Georg Speyer Haus, Frankfurt/Main

M171	Plasmid mit dem synthetischen Gen des optimierten C-Peptids	Geneart, Regensburg
M334	pCMV Δ R9; Expressionplasmid der HIV-Proteine gag-pro-pol zur lentiviralen Verpackung	Naldini et al., 1996
M421	p202, Plasmid zur Rev-abhängigen Expression des HIV _{HxB2} Env für Virusproduktion und Zell-Zellfusionsassays	F. Yang Whitehead Institute for Biomedical Research
M422	pcREV, Plasmid zur Expression von HIV-1 Rev	Malim et al., 1988

2.1.8 Bakterien

Als Wirtstamm für molekularbiologische Arbeiten wurden *Escherichia coli*-Stämme TOP10 von Invitrogen (Karlsruhe) oder XL1-blue von Stratagene (Heidelberg) verwendet.

Tab. 2.6: Genotyp der verwendeten Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ / <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-blue	F ⁻ <i>lacZ</i> Δ M15 <i>SupE44 hasdR17 recA1 endA1 deoR gyrA96 thi-1 relA lac</i> ⁻	Stratagene, Heidelberg

2.1.9 Zelllinien

Tab. 2.7: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz/ ATCC-Nummer	Medium
Anjou65	Humane Nierenepithelzellen	Kinsella & Nolan, 1996; CRL-11269	DMEM- Standard
293T	Humane embryonale Nieren- epithelzellen mit dem inserierten T Antigen von SV40	Numa et al., 1995; CRL-11268	DMEM- Standard
Jurkat	Humane T-Zelllinie ohne den humanen CCR5-Rezeptor	Weiss et al., 1984; TIB-152	RPMI- Standard
PM-1	Humane T-Zelllinie, abstammend von der Zelllinie HUT78, die CXCR4 und CCR5 exprimiert.	Lusso et al., 1995	RPMI- Standard
U87 CXCR4	Humane Glioblastomzelllinie, exprimiert stabil CD4 und CXCR4	Bjorndal et al., 1997	DMEM- Standard
U87 CCR5	Humane Glioblastomzelllinie, exprimiert stabil CD4 und CCR5	Bjorndal et al., 1997	DMEM- Standard

2.1.10. Geräte

Tabelle 2.8: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Kern, Albstadt
Ausschwingzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Brutschrank Cytoperm für die Zellkultur	Heraeus, Hanau
DNA-Elektrophoreseapparatur	BioRad, München
DNA-Sequenzierung: 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Durchflusszytometer: FACSCalibur & Software CellQuestPro	BD, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf
Heizblock	Techne England
Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20	Beckman, München
Mikroskop	Leica, Bensheim
PCR-Cycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter Mettler Toledo	Mettler, Giessen
Photometer Gene Quant II	Amersham Biotech, Fernwald
Rührer RCT Basic	IKA, Staufen
Schüttler TH25	Edmund Bühler, Tübingen
Sterilbank für Zellkulturen HERAsafe HS12	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Mikro 20	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge Rotina 48R	Hettich, Tuttlingen
UV-Transilluminator GelDoc 2000	BioRad, München
Vortex Genie 2	Bender und Hobein, Schweiz
Wasserbad	GFL, Burgwedel

2.2 Methoden

2.2.1 Gentechnische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli*

Plasmidtragende *Escherichia coli*-Stämme wurden in mit 100 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Selektivmedium kultiviert. Einzelkolonien wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf einer Petrischale mit LB-Agar-Medium und Inkubation im Brutschrank bei 37°C erhalten. Zur Konservierung konnten die Platten bei 4°C gelagert werden und waren für mehrere Wochen zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendbar.

Flüssigkulturen wurden zur dauerhaften Konservierung über Nacht geschüttelt und jeweils 500 µl einer Übernachtskultur mit 500 µl sterilem Wasser mit 7% DMSO gemischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Zur Identifizierung neuer Transformanden oder für Umklonierungen erfolgte die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab aus einer 2 ml-Übernachtskultur. Das verwendete JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit von Genomed ergab dabei in der Regel eine Ausbeute von je 10-20 µg Mini-Präparation. Für die Isolierung im präparativen Maßstab wurde eine 250 ml-Übernachtskultur angesetzt und die DNA mit dem QIAprep Plasmid Maxi Kit von QIAGEN erhalten. Hier betragen die DNA-Ausbeuten 500-1000 µg. Die Plasmid-DNA-Lösungen wurden zur Lagerung bei -20°C eingefroren.

2.2.1.3 Enzymatische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Bei der Neukonstruktion oder Testung von Plasmiden wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonucleasen gespalten. Dabei wurde in der Regel das Puffersystem der Firma New England Biolabs verwendet, das auf den Angaben von Sambrook et al. (1989) basiert. Die Auswahl des geeigneten Puffers erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers.

Etwa 0.5 μg Plasmid-DNA wurden zur Restriktionsanalyse eingesetzt und im präparativen Maßstab bis zu 5 μg . Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 μl , wobei 5 Units der Restriktionsendonuclease eingesetzt wurden. Die Puffer wurden als zehnfach konzentrierte Lösungen hinzugefügt und die Inkubationszeit betrug je nach Enzymkombination und Verwendungszweck zwischen 1 und 12 Stunden. Bei Bedarf wurden die erhaltenen Fragmente durch präparative Agarose-Gelelektrophorese isoliert oder für Ligationen das Enzym soweit möglich bei 65°C hitzeinaktiviert.

2.2.1.4 Eliminierung von 5'-Phosphaten an DNA-Enden mittels Phosphatasen

Zur Eliminierung von 5'-Phosphatresten an DNA-Fragmenten oder Plasmiden, die nur mit einem Enzym an mehreren Stellen geschnitten worden sind, wurde der Restriktionsverdau mit Wasser, 10X Phosphatase-Puffer auf 50 μl aufgefüllt und mit Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP, Boehringer, Ingelheim) 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde bei 65°C für 20 min hitzeinaktiviert. Die so erhaltene DNA konnte sofort für Ligationsreaktionen eingesetzt werden. Alternativ wurde die „Calf-Intestinal-Phosphatase“ (CIP) verwendet (New England Biolabs, Schwalbach), wobei die behandelte DNA anschließend mit dem EZNA Pure Kit (peqLab Biotechnologie, Erlangen) oder mittels Gelelektrophorese aufgereinigt werden musste, da das Enzym nicht hitzeinaktivierbar ist.

2.2.1.5 Phosphorylierung von DNA

Zur Vorbereitung der Ligationen von neuen PCR-Produkten mit dephosphorylierten Plasmiden wurde das Amplifikat oder andere DNA-Fragmente am 5'-Ende mit T4-Polynucleotidkinase behandelt. Dazu wurde die DNA mit 10X Kinasepuffer und 5 Units T4 Polynucleotidkinase 1 Stunde inkubiert und bei 65°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert. Die so erhaltene DNA konnte danach sofort für die Ligation eingesetzt werden.

2.2.1.6 Auffüllen von Einzelstrangenden mit Klenow Polymerase

Die nach Behandlung mit Restriktionsenzymen entstandenen überhängenden Einzelstrang-Enden wurden mit Hilfe der Klenow Polymerase in glatte Enden überführt. Dazu wurde 1 Unit des Enzyms DNA Klenow Polymerase (MBI Fermentas, St.Leon-Rot) in der vom Hersteller mitgeliefertem 10X Puffer, 1 μ l dNTP-Mix (je 1 mM dCTP, dATP, dGTP und dTTP) mit 1 μ g DNA vereinigt. Der Ansatz wurde für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Klenow Polymerase wurde für 20 Minuten bei 75°C hitzeinaktiviert und die DNA konnte anschließend für die weitere Klonierung verwendet werden.

2.2.1.7 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung doppelsträngiger DNA erfolgte in horizontalen Agarose-Gelen mit TBE oder TAE als Laufpuffer. Standardmäßig wurden dabei 1%ige Agarosegele eingesetzt. Sind die zu untersuchenden Fragmente kleiner als 500 Basenpaare, so wurden höherprozentige Gele mit bis zu 2 Prozent Agarose eingesetzt. Waren die Fragmente deutlich größer, so wurden 0.5-0.8%ige Gele verwendet. Die gewünschte Menge an Agarose wurde mit TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare Lösung erhalten wurde. Dann wurde 1/1000 Volumen Ethidiumbromidlösung (1% w/v in Wasser) zugegeben und die Flüssigkeit in die Gelkammer mit einem Geltaschenformer gegossen. Nach Erstarrung des Agarose-Gels wurde der Geltaschenformer entfernt und das Gel in eine mit TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben wurden mit 6X DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Jede Geltasche wurde üblicherweise mit maximal 30 μ l DNA-Lösung beladen. Als Größenmarker wurden 0.5 μ g 100-Basenpaarmarker oder 1-kb-Marker verwendet (New England Biolabs, Schwalbach). Die Gelelektrophorese erfolgte mit einer Spannung von 100 Volt für die Dauer von 20 Minuten. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Sofern erforderlich, wurden entsprechende Fragmente zur Gelisolierung mit einem Skalpell herausgeschnitten und isoliert (siehe Kap. 2.2.1.8).

2.2.1.8 Isolierung von DNA aus Gelen

Nach der Gelelektrophorese wurden die für die Klonierung gewünschten Banden aus dem Gel isoliert. Dazu wurde die Bande mit einem Skalpell vorsichtig aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die Isolierung wurde das „Jetquick Gel Extraction Kit“ (GENOMED, Bad Oeynhausen) verwendet. Die erhaltene DNA konnte direkt für weitere Klonierungen, Restriktionsanalysen und Sequenzierungen verwendet werden und es waren keine weiteren Reinigungsschritte erforderlich.

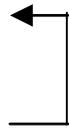
2.2.1.9 Genamplifizierung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde zur Amplifizierung von Genen aus einer cDNA-Bank oder zur Vervielfältigung bereits klonierter Genbereiche verwendet (Saiki et al, 1988). Dabei wurden jeweils zwei gegenläufige Oligodesoxynucleotide im Überschuss eingesetzt, die etwa 20 Basenpaare der Zielsequenz flankieren. Je nach Bedarf enthielten die Oligonucleotide zur Klonierung am 5'-Ende noch Restriktionsschnittstellen. Die Reaktion wurde in der Regel mit der Pfx-DNA-Polymerase durchgeführt, die aufgrund ihrer Proofreading-Aktivität eine sehr geringe Fehlerrate besitzt und DNA mit glatten Enden („blunt ends“) bildet.

Die folgenden Komponenten wurden in einer Standard-PCR in ein kleines PCR-Eppendorfgefäß pipettiert:

10x Amplifikationspuffer	5 µl
50 mM MgSO ₄	1,5 µl
dNTP-solution (10 mM ATP,GTP, CTP, TTP)	1,5 µl
Forwardprimer (10 µM)	1 µl
Reverseprimer (10 µM)	1 µl
Pfx-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
add Wasser auf 49 µl	38,5 µl
Plasmid-DNA(~20-60 ng/µl)	1 µl
<hr/>	
Gesamt	50 µl

Standard-Programm im Thermocycler:

95°C	3 min	Denaturierung		25x
94°C	30 s	Denaturierung		
60°C	30 s	Annealing		
68°C	1 min	Elongation		
68°C	3 min	Vervollständigung		

Beim Denaturierungsschritt wurden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge zerlegt, so dass die beiden Primer beim Annealing-Schritt an den Zielsequenzen hybridisieren konnten. Die Annealing-Temperatur wurde für jede PCR in Abhängigkeit der Schmelztemperaturen der Primer zwischen 56 und 68°C gewählt. Dabei wurde die Temperatur für jeden verwendeten Primer nach einer Faustformel berechnet, wobei G,C,A und T die Häufigkeit der Nucleotide im Primer angibt:

$$T_m = 4 \times (G \text{ oder } C) + 2 \times (A \text{ oder } T)$$

Bei der Elongationstemperatur von 68°C replizierte die Pfx-Polymerase in Gegenwart der dNTPs die komplementären Stränge. Die Menge des amplifizierten Produktes stieg dabei exponentiell mit der Zahl der Zyklen. Die Konzentration an MgSO₄, die Zyklenzahl und die Menge an Plasmid-DNA wurden je nach PCR individuell optimiert. Die Elongationszeit wurde in Abhängigkeit zur Produktgröße gewählt und betrug 1 min pro Kilobase.

Bei einer 3-Schritt-PCR wurden zwei einzelne PCR-Reaktionen angesetzt und die Produkte mittels Gelelektrophorese isoliert. Die Primer waren so konstruiert, dass beide PCR-Produkte einen überlappenden Bereich von etwa 20 Basenpaaren aufwiesen. Die beiden aufgereinigten PCR-Produkte wurden in äquimolaren Mengen in die dritte PCR-Reaktion als Template zugegeben und mit den äußeren Primern zu einem PCR-Produkt vereinigt.

2.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten wurde mit der T4 DNA-Ligase durchgeführt. Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl mit 2,5 µl vom Hersteller mitgeliefertem 10X Ligase-Puffer und 1 µl T4 DNA-Ligase über Nacht bei 16°C oder für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Für die

Ligation wurden etwa 50 fmol des geschnittenen Plasmids und ein etwa dreifacher Überschuss des Inserts eingesetzt. Zur Transformation von *Escherichia coli* mit den Ligationsprodukten wurden je 10 µl des Reaktionsansatzes und eine Kontrolle ohne Insert verwendet.

2.2.1.11 Ligation von PCR-Produkten in TOPO pCR1-Vektoren

Das Protokoll erfolgte weitgehend nach der Gebrauchsanweisung des „Topo TA cloning kits“ (Invitrogen, Karlsruhe). Mit Pfx-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte wurden zunächst mit 5 Units Taq-Polymerase versetzt und zur Adenylierung an den 3'-Enden 15 min bei 72°C inkubiert. Anschließend wurden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung und 1 µl Topo-Vektor für 5 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der mit dem Kit mitgelieferte Vektor war bereits geschnitten und besaß an beiden Enden das Enzym Topoisomerase, das eine effiziente und schnelle Insertion des PCR-Produktes in den Vektor gewährleistete. Nach Inkubation wurden die Ligationsprodukte in hochkompetente *Escherichia coli* Top10 transformiert und auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Nach 12-14 Stunden waren die Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von kleinen Minikulturen mit je 2 ml LB-Medium verwendet werden.

2.2.1.12 Herstellung kompetenter Zellen mit *Escherichia coli*

Zur Transformation von *Escherichia coli* mit Ligationsprodukten oder vollständigen Plasmiden wurden zunächst kompetente Zellen hergestellt. Hierfür wurde 2 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* zum Animpfen einer 200 ml-Kultur verwendet und bis zu einer $OD_{600} = 0.5 - 0.7$ herangezogen. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Nach dem Resuspendieren mit 20 ml kalter 0.1 M $MgCl_2$ -Lösung wurden die Zellen erneut für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, in 20 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei 4°C pelletiert und in 2 ml 50 mM $CaCl_2$ -Lösung mit 15% Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden á 200 µl in Eppendorf-Gefäße verteilt und bei -80°C bis zur Verwendung eingefroren. Die Zellen hatten in der Regel eine Kompetenz von etwa 5×10^5 bis 1×10^6 Kolonien/µg DNA.

2.2.1.13 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Produkte einer Ligation oder Plasmide wurden mit Hilfe von chemisch-kompetenten Zellen in *Escherichia coli* transformiert. 50 µl der kompetente *Escherichia coli* Top10-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und 10 µl Ligationsansatz beziehungsweise 50 ng Plasmid hinzugegeben. Die Zellen wurden 30 min auf Eis inkubiert und für 2 min im Wasserbad auf 42°C erhitzt. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurden 500 µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 125 U/min und 37°C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 8000 U/min herunterzentrifugiert und 450 µl Überstand verworfen. Im Restvolumen wurden die Zellen resuspendiert und auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen. Nach 12-14 Stunden wurden die einzelnen Bakterienkolonien sichtbar und konnten für das Animpfen von Minikulturen (2 ml) verwendet werden.

2.2.1.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde von der Service-Abteilung des „Georg Speyer Hauses“ (Margot Landersz, Ursula Dietrich) durchgeführt. Die Methode erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al (1977). Zur Sequenzierung von Minipräparationen wurden 7 µl DNA-Lösung verwendet und mit 1 µl 10 µM Primerlösung versetzt. Bei Maxipräparationen wurden 0.5 bis 1 µg Plasmid-DNA verwendet.

2.2.2 Zellkulturmethoden

2.2.2.1 Kultivierung und Konservierung von Zelllinien

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 7% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 90% kultiviert. Als Standardmedien wurde zum DMEM und RPMI 10% fötales Kälberserum, 2 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Streptomycin und 50 U/ml Penicillin zum Medium zugegeben.

Suspensionszellen wurden in Standard-RPMI-1640 Medium kultiviert. PM-1 Zellen, die den Neomycin-Resistenzmarker nach der retroviralen Transduktion exprimierten, wurden mit Standardmedium mit 0.8 mg/ml des Antibiotikums G418 verwendet. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 bis 1×10^6 gehalten und alle 2 bis 3 Tage wurde das verbrauchte Medium ersetzt.

Adhärenente Zellen wurden in DMEM Standardmedium gehalten, alle 2 bis 3 Tage mit frischem Medium gefüttert und regelmäßig in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:15 gesplittet. Dazu wurde das Medium entfernt, einmal mit PBS gewaschen und die Zellen mit Trypsin/EDTA behandelt. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und ein Teil der Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Für die Zelllinien U87 CXCR4 und U87 CCR5 wurde für die stabile Expression von CD4 und des Korezeptors die beiden Antibiotika G418 (0.3 mg/ml) und Puromycin (1 µg/ml) dem Medium zugesetzt.

Die dauerhafte Lagerung der Zellen erfolgte in FCS mit 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff. Zum Auftauen wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell erwärmt und in 5 bis 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert, um das für Zellen toxische DMSO zu entfernen. Adhärenente Zellen wurden anschließend in frischem und vorgewärmtem Medium resuspendiert und in eine neue Kulturflasche überführt. Suspensionszellen wurden nach der Zentrifugation in 2 ml RPMI-Standardmedium aufgenommen und in einer Verdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:6) in eine 24 Lochplatte verteilt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit Trypan-Blau (Invitrogen, Karlsruhe) gefärbt und mittels einer Neubauer-Zählkammer (Hycor Biomedicals, Kassel) ausgezählt (Phillips, 1973).

2.2.2.2 Transiente Transfektion zur Produktion retroviraler Vektoren

Die retroviralen Vektoren wurden durch transiente Transfektion mit Calciumphosphat in der Zelllinie Anjou65 produziert. Dazu wurden ein Tag vor der Transfektion 5×10^5 Anjou65-Zellen in einer 10 cm-Petrischale ausplattiert und in Standard-DMEM-Medium unter Standard-Zellkulturbedingungen kultiviert. Kurz vor der Transfektion wurde am nächsten Tag das Medium durch 2mM Glutamin/DMEM mit 10 μ M Chloroquin zur Erhöhung der Transfektionseffizienz ersetzt. 7,5 μ g retroviraler Vektor, 12,5 μ g des gag-pol-Expressionsplasmids (M57) sowie 1 μ g des GALV-env-Expressionsplasmids (M130) wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Wasser auf 450 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 μ l CaCl_2 -Lösung (2.5 M) wurde die Lösung Tröpfchenweise zu 500 μ l HEPES-Puffer unter ständigem Vortexen gegeben. Die Lösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen tropfenweise gegeben. Die Zellen wurden für 6 bis 8 Stunden mit dem DNA-Präzipitat inkubiert und anschließend das Medium mit 6 ml frischem DMEM ohne Chloroquin ausgetauscht. Die virushaltigen Zellkulturüberstände wurden nach 12, 24, 36 und 48 Stunden abgenommen und durch 6 ml frisches Medium ersetzt. Die gesammelten Überstände wurden durch einen 0.45 μ m-Filter steril filtriert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.3 Transiente Transfektion zur Produktion HIV Env pseudotypisierter lentiviraler Vektoren

Zur Herstellung von lentiviralen Vektoren wurden einen Tag vor der Transfektion 5×10^6 293T-Zellen in einer 10 cm-Petrischale ausplattiert und unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde kurz vor der Zugabe der DNA das Medium entfernt und 10 ml 2 mM Glutamin/DMEM ohne fetales Kälberserum hinzugefügt. 12,5 μ g M334 (Expressionsplasmid von gag, pro und pol), 7,5 μ g des lentiviralen Vektors M107 sowie 2 μ g des HIV-Hüllprotein Expressionsplasmids (M104, M191 oder M192) vereinigt und mit Wasser auf 450 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 μ l 2,5 M CaCl_2 -Lösung wurde die DNA-Lösung zur Präzipitation tropfenweise in 2X HEPES-Puffer unter vortexen gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation des DNA-Präzipitationsmixes wurde die DNA tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch DMEM-

Standardmedium ersetzt. Nach 24 Stunden und nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände entnommen, steril filtiert und vereinigt. Zur weiteren Verwendung wurden die Überstände bei -80°C gelagert.

2.2.2.4 Transduktion von Zelllinien mit retroviralen Überständen

Suspensionszellen

In einer mit Fibronectin-beschichteten 24 Lochplatte wurden je 2×10^5 Suspensionszellen in $100 \mu\text{l}$ Medium mit je 1 ml virushaltigem Zellkulturüberstand gemischt. Nach Zugabe von je $1 \mu\text{l}$ Protaminsulfatlösung (4 mg/ml) wurden die Zellen für 1 Stunde bei 2000 U/min und 31°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank mit dem virushaltigem Überstand inkubiert. Die Transduktion wurde je nach Bedarf mehrmals wiederholt und die Zellen anschließend 8-12 Stunden nach jedem Transduktionsschritt im Brutschrank inkubiert. Nach abgeschlossener Transduktion wurde das Medium gewechselt. Enthielten die Vektoren das Neomycinresistenzgen, so wurde dem Medium G418 zur Selektion positiv transduzierter Zellen hinzugefügt.

Adherente Zellen

In eine 24 Lochplatte wurden je $5 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ Zellen in 1 ml gegeben und über Nacht inkubiert. Das Medium wurde anschließend entfernt und durch virushaltige Zellkulturüberstände ersetzt. Nach Zugabe von $1 \mu\text{l}$ Polybrene (4 mg/ml) wurde für 1 Stunde bei 2000 U/min und 31°C zentrifugiert. Nach Bedarf wurde die Transduktion mehrfach wiederholt.

2.2.2.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der gleichzeitigen Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen oder Partikel. Die Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom hintereinander angeordnet und einzeln mittels eines Laserstrahls untersucht. Aufgrund ihrer Streulichteigenschaften können simultan Zellgröße und Granularität für mehrere tausend einzelne Zellen bestimmt werden.

Nach Anfärbung mit einem Fluorochrom oder durch Expression fluoreszierender Proteine (z.B. grün fluoreszierendes Protein) können die

Zellen mit dem Laserstrahl zur Fluoreszenz angeregt werden. Oberflächenproteine können mit einem Primärantikörper erkannt und mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper detektiert werden. Die Höhe der Fluoreszenz ist dabei proportional zur vorhandenen Zahl der Moleküle des Fluorochroms oder der Bindungsstellen für den Fluoreszenz-markierten Antikörper. Im Durchflusszytometer passieren die Zellen dann einen Laserstrahl, der die Fluoreszenzmarker anregt. Fluoreszierende und nicht fluoreszierende Zellen lassen sich so unterscheiden und voneinander trennen.

Direkte Färbung der Zellen

Für jede Probe wurden etwa 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und pelletiert. Nach Zugabe von 20 μ l des fluoreszenz-markierten Antikörpers wurden die Zellen für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Um den überschüssigen und ungebundenen Antikörper wieder zu entfernen, wurde zu den Zellen 2-3 ml FACS-Puffer (PBS mit 3% fetalem Kälberserum) gegeben, gevortext und für 7 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden erneut 2-3 ml FACS-Puffer zugegeben und nach Vortexen zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen anschließend in FACS-Puffer mit 1.5% Formaldehyd konserviert und bis zur Messung bei 4°C gelagert.

Indirekte Färbung der Zellen

Für die indirekte Färbung der Zellen wurden für jede Probe zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und bei 1200 U/min für 7 min pelletiert. Anschließend wurde 1 μ g des primären Antikörpers zugegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers wurden die Zellen gewaschen: 2-3 ml FACS-Puffer (PBS mit 3% fetales Kälberserum) wurden zur Zellsuspension hinzugegeben, gevortext, für 7 min bei 1200 U/min zentrifugiert und das Waschen zweimal wiederholt. Pro Probe wurden 20 μ l einer 1:40-Verdünnung des Phycoerythrin-gekoppelten Zweitantikörpers zugegeben und 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen und anschließend in FACS-Puffer mit 1.5% Formaldehyd bis zur Messung konserviert und bei 4°C gelagert.

Die FACS-Messung und -Analyse erfolgte am Durchflusszytometer (FACScan oder FACS-Calibur (BD, Heidelberg) mit der Software CellQuest Pro.

2.2.2.6 FACS-Sorting

Die Zellseparation mittels „FACS-Sorting“ diente der Anreicherung von transduzierten Zellen, sofern diese keinen Selektionsmarker exprimierten. In ein steriles FACS-Röhrchen wurden Zellen wie oben beschrieben (Kapitel 2.2.2.5) mit dem Erstantikörper inkubiert, gewaschen und nach Inkubation mit dem Zweitantikörper mit sterilem PBS auf eine Konzentration von etwa 1×10^7 eingestellt. Der FACS-Calibur wurde für 30 Minuten mit 70% Ethanol sterilisiert und anschließend mit sterilem PBS gewaschen. Während des Sortiervorgangs wurde die Sort-Frequenz unter 1000 Zellen pro Sekunde belassen. Direkt nach dem „Sorten“ wurde ein Teil der Zellen für die Reanalyse verwendet und die Effizienz der Sortierung überprüft. In der Regel betrug die Reinheit > 95% der sortierten Zellen.

2.2.2.7 Infektion von Zelllinien mit HIV

In den Infektionsexperimenten wurde die T-Zelllinie PM-1 mit einem infektiösen und replikationskompetenten HIV-Stamm infiziert und zur Bestimmung des HIV-1 Antigens p24 mittels ELISA in regelmäßigen Abständen Zellkulturüberstände entnommen.

Zur Infektion wurden 1×10^5 PM-1 Zellen in einer 24 Lochplatte ausgesät. Die HIV-1-Virusstammlösung wurde bis zur entsprechenden MOI verdünnt und in 5 bis 20 μl zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden weiterkultiviert und alle 2 bis 3 Tage wurden 100 μl Zellkulturüberstand zur p24-Bestimmung entnommen, in 96 Lochplatten überführt und mit 10 μl 5% NP40-Lösung inaktiviert. Bis zur p24-Bestimmung wurden die Proben bei -20°C gelagert (siehe Kapitel 2.2.2.8).

2.2.2.8 ELISA zur Bestimmung der p24-Konzentration in Zellkulturüberständen

Als Maß für die HIV-Infektion und -Replikation dient die Produktion von p24, das von infizierten Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben wird. Die Infektion mit HIV-1 führt in Zellkulturüberständen zu einer steigenden Konzentration des HIV-Antigens p24. Die Konzentration von HIV-1 p24 dient dabei als Maß für die Höhe der HIV-Replikation.

Die in 96 Lochplatten gelagerten Überstände wurden aufgetaut und je nach zu erwartender Konzentration zwischen 1:100 und 1:1000 verdünnt. Zur Bestimmung der Standardkurve wurde eine Negativ-Kontrolle sowie Standard-Lösungen des ELISA-Kits in verschiedenen Verdünnungen vorbereitet. Die Durchführung des ELISA-Tests erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers (Innogenetics, Heiden-Westfalen) und anhand der bestimmten Standard-Kurve wurde die Endkonzentration in den Überständen berechnet. Zur Auswertung wurde das Modell der linearen Regression zugrunde gelegt.

2.2.2.9 „Single-round infection“ mit HIV-Pseudotypisierten Viren

5×10^4 adhärente oder $2-5 \times 10^5$ Suspensionszellen wurden in 24 Lochplatten ausgesät, der virushaltige Zellkulturüberstand mit gewünschter MOI auf die Zellen gegeben und 1 Stunde bei 2000 U/min und 31°C zentrifugiert. Nach Inkubation im 37°C -Brutschrank über Nacht wurde die Transduktion bei Suspensionszellen wiederholt. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und nach weiteren zwei Tagen Kultivierung die Zellen schließlich in FACS-Röhrchen überführt. Nach Waschen mit FACS-Puffer (PBS mit 1.5% fetales Kälberserum) wurden die Zellen pelletiert und in FACS-Puffer mit 3% Formaldehyd bis zur Messung konserviert und bei 4°C gelagert. Im FACS-Gerät wurde dann das Markergen GFP detektiert und der Prozentsatz infizierter Zellen bestimmt.

2.2.2.10 Herstellung replikationskompetenter Viren

Zur Durchführung von Infektionsexperimenten mit replikationskompetentem HIV wurden virushaltige Zellkulturüberstände hergestellt. Dazu wurden 5×10^5 der T-Zelllinie PM-1 ausplattiert und mit dem Virusstamm HIV_{NL4-3} infiziert. Andere Virusstämme wie das Primärisolat HIV_{D117-II} (Rübsamen-Waigmann et al., 1989) wurden auf PBMCs kultiviert. Alle 2 bis 3 Tage wurden die Kulturen auf die Bildung von Synzities hin untersucht und Überstände zur Ermittlung der HIV p24-Antigenkonzentration gesammelt. Ein Mal pro Woche wurden PHA-stimulierte primäre T-Zellen zur Weitvermehrung der viralen Partikel im Falle des Primärisolats HIV_{D117-II} zugegeben. Bei entsprechend hoher p24-Konzentration wurde der Zellkulturüberstand gesammelt, steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung in je 500 µl bei -80°C gelagert.

2.2.2.11 Bestimmung der Virustiter mit der TCID₅₀-Methode

3×10^4 PM-1 Zellen wurden in einer 96 Lochplatte in 150 μ l RPMI-Standardmedium gegeben und mit verschiedenen Verdünnungen der virushaltigen Zellkulturüberstände infiziert. Die Zellen wurden für 14 Tage bei 37°C im Inkubator weiterkultiviert und alle 2 Tage mit frischem Medium versorgt. Anschließend wurden die Kulturen unter dem Lichtmikroskop auf Synzitionen hin untersucht. Die Verdünnung, bei der die Hälfte der Zellen Synzitionen gebildet haben, wurde zur Bestimmung des Virustiter verwendet und konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Titer} = (\text{Zahl der Viruspartikel/ml}) = \text{Verdünnungsfaktor} \times 100$$

2.2.2.12 Bestimmung der Virustiter mittels intrazellulärer p24-Färbung

Einen Tag vor der Infektion wurden 3×10^4 U87 CXCR4 oder U87 CCR5-Zellen in einer 48 Lochplatte ausplattiert und in 500 μ l DMEM-Standardmedium kultiviert. Von den virushaltigen Zellkulturüberständen wurde eine Serie von Verdünnungen angesetzt und die Indikatorzelllinien infiziert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in Aceton/Methanol (1:1) zur Fixierung 5 min inkubiert und erneut mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Antikörper EVA365 und EVA366 in RPMI ohne Phenolrot (2% FCS) wurden die Zellen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit dem Sekundärantikörper G α MlgG inkubiert, der den Primärantikörper detektiert und mit β -Galactosidase gekoppelt ist. Nach sorgfältigem Waschen mit PBS wurde mit 300 μ l Substratlösung gefärbt. Unter dem Lichtmikroskop wurde dann die Zahl der blau gefärbten Synzitionen gezählt und daraus der Virustiter bestimmt:

$$\text{Virustiter [FFU/ml]} = \text{blau gefärbte Synzitionen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.2.2.13 Zell-Zellfusionsassays

Transiente Transfektion für die Expression von HIV-Env auf der Zelloberfläche der Effektorzellen

Für die Zell-Zellfusionsassays wurden als Effektorzellen 293T-Zellen verwendet, die nach Transfektion der Plasmide M421 (pSG-HxB2) und Rev (Plasmid pcREV, M422) das Hüllprotein von HIV_{HxB2} exprimierten. Dazu wurden zunächst 5×10^5 293T-Zellen in einer 10 cm-Petrischale ausplattiert. Am nächsten Tag wurden je 12.5 µg M421 und 7.5 µg M422 in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit sterilem Wasser auf 450 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 50 µl CaCl₂-Lösung (2.5 M) wurde die Mischung in 500 µl HEPES-Puffer unter vortexen pipettiert. Das Präzipitat wurde 20 Minuten inkubiert und kurz vor der Zugabe die Zellen mit DMEM (10 µM Chloroquin) versetzt. 2 Tage nach Transfektion exprimierten die Zellen maximal die entsprechenden Proteine und konnten für die Zell-Zell-Fusionsassays eingesetzt werden.

Färbung und Fusionsexperiment

Die PM-1-Zielzellen wurden zunächst zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 2 ml PBS mit 7 µl 7-Amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC, MoBiTec, Göttingen) für 30 Minuten im 37°C-Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und für 15 Minuten in PBS bei 37°C inkubiert und zwei Mal mit PBS gewaschen. Die Effektorzellen wurden analog mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Calcein AM (MoBiTec, Göttingen) gefärbt.

Anschließend wurden die Zellen gezählt und 2×10^5 der Ziel- mit der gleichen Zellzahl an Effektorzellen in 400 µl DMEM-BSA vereinigt. Je 200 µl wurden in eine Kammer pipettiert. Nach Inkubation bei 37°C wurde die Kammer zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die Fusion von Zielzellen und Effektorzellen konnte durch das Durchmischen der beiden Fluoreszenzfarbstoffen beobachtet werden. Anhand der Zellkontakte und der beobachteten Fusionen wurde der Anteil an fusionierten Zellen berechnet:

$$\frac{\text{(Zahl der Fusionsereignisse)}}{\text{(Gesamtzahl Kontakte Ziel- und Effektorzellen)}} \times 100 = \% \text{ Fusion}$$

Temperatur- und Lipid-arretiertes Stadium

Zur Etablierung des „Temperatur-arretierten“-Stadiums (TAS) wurden die Zellkammern mit den wie oben gefärbten Zellen zunächst für 3 Stunden bei 23°C inkubiert und erst anschließend für das Fusionsexperiment in den Brutschrank bei 37°C gestellt. Das „Lipid-arretierte Stadium“ (LAS) wurde erreicht, indem die Zellen zunächst analog wie beim „Temperatur-arretierten Stadium“ für 3 Stunden bei 23°C inkubiert wurden. Anschließend wurde das Medium vorsichtig entfernt und L-Lysophatidylcholin (2 mg/ml) in PBS zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Dabei kann die Fusion der Zellen bis zur Inhibition der Membranfusion fortschreiten. Nach Abkühlung auf Eis wurde zweimal mit PBS gewaschen und anschließend die Kammer zur Durchführung des Fusionsexperimentes bei 37°C inkubiert.

3. Ergebnisse

3.1 Strategien zur Optimierung von M87-Ineo

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Laer wurde der retrovirale Vektor M87-Ineo entwickelt, der die Expression des Fusionsinhibitors C36 auf der Zelloberfläche ermöglicht und den Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle hemmt (Hildinger et al., 2001). Der Inhibitor C36 ist abgeleitet von HIV gp41-Protein (Aminosäuren 643-678) und wurde mit einem flexiblen Linker (murine Hinge IgG2) sowie zur Verankerung mit der Membrandomäne von Δ LNGFR fusioniert (Abb. 3.1). Zur Selektion transduzierter Zellen enthält der Vektor außerdem das Neomycin-Resistenzgen für die Expression der Neomycin-Phosphotransferase (Hildinger et al., 1998) vermittelt über eine polio-IRES (Dirks et al., 1993; Attal et al., 1999). Mit diesem Vektor transduzierte Zellen exprimieren das Peptid auf ihrer Oberfläche und hemmen sehr effizient die HIV-Replikation von HIV_{NL4-3} (Hildinger et al., 2001).



Abb. 3.1: Aufbau des retroviralen Vektors M87-Ineo

- LTR MPSV: Long-terminal repeats des „Myeloma proliferative sarcoma virus“
 Leader MESV: „Mouse embryonic stem cell virus“-Leader (MP1)
 S: Signalpeptid für die Translokation in das ER abgeleitet von Δ LNGFR
 C36: Inhibitorisches Peptid abgeleitet von HIV-1 gp41 (Aminosäuren 643-678)
 muHIgG2: Hinge von murinem IgG2
 LNGFR-MSD: Transmembrandomäne von LNGFR

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung des retroviralen Vektors M87-Ineo für die klinische Applikation zur Gentherapie der HIV-Infektion. Im Mittelpunkt standen dabei die Reduktion der Immunogenität des exprimierten

Peptides, die Erhöhung der Expression sowie der Resistenzbildung vorzubeugen.

Die einzelnen Module des Peptids und des retroviralen Vektors wurden systematisch ausgetauscht und auf ihre Funktionalität hin getestet. Die neu konstruierten Vektoren wurden zur Produktion der retroviralen Partikel gemeinsam mit den Expressionsplasmiden für gagpol (M57) und GALV env (M130) in Anjou65 transfiziert. Die so hergestellten Zellkulturüberstände wurden zur Transduktion der T-Helferzelllinie PM-1 verwendet. In der Regel wurde dabei eine Transduktionsrate von unter 25 Prozent angestrebt, um Mehrfachintegrationen zu verhindern. Zellen, die mit Konstrukten mit Neomycin-Resistenzmarker transduziert worden sind, wurden vor der Durchführung weiterer Experimente für 7 Tage unter Selektion gestellt.

3.2 Reduktion der Immunogenität durch Substitution des flexiblen Linkers

Der Vektor M87-Ineo ermöglicht die Expression von Fusionsinhibitoren auf der Oberfläche von transduzierten Zellen. Das inhibitorische Peptid C36 wurde dabei mit einem Linker versehen, der dem Peptid Flexibilität verleihen sollte. Die Sequenz dieses Linkers ist abgeleitet vom Gelenk („Hinge“) des murinen IgG2 Antikörpers. Somit handelt es sich um eine murine Sequenz, die potentiell immunogen wirken könnte. Zellen, die *ex vivo* mit dem retroviralen Vektor transduziert wurden, könnten nach autologer Transfusion vom Immunsystem als „fremd“ erkannt und eliminiert werden. Um das immunogene Potential des exprimierten Peptids zu reduzieren, wurden analog die Gelenke von humanen Antikörpern der IgG-Klasse getestet. Dabei wurde der murine Linker durch Sequenzen von Hinges der humanen Antikörper IgG1, IgG2 und IgG4 ersetzt (siehe Tab. 3.1). Die Hinge des humanen IgG3 wurde nicht bei der Auswahl berücksichtigt, weil der Linker mit 85 Aminosäuren wesentlich länger ist als mit 13 im ursprünglichen Konstrukt M87-Ineo.

Tab. 3.1.: Aminosäure-Sequenzen und Längen der verwendeten Linker sowie deren Konstruktamen.

Linker	Sequenz	Länge	Konstrukt
mlgG2	VPRDCGCKPCICT	13	M87-Ineo
hulgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP	23	M87/HlgG1-Ineo
hulgG2	ERKCCVECPAPPVAGP	19	M87/HlgG2-Ineo
hulgG3	ELKTPLGDTTGT(CPRCP) ₄ (EPKSCDTPPPCPRCP) ₃ APPELLGGP	85	-
hulgG4	ESKYGPPCPSCPAPPELLGGP	21	M87/HlgG4-Ineo

3.2.1. Klonierung der Vektorkonstrukte mit den Linkervarianten

Die verschiedenen Linker-Varianten wurden über eine so genannte 3-Schritt-PCR generiert, da im Bereich der Linkersequenz keine Restriktionsstellen vorhanden waren und die neuen Linker über die Oligonucleotide eingeführt wurden. Der flexible Linker der humanen Hinge von IgG2 wurde kloniert, indem eine PCR mit den Primern M87-F1289 und Higg2B, sowie Higg2A und M87-1-R ausgehend von M87-Ineo durchgeführt wurde. Die Oligonucleotid-Primer waren so konzipiert, das die beiden ersten PCR-Produkte eine komplementäre Überlappung von etwa 20 bp enthielten. Die beiden PCR-Produkte wurden kombiniert, mit den beiden äußeren Primern M87-F1289 und M87-1-R amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit der NotI-Schnittstelle durch die Genkassette in M87-Ineo ersetzt (Abb. 3.2). Analog wurden die Klonierungen für die humane Hinge von IgG1 (Primer Higg1A und Higg1B) und für IgG4 (Primer Higg4A und Higg4B) durchgeführt.

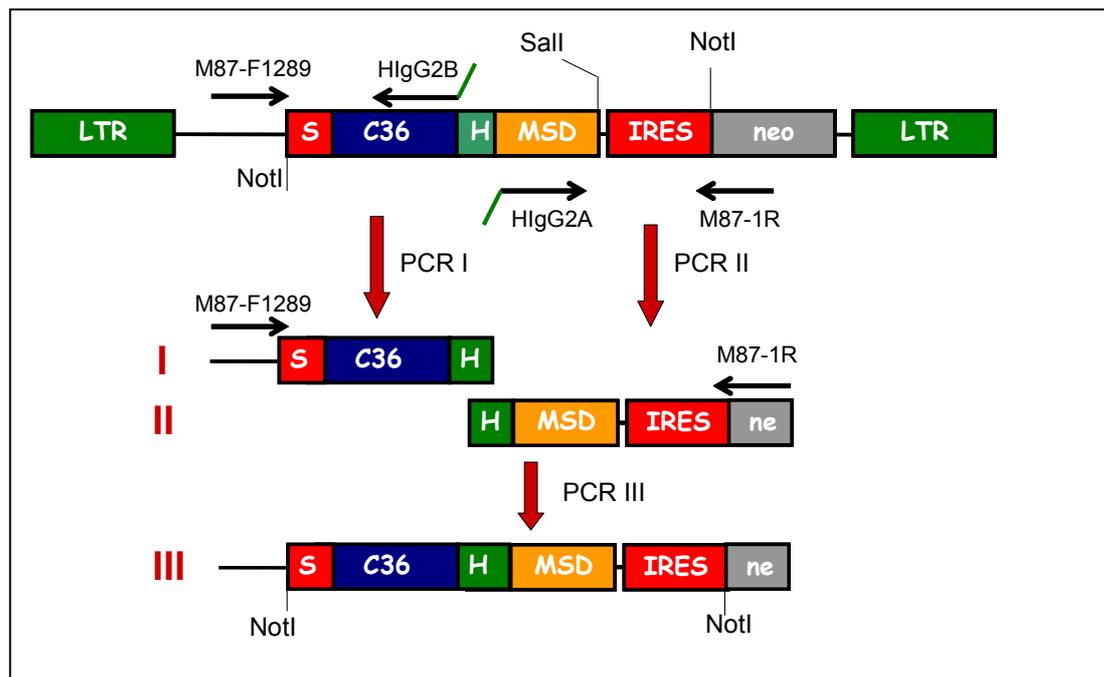


Abb. 3.2: Strategie zur Klonierung der Linker-Varianten. In der PCR I wurde der 5'-Bereich des Transgens mit den Primern M87-F1289 & HlgG2 und in PCR II der 3'-Bereich mit den Primern HlgG2A und M87-1R amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden vereinigt und in PCR III mit den Primern M87-F1289 und M87-1-R vervollständigt. Die mitamplifizierten Restriktionsstellen (NotI) dienen zur Umklonierung in den Vektor M87-Ineo.

3.2.2. Einfluss des Linkertyps auf Expression und inhibitorische Wirkung des Fusionshemmers C36

Im ersten Schritt wurden die retroviralen Konstrukte M87-Ineo mit der murinen Hinge IgG2, M87/HlgG1-Ineo, M87/HlgG2-Ineo und M87/HlgG4-Ineo gemeinsam mit dem GALV env Expressionsplasmid (M130) und dem MLV gagpol Expressionsplasmid (M57) in Anjou65 Zellen transfiziert, die infektiöse, replikationsinkompetente Viruspartikel produzierten. Die T-Helferzelllinie PM-1 wurde mit den virushaltigen Zellkulturüberständen transduziert und mit G418 selektioniert.

Die transduzierten und selektionierten Zellen wurden mit dem monoklonalen humanen C2F5-Antikörper gefärbt, der an das Epitop ELDKWA von HIV-1 gp41 bindet (Buchacher et al., 1994; Kunert et al., 1999). Der Antikörper C2F5 wurde mit dem PE-gekoppeltem Sekundärantikörper ($Z\alpha$ HlgG-PE) detektiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Als Maß für die Bindung des PE-gekoppelten Antikörpers diente die mittlere Fluoreszenz der gefärbten Zellen im FACS.

Beim Vergleich zwischen den Vektorkonstrukten mit den verschiedenen Linkern und dem Anfangskonstrukt M87-Ineo gibt es in der Expression keine wesentlichen Unterschiede und die mittleren Fluoreszenzen sind vergleichbar (Abb. 3.3; M87-Ineo=8.2, M87/HlgG1-Ineo=9.9, M87/HlgG2-Ineo=7.9, M87/HlgG4-Ineo=9.11). Der Austausch des Linkers hatte somit keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression.

Die PM-1 Zelllinie wurde zur Testung der inhibitorischen Effizienz mit dem Stamm HIV-1_{NL4-3} mit einer MOI = 0.05 infiziert und es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellkulturüberstände entnommen. Mit einem ELISA wurde die Konzentration des HIV p24-Antigens als Maß für die HIV-Replikation bestimmt. Das Konstrukt M87-Ineo hemmte effizient die HIV-Replikation über den 12. Tag hinaus, während bei den Kontrollzellen MP1-neo nach Tag 3 eine steigende Replikation festgestellt wurde. Das Konstrukt, welches das Peptid mit der Hinge von hulgG4 exprimiert, zeigte eine zeitliche Verzögerung der Infektion um 5 Tage, verhinderte aber einen Durchbruch der HIV-Replikation nicht und hemmte daher ineffizienter als M87-Ineo. Die Expression des C36-Peptids mit der Hinge von hulgG1 auf der Oberfläche der

T-Zellen hemmte die HIV-Replikation nicht, weil bereits nach Tag 3 die HIV-Infektion in der Kultur durchgebrochen war. Die HIV-Replikation wurde durch das Konstrukt mit der Hinge von hulG2 mindestens genauso effizient inhibiert, wie durch das Basiskonstrukt M87-Ineo (Abb. 3.4).

Der Austausch des Linkers führte zwar zu keiner Veränderung der Expression, hingegen war die Stärke der inhibitorischen Wirkung des Peptides von der Linkersequenz des Peptides abhängig. Die humane Hinge von IgG2 wurde für das optimierte Konstrukt weiterverwendet, weil nur dieses die HIV-Replikation genauso erfolgreich hemmte, wie das Basiskonstrukt M87-Ineo.

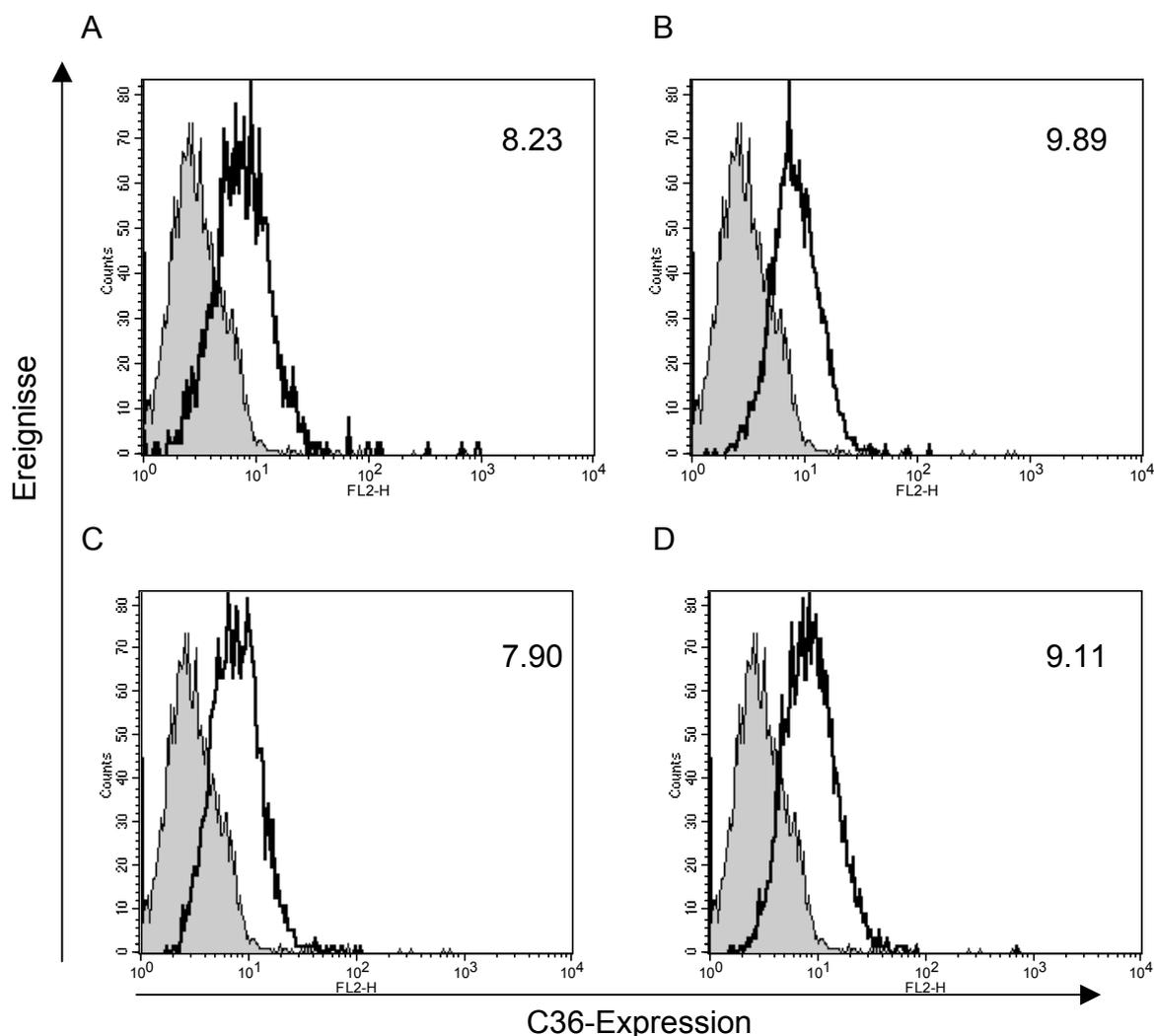


Abb. 3.3: Expression der verschiedenen Linkerkonstrukte. Die Zelllinie PM-1 wurde mit den retroviralen Vektoren transduziert und nach Selektion mit G418 wurde das Peptid mit dem C2F5-Antikörper detektiert. Die Werte geben die mittlere Fluoreszenzen an. **(A)** M87-Ineo **(B)** M87/HlgG1-Ineo **(C)** M87/HlgG2-Ineo **(D)** M87/HlgG4-Ineo (In grau jeweils MP1-neo).

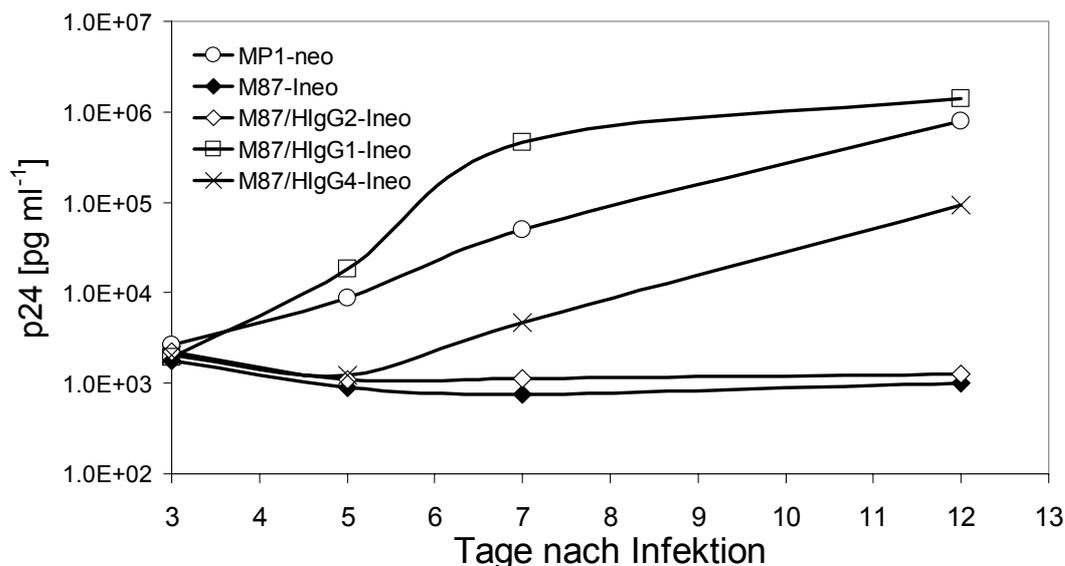


Abb. 3.4: Hemmung der HIV-Replikation durch Expression der verschiedenen Linkerkonstrukte in PM-1. Die transduzierten und selektionierten PM-1 Zellen wurden mit dem Stamm HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.05 infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Zellkulturüberstände entnommen. Als Maß für die HIV-Replikation wurde die Konzentration des HIV-Antigen p24 in den Überständen mittels ELISA gemessen.

3.3 Substitution des Δ LNGFR-Membranankers

Zur Verankerung des inhibitorischen C36-Peptids auf der Oberfläche wurde in M87-Ineo die Transmembrandomäne von LNGFR verwendet, das als Oberflächenmarker für T-Zellen entwickelt wurde (Mavilio et al., 1994). Doch neuere Mausmodelle (Li et al., 2002) in Verbindung mit früheren Studien in Fibroblasten (Hantzopoulos et al., 1994) stützen die Hypothese, dass die Δ LNGFR-Expression in myeloiden Zellen ihre Transformation verstärken könnten. Zwar sind die Interaktionsdomänen des Δ LNGFR im extrazelluläre Bereich, doch um eine Gefährdung des Patienten in einer klinischen Studie grundsätzlich auszuschließen, wurde der Membrananker in M87-Ineo ausgetauscht. Darüber hinaus wurde für Δ LNGFR gezeigt, dass das Protein nicht fest in der Membran verankert ist und sich von der Oberfläche lösen kann (Comoli et al., 1996). Eine Alternative zu Δ LNGFR bietet der Membrananker von trunkiertem CD34 (tCD34), einer natürlichen Splice-Variante des CD34-Proteins (Fackler et al., 1995). Die mRNA enthält ein zusätzliches Exon, das so genannte Exon X, welches ein funktionelles

Stopcodon zwischen die Exons 7 und 8 inseriert (Suda et al., 1992; Nakamura et al., 1993). Diese Exons kodieren für die intrazelluläre Domäne von CD34, so dass tCD34 einen verkürzten cytoplasmatische Teil statt der üblichen 73 nur 16 Aminosäuren besitzt. Damit fehlt dem tCD34-Molekül der intrazelluläre Bereich, der für die Signaltransduktion von Bedeutung ist (Krause et al., 1996), aber für die HIV-Gentherapie sich störend auswirken könnte. Das verkürzte CD34-Molekül ist deshalb interessant, weil es bereits erfolgreich als Markergen in T-Zellen verwendet wurde und fest in der Membran integriert wird (Fehse et al., 2000). Für den Austausch des Membranankers wurden die Aminosäuren 278 bis 316 von tCD34 anstelle des Δ LNGFR-Ankers kloniert, mit dem Ziel zumindest keinen Verlust der Expression des Fusionshemmers zu erzielen.

3.3.1. Klonierung des Vektorkonstruktes mit der tCD34-Transmembrandomäne

Zum Austausch des Membranankers wurden die Aminosäuren 278 bis 316 der Transmembrandomäne von trunkiertem CD34 kloniert. Dazu wurde mit den Primer M165-F1629 und CD34-R der Membrananker-kodierende Bereich aus dem Plasmid M150 (Sfa11-tCD) amplifiziert. Der 5'-Bereich wurde aus dem Plasmid M87-Ineo mit den Primern M165-R1629 und M87-F1289 amplifiziert. Die Oligonucleotide waren so konstruiert, dass die beiden PCR-Produkte eine Überlappung von etwa 20 bp besaßen, so dass die Produkte vereinigt und in einer dritten PCR mit den Primern M87-F1289 und CD34-R vervollständigt werden konnte (siehe Abb. 3.5). Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Enzymen BstXI und Sall in den Vektor M87-Ineo rekloniert und das Plasmid M87/CD34-Ineo erhalten.

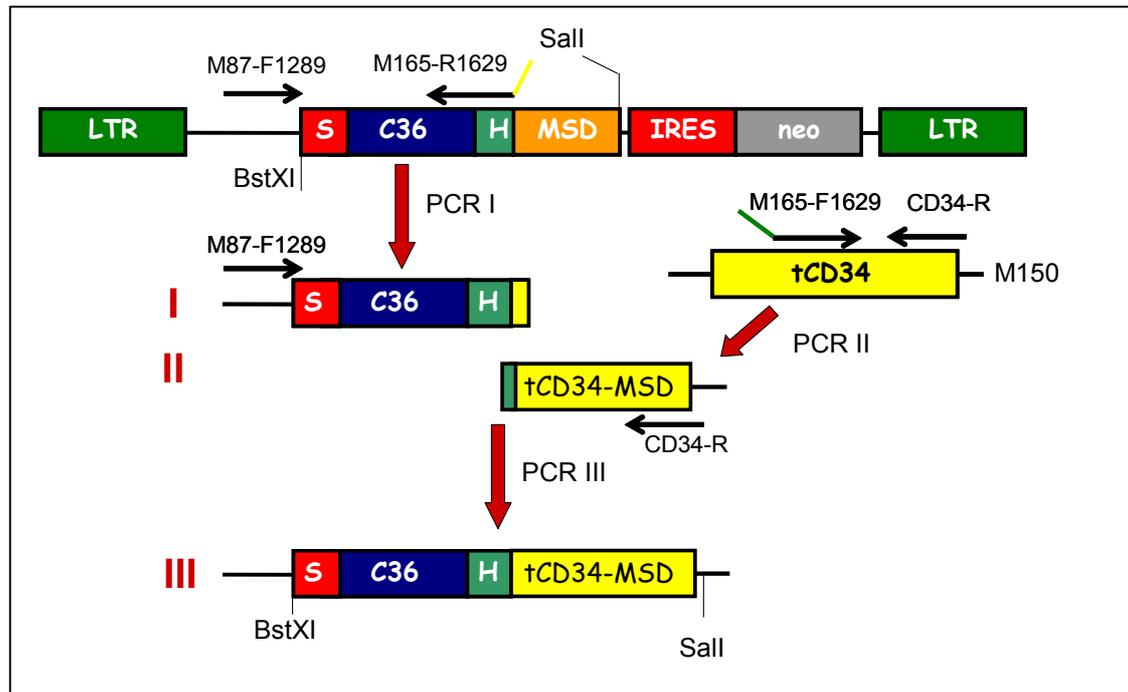


Abb. 3.5: Strategie zur Klonierung des Konstruktes mit der tCD34-Transmembrandomäne. In der PCR I wurde der 5'-Bereich von M87-Ineo mit den Primern M87-F1289 & M165-R1629 und in PCR II etwa 10 Basen der Hinge mit der Transmembrandomäne von tCD34 durch die Primer M165-F1629 und CD34-R amplifiziert. Beide PCR-Produkte wurden vereinigt und in PCR III mit den Primern M87-F1289 und CD34-R vervollständigt. Die Restriktionsstellen BstXI und Sall dienten zur Umklonierung in den Vektor M87-Ineo.

3.3.2. Vergleich des Konstruktes mit dem M87/CD34-Ineo mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo

Von den Konstrukten wurden Virusüberstände in der Zelllinie Anjou65 produziert und damit die Zelllinie PM-1 transduziert. Nach Selektion mit G418 wurde das C-Peptid mit dem C2F5-Antikörper auf der Zelloberfläche mittels Durchflusszytometrie detektiert. Wie das Histogramm in Abbildung 3.6 zeigt, exprimierten die PM-1 Zellen nach dem Austausch der Transmembrandomäne (M87/CD34-Ineo) das C-Peptid genauso gut (mittl. Fluoreszenz 5.0) wie das Basiskonstrukt M87-Ineo (4.6).

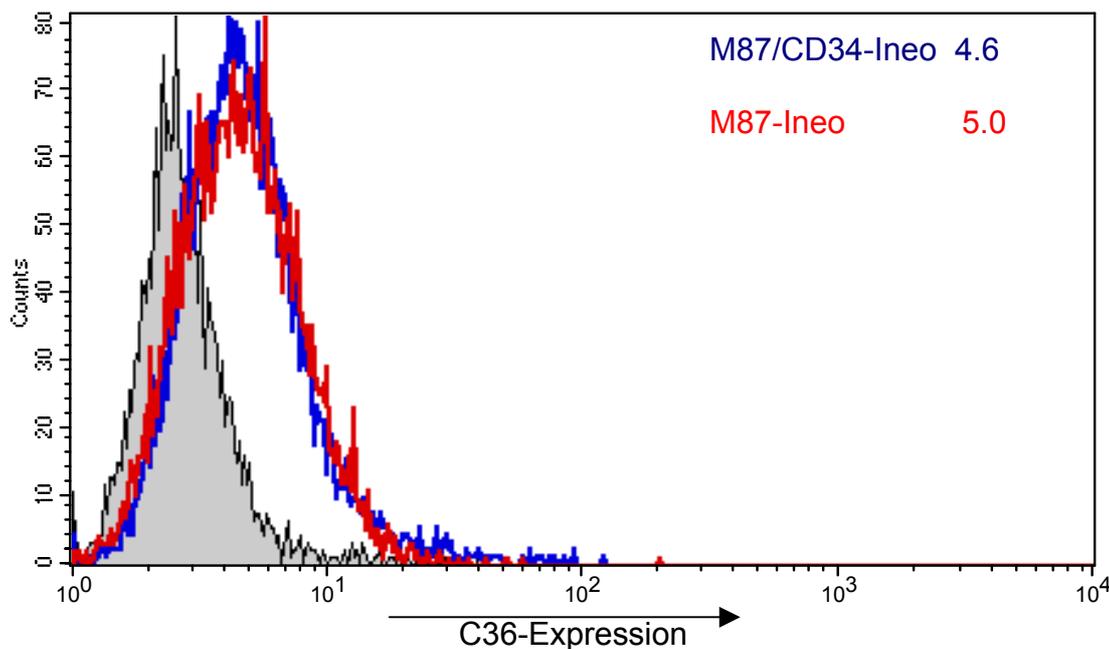


Abb. 3.6: Expression des C36-Peptids mit der Transmembrandomäne von Δ LNGFR (M87-Ineo) und tCD34 (M87/CD34-Ineo). Die PM-1 Zellen wurden mit den retroviralen Vektoren von M87-Ineo und M87/CD34-Ineo transduziert. Nach Selektion mit G418 wurde das C-Peptid mit den C2F5-Antikörper mittels Durchflusszytometrie gemessen und die mittlere Fluoreszenz bestimmt. (grau = Kontrollzellen PM-1 MP1-neo)

3.4. Verlängerung des inhibitorischen Peptids C36

Die Sequenz des C36 ist abgeleitet von den Aminosäuren 638 bis 673 des gp41 und liegt im Bereich des C-terminalen „heptad repeat“ (HR2). Gegenmutationen im N-terminalen „heptad repeat“ (HR1) sind verantwortlich für die Resistenz gegen das C36/T20-Peptid (Rimsky et al., 1998). Dabei werden die 3 Aminosäuren GIV im HR1 zu SIM oder DTV mutiert (Abb. 3.7). Fusionsinhibitoren, deren Peptidsequenz vom weiter N-terminal liegenden Bereich des HR2 abgeleitet sind, können diese HIV env-Resistenzmutanten hemmen. Dieser Bereich im HR2 bildet eine bei verschiedenen HIV-Stämmen konservierte Region, die für die Interaktion zwischen dem HR1 und HR2 wichtig ist (Chan et al., 1997). Um T20/C36-resistente HIV-Stämme zu hemmen, wurde das C-Peptid um 10 Aminosäuren auf insgesamt 46 verlängert (Aminosäuren 629 bis 673 von gp160).

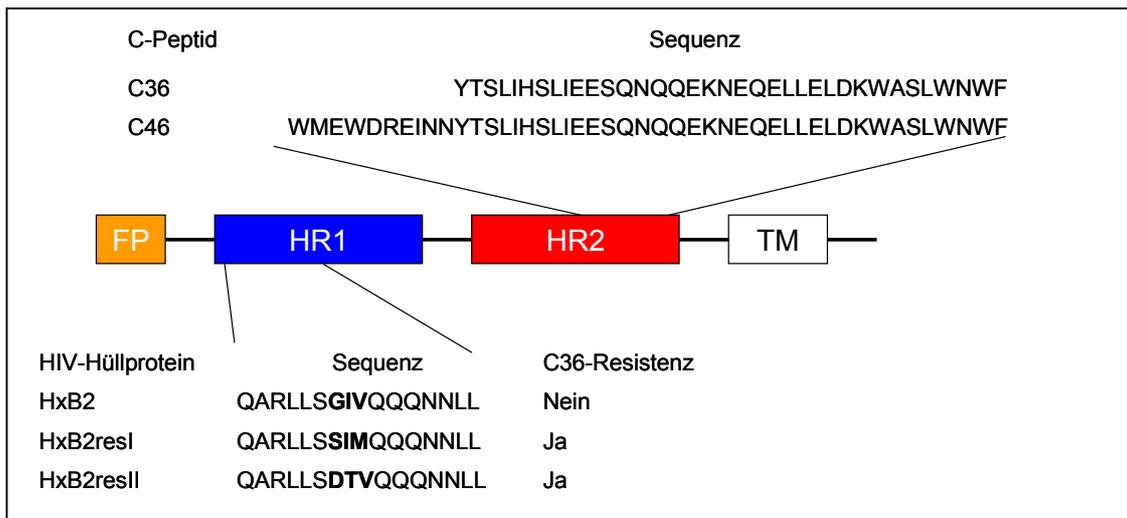


Abb. 3.7: C36/T20-resistente HIV-Stämme besitzen im HR1 Mutationen des GIV-Motifs. Das C36-Peptid ist vom „heptad repeat“ 2 (HR2) abgeleitet. Mutationen im HR1 führen zur Resistenz von C36-Peptiden. Weiter N-terminal liegende Aminosäuren des HR2 interagieren mit einer konservierten Region im HR1 und inhibieren C36-resistente HIV-Stämme. Das C36-Peptid wurde um 10 Aminosäuren zum C46-Peptid N-terminal verlängert, um auch C36-resistente HIV-Stämme hemmen zu können.

FP: Fusionspeptid von gp41; HR1/HR2: heptad repeat 1/2; TM: Transmembrandomäne von gp41

3.4.1 Klonierung des Vektorkonstruktes

Für die Verlängerung des C36-Peptids um 10 Aminosäuren wurde eine PCR mit dem Primern M87-F1241 und M87N+1-R sowie M87N+2F und M87-R1911 mit dem Plasmid M87-Ineo durchgeführt. Die beiden PCR-Produkte wurden kombiniert und in einer dritten PCR mit den Primern M87-F1241 und M87-R1911 amplifiziert. Das vervollständigte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BstXI und Sall geschnitten, in den Vektor M87-Ineo kloniert und das Konstrukt M87/C46-Ineo erhalten (Abb. 3.8).

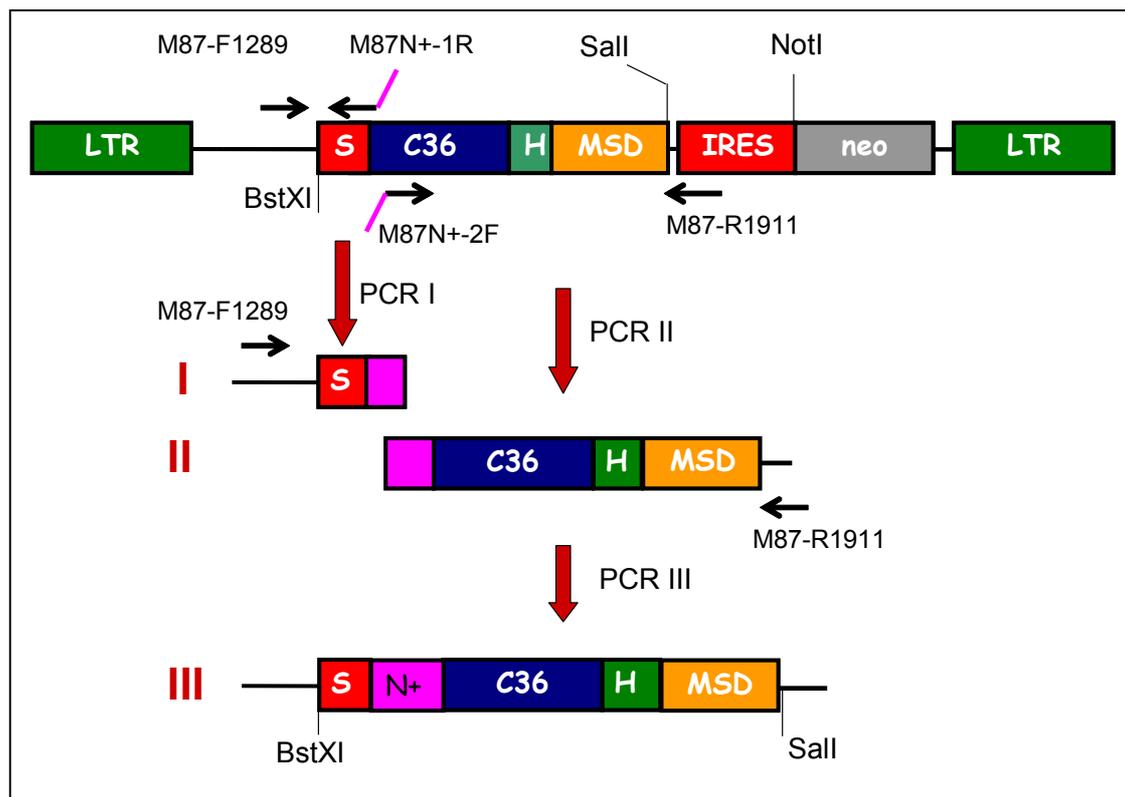


Abb. 3.8: Strategie zur Klonierung des Vektors mit dem N-terminal verlängerten C46-Peptid. Ausgehend vom Basiskonstrukt wurde mit den Primern M87-F1289 und M87-N+-1R das Signalpeptid und ein Teil der Verlängerung über den Primer amplifiziert. In PCR II wurde das C36-Peptid mit Linker und Membrananker über die Primer M87N+-2F und M87-R1911 amplifiziert. Die beiden PCR-Produkte besaßen einen überlappenden Bereich von 20 Basenpaaren und wurden in einer dritten PCR vereinigt und mit den Primern M87-F1289 und M87-R1911 zu einem PCR-Produkt vervollständigt.

3.4.2. Vergleich der Expression und inhibitorischen Wirkung

Nachdem die retroviralen Überstände mittels Transfektion von pgagpol (M51) und pGALV env (M130) mit den retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87/C46-Ineo in den Anjou65 Zellen produziert worden sind, wurden PM-1 Zellen mit den Vektoren transduziert und mit G418 selektioniert. Anschließend wurde das Expressionsniveau der C-Peptide mit dem Antikörper C2F5 auf der Zelloberfläche mittels FACS detektiert. Das N-terminal verlängerte Peptid wurde etwas stärker mit einer mittleren Fluoreszenz von 13.1 im Vergleich zu M87-Ineo mit 11.2 exprimiert (Abb. 3.9).

Die beiden Zelllinien PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87/C46-Ineo wurden mit HIV_{NL4-3} (MOI = 0.05) infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellkulturüberstände entnommen, um mittels ELISA die Konzentration des p24 Antigens von HIV zu bestimmen. Bei den Kontrollzellen ist ein Durchbruch der HIV-Infektion schon nach 5 Tagen zu beobachten. Im Gegensatz dazu sind die mit M87-Ineo und M87/C46-Ineo transduzierten T-Zellen vor der HIV-Replikation durch die Expression der verschiedenen C-Peptide innerhalb des Beobachtungszeitraumes geschützt (Abb. 3.10).

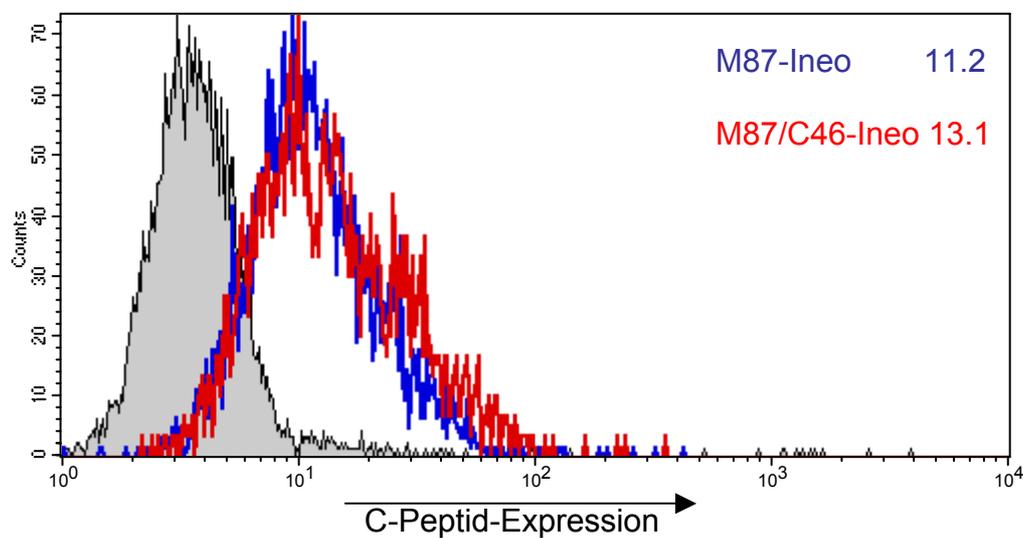


Abb. 3.9: Expression des C36-Peptides versus des verlängerten C46-Peptids. Die PM-1 Zellen wurden transduziert mit Viruspartikeln von M87-Ineo und M87/C46-Ineo. Nach Selektion wurde das Peptid mit dem Antikörper C2F5 nachgewiesen. Die Zahlen geben die mittleren Fluoreszenzen an. In grau sind die Kontrollzellen PM-1 MP1-Ineo dargestellt.

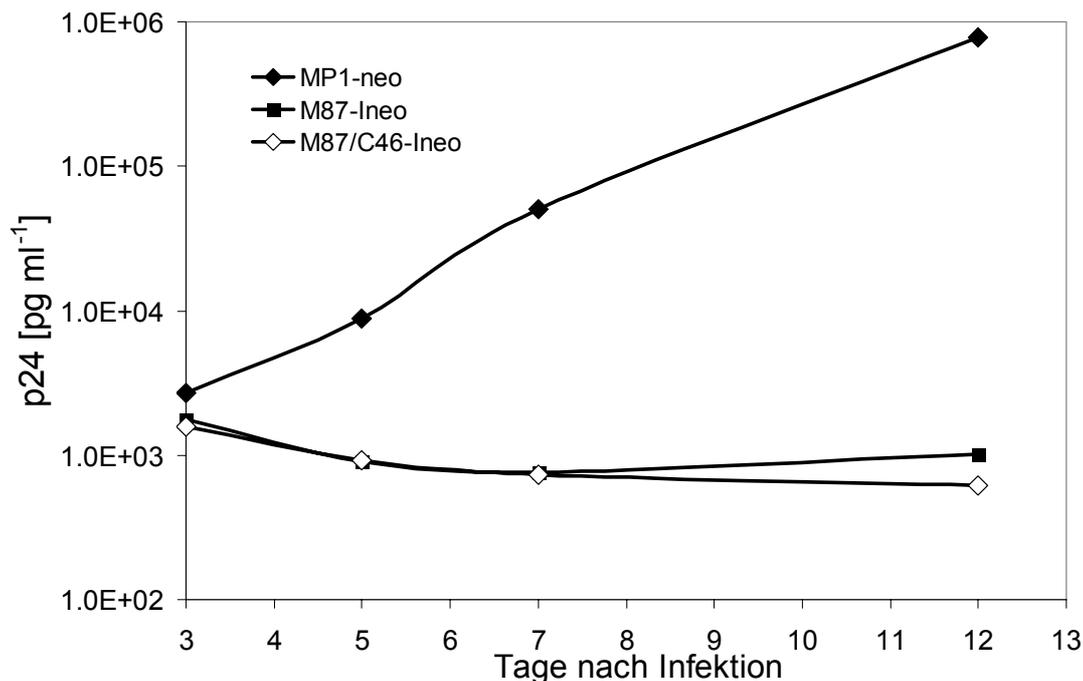


Abb. 3.10: Hemmung der HIV-Replikation durch Expression der verschiedenen C-Peptide. Die transduzierten und selektierten PM-1 Zellen wurden mit dem Stamm HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.05 infiziert. Nach Entnahme der Zellkulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Konzentration des HIV p24-Antigens mittels ELISA bestimmt.

3.4.3. Hemmung C36-resistenter HIV-Stämme durch Verlängerung des C-Peptids

Um zu zeigen, dass das N-terminal verlängerte C46-Peptid HIV-Stämme hemmt, die gegen C36/T20 resistent sind, wurden HIV-pseudotypierte Viren hergestellt. Diese Pseudotypen enthielten Mutationen im GIV-Motif von HR1, die für die Resistenz verantwortlich sind (Rimsky et al., 1998; Abb. 3.7).

Durch zielgerichtete Mutagenese wurden diese Mutationen im HxB2-Expressionsplasmid pSG-HxB2 (M104, He et al., 1997) eingeführt. Dabei wurden die Aminosäuren GIV zu SIM und DTV durch zielgerichtete Mutagenese mit den Primern M104-SIM-F und M104-SIM-R, bzw. M104-DTV-F und M104-DTV-R mit dem QuikChange Kit von Stratagene (Heidelberg) verändert. Zur Herstellung von Viruspartikeln der HxB2-Varianten wurde ein 3-Plasmid-System verwendet (Naldini et al., 1996). Als

Kontrolle dienten VSV-G-Pseudotypen, die alle Zellen unabhängig von der Transgenexpression gleich gut infizieren sollten. Eine transiente Transfektion in 293T Zellen wurde mit dem Verpackungsplasmid pCMV Δ R9, dem Transfervektor pRRLsinCMVGFPpre und den env-Expressionsplasmiden durchgeführt (Abb. 3.11). Das Plasmid pCMV Δ R9 liefert die für die Verpackung notwendigen Proteine von gag, pro, pol, tat und rev unter Kontrolle eines CMV-Promoters. Die offenen Leserahmen von Env und vpu sind durch Mutationen deaktiviert worden (Naldini et al., 1996). Der Transfervektor pRRLsinCMVGFPpre enthält für die Virusproduktion als einziges Konstrukt das Verpackungssignal ψ und kodiert unter dem CMV-Promoter EGFP (Dull et al., 1998). Mit den produzierten Viruspartikeln wurden die Zelllinien PM-1 MP1-neo, PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87/C46-Ineo in einer „single round infection“ infiziert, das EGFP nach 2 Tagen mittels FACS-Analyse detektiert und der Prozentsatz positiver Zellen bestimmt.

Die VSV-G Pseudotypen infizierten unabhängig von der Transgenexpression gleich gut, während die Expression der C-Peptide C36 und C46 den Eintritt von Wildtyp env (HxB2) inhibierte – C46 hemmte dabei etwas effizienter, als C36. Der Unterschied zwischen C36 und C46 in der Hemmung war mit den beiden HxB2-Resistenzmutanten deutlicher: Sie wurden von M87-Ineo nur noch 6 bzw. 4fach gehemmt, während M87/C46-Ineo auch diese HIV env Mutanten effektiv inhibierte. Durch Verlängerung des C36-Peptids um 10 weitere Aminosäuren wurden somit HIV-Hüllproteine an der Fusion gehindert, die gegen C36 (T20) resistent sind. T20-resistente HIV-Stämme können also mit dem C46-Peptid effektiv gehemmt werden. Weiterhin ist es für das Virus schwieriger, Resistenzen gegen das C46-Peptid zu generieren. Resistenz-Stämme konnten daher bisher in der Zellkultur nicht beobachtet werden (Mitteilung Prof. von Laer).

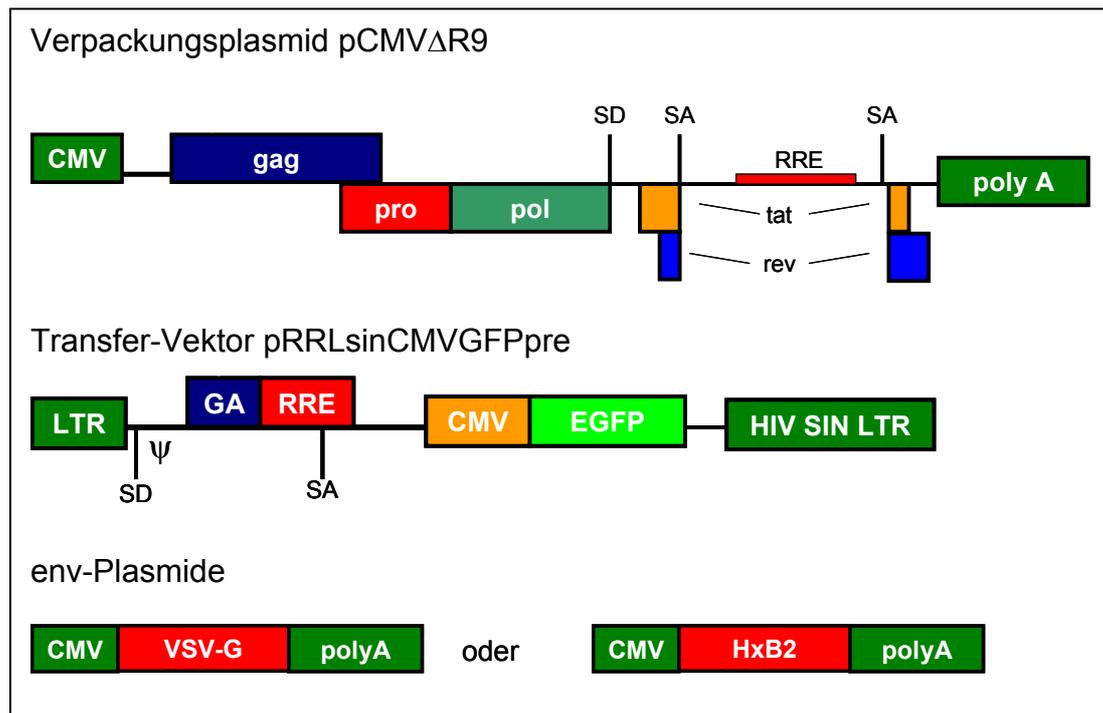


Abb. 3.11: Schematische Darstellung des 3-Plasmid-Systems zur Herstellung von pseudotypisierten lentiviralen Vektoren. Das Verpackungsplasmid liefert die für die Virusproduktion nötigen Proteine, deren Expression über einen CMV-Promoter vermittelt wird. Der Transfer-Vektor enthält das Marker-Gen GFP mit dem Verpackungssignal ψ , das durch ein funktionelles Intron flankiert ist. Zur Pseudotypisierung dienten Expressionsplasmide von HxB2, deren Resistenzvarianten oder als Kontrolle VSV-G.

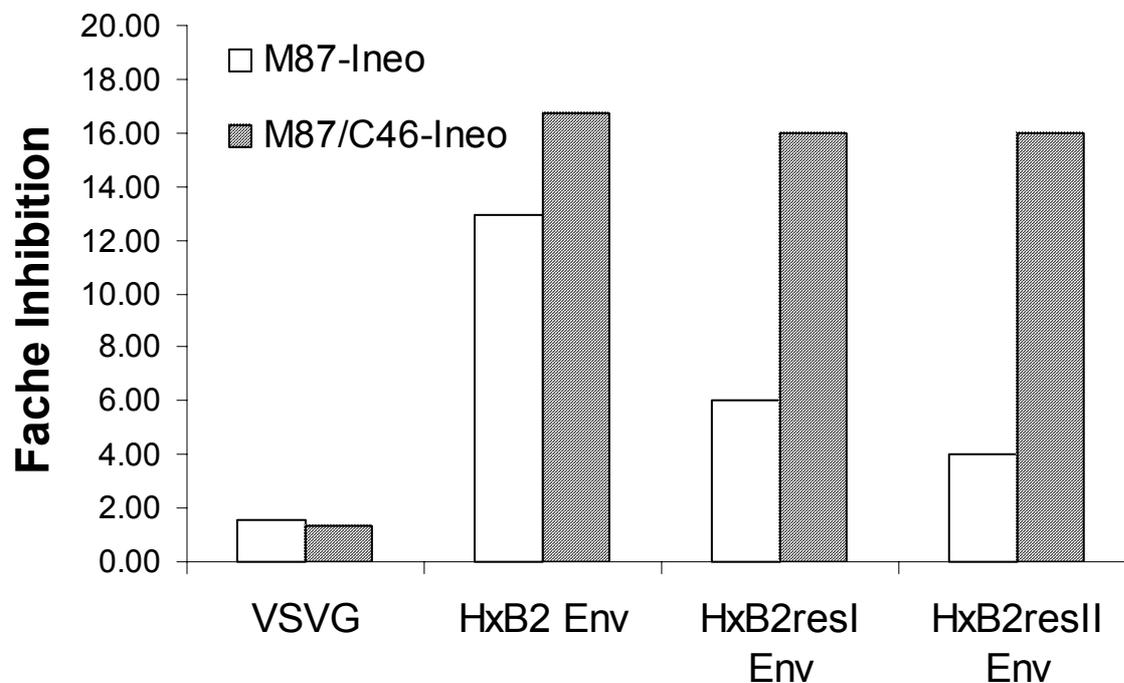


Abb. 3.12: Infektion der Zelllinien PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87/C46-Ineo im Vergleich zur Kontrolle PM-1 MP1-neo mit pseudotypisierten lentiviralen Vektoren. 2 Tage nach der Infektion wurde der Prozentsatz EGFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt und die Inhibition im Vergleich zu den Kontrollzellen errechnet.

3.5 Kombination aller optimalen Module & Optimierung der Codon Usage

Zur Entwicklung des optimalen Konstruktes wurden alle aus den Einzelsubstitutionen optimierten Module in einem retroviralen Vektor vereinigt:

- Die N-terminale Verlängerung des inhibitorischen Peptids zur Verhinderung von Resistenz-Mutationen im gp41 von HIV
- Austausch des murinen Linkers durch Sequenzen des humanen Antikörpers IgG2 zur reduzierten Immunogenität des exprimierten Peptids
- Austausch des Δ LNGFR-Membranankers durch die Transmembranregion von tCD34

Zellen verschiedener Spezies verwenden Codons bestimmter Aminosäuren mit unterschiedlicher Häufigkeit. Die Optimierung der verwendeten Codons für die entsprechende Spezies kann die Genexpression erhöhen (Haas et al., 1997). Für das Grün fluoreszierende Protein (GFP) von *Aequorea victoria* konnte nach Optimierung der Codon Usage eine mehr als 40fache Erhöhung der Expression in humanen Zellen beobachtet werden. Auch HIV-1 env und gag sind durch ungünstige Codons kodiert (Kypr. et al., 1987; Sharp et al., 1986; Chou et al., 1992). Damit ist die Expression der HIV-Proteine reduziert, so dass die MHC-Erkennung durch das Immunsystem erschwert wird. Außerdem besitzen Bereiche der mRNA weitere Funktionen: so befindet sich im env das RRE, ein RNA-Element, das über das rev-Genprodukt für die Regulation der env-Expression verantwortlich ist (Hope, 1999).

Das optimierte membranverankerte C46-Peptid ist bei 10 der 18 durch mehrfache Codons kodierten Aminosäuren durch ungünstige Codons kodiert. So wird Isoleucin in hochexprimierten Genen zu 77 Prozent mit dem Codon ATC kodiert. Im env-Protein von HIV sind es 25% und im nichtoptimierten retroviralen Konstrukt sogar nur 20%. Durch Optimierung der Codons wurden alle Ile-Codons durch ATC ersetzt (siehe Tab. 3.1). Zur Erhöhung der Oberflächenexpression des membranverankerten Peptids wurden die Codons der Genkassette für humane Zellen optimiert und die Expression mit dem Konstrukt ohne Codon-Optimierung verglichen.

Tab. 3.2: Verwendung der Codons bei hochexprimierten Genen (hoch), bei HIV-1 env, dem inhibitorischen Peptid ohne und mit Codon Usage-Optimierung. Die Häufigkeiten (x100) der einzelnen Codons ist für alle Aminosäuren dargestellt, die über einen degenerierten Code verfügen. In **fett** sind die dominierenden Codons hervorgehoben.

		Hoch	env	ohne	mit
Ala	GCC	53	27	40	100
	GCT	17	18	10	0
	GCA	13	50	50	0
	GCG	17	5	0	0
Arg	CGC	37	0	56	78
	CGT	7	4	0	0
	CGA	6	0	0	0
	CGG	21	0	0	0
	AGA	10	88	33	22
	AGG	18	8	11	0
Asn	AAC	78	30	33	100
	AAT	22	70	67	0
Asp	GAC	75	33	67	100
	GAT	25	67	33	0
Cys	TGC	68	16	50	100
	TGT	32	84	50	0
Gln	CAA	12	55	75	0
	CAG	88	45	25	100
Glu	GAA	25	67	77	0
	GAG	75	33	23	100
Gly	GGC	50	6	25	100
	GGT	12	13	17	0
	GGA	14	53	33	0
	GGG	24	28	25	0
His	CAC	79	25	100	100
	CAT	21	75	0	0
Ile	ATC	77	25	20	100
	ATT	18	31	60	0
	ATA	5	44	20	0
Leu	CTC	26	10	0	0
	CTT	5	7	9	0
	CTA	3	17	5	0
	CTG	58	27	50	100
	TTA	2	30	18	0
	TTG	6	20	18	0
Lys	AAA	18	68	67	0
	AAG	82	32	33	100
Pro	CCC	48	27	11	78
	CCT	19	14	11	22
	CCA	16	55	44	0
	CCG	17	5	33	0
Phe	TTC	80	26	50	100
	TTT	20	74	50	0
Ser	TCC	28	8	20	0
	TCT	13	8	20	20
	TCA	5	22	0	0
	TCG	9	0	20	0
	AGC	34	22	30	80
	AGT	10	41	10	0
Thr	ACC	57	20	40	100
	ACT	14	22	40	0
	ACA	14	51	20	0
	ACG	15	7	0	0
Tyr	TAC	74	8	50	100
	TAT	26	92	50	0
Val	GTC	25	12	60	0
	GTT	7	9	0	0
	GTA	5	62	0	0
	GTG	64	18	40	100

3.5.1 Klonierung der Vektorkonstrukte mit und ohne Codon Usage-Optimierung

Das Konstrukt mit allen optimierten Peptidmodulen wurde über eine Dreischritt-PCR erhalten. Der 5'-Bereich der Genkassette wurde aus dem Konstrukt mit dem verlängerten C-Peptid (M87/C46-Ineo) mit den Primern M87-F1289 und hlgG2-T20-R amplifiziert. Der 3'-Bereich mit dem tCD34-Membrananker wurde aus M165 mit den Primern hlgG2-CD34-F und BspE1-CD34-R erhalten. Beide PCR-Produkte wurden kombiniert und mit den Primern M87-F1289 und BspE1-CD34-R zur kompletten Genkassette vervollständigt. Das PCR-Produkt wurde in das Klonierungsplasmid pBluescript (M23) überführt und mit BstXI und Sall in den retroviralen Vektor M87-Ineo kloniert und das Plasmid M87oc/MP1-Ineo erhalten (Abb. 3.13).

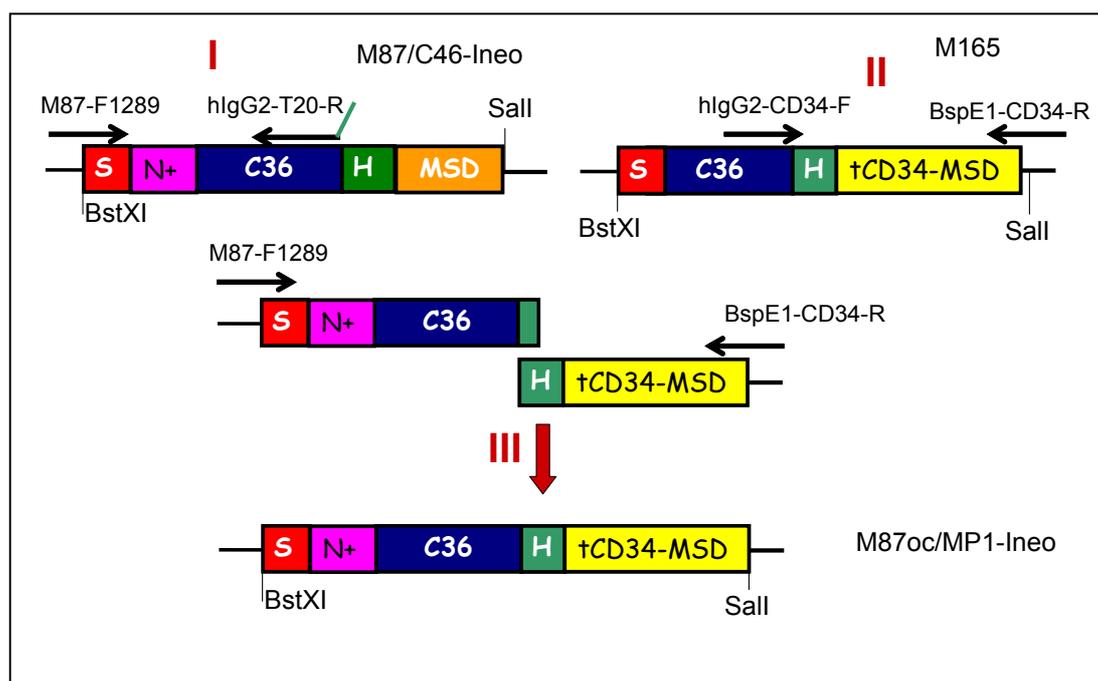


Abb. 3.13: Strategie zur Klonierung des retroviralen Konstruktes mit allen optimierten Modulen. Der N-terminale Bereich des Transgens mit dem verlängerten Peptid wurde aus dem Plasmid M87/C46-Ineo und den Primern M87-F1289 und hlgG2-T20-R amplifiziert (links). Das Modul mit dem humanen Linker und der tCD34-Transmembrandomäne wurde aus dem Plasmid M165 und den Primern hlgG2-T20-F und BspE1-CD34-R erhalten (rechts). Beide PCR-Produkte wurden in einer dritten PCR vereinigt und vervollständigt. Die BstXI und Sall-Schnittstellen wurden verwendet, um das Produkt in den Basisvektor M87-Ineo zu klonieren.

Für die gesamte Genkassette des inhibitorischen Peptids wurden die optimalen Kodons ausgewählt (Wada et. al, 1990). Die BglIII-Restriktionsstellen, die das C46-Peptid über die Codons AGA TCT flankieren, wurden unverändert belassen, um die Stellen für das Restriktionsenzym beizubehalten. Das synthetische Gen wurde aus dem Plasmid M171 (Geneart, Regensburg) mit den Primern M171-F632-BstXI und M171-R1116-Sall amplifiziert, mit den Enzymen BstXI und Sall geschnitten und in den retroviralen Vektor M136 zwischenkloniert. Durch Verdau mit den Enzymen BstXI und Sall wurde das synthetische Gen erhalten und in den retroviralen Vektor M87-Ineo das Plasmid M87o/MP1-Ineo kloniert (Abb. 3.14).

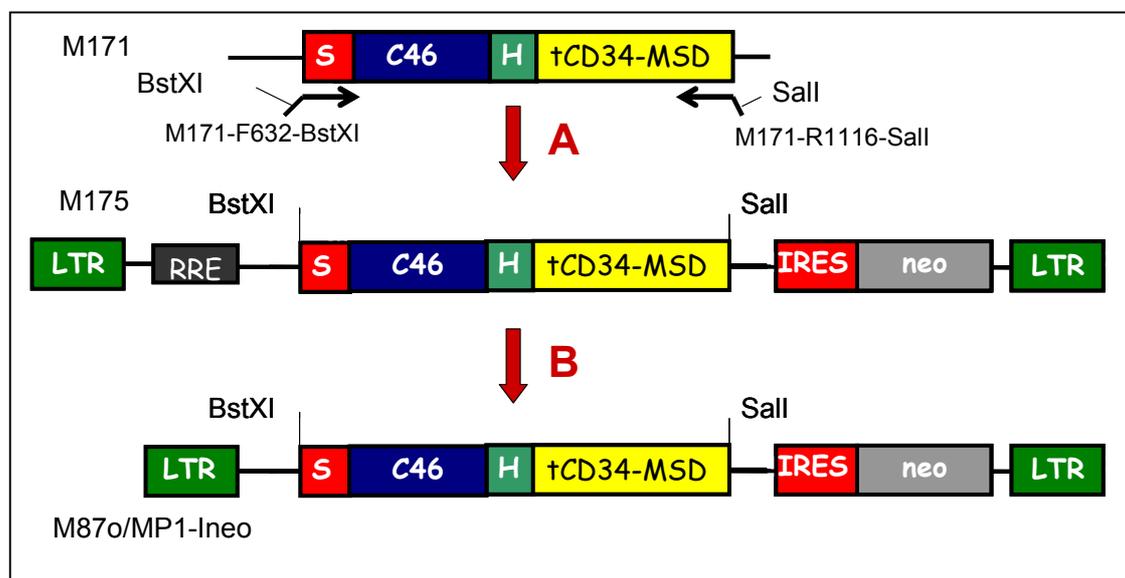


Abb. 3.14: Strategie zur Klonierung des Vektors M87o/MP1-Ineo mit dem optimierten Peptid sowie Adaption der Codon Usage. **(A)** Das synthetische Gen wurde als Plasmid M171 von Geneart (Regensburg) erhalten und mit den Primern M171-F632-BstXI und M171-R1116-Sall amplifiziert und in den Vektor M136 zwischenkloniert. **(B)** Aus diesem Vektor wurde es mit den Schnittstellen BstXI und Sall in den Basisvektor M87-Ineo kloniert.

3.5.2. Vergleich der Expression des C-Peptides auf der Oberfläche mit den optimierten Modulen und nach Codon Usage Optimierung

Von den beiden retroviralen Vektoren M87oc/MP1-Ineo und M87o/MP1-Ineo wurden durch Transfektion mit pGALV env (M130) und pgagpol (M57) Vektorüberstände produziert und zur Transduktion der PM-1-Zelllinie verwendet. Nach Selektion mit G418 wurde das Peptid mit dem C2F5-Antikörper detektiert. Die Expression des Peptides durch Verwendung aller optimierten Module in M87oc/MP-1-Ineo ist mit einer mittleren Fluoreszenz von 8.3 im Vergleich zum ursprünglichen Konstrukt M87-Ineo mit 4.6 erhöht. Die anschließende Optimierung der verwendeten Codons des kompletten Transgens nach Wada et al. führt zu einer weiteren Erhöhung der C46-Expression von 8.3 (M87oc/MP1-Ineo) auf 13.4 (M87o/MP1-Ineo, vgl. dazu Abb. 3.15).

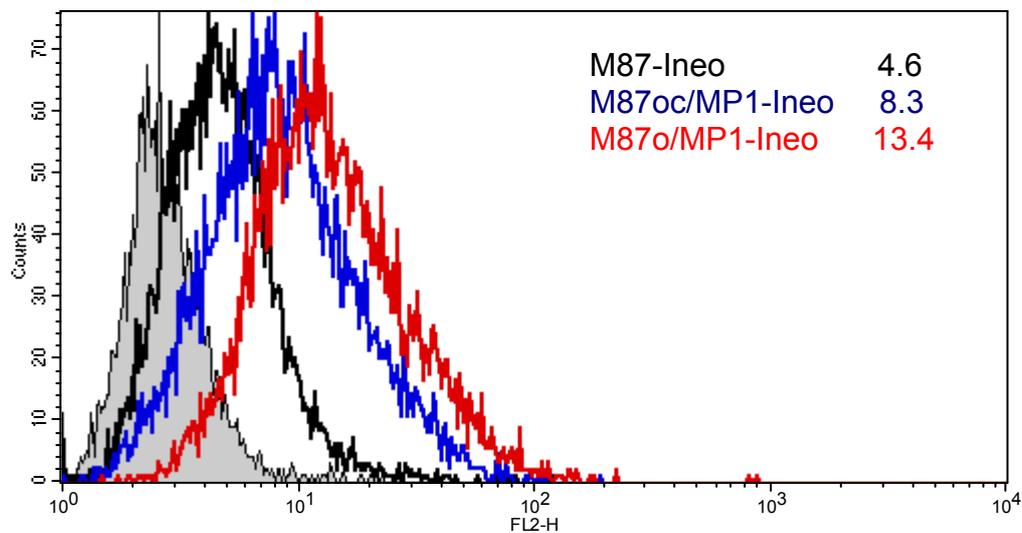


Abb. 3.15: Expression des optimierten C-Peptides mit und ohne Codon Usage Optimierung im Vergleich zum Basiskonstrukt M87-Ineo. Die Werte geben die mittlere Fluoreszenzen der Konstrukte an. (In grau: Kontrollzellen PM-1 MP1-neo)

3.6 Optimierung der Vektorelemente

Der retrovirale Vektor M87-Ineo und die hier bisher erwähnten Derivate besitzen den gleichen retroviralen Vektor mit einem MP1-Leader (Hildinger et al., 1999) und keinen weiteren cis-Elementen. Im Leader des Vektors vor der eigentlichen Transgenkassette des C-Peptids befinden sich sieben artifizielle Startcodons, welche die Expression des gewünschten Genproduktes stören können (Hildinger et al., 1999). Daher wurde der MP1-Leader gegen den MP71-Leader ausgetauscht, um die Expression des inhibitorischen Peptids zu erhöhen. Dieser Leader besitzt außerdem statt einer artifiziellen Splice-Donor-Stelle ein funktionelles Intron mit Splice-Donor und Splice-Akzeptorstelle. Das Intron führt durch Splicing zu erhöhtem RNA-Export und somit zur erhöhten Expression des Transgens (Zufferey et al., 1999).

Ein weiterer Schritt war die Einführung des „post-transcriptional responsive Element“ (PRE) des Woodchuck-Hepatitis B-Virus, das kontextabhängig die Transgen-Expression erhöhen kann (Schambach et al., 2000). Das PRE-Element besitzt einen 166 Aminosäuren langen offenen Leserahmen von pol HBV (Donello et al., 1996), das zur unerwünschten und potentiell immunogenen Expression des artifiziellen Peptids führen könnte. Daher wurde dieses ATG im wPRE mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese entfernt.

3.6.1 Klonierung der Konstrukte

Ausgehend von dem Vektor M175 (siehe auch Abb. 3.14) wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym BspE1 verdaut und die Kassette des wPRE aus M56a über die Restriktionsstellen BspE1 und HindIII eingeführt. Ein ATG in der 5'-Region des wPRE wurde mittels site-directed Mutagenese mit dem Quickchange Kit (Stratagene, Heidelberg) mit den Primern M176-S-PRE-qcF1910 und M176-S-PRE-qcR1910 mutiert. Dieses ATG startet einen 166 Aminosäuren langen offenen Leserahmen. Durch Agel/HindIII-Verdau wurde das Transgen mit dem wPRE erhalten, in den retroviralen Vektor M56a

kloniert (Hildinger et al., 1999) und der Vektor M87o erhalten (Abb. 3.16). Das Konstrukt M87o- Δ PRE wurde kloniert, in dem aus dem Vektor M87o das wPRE-Element mit EcoRI herausgeschnitten und der Vektor religiert wurde. Der Vektor M87o/MP1-*neo* (siehe Kap. 3.4.2) wurde mit HindIII geschnitten und religiert, um das Konstrukt M87o/MP1 zu erhalten.

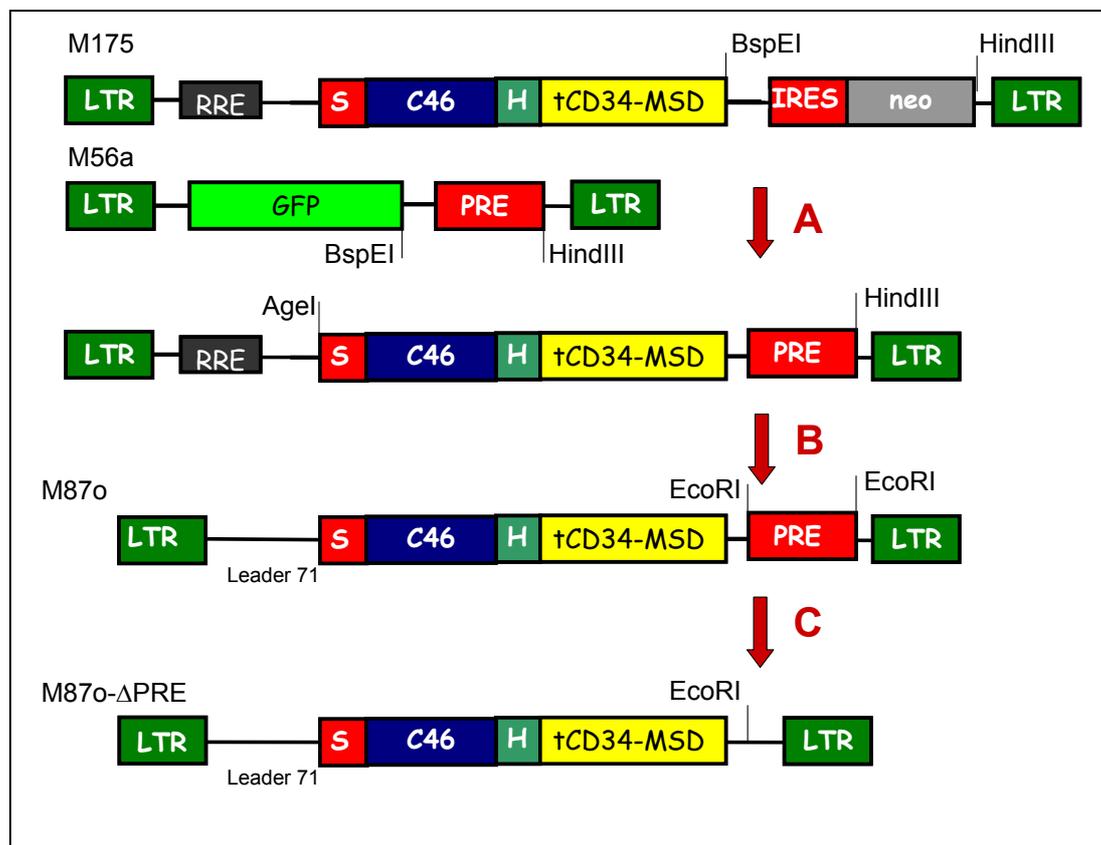


Abb. 3.16: Strategie zur Klonierung der beiden Vektoren M87o und M87o- Δ PRE. **(A)** Aus dem GFP-Vektor M56a wurde das PRE mit den Restriktionsstellen BspEI und HindIII erhalten und in den Vektor M175 (siehe Kap.) kloniert. **(B)** Nach zielgerichteter Mutagenese im PRE wurde die Transgenkassette mit dem PRE durch Verdau mit den Enzymen Agel und HindIII erhalten und in den Vektor M56a kloniert. Dabei wird der Vektor M87o erhalten, der nun einen optimierten MP71-Leader besitzt. **(C)** Als Vergleichskonstrukt ohne PRE wurde der Vektor mit EcoRI geschnitten und religiert (M87o- Δ PRE).

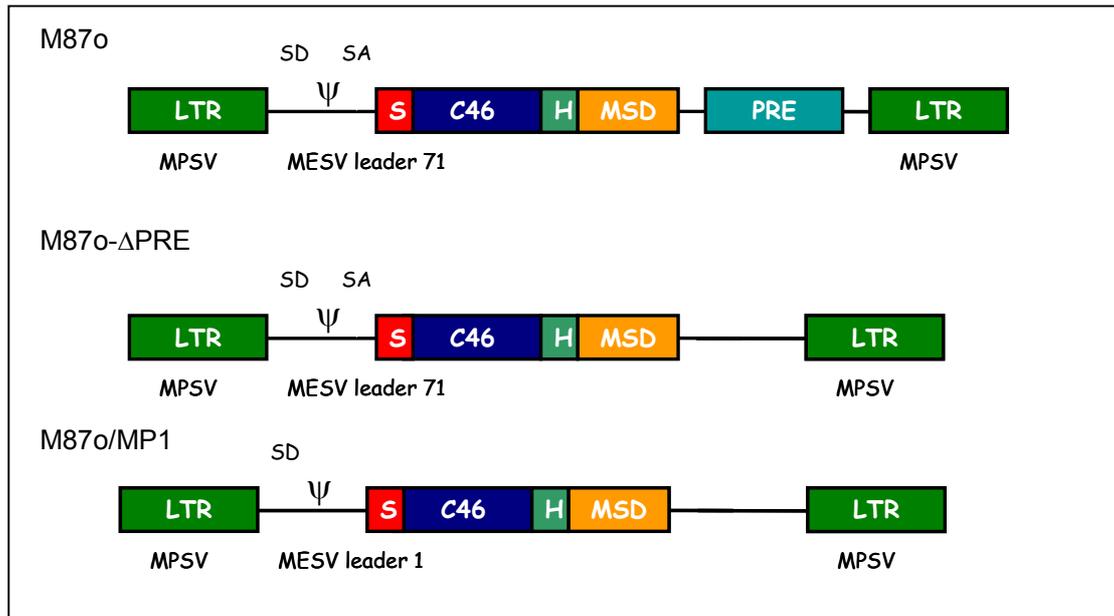


Abb. 3.17: Die retroviralen Vektoren M87o, M87o-ΔPRE und M87o/MP1. Die Vektoren unterscheiden sich im Leader-Bereich sowie im PRE - das exprimierte Peptid ist identisch.

3.6.2 Vergleich der Konstrukte mit dem PRE und dem optimierten Leader in ihrer Expression

Die Zelllinie PM-1 wurde mit den Konstrukten M87o/MP1, M87o und M87o-ΔPRE transduziert und die Oberflächenexpression mit dem 2F5-Antikörper detektiert. Da diese Konstrukte monocistronisch sind und keine Antibiotika-Selektion möglich ist, wurde der Anteil der Zellen, die das Peptid auf der Oberfläche exprimierten, mittels FACS-Analyse gemessen. Um Mehrfachintegrationen der Vektoren auszuschließen, wurden die Zellen bei niedriger MOI transduziert. Der Anteil der transduzierten Zellen betrug <15 Prozent.

Die mittlere Fluoreszenz lag für den Vektor M87o/MP1 bei 59.7. Der Austausch des Leaders durch den MP71-Leader in M87o-ΔPRE führt zu einer fast 10fach höheren Expression (mittl. Fluoreszenz 461.5), als mit dem MP1-Leader. Durch Hinzufügen des wPRE-Elements wird die Expression des

inhibitorischen Peptids in den PM-1 Zellen nicht weiter erhöht (mittlere Fluoreszenz 409.6 für M87o).

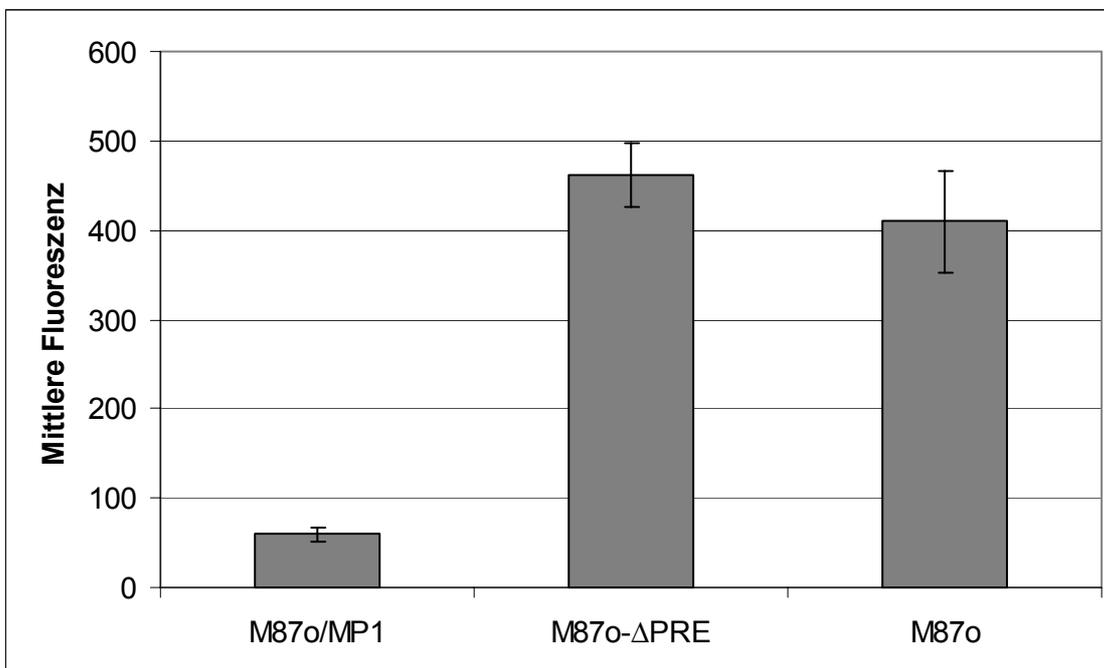


Abb. 3.18: Expression des C46-Peptids mit optimiertem Leader und PRE im Vergleich zum MP1-Leader ohne PRE. Angegeben sind die mittleren Fluoreszenzen des C-Peptids mit den Vektoren M87o/MP1, M87o- Δ PRE und M87o.

3.7 Hinzufügen eines weiteren inhibitorischen Prinzips

Das optimierte Konstrukt M87o-*Ineo* mit einem entsprechend hohen Expressionsniveau hemmt die HIV-Replikation wesentlich effizienter, als mit dem Basiskonstrukt M87-*Ineo* (siehe unten), und resistente HIV-Stämme gegen das C46-Peptid konnten bisher nicht etabliert werden (int. Mitteilung D. von Laer). Um dennoch der Resistenzbildung vorzubeugen, wurde in den retroviralen Vektor ein zweites inhibitorisches Prinzip eingeführt.

Das 241 Basenpaare große RRE-Element ist wichtig für den Export der ungesplitten mRNA von HIV zur Expression späterer Gene und liegt im Bereich des *env*-Gens. Ein 41 Basenpaare großes Fragment des RRE-Elementes ist in der Lage, die HIV-Replikation zu inhibieren (Bahner et al., 1996) und wurde

in einem retroviralen Vektor bereits verwendet (Kohn, 2000). Es bietet den Vorteil auf RNA-Ebene zu wirken und sollte die Expression des C-Peptides nicht stören. Darüber hinaus ist das RRE-decoy ein Typ II-Gen, das mit einem Typ I-Gen wie den C-Peptiden besonders wirksam sein sollte (von Laer et al., in Vorbereitung).

3.7.1 Klonierung des Konstruktes mit dem RRE im 3'-Bereich des Transgens

Zur Klonierung des Konstruktes M87o-RRE wurden die beiden Oligonucleotide, die für das RRE kodieren, RRE-HindIII-F und RRE-HindIII-R an den 5'-Enden phosphoryliert und hybridisiert. Anschließend wurde der Vektor M87o (siehe Kap. 3.5.2) mit dem Enzym HindIII geschnitten und die hybridisierten Oligonucleotide in den Vektor ligiert (Abb 3.19).

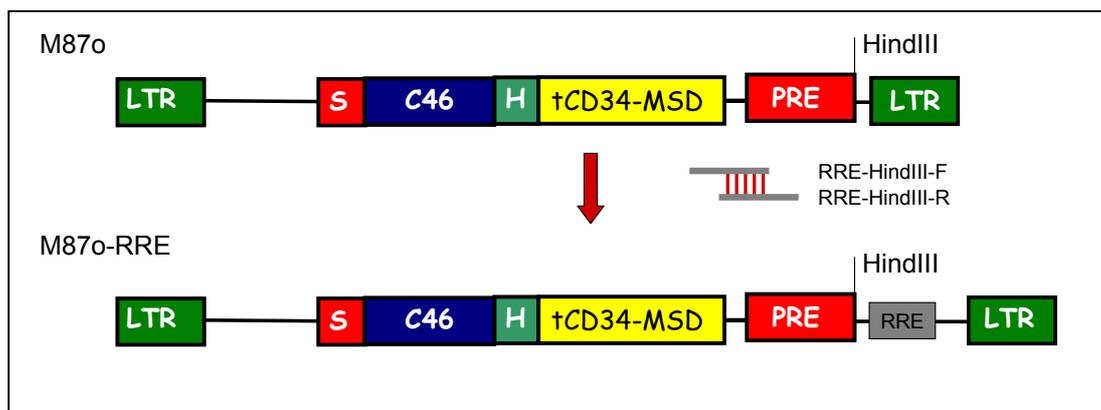


Abb. 3.19: Strategie zur Klonierung des Vektors M87o-RRE. Der Vektor M87o wurde mit dem Enzym HindIII geschnitten und das RRE-Element mittels zweier Oligonucleotide eingeführt.

3.7.2 Expression und Hemmwirkung der Konstrukte mit und ohne RRE-Element

Von den retroviralen Vektoren M87o und M87o-RRE wurden Virusüberstände produziert und zur Transduktion von PM-1 Zellen verwendet. Die transduzierten Zellen wurden mit dem Antikörper C2F5 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie bis auf über 99 Prozent C46-positiver Zellen gesortet.

Die beiden Konstrukte exprimierten in der Reanalyse das C46-Peptid mit einer mittleren Fluoreszenz von 1062 (M87o) bzw. 958 (M87o-RRE) mit gleichem Niveau (Abb 3.20). Die gesorteten Zellen wurden mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.01 infiziert und in regelmäßigen Zeitabständen Zellkulturüberstände entnommen. Mittels ELISA erfolgte die Konzentrationsbestimmung des p24-Antigen von HIV. Nach 3 Tagen wurde in den Kontrollzellen PM-1 MP1-neo ein Durchbruch der HIV-Replikation beobachtet, während die beiden C46-exprimierenden Zellen (M87o und M87o-RRE) die Replikation gleich effizient hemmten.

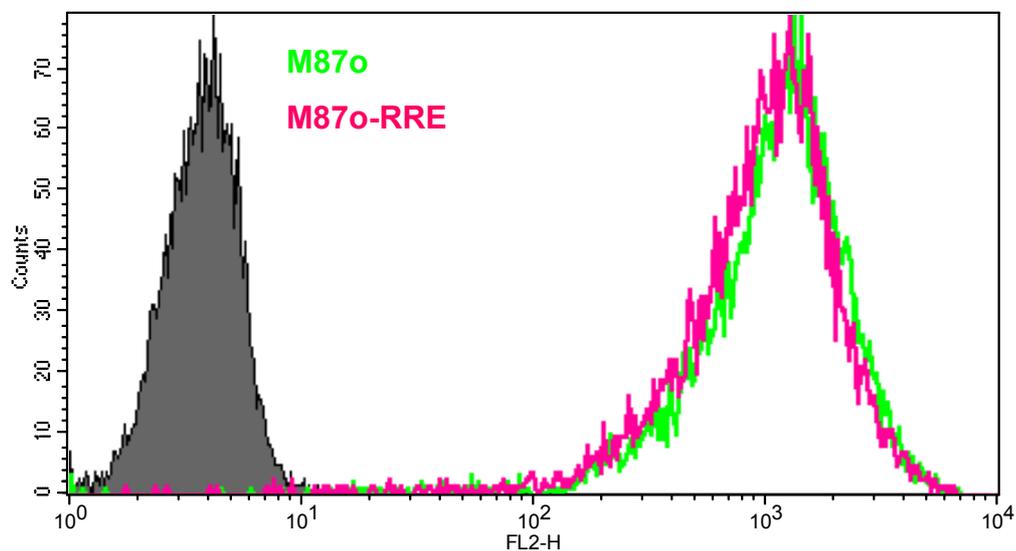


Abb. 3.20: Expression des inhibitorischen Peptids mit den beiden Vektoren M87o (grün, mittl.Fluoreszenz 1062) und M87o-RRE (lila, 958). Die Werte geben die mittleren Fluoreszenzen an. (in grau PM-1 MP1-neo)

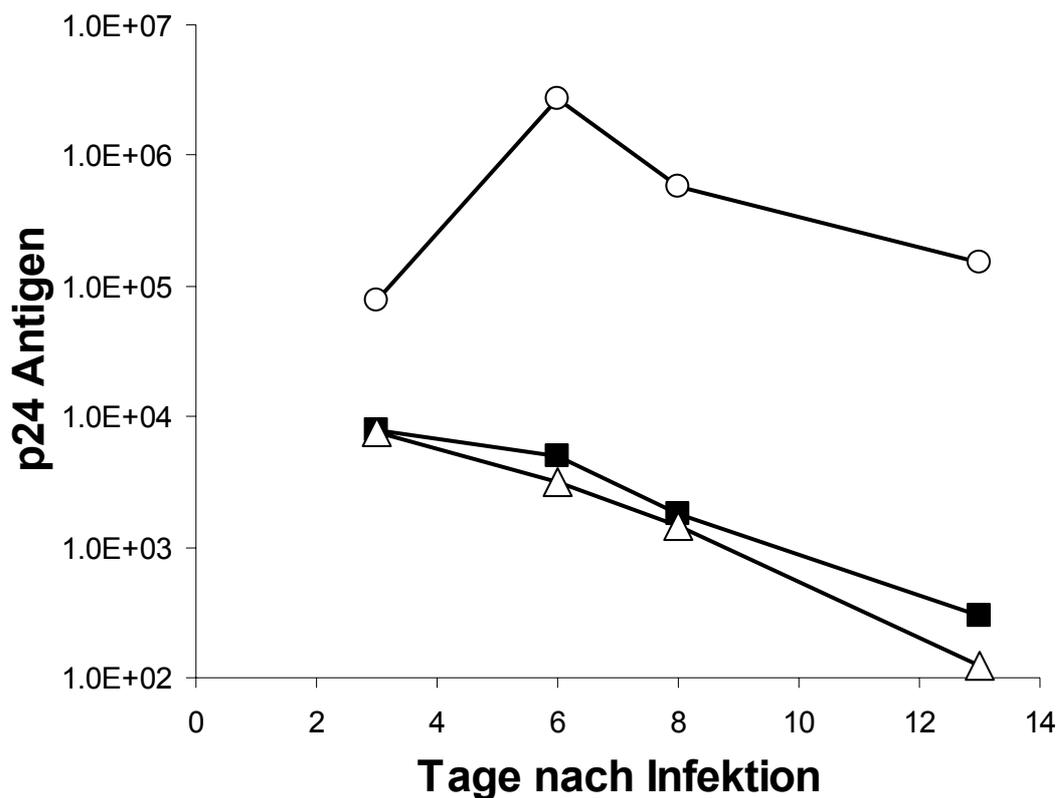


Abb. 3.21: Hemmung der HIV-Replikation mit M87o (■) und M87o-RRE(△). Als Kontrollzellen dienen PM-1 transduziert mit MP1-neo (○). Die transduzierten und gesorteten PM-1 Zellen wurden mit dem Stamm HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.01 infiziert. Die Konzentration des HIV p24-Antigens wurde anschließend aus den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

3.8 Vergleich der retroviralen Konstrukte M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo

Im direkten Vergleich wurde das Ursprungskonstrukt M87-Ineo mit dem optimierten Konstrukt M87o-RRE-Ineo verglichen. Sowohl der offene Leserahmen als auch das Rückgrat des retroviralen Vektors sind optimiert und ausgetauscht worden (Abb.3.22).

Das Konstrukt M87o-RRE-Ineo wurde kloniert, indem der retroviralen Vektor M87o-RRE mit HindIII geschnitten und die IRES-neo Genkassette aus M87-Ineo ligiert wurde.

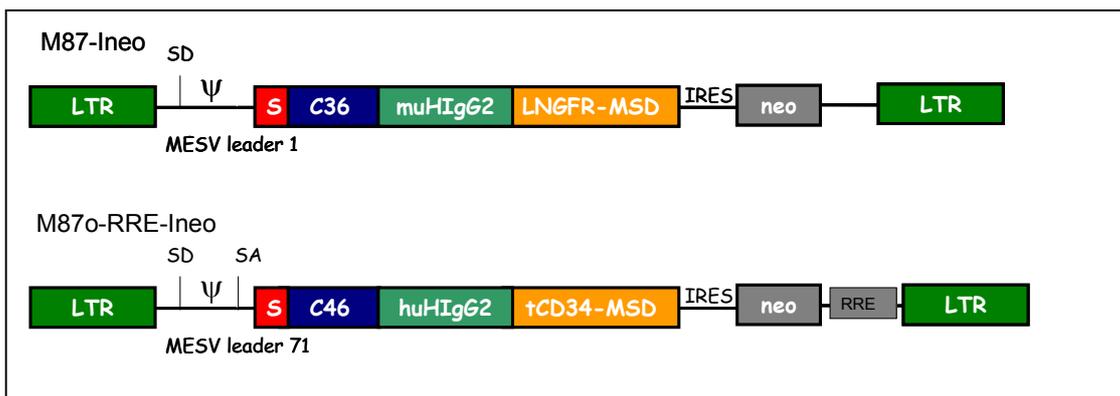


Abb. 3.22: Die beiden retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo. Im Vektor M87o sind das inhibitorische Peptid verlängert, der Linker, die Transmembrandomäne (MSD) und der Leader ausgetauscht worden und die Codon Usage ist optimiert.

Die PM-1-Zelllinie wurde transduziert mit Virusüberständen von MP1-neo, M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo und anschließend mit G418 selektioniert. Nach 7-tägiger Selektion wurde das membranverankerte Peptid auf der Oberfläche mit dem C2F5-Antikörper nachgewiesen und nach Detektion mit einem PE-gekoppeltem Sekundärantikörper mittels FACS analysiert. Die Expression des C-Peptides konnte wie erwartet um den Faktor 10 von 13.7 für M87-Ineo auf 120.8 für M87o-RRE-Ineo erhöht werden (Abb. 3.23).

Ob die erhöhte Expression auch eine verbesserte Hemmung der HIV-Replikation zur Folge hatte, wurde in einem Infektionsexperiment getestet. Dazu wurden die Zelllinien PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87o-RRE-Ineo parallel mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.001 infiziert und die Kinetik der Replikation beobachtet. Bei M87-Ineo war unter diesen Bedingungen ab dem Tag 7 ein Durchbruch der Replikation zu beobachten, während bei M87o über den beobachteten Zeitraum die HIV-Replikation effizient gehemmt wurde (Abb. 3.24). Analog wurde das Infektionsexperiment mit dem dualtropen Virusisolat HIV_{D117-II} (MOI = 0.00025, Rübsamen-Weigmann et al., 1989) mit analogem Ergebnis durchgeführt (Abb. 3.25).

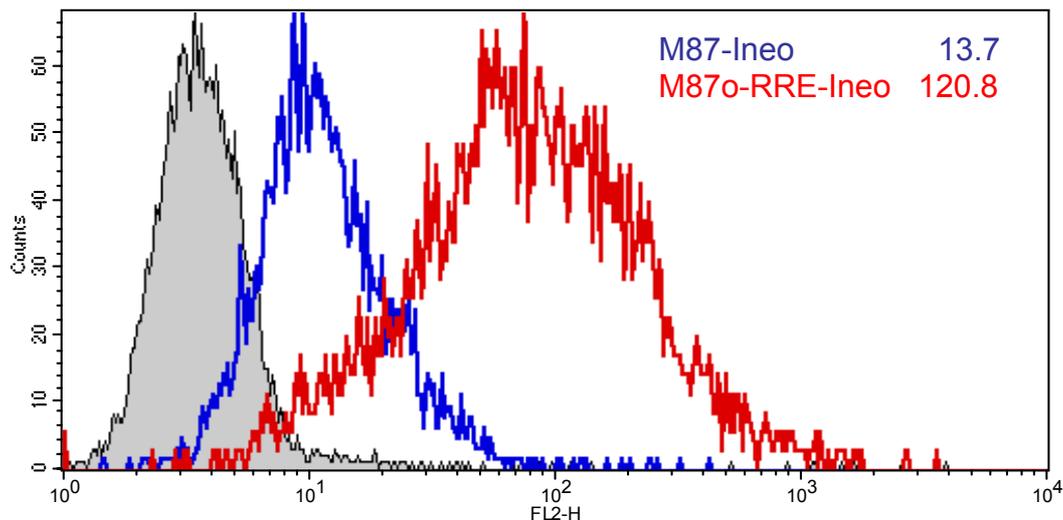


Abb. 3.23: Expression des C-Peptides mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo und dem optimierten Konstrukt M87o-RRE-Ineo. Die Werte geben die mittlere Fluoreszenzen der Konstrukte an. In grau sind die Kontrollzellen PM-1 MP1-neo dargestellt.

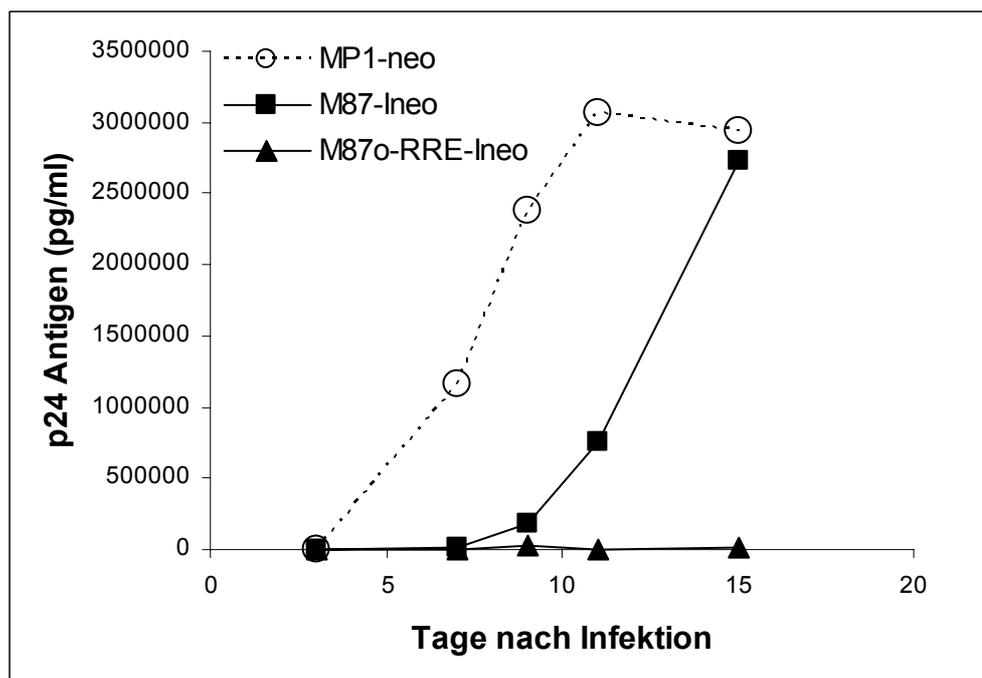


Abb. 3.24: Hemmung der HIV-Replikation von HIV_{NL4-3} durch die retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo. Die transduzierten und selektionierten PM-1 Zellen wurden mit dem Stamm HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.001 infiziert. Nach Entnahme der Zellkulturüberstände zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Konzentration des HIV p24-Antigens mittels ELISA bestimmt.

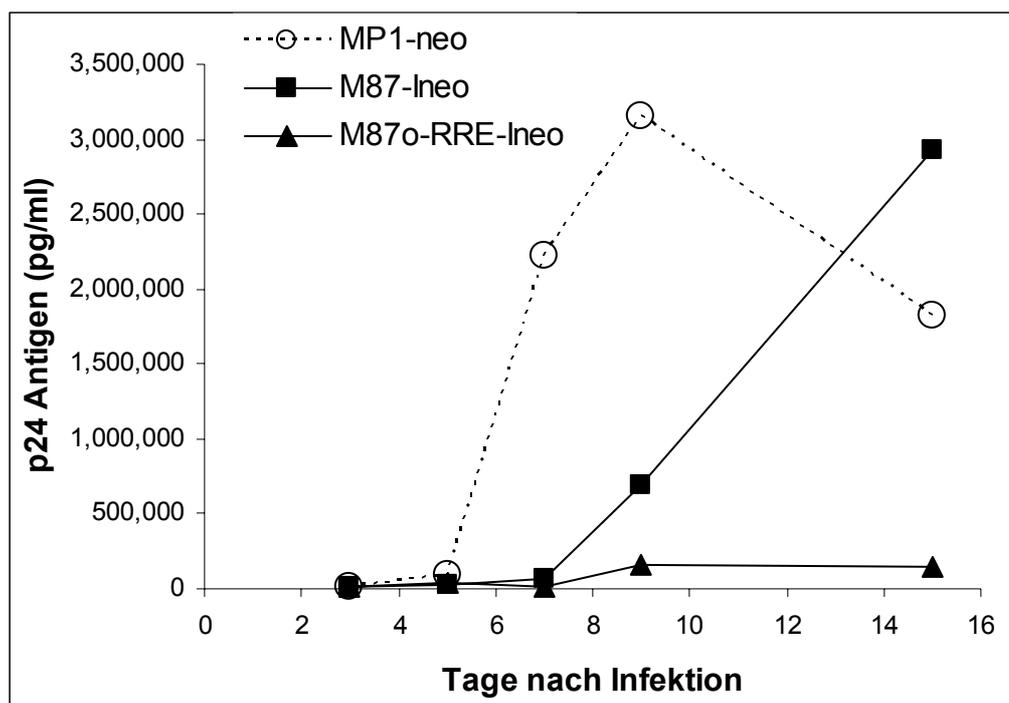


Abb. 3.25: Hemmung der HIV-Replikation von HIV_{D117-II} durch die retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo. Die transduzierten und selektierten PM-1 Zellen wurden mit dem Stamm HIV_{D117-II} mit einer MOI = 0.00025 infiziert. Für die verschiedenen Zeitpunkte wurde die p24-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

3.9 Konstruktion & Charakterisierung des Prototyp-Vektoren

Durch den Neomycin-Selektionsmarker konnten die einzelnen Zelllinien einfach etabliert werden und zeitaufwendiges FACS-Sorting war nicht erforderlich. Außerdem war die Expression des Basiskonstruktes M87-Ineo so niedrig, so das Sorten im Durchflusszytometer nicht möglich war. Doch für die klinische Studie ist ein Selektionsmarker weder notwendig noch wünschenswert: die Selektion der transduzierten Zellen soll über die C46-Peptid-Expression *in vivo* erfolgen (von Laer et al., in Vorbereitung). Weiterhin könnte das Genprodukt des Neomycin-Selektionsmarkers immunogen wirken. Bicistronische Vektoren produzieren bei der Verpackung niedrigere Virustiter und exprimieren das Transgen niedriger als in Vektoren, die nur für das Transgen kodieren, so dass das Entfernen der IRES-neo-Kassette die Expression des inhibitorischen Peptids erhöhen könnte.

Die Klonierung des retroviralen Vektors M87o-RRE wurde in Kapitel 3.6.1 und von M87o-RRE-Ineo in Kapitel 3.8 beschrieben. Von M87o-RRE-Ineo und M87o-RRE wurden Virusüberstände hergestellt und damit die Zelllinie PM-1 transduziert. Beide Kulturen wurden anschließend für 7 Tage weiterkultiviert und mit dem C2F5-Antikörper das C46-Peptid auf der Zelloberfläche detektiert. Die Transduktionsrate war mit 3.7 % für M87o-RRE-Ineo und M87o-RRE identisch. Durch Entfernen der IRES-neo-Kassette stieg die Expression des Transgens um mehr das 10fache von einer mittleren Fluoreszenz von 338 für M87o-RRE-Ineo auf 1521 (M87o-RRE, Abb. 3.26).

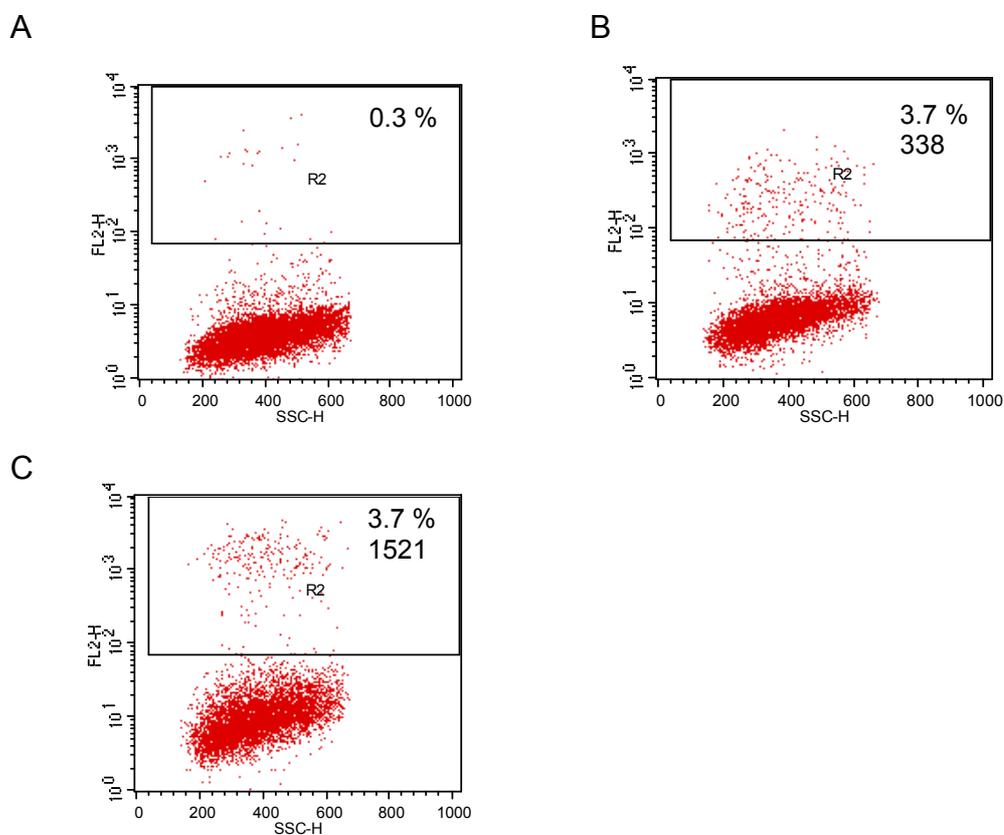


Abb. 3.26: Expression des optimierten Konstruktes mit bzw. ohne IRES-neo-Element. Die PM-1 Zellen wurden mit Virusüberständen von MP1-neo M87o-RRE-Ineo und M87o-RRE mit niedriger MOI transduziert und nach 7 Tagen der Prozentsatz transduzierter Zellen sowie deren Expressionsniveau mittels Durchflusszytometrie gemessen. **(A)** MP1-neo **(B)** M87o-RRE-Ineo **(C)** M87o-RRE.

3.10 Inhibitionssmechanismus der membranverankerten C-Peptide

3.10.1 Inhibition des Eintritts von HIV

Mit Hilfe von Zell-Zell-Fusionsassays kann direkt nachgewiesen werden, dass membranverankerte C-Peptide den Eintritt von HIV in die Zelle hemmen und die Peptide so die HIV-Replikation inhibieren. Bei diesem Assay werden Zielzellen von HIV-1, die CD4 und Corezeptor besitzen („Targetzellen“) mit Zellen inkubiert, die das HIV-Hüllprotein auf ihrer Oberfläche exprimieren („Effektorzellen“). Die Zellen können so, analog wie bei einer Zell-Virus-Fusion, miteinander in Kontakt kommen und fusionieren. Zielzellen und Effektorzellen werden zuvor mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert, so dass die Fusion unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet und die Kinetik bestimmt werden kann (Cohen et al., 1998).

Als Effektorzellen wurden in diesen Experimenten 293T-Zellen verwendet, die mit dem HxB2 Env Expressionsplasmid p202 und dem Plasmid pcREV transfiziert wurden (Malim et al., 1988). Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit dem Farbstoff Calcein AM (CaAM) und die Zielzellen mit 7-Amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC) gefärbt. Nach Färbung wurden Ziel- und Effektorzellen inkubiert und anschließend die Fusionsereignisse pro Zell-Zell-Kontakte ermittelt (Abb. 3.27). Zielzellen waren PM-1, transduziert mit MP1-neo, M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo. Nach einer Lag-Phase sind nach 20 Minuten erste Fusionsereignisse zu beobachten, die mit gleicher Kinetik bei MP1-neo, M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo transduzierten Zellen erfolgten (Abb. 3.28). Anschließend war die Fusionskinetik durch Expression des C-Peptides verlangsamt - während bei M87-Ineo transduzierten Zellen die Fusionsgeschwindigkeit nach 120 Minuten wieder zunahm, blieb sie bei M87o-RRE-Ineo konstant.

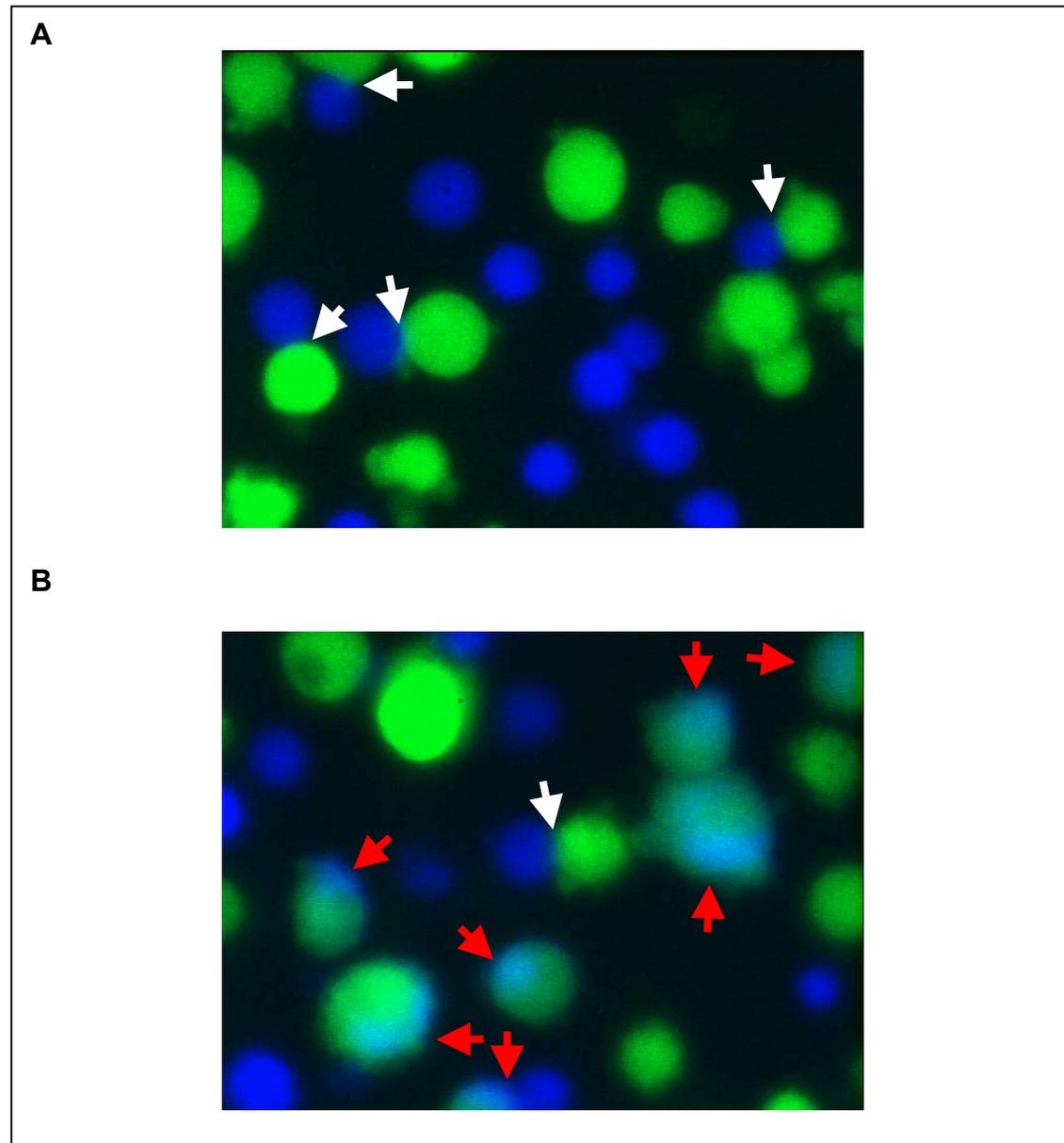


Abb. 3.27: Zell-Zell-Fusionsexperimente unter dem Fluoreszenzmikroskop. Die Zielzellen PM-1 wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMAC und die Effektorzellen 293T HxB2 mit dem Farbstoff CaAM gefärbt. Je 2×10^5 Zellen wurden in eine Zellkammer gegeben und die Fusion unter dem Mikroskop ausgezählt. **(A)** Vor Inkubation bei 37°C findet bei allen Zell-Zellkontakten keine Fusion statt (weiße Pfeile) **(B)** Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C deutet die Überlagerung der blauen und grünen Fluoreszenz auf die Fusion hin (rote Pfeile). Bei manchen Zell-Zellkontakten bleibt die Fusion aus (weißer Pfeil).

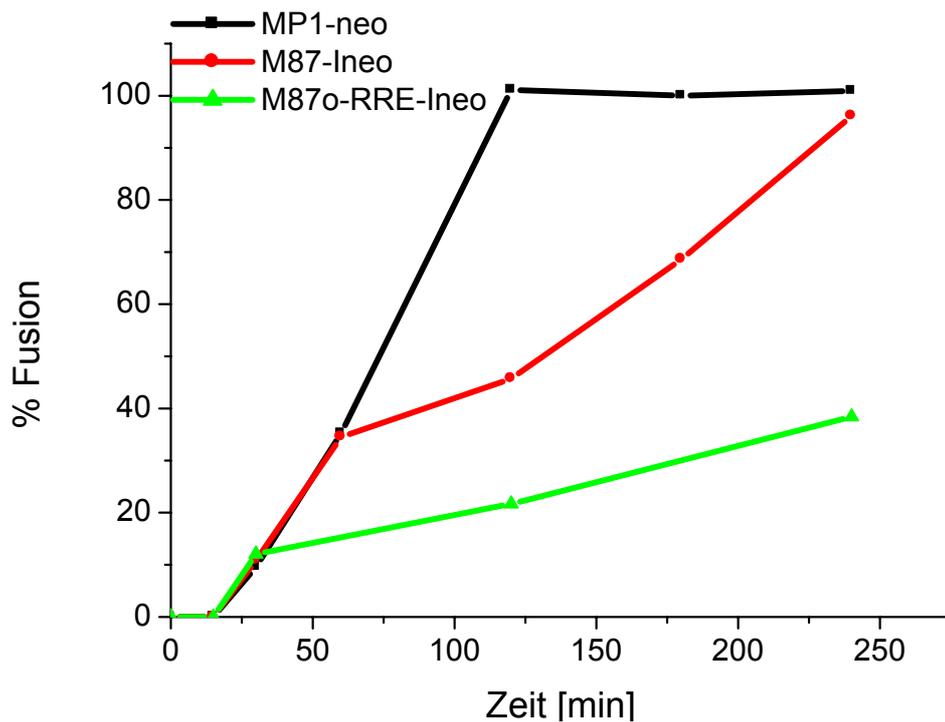


Abb. 3.28: Kinetik der Fusion der PM-1 Zellen MP1-neo, M87-lneo und M87o-RRE-lneo. Die Zielzellen wurden mit dem Farbstoff CMAC gefärbt und 293 T HxB2 mit CaAM. Die Zellen wurden coinkubiert und anschließend wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop der Anteil der Fusionen pro Zellkontakte bestimmt.

3.10.2 Temperatur-arretiertes Stadium (TAS)

Werden Zielzellen und Effektorzellen gemischt und vor der Fusion, die bei 37°C stattfindet, für 2 Stunden bei 21°C inkubiert, so wird das so genannte „Temperatur-arretierte Stadium“ (TAS) erreicht (Melikyan et al., 2000). Von diesem Stadium aus läuft die Fusion bei 37°C beschleunigt und ohne 15-minütige Wartephase ab (Abb. 3.29). Im TAS-Stadium erfolgen erste Interaktionen zwischen dem HIV Env-Protein und den Rezeptoren und konformationelle Änderungen finden statt, die nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C zu einer unverzögerten Fusion führen.

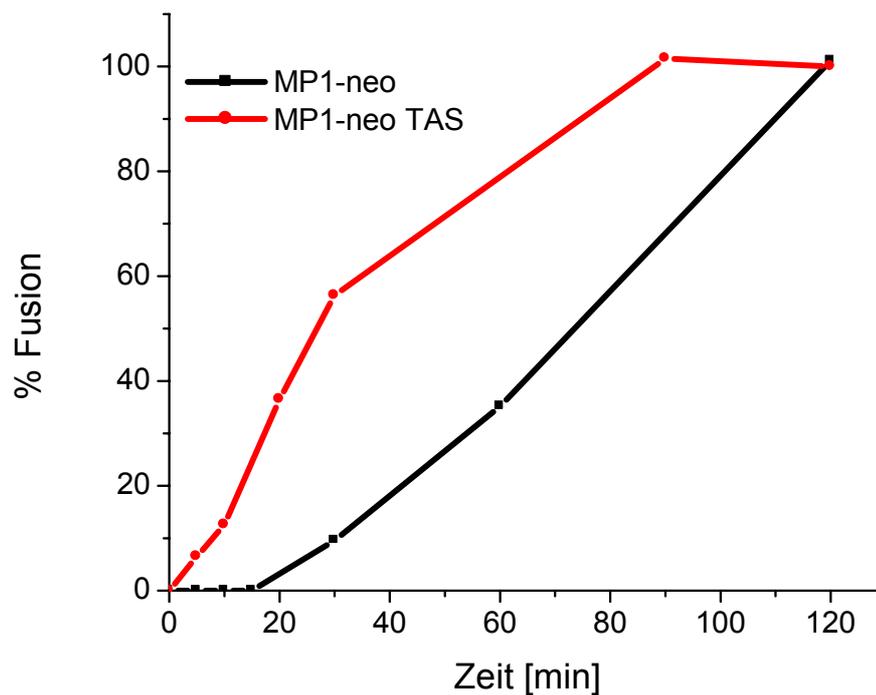


Abb. 3.29: Fusion von PM-1 MP1-neo nach Etablierung des TAS-Stadiums. Nach Färbung der PM-1 MP1-neo Zielzellen (CMAC) und 293 T HxB2 Effektorzellen (CaAM) wurden die Zellen co-inkubiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop der Anteil fusionierter Zellen bestimmt.

Die Fusion der M87-Ineo transduzierten Zellen nach dem TAS-Stadium läuft zunächst mit gleicher Kinetik ab, wie dies für die Kontrollzellen der Fall ist (Abb. 3.30): sofort erfolgt die Fusion mit schnellerer Kinetik, als ohne Einführung des TAS-Stadiums. Ähnlich wie dem Experiment ohne TAS-Stadium erfolgt die Fusion von M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo mit gleicher Geschwindigkeit wie bei den neo-transduzierten Kontrollzellen (MP1-neo). Bei der Zelllinie M87-Ineo wurde nach etwa 40 % Fusion nach 20 Minuten zunächst ein Plateau erreicht. Nach 90 Minuten steigt die Geschwindigkeit der Fusion anschließend wieder an und hat nach 240 Minuten 80 Prozent erreicht.

M87o-RRE-Ineo zeigt bereits zu Beginn der Fusion eine sehr verlangsamte, unveränderte Kinetik im Vergleich zu den MP1-neo transduzierten Kontrollzellen. Die unverändert langsame Kinetik ist ebenfalls analog wie im Experiment ohne TAS-Stadium (vgl. Abb. 3.28).

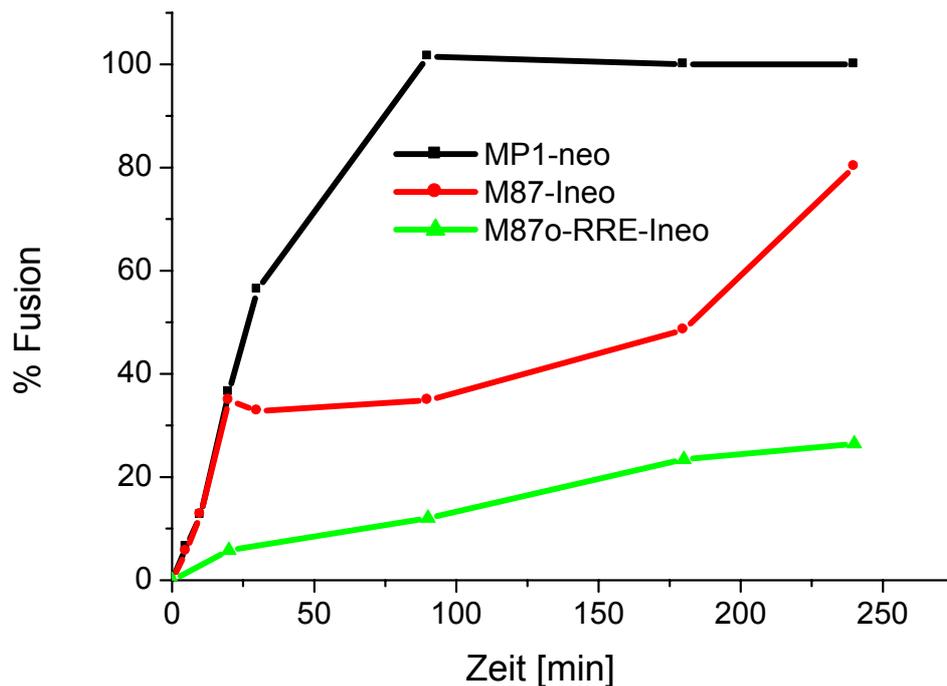


Abb. 3.30: Fusion von MP1-neo, M87-ineo und M87o-RRE-ineo nach Etablierung von TAS. Die Zielzellen PM1 MP-1neo/M87-ineo/M87o-ineo wurden mit Fluoreszenz-Farbstoff gefärbt und mit gefärbten 293T HxB2 co-inkubiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zahl der Kontakte und der Fusionen gezählt.

3.10.3 Lipid-arretiertes Stadium (LAS)

Im so genannten „Lipid-arretierten Stadium“ (LAS) werden vor dem eigentlichen Fusionsexperiment Lipide zugegeben, die den letzten der Schritt der Fusion, die Verschmelzung der beiden Membranen, verhindern. Dazu werden Zielzellen und Effektorzellen für 3 Stunden bei 23°C inkubiert und TAS etabliert. Dieser Schritt dient zur Erhöhung der Fusionsgeschwindigkeit bis zum LAS-Stadium, weil das inhibitorische Lipid hochtoxisch ist. Anschließend wird das Lipid L-Lysophosphatidylcholin (L-LPC) zu 2 mg/ml in PBS zugegeben und die Zellen für 30 Minuten auf 37°C inkubiert. Hierbei schreitet die Zell-Zellfusion bis zum letzten Schritt der Fusion – der Verschmelzung der beiden Membranen – fort. Nach Abkühlung auf 4°C wird das Lipid entfernt und das eigentliche Fusionsexperiment bei 37°C durchgeführt (Abb. 3.31).

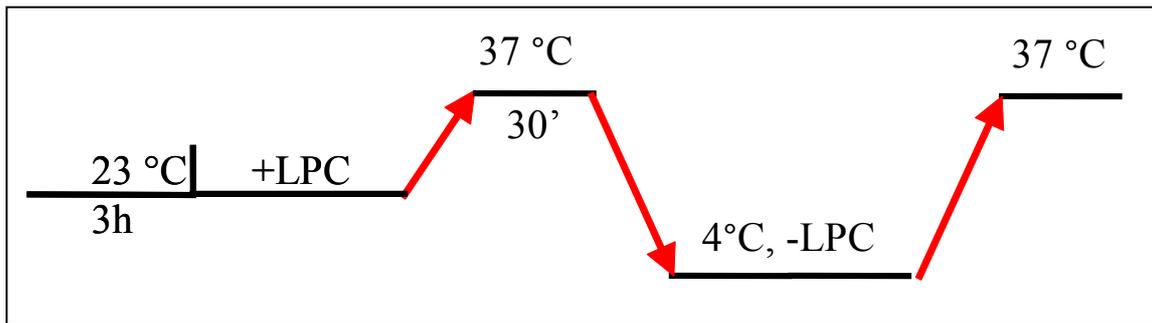


Abb. 3.31: Schema zur Etablierung von LAS. Nach 3-stündiger Inkubation wird TAS erreicht, das Peptid LPC zugegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert (LAS). Anschließend wird das Lipid bei 4°C mit PBS wieder ausgewaschen und das Fusionsexperiment bei 37°C durchgeführt.

Die Zielzellen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMAC gefärbt und mit den gefärbten Effektorzellen 293T HxB2 inkubiert und wie oben beschrieben das LAS-Stadium etabliert. Nach Auswaschen des Lipids erfolgte die Fusion der PM-1 Zellen analog wie beim TAS-Stadium unverzögert. Im Gegensatz zu TAS ist die Kinetik der Fusion von Beginn an für PM-1 MP1-neo und PM-1 M87-Ineo unterschiedlich – so hat PM-1 MP1-neo nach 60 min über 30 Prozent erreicht, während M87-Ineo unter 10 Prozent Fusion liegt (Abb. 3.32).

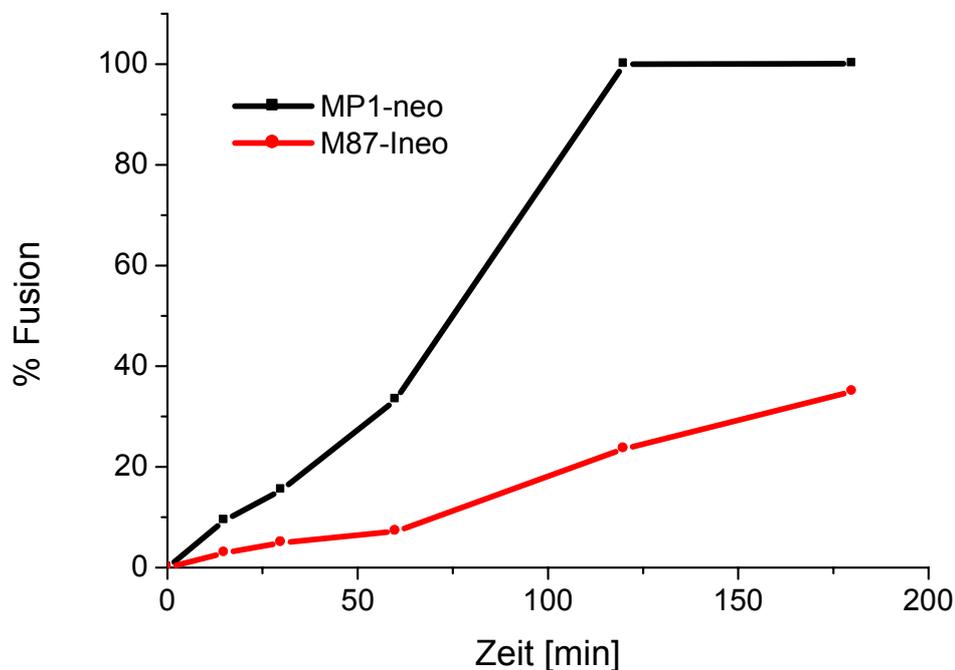


Abb. 3.32: Kinetik der Fusion von PM-1 MP1-neo und PM-1 M87-Ineo nach Etablierung des Lipid-arretierten Stadiums (LAS). Die PM-1 Zellen wurden mit CMAC und die 293T HxB2 mit CaAM gefärbt und nach Etablierung von LAS die Fusion unter dem Mikroskop beobachtet.

4. Diskussion

In genetisch modifizierten T-Lymphozyten könnte idealerweise durch Expression eines antiretroviralen Gens die Vermehrung von HIV bzw. dessen Eintritt in die Zelle verhindert werden. Aufgrund dieses Überlebensvorteils könnten sich die Zellen nach autologer Infusion langfristig im Organismus des HIV-Patienten anreichern (von Laer und Brandenburg, 2001). Am besten geeignet sind Gene und Genprodukte, die vor der Integration der proviralen DNA wirken – diese Gene bedürfen keiner effizienten Inhibition von HIV-Genprodukten in der Zelle (vgl. Kap. 1.6). Durch Expression von Fusionsinhibitoren kann der Eintritt von HIV in die Zelle verhindert werden, wobei diese Inhibitoren die Fusion zwischen viraler und zellulärer Membran verhindern. Der Fusionshemmer T20 ist abgeleitet vom C-terminalen „heptad repeat“ von gp41 und hemmt HIV-1 Fusion und Eintritt bei nanomolaren Konzentrationen (Wild et al., 1992). Es wurde bereits hinsichtlich seiner antiviralen Wirkung in einer klinischen Studien getestet und ist seit März 2003 zugelassen. Mit dem onkoretroviralen Vektor M87-Ineo gelang nach Transduktion von T-Zellen die erfolgreiche Expression des membranverankerten Fusionsinhibitors T20 auf der Zelloberfläche und die effiziente Hemmung der HIV-Replikation (Hildinger et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde der retrovirale Vektor M87-Ineo erfolgreich für die klinische Applikation durch folgende Verbesserungen optimiert:

- Erhöhung der Expression des C-Peptids
Die Expression des membranverankerten Peptids wurde durch Austausch des retroviralen Leaders und durch Optimierung der Codons um ein vielfaches erhöht. Die erhöhte Expression korrelierte mit einer stärkeren Hemmwirkung.
- Reduktion der Immunogenität des Transgens
Der Linker zwischen dem Membrananker und dem C36-Peptid wurde erfolgreich ausgehend vom Linker des murinen Antikörpers IgG2 durch das Gelenk („Hinge“) von humanem IgG2 ersetzt. Damit konnte nun eine potentielle Immunogenität durch den Linker ausgeschlossen werden.

- Verhinderung der Resistenzbildung
Das C-Peptid wurde N-terminal verlängert und ein weiteres inhibitorisches Prinzip eingeführt – damit wurden Strategien implementiert, die die Resistenzbildung von HIV *in vivo* wesentlich erschweren.

4.1 Reduktion der Immunogenität

Bei der Entwicklung von M87-Ineo wurde das Gelenk des murinen Antikörpers IgG2 als flexibler Linkerbereich verwendet (Hildinger et al, 2001). Zellen, die mit diesem Vektor transduziert wurden und das murine Peptid exprimieren, könnten nach autologer Transfusion eine xenogene Immunantwort des Patienten auslösen, somit vom Immunsystem als fremd erkannt und eliminiert werden. Eine xenogene Immunantwort konnte beispielsweise bei einem Transfer der „Herpes simplex virus thymidin kinase“ (HSV-TK) in T-Lymphozyten nach Reinfusion beim Menschen beobachtet werden (Bonini et al., 1997). Stripecke et al. (1999) fanden bei einem Maus-Transplantationsmodell eine Immunantwort gegen das Grün fluoreszierende Protein (GFP). Um dieses Risiko für das inhibitorische C-Peptid in M87-Ineo auszuschließen, wurde der murine Linker durch humane Sequenzen der Gelenke von IgG1, IgG2 und IgG4 substituiert und die Konstrukte in der Zellkultur getestet.

Die Klonierung der Konstrukte mit den verschiedenen Linkervarianten erfolgte mittels einer 3-Schritt-PCR. Nach Herstellung der retroviralen Vektoren wurde die Zelllinie PM-1 erfolgreich transduziert und mit G418 selektioniert. Mit allen retroviralen Konstrukten (M87-Ineo, M87/HlgG1-Ineo, M87/HlgG2-Ineo und M87/HlgG4-Ineo) konnte die Expression des C36-Peptids auf der Oberfläche der PM1-Zellen nachgewiesen werden. Dabei beeinflussten die Modifikationen im Linkerbereich die Höhe der C36-Expression nicht (Tab. 4.1) Anders hingegen verhielt es sich mit der Effizienz der Inhibition durch die Expression der verschiedenen Linker-Konstrukte. Nach Infektion mit HIV_{NL4-3} mit einer MOI = 0.05 konnte nur der Linker mit der humanen Hinge von IgG2 (M87/HlgG2-Ineo) die HIV-Replikation genauso gut hemmen wie das Basiskonstrukt M87-Ineo. Zur Entwicklung des Vektors für die klinische Applikation konnte somit der Linker durch das Gelenk des humanen IgG2 ohne Verlust an Expression und inhibitorischer Wirkung ersetzt werden. Doch

die beiden anderen Konstrukte M87/HlgG1-Ineo und M87/HlgG4-Ineo hemmten trotz gleicher Oberflächenexpression die HIV-Replikation schlechter bis gar nicht, obwohl sie das Peptid gleich hoch exprimierten.

Tab. 4.1: Mittlere Fluoreszenzen der verschiedenen Linker-Konstrukte

Konstrukt	Mittlere Fluoreszenz	Linkerlänge (Zahl Aminosäuren)
M87-Ineo	8.2	13
M87/HlgG1-Ineo	9.9	23
M87/HlgG2-Ineo	7.9	19
M87/HlgG4-Ineo	9.1	21

Somit ist nicht die Expression, aber die inhibitorische Wirkung des C-Peptids vom verwendeten Linker abhängig. Für die unterschiedliche Hemmung könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein:

- Einfluss der Linkerlänge

Das Konstrukt mit der murinen Hinge von IgG2 (M87-Ineo) besitzt mit 13 Aminosäuren die kürzeste Hinge von allen Vektorderivaten, während die anderen Konstrukte längere Linker aufwiesen (Tab. 4.1). Von den neu konstruierten Vektoren inhibierte das Konstrukt gleich effizient wie M87-Ineo, das auch den kürzesten Linker mit 19 Aminosäuren besaß (M87/HlgG2-Ineo). Ist der Linker zu lang, so könnte die Interaktion zwischen dem membranverankerten Inhibitor und dem N-terminalen „heptad repeat“ (HR1) gestört sein, weil das Peptid zu weit aus der T-Zellmembran herausragt (Abb. 4.2 A). Der Abstand zwischen dem C-terminalen heptad repeat und der Virusmembran bei HIV-1 gp41 beträgt 12 Aminosäuren. Dieser Abstand sollte auch für die Interaktion des C-Peptides optimal sein.

- Zusätzliche Wechselwirkungen zwischen Linker und gp41

Ein anderer Grund könnte in zusätzlichen Wechselwirkungen zwischen dem Linker und dem Bereich des gp41-Fusionspeptides liegen. Dieser Bereich ist durch viele hydrophobe Aminosäuren unpolar und je polarer der Linkerbereich ist, desto mehr könnte die Interaktion von HR1 mit dem C36-Peptid gestört sein (Abb. 4.2 B).

- Einfluss des Linkers auf die korrekte Faltung und Helizität des C-Peptids
- Der inhibitorische Effekt des löslichen T20 wird durch Octylierung am C-Terminus erhöht und selbst inaktive T20-Mutanten können durch diese Modifikation ihre Hemmwirkung zurückgewinnen (Peisajovich et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass die Octylierung den helikalen Anteil des Peptides erhöhte. Die Helizität ist somit von kritischer Bedeutung für die Hemmwirkung, was auch Jin et al. (2000) für das C34-Peptid zeigen konnten. Ähnliches könnte auch für das membranverankerte C46-Peptid gelten: Bestimmte Linkersequenzen sind möglicherweise eher dazu geeignet, das C36 auf der Zelloberfläche in eine helikale und für die Inhibition optimalere Konformation zu bringen oder bestimmte Linker stören die Ausbildung der helikalen Konformation.

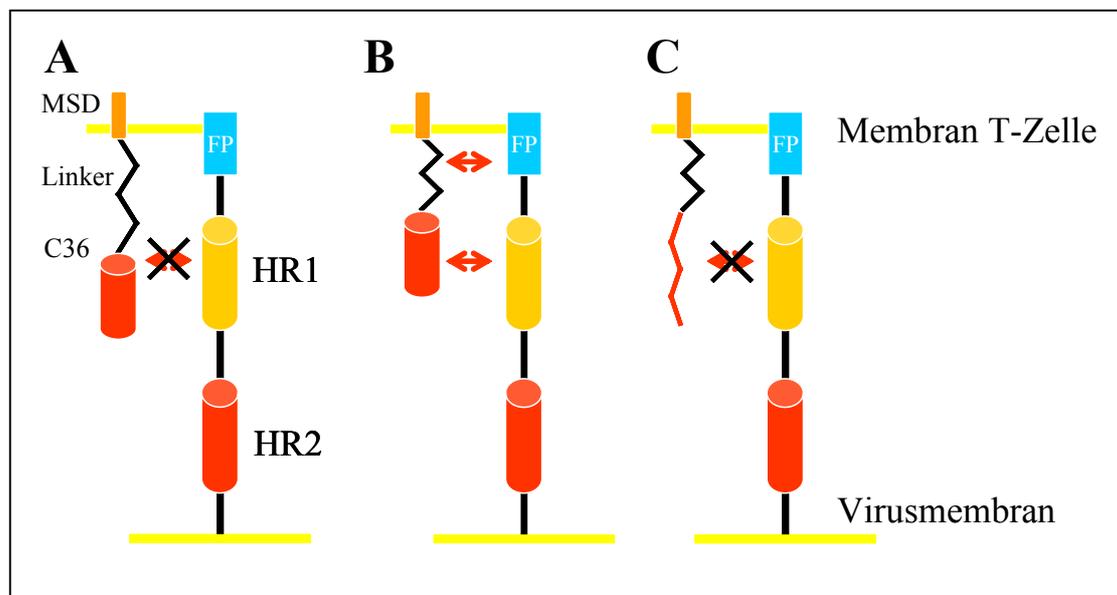


Abb. 4.1: Modell zur Wirkung des Linker-Austauschs. Schematisch dargestellt sind die Virusmembran mit dem HIV-Hüllprotein und den beiden "heptad repeats" (HR1; HR2) und dem Fusionspeptid (FP), das die Membran der Wirtszelle penetriert. Auf der T-Zelle ist das membranverankerte C-Peptid, das mit dem HR1 von HIV Env interagiert. Es besteht aus dem Membrananker (MSD), dem Linker und dem C-Peptid (C36) (**A**) Ist der Linker zu lang, so könnte das C36-Peptid mit dem HR1 nicht mehr korrekt interagieren, da die Interaktionsbereiche zu weit entfernt sind. (**B**) Der Bereich N-terminal vor dem HR1 ist sehr hydrophob. Sehr polare Linker könnten die Wechselwirkungen zwischen C-Peptid und HR1 stören. (**C**) Stören bestimmte Linkersequenzen die Bildung der helikalen Sekundärstruktur des C36-Peptids, so wäre die Hemmwirkung aufgehoben oder zumindest geschwächt.

4.2 Substitution der Transmembrandomäne

Zur Verankerung des C36-Peptids wurde in M87-Ineo die Transmembrandomäne von LNGFR verwendet (Hildinger et al., 2001). Comoli et al. (1996) beschrieben, dass diese Transmembrandomäne nicht fest in der Membran verankert ist und sich aus der Membran in den extrazellulären Raum lösen kann. Sollte Gleiches für membranverankerte Peptide gelten, so könnten diese in ihrer Oberflächenexpression reduziert worden sein. Ein fest in der Membran sitzender Anker könnte somit zur Expressionserhöhung auf der Zelloberfläche führen. Außerdem sollte der LNGFR-Anker nicht für die klinische Applikation verwendet werden: In früheren Studien verstärkte die Expression von Δ LGNFR in Fibroblasten die Transformation (Hantzopoulos et al., 1994) – neuere Mausmodelle stützen inzwischen diese Hypothese (Li et al., 2002; Baum et al., 2003). Zwar befinden sich die Aktivierungsdomänen von Δ LNGFR im extrazellulären Bereich außerhalb der Transmembrandomäne in M87-Ineo, doch um dieses Risiko bei der autologen Transfusion der retroviral transduzierten Zellen in den Patienten grundsätzlich auszuschließen, wurde eine neue Membranverankerung entwickelt und erfolgreich getestet.

Hierzu wurde über eine 3-Schritt-PCR ein Konstrukt mit der Transmembrandomäne von humanem trunkiertem CD34 kloniert (tCD34; Egelhofer et al., 2004). Die Membrandomäne ist abgeleitet von einer natürlichen Isoform des CD34-Markers (Suda et al. 1992) und besitzt 16, statt der bei CD34 üblichen 86 Aminosäuren. Ein vollständiger Transmembranbereich mit den Aktivierungsdomänen könnte als C-Peptid-Expressionskonstrukt unvorhersehbare Nebeneffekte bei Andocken eines HIV-Partikels hervorrufen.

Der Austausch des Membranbereichs in M87-Ineo durch die tCD34-Transmembrandomäne (M87/CD34-Ineo) führte mit einer mittleren Fluoreszenz von 5.0 zu einer mindestens gleich hohen Oberflächenexpression wie das Basiskonstrukt M87-Ineo (mittl. Fluoreszenz = 4.6). Da die Expression nahezu unverändert war, ist anzunehmen, dass der ursprüngliche LNGFR-Membrananker sich nicht aus der Membran gelöst hatte sowie nicht in den extrazellulären Bereich abgegeben wurde. Da aber die tCD34-Transmembrandomäne für die klinische Applikation wichtige Sicherheitsaspekte berücksichtigt und gleich hoch exprimiert wie das

Basiskonstrukt M87-Ineo, wurde diese Verankerung für die Klonierung des Prototyp-Vektoren gewählt.

4.3 Strategien gegen die Bildung C36-resistenter HIV-Stämme

4.3.1 Verlängerung des C-Peptides

In der ersten klinischen Studie mit löslichem T20 wurde bei allen Patienten ein Abfall der Viruslast beobachtet (Kilby et al. 1998). Bei 2 Patienten, die die höchste Dosis von 100 mg erhielten, wurde jedoch nach 14 Tagen ein langsamer Anstieg der Viruslast beobachtet. Wei et al. (2002) isolierten Viren aus diesen Patienten und konnten zeigen, dass HIV gegen das T20 resistent geworden war. Punktmutationen im GIV-Motiv im Bereich des „heptad repeat“ 1 (HR1) beispielsweise zu DTV/SIM sind hierfür verantwortlich. Analog konnten Rimsky et al. (1998) gegen T20 resistente Stämme *in vitro* generieren, die die gleichen Punktmutationen im HIV Env aufwiesen (Abb. 4.2).

Um die Bildung dieser Resistenzmutanten zu verhindern, wurde das C-Peptid N-terminal um 10 weitere Aminosäuren verlängert. Dieser Bereich ist bei HIV hochkonserviert und spielt eine entsprechend große Rolle bei der Virus-Zellfusion (Chan et al., 1997; Chan et al. 1998, Abb. 4.2). Das Konstrukt M87/C46-Ineo mit dem verlängerten C-Peptid wurde über eine 3-Schritt-PCR kloniert und nach Verpackung des Vektors die Zelllinie PM-1 mit dem retroviralen Vektor transduziert. Die Expressionshöhe wurde mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo verglichen - das membranverankerte C46-Peptid exprimiert mit einer mittleren Fluoreszenz von 13.1 etwas höher als das C36-Peptid im Basiskonstrukt M87-Ineo (mittl. Fluoreszenz = 11.2). Die Hemmung der Replikation von HIV_{NL4-3} war bei einer MOI von 0.05 gleich effizient.

Um den Effekt der Verlängerung zu untersuchen, wurden T20-resistente HIV-Hüllproteine generiert. Im HxB2 Env Expressionsplasmid wurde dazu das GIV-Motiv zu DTV bzw. SIM mutiert und lentivirale Pseudotypen von diesen HIV-Hüllproteinen hergestellt. Die beiden Zelllinien PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87/C46-Ineo wurden mit diesen lentiviralen Vektoren in einer „single round infection“ infiziert, der Prozentsatz positiver Zellen bestimmt und die Hemmung relativ zu Kontrollzellen PM-1 MP1-neo berechnet. Wie erwartet,

hemmte keines der Zellen die Infektion mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren (Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu wurden lentivirale Vektoren mit dem Wildtyp-HxB2 von beiden Konstrukten, M87-Ineo und M87/C46-Ineo effizient gehemmt. Die Hemmwirkung von M87-Ineo und deren Derivate basiert somit auf der spezifischen Fusionsinhibition von HIV Env: VSV-G pseudotypisierte Viren konnten ungehindert in die Zellen eindringen, während HIV-Pseudotypen inhibiert worden sind. Interessanterweise war eine stärkere Hemmung mit C46 (17fach) im Vergleich zu C36 (13fach) beobachten. Möglicherweise führte die Verlängerung des C-Peptides zu einer erhöhten Affinität aufgrund der verstärkten hydrophoben Wechselwirkungen im N-terminalen Bereich.

Die beiden Resistenzmutanten von HxB2 wurden vom verlängerten C46 mit gleicher Effizienz gehemmt (je 16fach), während C36 wesentlich schwächer inhibierte (6 bzw. 5fach). Der N-terminale Bereich des verlängerten C-Peptids hemmte somit HIV Env Mutanten, die gegen das T20/C36-Peptid unempfindlicher geworden sind. Diese Hemmung beruht auf der Interaktion des C46-Peptids mit dem hochkonsevierten Bereich im HR1 (Abb.4.2).

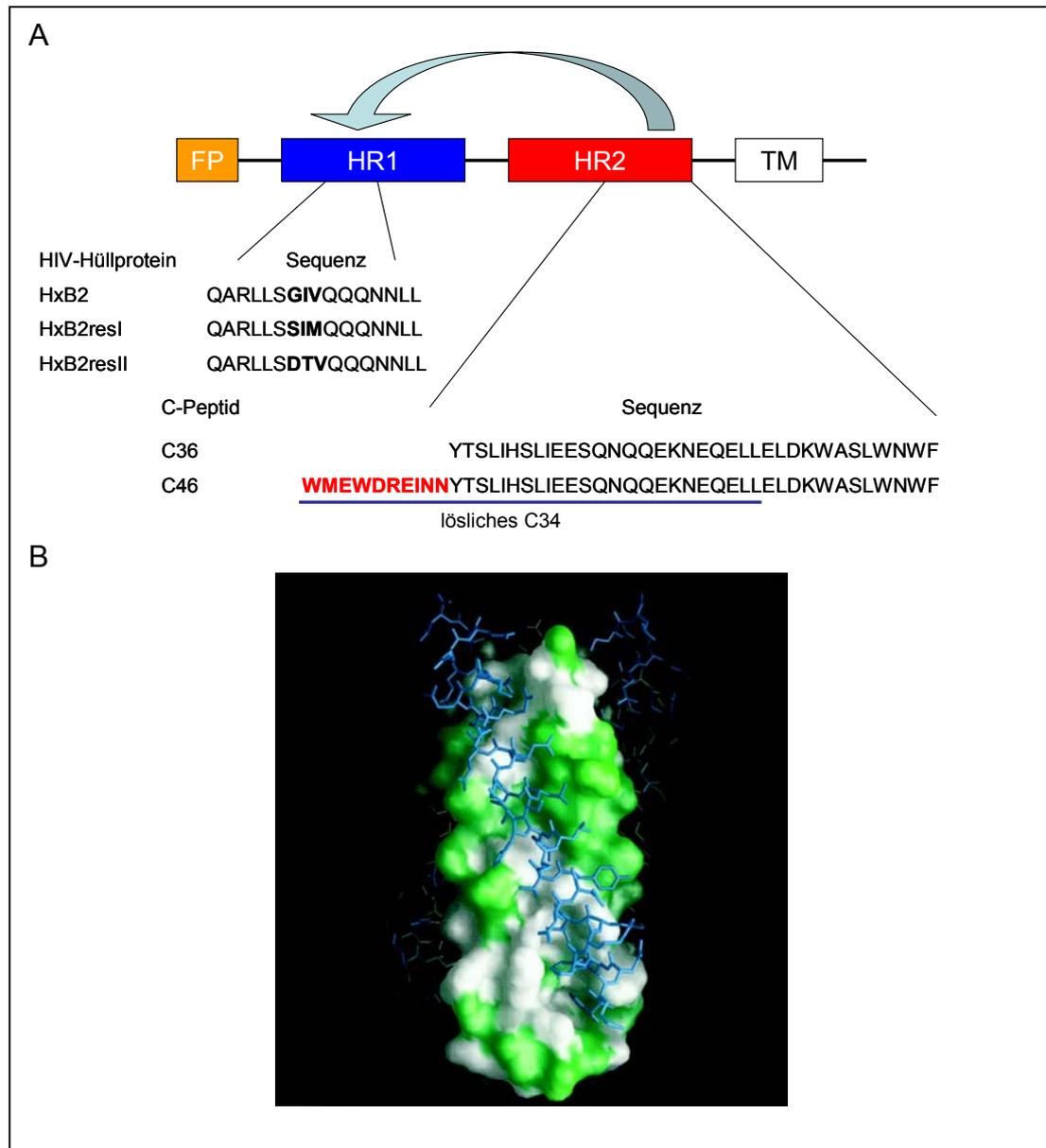


Abb. 4.2: **(A)** Schema des HIV-Hüllproteins gp41. Bei der Fusion klappen die beiden „heptad repeat“ Regionen des HR1 und HR2 in Trimeren zusammen und bilden ein Sechs-Helix-Bündel. Das C36/T20-Peptid ist vom HR2 abgeleitet und hemmt die Fusion durch Interaktion im HR1. Mutationen im GIV-Motiv von HR1 führen zur Resistenz gegenüber C36. Das um 10 Aminosäuren verlängerte C46-Peptid (rot) inhibierte solche Resistenzmutanten. **(B)** Die C34-Peptide sind blau dargestellt und in Oberflächendarstellung das N36-Trimer. Das C-Peptid interagiert mit Bereichen im HR1, die zwischen HIV und SIV hochkonserviert sind (weiß). Auf diese Weise interagiert das C46-Peptid und inhibiert HIV, das durch Punktmutationen im GIV gegenüber C36 unempfindlich ist (nach Chan et al., 1997).

4.3.2. Einführung eines zweiten inhibitorischen Prinzips

Bei einer Monotherapie mit klassischen antiviralen Substanzen wie Reverse-Transkriptase- oder Proteasehemmer bilden sich schnell resistente HIV-Stämme. So beobachteten Schuurmann et al. (1995) bei einer Monotherapie mit dem Nucleosid-Analoga Lamivudine (3TC) innerhalb von Wochen die Etablierung von 3TC-resistenten HIV-Stämmen. Dies führte zur Einführung von Kombinationstherapien mit verschiedenen Klassen antiviraler Substanzen (Perleson et al., 1997). Gleiches könnte auch bei einer Gentherapie von HIV zu erwarten sein – Vektoren mit einem einzigen Gen oder Genprodukt könnten im Laufe der Zeit zur Ausbildung von Resistenzen führen. Deshalb wurde in den retroviralen Vektor ein zweites inhibitorisches Gen mit einem anderen Inhibitionsprinzip in den retroviralen Vektor M87o eingeführt. Besonders geeignet erschien dabei das RRE-decoy (Lee et al., 1994): es wurde bereits in der klinischen Phase getestet (Kohn, 2000) und als RNA-Element ist keine Co-Expression eines zweiten Proteins erforderlich. Dies würde nämlich die Konstruktion eines bicistronischen Vektors erfordern, bei dem aber die Expression des ersten Gens beeinträchtigt wäre. Das RRE-Element in HIV ist für den Transport der viralen mRNA aus dem Zellkern zur Expression später Gene verantwortlich und interagiert mit dem Rev-Protein von HIV. Durch Expression des RRE-decoys im retroviralen Vektor wird das RRE der HIV-RNA kompetitiert und es gelangen weniger virale mRNA-Moleküle aus dem Zellkern.

Das RRE-decoy mit einer Länge von 41 Basenpaaren wurde über Oligonucleotide 3' des Transgens kloniert. Die Expression des inhibitorischen Peptids war durch Einführung des RRE-Elementes unbeeinflusst (M87o mittl. Fluoreszenz=1062; M87o-RRE=958) und beide Konstrukte inhibierten die HIV-Replikation mindestens gleich effizient. Mit diesen Experimenten konnte allerdings bisher nicht nachgewiesen werden, dass das RRE-Element einen zusätzlichen inhibitorischen Effekt ausübt. Der Effekt des membranverankerten Fusionspeptids ist nach der Optimierung wahrscheinlich so groß, dass die antivirale Aktivität des RRE-decoys *in vitro* nicht bedeutsam ist.

4.4 Kombination aller optimalen Peptid-Module und Optimierung der Codon Usage

Für das optimierte Peptid wurden alle geeigneten Module in einem Konstrukt vereinigt. Für den flexiblen Linker wurde das Gelenk des humanen Antikörpers IgG2 verwendet, da dieser als einziger Linker auch ebenso effizient wie das Basiskonstrukt M87-Ineo die HIV-Infektion gehemmt hatte. Dieses wurde über eine 3-Schritt-PCR mit dem tCD34-Membrananker und dem verlängerten C46-Peptid zur Reduzierung der Resistenzbildung fusioniert (M87oc-Ineo). Analog wurde das Konstrukt M87o/MP1-Ineo hergestellt, das für das gleiche Peptid, jedoch mit für humane Zellen optimierter „Codon Usage“, kodiert. Verschiedene Organismen verwenden für die verschiedenen Aminosäuren Codons in unterschiedlicher Häufigkeit (Knight et al., 2001), wobei die Optimierung der Codons für den entsprechenden Organismus zur erhöhten Expression führen kann (Hamdan et al., 2002; Bojak et al., 2002).

Nach Klonierung der beiden Konstrukte M87oc-Ineo und M87o/MP1-Ineo wurden die retroviralen Vektoren produziert und PM-1 Zellen transduziert. Nach Selektion war die Expression des optimierten Konstruktes M87oc-Ineo (mittl. Fluoreszenz 8.3) im Vergleich zum Basiskonstrukt M87-Ineo (4.6) leicht erhöht. Diese Beobachtung ist aus den Daten der Einzelaustausche nicht eindeutig erklärbar, weil bei diesen keine wesentlichen Unterschiede in der Expression festzustellen war. Möglich ist, dass die kombinierten Module im Gesamtzusammenhang als artifizielles Protein effizienter in der Zelle prozessiert werden. Das Konstrukt mit optimierten Codons (M87o/MP1-neo) exprimiert mit einer mittleren Fluoreszenz von 13.4 im Vergleich zu M87oc-Ineo mit 8.3 nochmals stärker. Der Effekt ist jedoch mit einer etwa 1.5fachen Erhöhung nicht so stark ausgeprägt, wie dies für GFP nach Haas et al. (1995) beobachtet wurde. Sie erhöhten die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) von *Aequorea victoria* in humanen Zellen durch das Optimieren der verwendeten Codons um das 40-fache (Haas et al. 1995). Eine mögliche Ursache ist, dass die Auswahl der Codons vor Optimierung weniger ungünstig war, als wie beispielsweise für das GFP. Der Membrananker, das Signalpeptid und der Linker enthalten im nichtoptimierten Konstrukt bereits die humane Original-Nucleotidsequenz. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass insbesondere die Verwendung der Codons im 5'-Bereich des Transgens besondere Bedeutung hat (Hamdan et al., 2002). Im Falle des

C-Peptids waren dort im humanen Signalpeptid nur wenige sehr ungünstige Codons zu finden (Abb. 4.3).

- cu	ATG	GGG	GCA	GGT	GCC	ACC	GGC	CGC	GCC	ATG	GAC	GGG
+ cu	ATG	GGC	GCC	GGC	GCC	ACC	GGC	CGC	GCC	ATG	GAC	GGC
		<i>ggt</i>		<i>gca</i>	<i>act</i>	<i>ggt</i>	<i>cga</i>	<i>gca</i>		<i>gat</i>	<i>ggt</i>	
AS	M	G	A	G	A	T	G	R	A	M	D	G
- cu	CCG	CGC	CTG	CTG	CTG	TTG	CTG	CTT	CTG	GGG	GTG	TCC
+ cu	CCC	CGC	CTG	GGC	GTG	AGC						
	<i>cca</i>	<i>gat</i>	<i>tta</i>	→					<i>ggt</i>	<i>gta</i>	<i>tca</i>	
AS	P	R	L	L	L	L	L	L	L	G	V	S
- cu	CTT	GGA	GGT	GCC								
+ cu	CTG	GGC	GGC	GCC								
	<i>tta</i>	<i>ggt</i>		<i>gca</i>								
AS	L	G	G	A								

Abb. 4.3: Sequenz des Signalpeptids ohne (-cu) sowie mit adaptierte Codon Usage (+cu). 13 der 84 Basen wurden ausgetauscht (rot, ~ 15%). 3 von 28 Aminosäuren wurden vor der Adaption durch ungünstigste Codons kodiert (grün).

4.6 Optimierung des Vektorrückgrats

Im Basiskonstrukt M87-Ineo wurde die Expression des Transgens über eine „Myeloma Proliferative Sarcoma virus“-LTR reguliert. Der MP-1 Leader stromabwärts der „long terminal repeats“ (LTR) enthält das Verpackungssignal ψ sowie eine Splice-Donor-Stelle mit einem schwachen Splice-Akzeptor (Abb. 4.4). Weiterhin sind 7 artifizielle ATGs zu finden, die eine Translation unbekannter Polypeptide zur Folge haben könnte (Hildinger et al., 1999), die potentiell toxisch oder immunogen sind. Diese kurzen offenen Leserahmen stören außerdem die Expression des eigentlichen Transgens. In der Gruppe von C. Baum wurde der optimierte Leader MP71 entwickelt, in dem ein ganzer Bereich stromaufwärts des Transgens einschließlich der sieben Startcodons entfernt und eine effiziente Splice-Akzeptorstelle eingefügt wurde. Dabei wurde eine Expressionserhöhung unabhängig vom Transgen oder der Zelllinie beobachtet (Hildinger et al., 1999).

Um zu untersuchen, ob ein Leader-Austausch auch die Expression der membranverankerten Peptide erhöht, wurden die beiden Konstrukte M87o/MP1 und M87o- Δ PRE kloniert sowie ein weiteres Konstrukt mit einem PRE-Element von Woodchuck HBV konstruiert (M87o). Von den Konstrukten wurden retrovirale Partikel hergestellt und zur Transduktion von PM-1 Zellen verwendet. Der optimierte Leader erhöhte die Expression des inhibitorischen Peptids von einer mittleren Fluoreszenz von 59.7 für M87o/MP1 auf 461 für M87o- Δ PRE und somit um etwa das 10fache. Somit wurde wie bei Hildinger et al. (1999) eine Steigerung des Expressionsniveaus durch den optimierten MP71-Leader erreicht. Mit diesem Konstrukt war auch erstmalig eine Expression auf transduzierten PBMCs detektierbar (Mitteilung G. Brandenburg). Keine der Modulsstitutionen oder Veränderungen in der Codon Usage führten zu einer so deutlichen Expressionserhöhung. Das Konstrukt mit dem PRE-Element (M87o) hatte bei einer mittleren Fluoreszenz von 410 im Vergleich zu M87o- Δ PRE (mittl. Fluoreszenz 461) hingegen keinen positiven Einfluss auf die Expression des membranverankerten Peptids. Daten mit demselben Ergebnis wurden auch mit T-Lymphozyten generiert (Mitteilung G.Brandenburg), so dass ein durch die Zelllinie PM-1 bedingter Effekt ausgeschlossen werden kann.

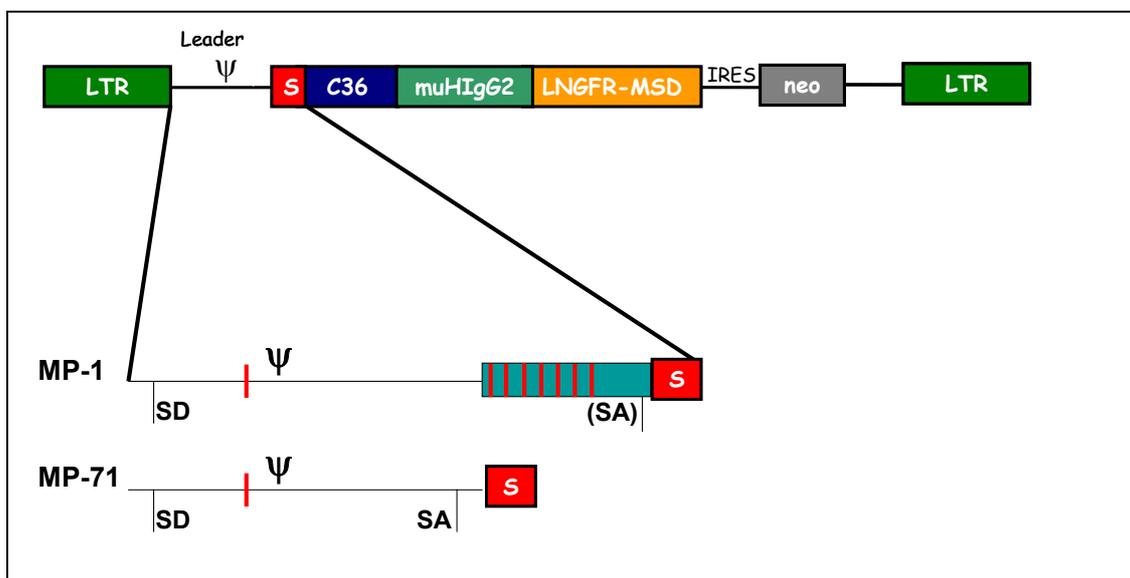


Abb. 4.4: Architektur des Leaderbereiches. Der MP1-Leader in M87-Ineo enthält noch Sequenzen, die ursprünglich stromaufwärts des gag-pol-Gens liegen mit 7 ATGs vor dem eigentlichen Transgen (türkis & rot) mit einer schwachen Splice-Akzeptor-Stelle. Dieser Bereich wurde durch einen effizienten Splice-Akzeptor ersetzt.

Das „Posttranscriptional regulatory element“ (PRE) ist vom Woodchuck Hepatitis B Virus (wHBV) abgeleitet und kann abhängig vom jeweiligen Transgen die Expression erhöhen (Schambach et al, 2000). Es wurde häufig in retroviralen und lentiviralen Vektoren zur Expressionserhöhung eingesetzt. Das PRE besitzt eine ausgeprägte Sekundärstruktur (Patzel et al. 1997; Smith III et al., 1998) und Deletionsanalysen haben gezeigt, dass das HBV PRE aus zwei Untereinheiten besteht, die synergistisch wirken (Donello et al. 1996). Das PRE verhilft zu einem effizienten Export der RNA aus dem Zellkern (Huang et al., 1995 & Huang et al., 1994) und ist möglicherweise auch für eine erhöhte Stabilität der RNA verantwortlich. Doch im Falle des C-Peptides wurde kein positiver Effekt beobachtet. Hierfür kommen folgende Ursachen in Frage:

- Durch die Optimierung des Leaders wird das inhibitorische Peptid bereits sehr hoch in den Zellen exprimiert, so dass es möglicherweise bereits zur Sättigung in entsprechenden Kompartimenten der Zelle kommt (z.B. ER). Mehr Protein könnten die Zellen nicht prozessieren, weshalb eine weitere Expressionserhöhung nicht mehr möglich ist.
- AU-reiche Bereiche innerhalb der mRNA können Retentionssignale enthalten, die den Export der mRNA hemmen. Solche RNAs profitieren wahrscheinlich durch das PRE, da diese für den Export aus dem Zellkern sorgt (Zufferey et al., 1999). Doch bei der Optimierung der Codons wurden mehrfach Substitutionen von A/T zu G/C vorgenommen, so dass keine Retentionssignale in der mRNA bestehen sollten, die durch das PRE üblicherweise kompensiert werden könnten.
- Durch das funktionelle Intron im optimierten Leader kommt es zu Interaktionen der mRNA mit zellulären Faktoren, die für das Splicing und einen schnellen Export der RNA aus dem Zellkern sorgen (Schambach et al., 2000). Möglicherweise ist der Export der RNA so schnell und effizient, so dass ein verbesserter Export durch das PRE nicht mehr möglich ist.

4.7 Vergleich von Basiskonstrukt M87-Ineo und optimiertem Konstrukt M87o-RRE-Ineo

Der Fortschritt in der Weiterentwicklung des retroviralen Vektors für die klinische Applikation spiegelt sich besonders im Vergleich zwischen dem Basiskonstrukt M87-Ineo und dem optimierten Konstrukt M87o-RRE-Ineo wider. M87o-RRE-Ineo enthält den MP71-Leader für die verbesserte Expression sowie das Gen aus M87o/MP1-Ineo mit dem synthetische Gen und allen optimierten Modulen (Abb. 4.5).

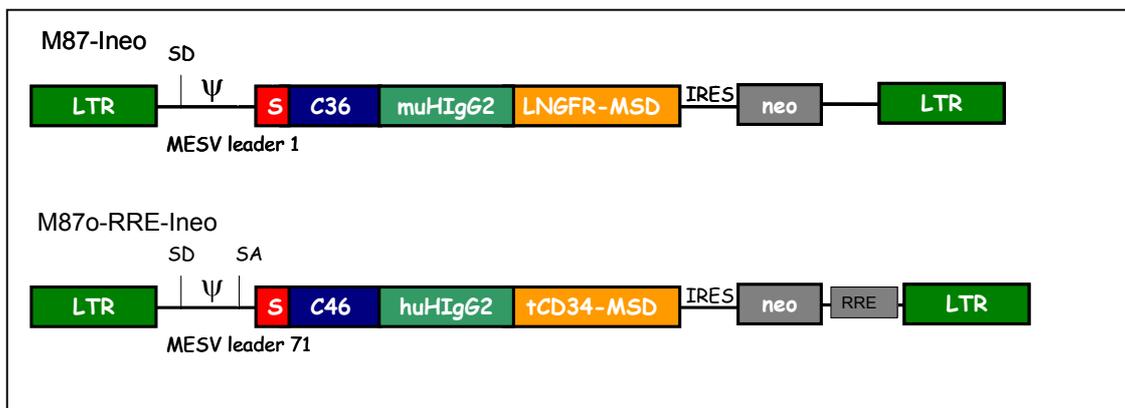


Abb. 4.5: Architektur der beiden Konstrunkte M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo. Der Vektor M87o-RRE enthält den optimierten MP71-Leader sowie das synthetische Gen von M87o/MP1-Ineo.

Die Expression bei M87o-RRE-Ineo ist mit einer mittleren Fluoreszenz von 120.8 im Vergleich zum Basiskonstrukt M87-Ineo mit 13.7 etwa 10fach erhöht. Die hier beobachtete Expressionserhöhung von M87-Ineo zu M87o-RRE-Ineo ist im Wesentlichen auf die Verwendung des optimierten MP71-Leaders zurückzuführen – kleinere Effekte wurden aber auch durch die optimierte Codon-Usage erreicht. Infektionsexperimente mit den Stämmen HIV_{NL4-3} und HIV_{D117-II} zeigten, dass die stärkere Expression auch mit einer verbesserten Hemmwirkung korrelierte. Während bei M87-Ineo transduzierten Zellen ein Durchbruch der HIV-Infektion bei sehr hoher MOI zu beobachten war, inhibierte M87o-RRE-Ineo über den gesamten beobachteten Zeitraum. Gerade die Infektion mit dem dualtropen und „aggressiven“ Stamm HIV_{D117-II} bei einer hohen MOI = 0.00025 zeigte, wie effizient das optimierte Konstrukt die HIV-Replikation hemmte. Die effiziente Hemmung durch M87o-RRE-Ineo zeigt sich weiterhin darin, dass HIV-Stämme, die gegen das C46-Peptid oder M87o-RRE resistent sind, bisher *in vitro* nicht generiert werden konnten. Die verbesserte Hemmwirkung von M87o-RRE-Ineo im Vergleich zum

Basiskonstrukt korreliert ebenfalls mit einer erhöhten Inhibition bei Zell-Zell-fusionsexperimenten mit HIV_{HxB2} Env-exprimierenden 293T Zellen (siehe Kap. 4.8).

4.8 Mechanismus der Inhibition

Zur eingehenden Untersuchung, wie membranverankerte C-Peptide die Fusion von HIV hemmen, wurden so genannte Zell-Zellfusionsassays durchgeführt. Der entscheidende Vorteil solcher Experimente besteht darin, dass die Geschwindigkeit der Fusion beobachtet und das Stadium der Fusion zu bestimmten Zeitpunkten arretiert werden kann (Cohen et al., 1998). Experimente dieser Art erlauben die Untersuchung des Fusionsmechanismus von HIV und der Funktionsweise von Fusionshemmern wie T20 (Melikyan et al., 2000).

Ein solches System wurde für PM-1-Zellen als Zielzellen und 293T HxB2 Env als Effektorzellen etabliert. Nach Transduktion der PM-1 Zellen mit MP1-neo, M87-Neo und M87o-RRE-Neo und anschließender Selektion wurden beide Konstrukte direkt miteinander in Zell-Zellfusionsexperimenten mit 293T HxB2-Zellen verglichen.

Im nicht-arretierten Stadium wurden die ersten Fusionsereignisse nach einer „Lag“-Phase von 15 Minuten beobachtet. Dabei fusionierten alle Zelllinien mit gleicher Geschwindigkeit, bis die Hemmwirkung des C-Peptids bei M87o-RRE-Neo und M87-Neo zur Wirkung kam. M87o-RRE-Neo zeigt eine deutlich stärkere Hemmwirkung, da die Fusionsgeschwindigkeit deutlich verlangsamt war, während PM1 M87-Neo bis zu 40 % mit gleicher Geschwindigkeit wie PM1 MP1-neo fusionierte und erst dann sich verlangsamte. Ein bestimmter Anteil der Zellen fusionierte somit trotz Peptidexpression mit gleicher Geschwindigkeit und ohne Hemmschutz mit den Effektorzellen. Dies lässt sich so erklären, dass möglicherweise die Fusion eines Teils der Zellen so schnell stattfindet, dass zunächst sich nicht genügend C-Peptid-Moleküle rechtzeitig an der Kontaktstelle konzentrieren können und Fusion ungehindert stattfinden kann. Der Anteil dieser schnell fusionierenden Population scheint auch von der Expressionshöhe abhängig zu sein, da M87o-RRE-Neo transduzierte Zellen bereits bei etwa 15 % Fusion langsamer zu fusionieren begannen, während M87-Neo transduzierte Zellen erst nach 40 Prozent verlangsamte Fusion zeigten. In Übereinstimmung mit

den Expressionsdaten und der Hemmtests mit replikationskompetentem HIV war in den Zell-Zellfusionsexperimenten die Hemmung mit dem Konstrukt M87o-RRE-Ineo effizienter (max. Fusion nach 4 h = 30%) als mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo (90%).

Im Temperatur-arretierten Stadium („TAS“) werden durch Inkubation bei 23°C alle Fusionsvorgänge „eingefroren“ und synchronisiert (Gallo et al., 2001). Erste Interaktionen zwischen HIV Env und Zielzelle finden statt, da nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C die Fusion sofort und ohne Lag-Phase startete. Die Fusion zeigte bei M87-Ineo wieder das gleiche Phänomen wie ohne Arretierung: Bis zum Erreichen von 40 Prozent Fusion fusionierten die Zellen mit gleicher Geschwindigkeit wie die Kontrollzellen PM1 MP1-neo. Für M87oRRE-Ineo transduzierte Zellen galt dies im TA-Stadium nicht, weil diese von Beginn an nur langsam fusionierten. Eine mögliche Ursache liegt darin, dass PM1 M87o-RRE-Ineo mehr C-Peptidmoleküle auf der Zelloberfläche besitzt, die im TAS-Stadium auch zur richtigen Stelle rekrutiert werden können, während ohne TAS möglicherweise zum Teil nicht genügend Moleküle an der Kontaktstelle zu finden sind. M87-Ineo aber kann aufgrund der 10fach niedrigeren Expressionshöhe selbst im TA-Stadium genügend C-Peptidmoleküle zur Kontaktstelle rekrutieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die unterschiedliche Kinetik von M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo auf einen anderen Mechanismus oder zusätzliche Wechselwirkungen zurückzuführen ist: Das Basiskonstrukt M87-Ineo kodiert für das C36-Peptid, während M87o-RRE-Ineo für die Expression des verlängerten C46-Peptid verantwortlich ist. So zeigten Kliger et al. (2001), dass das lösliche Peptid C36/T20 auch zu einem späteren Zeitpunkt der Fusion, beim so genannten „post-lipid-mixing“-Stadium, im Gegensatz zum weiter N-terminal liegenden C34, inhibitorisch wirken kann. Der Hemm-Mechanismus von löslichem C34 und T20 (C36) ist somit im Detail unterschiedlich, was auch für das membranverankerte C36- und C46-Peptid zutreffen könnte.

4.9 M87o-RRE für die klinische Applikation

Für die klinische Applikation wurde der retrovirale Vektor M87o-RRE kloniert. Es handelt sich dabei um ein Derivat von M87o-RRE-Ineo, aus dem die IRES-neo-Genkassette entfernt wurde (Dirks et al., 1993). Da nun die genetisch manipulierten Zellen aufgrund der hohen Expression mit dem 2F5-Antikörper einfach detektiert werden können, ist ein Markergen nicht mehr notwendig. Das Entfernen des Neomycin-Selektionsmarkers führt darüber hinaus zu einer weiteren Verminderung der Immunogenität der Therapie.

Im Vergleich zu dem bicistronischen Konstrukt M87o-RRE-Ineo mit einer mittleren Fluoreszenz von 338 exprimierte das monocistronische Konstrukt M87o-RRE etwa 10fach höher (mittlere Fluoreszenz: 1521). Somit ist das Konstrukt gleichzeitig weniger potentiell immunogen und exprimiert das C-Peptid um den Faktor 10 höher.

Mit allen geeignet Peptidmodulen, einem zweiten inhibitorischen Prinzip (Abb. 4.6) sowie durch die optimierte Expression ist der retrovirale Vektor M87o-RRE das bestmögliche Tool für die klinische Studie der Phase I. Da sich das Transgen durch einen recht kleinen offenen Leserahmen von etwa 500 Basenpaaren auszeichnet, dürfte die Expression weiterer antiviraler Gene innerhalb des gleichen Vektors in Zukunft möglich sein.

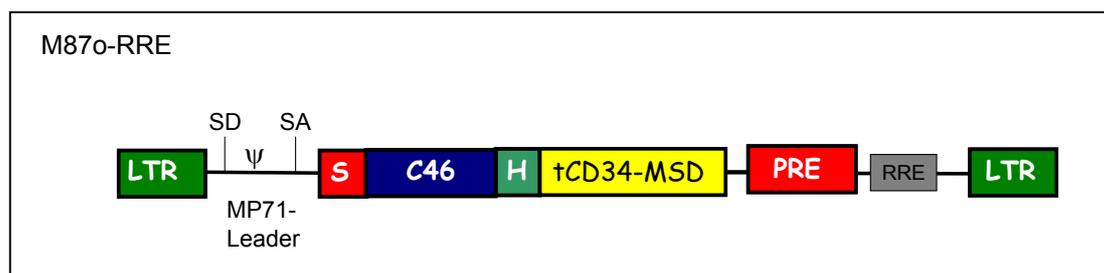


Abb. 4.6: Der retrovirale Vektor M87o-RRE für die klinische Studie der Phase I. Er besteht aus dem optimierten MP71-Leader und dem synthetischen Gen mit den optimierten Peptidmodulen (Signalpeptid LNGFR (S), C46-Peptid, humane Hinge von IgG2 (H) und tCD34-Transmembrandomäne (tCD34-MSD)). 3' des Transgens befindet sich das PRE sowie das RRE-decoy als zweites inhibitorisches Prinzip.

Den optimierten Vektor zeichnet somit eine geringere potentielle Immunogenität und ein höheres Expressionsniveau des Transgens bei gleichzeitiger Implementierung eines weiteren inhibitorischen Prinzips aus. Die Verlängerung des C-Peptides bietet darüber hinaus ein geringeres Risiko der Resistenzbildung. Das Konstrukt inhibierte die HIV-Replikation so effizient, dass *in vitro* bisher keine M87o-resistenten HIV-Stämme isoliert werden konnten. Der Vektor zeigte in intensiven präklinischen Toxizitätsstudien in Maus und Rhesusmacaquen keine detektierbare Nebenwirkungen oder Immunogenität (Mitteilung G. Brandenburg, G. Koopman, C. Baum) und befindet sich konsequenterweise nun seit 2003 in der klinischen Studie der Phase I.

5. Literatur

Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E., and Trono, D. (1994). Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**: 853-864.

Amado, R.G., Mistuyasu, R.T., and Zack, J.A. (1999). Gene therapy for the treatment of AIDS: animal models and human clinical experience. *Front. Biosci.* **4**: 468-475.

Attal, J., Theron, M.C., Puissant, C. and Houdebine L.M. (1999). Effect of intercistronic length on internal ribosome entry site (IRES) efficiency in bicistronic mRNA. *Gene Expr.* **8**: 299-309.

Bahner, I., Kearns, K., Hao, Q.-L., Smogorzewska, E.M. and Kohn, D.B. (1996). Transduction of human CD34+ Hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. *J. Virol.* **70**: 4352-4360.

Barbaro, G., and Klatt, E.C. (2003). Highly active antiretroviral therapy and cardiovascular complications in HIV-infected patients. *Curr. Pharm. Des.* **9**: 1475-1481.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Danguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**: 868-871.

Basmaciogullari, S., Babcock, G.J., Van Ryk, D., Wojtowicz, W. and Sodroski, J. (2002). Identification of conserved and variable structures in the human immunodeficiency virus gp120 glycoprotein of importance for CXCR4 binding. *J. Virol.* **76**: 10791-10800.

Baum, C., Duellmann, J., Zhixiong, L., Fehse, B., Meyer, J., Williams, D.A. and von Kalle, C. (2003). Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* **15**: 2099-2114

Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu. Rev. Immunol.* **17**: 657-700.

Bewley, C.A., Louis, J.M., Ghirlando, R., and Clore G.M. (2002). Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric colied-coli of gp41. *J. Biol. Chem.* **277**: 14238-14245.

Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J.R., Colognesi, C., Karlsson, A., Albert, J., Scarlatti, G., Littman, D.R., and Fenyo, E.M. (1997). Coreceptor

usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J. Virol.* **71**: 7478-7487.

Blaese, R.M., Culver, K.W., Miller, A.D., Carter, C.S., Fleisher, T., Clerici, M., Shearer, G., Chang, L., Chiang, Y., and Tolstoshev, P. T (1995). Lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial results after 4 years. *Science* **270**: 475.

Bojak, A., Wild, J., Deml, L., and Wagner, R. (2002). Impact of Codon usage modification on T cell immunogenicity and longevity of HIV-1 gag-specific DNA vaccines. *Intervirology* **45**: 275-286.

Bonini, C., Ferrari, G., Verzeletti, S., Servida, P., Zappone, E., Ruggieri, L., Ponzoni, M., Rossini, S., Mavilio, F., Traversari, C., and Bordignon, C. (1997). HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. *Science* **276**: 1719-1724.

Bonyhadi, M.L., Moss, K., Voytovich, A., Auten, J., Kalfoglou, C., Plavec, I., Forestell, S., Su, L., Bohnlein, E., and Kaneshima, H. (1997). RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* **71**: 4707-4716.

Brown, H.E., Chen, H., and Engelman, A. (1999). Structure-based mutagenesis of the human immunodeficiency virus type 1 DNA attachment site: effects on integration and cDNA synthesis. *J. Virol.* **73**: 9011-9020.

Buchacher, A., Predl, R., Strutzenberger, K., Steinfellner, A., Trkola, A., Purtscher, M., Gruber, G., Tauer, C., Steindl, F., Jungbauer, A. and Katinger, H. (1994). Generation of human monoclonal antibodies against HIV-1 proteins; Electroporation and Epstein-Barr Virus transformation for peripheral blood lymphocyte immortalization. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**: 359-369.

Buchsacher, G.L. and Wong-Staal, F. (2001). Approaches to gene therapy for human immunodeficiency virus infection. *Hum. Gene Ther.* **12**: 1013-1019.

Cammack, N. (2001). The potential for HIV fusion inhibition. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **14**: 13-16.

Campiani, G., Rammunno, A., Maga, G., Nacci, V., Fattorusso, C., Catalanotti, B., Morelli, E. and Novellino, E. (2002). Non-nucleoside HIV-1 reverse transcriptase (RT) inhibitors: past, present, and future perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **8**: 615-657.

Capodici, J., Kariko, K., and Weisman, D. (2002). Inhibition of HIV-1 infection by small interfering RNA-mediated RNA interference. *J. Immunol.* **169**: 5196-5201.

Cara, A., Rybak, S.M., Newton, D.L., Crowley, R., Rottschaefer, S.E., Reitz, M.S., and Gusella, G.L. (1998). Inhibition of HIV-1 replication by combined

expression of gag dominant negative mutant and a human ribonuclease in a tightly controlled HIV- inducible vector. *Gene Ther.* **5**: 65-75.

Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.-L., Bousso, P., Le Deist, F. and Fischer, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669-672.

Chan, D.C., Fass, D., Berger, J.M. and Kim, P.S. (1997). Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein. *Cell* **89**: 263-273.

Chan, D.C., Chutkowski, C.T., and Kim, P.S. (1998). Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15613-15617.

Chan, D.C., and Kim, P.S. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell* **93**: 681-684.

Chen, Z., Luckay, A., Sodora, D.L., Telfer, P., Reed, P., Gettie, A., Kanu, J.M., Sadek, R.F., Yee, J., Ho, D.D., Zhang, L., and Marx, P.A. (1997). Human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) seroprevalence and characterization of a distinct HIV-2 genetic subtype from the natural range of simian immunodeficiency virus-infected sooty mangabeys. *J. Virol.* **71**: 3953-3960.

Chou, K.C., and Zhang, C.T. (1992). Diagrammatization of codon usage in 339 human immunodeficiency virus proteins and its biological implication. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **8**: 1967-1976.

Cohen, F. and Melikyan, G.B. (1998). Methodologies in the Study of Cell-Cell Fusion. *Methods Enzym.* **16**: 215-226.

Comoli, P., Dilloo, D., Hutchings, M., Hoffma, T., Heslop, H.E. (1996) Measuring gene-transfer efficiency. *Nat. Med.* **2**: 1280-1281.

Connolly, J.B. (2002). Lentiviruses in gene therapy clinical research. *Gene Ther.* **9**: 1730-1734.

De Clercq, E. (2002). New Anti-HIV agents and targets. *Med. Res. Rev.* **22**: 531-565.

De Clercq, E., Yamamoto, N., Pauwels, R., Baba, M., Schols, D., Nakashima, H., Balzarini, J., Debyser, Z., Murrer, B.A., Schwartz, D., Thornton, D., Bridger, G., Fricker, S., Henson, G., Abrams, M., and Picker, D. (1992). Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV)-1 and HIV-2 replication by a class of bicyclams interacting with a viral uncoating event. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5286-5290.

Dirks, W., Wirth, M. and Hauser, H. (1993). Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells. *Gene* **128**: 247-249.

Donello, J.E., Beeche, A.A., Smith III, G.J., Lucero, G.R. and Hope, T.J. (1996). The Hepatitis B Virus posttranscriptional regulatory element is composed of two subelements. *J. Virol.* **70**: 4345-4351.

Donzella, G.A., Schols, D., Lin, S.W., Este, J.A., Nagashima, K.A., Maddon, P.J., Allaway, G.P., Sakmar, T.P., Henson, G., De Clercq, E., and Moore, J.P. (1998). AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor. *Nat. Med.* **4**: 72-77.

Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R.J., Nguyen, M., Trono, D. and Naldini, L. (1998). A Third-Generation Lentivirus Vector with a Conditional Packaging System. *J. Virol.* **72**: 8463-8471.

Eckert, D.M., Malashkevich, V.N., Hong, L.H., Carr, P.A., and Kim, P.S. (1999). Inhibiting HIV-1 entry: discovery of D-peptide inhibitors that target gp41 coiled-coil pocket. *Cell* **99**: 103-115.

Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Melikyan, G., Kunert, R., Baum, C., Choi, I., Alexandrov, A., and von Laer D. (2004) Inhibition of HIV-1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* accepted.

Fackler, O.T., and Baur, A.S. (2002). Live and let die: Nef functions beyond HIV replication. *Immunity* **16**: 493-497.

Fackler, M.J., Krause, D.S., Smith, O.M., Civin, C.I. and May, W.S. (1995) Full length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation in M1 cells. *Blood* **85**: 3040-3047

Fehse, B., Richters, A., Putimtseva-Scharf, K., Klump, H., Zhixiong, L., Ostertag, W., Zander, A.R. and Baum, C. (2000). CD34 Splice Variant: An Attractive Marker for Selection of Gene-Modified Cells. *Mol. Ther.* **5**: 448-456

Fehse, B., Schade, U.M., Li, Z., Uhde, A., Koch, S., Goller, B., Rüger, R., Fehse, N., Stockschröder, M. and Zander, A.R. (1998). Highly-efficient gene transfer with retroviral vectors into human T lymphocytes on fibronectin. *Br. J. Haematol.* **102**: 566-574.

Furuta, R.A., Wild, C.T., Weng, Y. and Weiss, C.D. (1998). Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat. Struct. Biol.* **5**: 247-260.

Gallaher, W.R., Ball, J.M., Garry, R.F., Griffin, M.C., and Montelaro, R.C. (1989). A general model for the transmembrane proteins of HIV and other retroviruses. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **5**: 703-706.

Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M., and Trono, D. (1996). Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* **70**: 1027-1032.

Gallo, R.C., Salahuddin, S.Z., Popovic, M., Shearer, G.M., Kaplan, M., Haynes, B.F., Palker, T.J., Reifield, R., Oleske, J., Safai, B., et al. (1984).

Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* **224**: 500-503.

Gallo, S.A., Puri, A., and Blumenthal, R. (2001). HIV-1 gp41 six-helix bundle formation occurs rapidly after engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 Env-mediated fusion process. *Biochemistry* **16**: 12231-12236.

Galpin, J.E., Casciato, D.A., and Richards, S.B. (1994). A phase I clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (TAF) (HIV-1III Benv-transduced, autologous fibroblasts) in asymptomatic HIV-1 infected subjects. *Hum. Gene Ther.* **5**: 997-1017.

Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., Sharp, P.M., and Hahn, B.H. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature* **397**: 436-441.

Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., and Hahn B.H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVsm-related HIV-2 in west Africa. *Nature* **358**: 495-499.

Geleziunas, R., Xu, W., Takeda, K., Ichijo, H., and Greene, W.C. (2001). HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell. *Nature* **410**: 834-838.

Grzesiek, S., Stahl, S.J., Wingfield, P.T., and Bax, A. (1996). The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. *Biochemistry* **35**: 10256-10261.

Haas, J., Park, E.-C. and Seed, B. (1996). Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* **6**: 315-324.

Hamdan, F.F., Mousa, A. and Ribeiro, P. (2002). Codon optimization improves heterologous expression of *Schistosoma mansoni* cDNA in HEK293 cells. *Parasitol Res.* **88**: 583-586.

Hantzopoulos, P.A., Suric, C., Glass, D.J., Goldfarb, M.P. and Yancopoulos, G.D. (1994). The low affinity NGF receptor, p75, can collaborate with each of the Trks to potentiate functional responses to the neurotrophins. *Neuron.* **13**: 187-201.

He, J., Chen, Y., Farzan, M., Choe, H., Ohagen, A., Gartner, S., Busciglio, J., Yang, X., Hofmann, W., Newman, W., Mackay, C.R., Sodroski, J. and Gabuzda, D. (1997). CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature* **385**: 645-649

Hildinger, M., Fehse, B., Hegewisch-Becker, S., John, J., Rafferty J.R., Ostertag, W. and Baum, C. (1998). Dominant selection of hematopoietic

progenitor cells with retroviral MDR1 co-expression vectors. *Hum. Gene Ther.* **9**: 33-42.

Hildinger, M., Abel, K.L., Ostertag, W., and Baum, C. (1999). Design of 5'untranslated sequences in retroviral vectors developed for medical use. *J. Virol.* **73**: 4083-4089.

Hildinger, M., Dittmar, M.T., Schult-Dietrich, P., Fehse, B., Schnierle, B.S., Thaler, S., Stiegler, G., Welker, R. and von Laer, D. (2001). Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J. Virol.* **75**: 3038-3042.

Hinkula, J., Rosen, J., Sundqvist, V.A., Stigbrand, T. and Wahren, B. (1990). Epitope mapping of the HIV-1 gag region with monoclonal antibodies. *Mol. Immunol.* **27**: 395-403.

Holstein, A., Plaschke, A. and Egberts, E.H. (2001). Lipodystrophy and metabolic disorders as complication of antiretroviral therapy of HIV infection. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes* **109**: 389-392.

Hope, T.J. (1999) The Ins and Outs of HIV rev. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 186-191.

Huang Z.M. und Yen T.S. (1994). Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J. Virol.* **68**: 3193-3199.

Huang, Z.M. and Yen, T.S. (1995). Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3864-3869.

Hughson, F.M. (1997). Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr. Biol.* **7**: R565-569.

Inubushi, R., Shimano, R., Oshima Y. and Adachi, A. (1998). The potential of various HIV-1 mutants to inhibit the replication of wild-type virus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **247**: 349-352.

Jacobson, J.M., Lowy, I., Fletcher, C.V., O'Neill, T.J., Tran, D.N., Ketas, T.J., Trkola, A., Klotman, M.E., Maddon, P.J., Olson, W.C., and Israel, R.J. (2000). Single-dose safety, pharmacology and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J. Infect. Dis.* **182**: 326-329.

Ji, H., Shu, W., Burling, F.T., Jiang S. and Lu, M. (1999). Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infectivity by the gp41 Core: Role of a Conserved Hydrophobic Cavity in Membrane Fusion. *J. Virol.* **73**: 8578-8586.

Jin, B.S., Ryu, J.R., Ahn, K. and Yu, Y.G. (2000). Design of a peptide inhibitor that blocks the cell fusion mediated by glycoprotein 41 of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**: 1797-1804.

Junker, U., Moon, J.J., Kalfoglou, C.S., Sniecinski, I., Forman S.J., Zaia, J.A., Kaneshima, H. and Böhnlein, E. (1997). Hematopoietic potential and retroviral transduction of CD34⁺Thy-1⁺ peripheral blood stem cells from asymptomatic human immunodeficiency virus type-1-infected individuals mobilized with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **89**: 4299-4306.

Kilby, J.M., Hopkins, S., Venetta, T.M., Dimassimo, B., Cloud, G.A., Lee, J.Y., Alldredge, L., Hunter, E., Lambert, D., Bolognesi, D., Matthews, T., Johnson, M.R., Nowak, M.A., Shaw, G.M. and Saag, M.S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Med.* **4**: 1302-1307.

Kinsella, T.M. and Nolan, G.P. Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus (1996). *Hum. Gene Ther.* **7**: 1405-1413.

Klebba, C., Ottmann, O.G., Scherr, M., Pape, M., Engels, J.W., Grez, M., Hoelzer, D., and Klein, S.A. (2000). Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4⁺ T cells in vitro. *Gene Ther.* **7**: 408-416.

Kliger, Y., Gallo, S.A., Peisajovich, S.G., Munoz-Barroso, I., Avkin, S., Bluemthal, R. and Shai, Y. (2001). Mode of Action of an antiviral peptide from HIV-1 – inhibition at a post-lipid mixing stage. *J. Biol. Chem.* **276**: 1391-1397.

Knight, R.D., Freeland, S.J. and Landweber, L.F. (2001). A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biol.* **2**: 1-13.

Kohn, D.B. (2000). Clinical Protocol Transduction of CD34⁺ cells from the bone marrow of HIV-1-infected children: Comparative marking by an RRE decoy gene and a neutral gene. *Hum. Gene Ther.* **11**: 1577-1590.

Kolson, D.L., Collman, R., Hrin, R., Balliet, J.W., Laughlin, M., McGann, K.A., Debouck, C., and Gonzalez-Scarano, F. (1994). Human immunodeficiency virus type 1 Tat activity in human neuronal cells: uptake and trans-activation. *J. Gen. Virol.* **75**: 1927-1934.

Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I. and May, W.S. (1996). CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood* **87**: 1-13.

Kunert, R., Steinfellner, W., Purtscher, M., Assadian, A. and Katinger, H. (1999). Stable recombinant expression of the anti HIV-1 monoclonal antibody 2F5 after IgG3/IgG1 subclass switch in CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **67**: 97-103.

Kypr J. und Mrazek J. (1987) Unusual codon usage of HIV. *Nature* **327**: 20.

Labrosse, B., Brelot, A., Heveker, N., Sol, N., Schols, D., De Clercq, E., and Alizon M. (1998). Determinants for sensitivity of human immunodeficiency virus coreceptor CXCR4 to the bicyclam AMD3100. *J. Virol.* **72**: 6381-6388.

Lee, S.W., Gallardo, H.F., Gilboa, E. and Smith, C. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in human t-cells by a potent RRE-decoy comprised of the 13-nucleotide minimal rev-binding domain. *J. Virol.* **68**: 8254-8264.

Levy-Mintz, P., Duan, L., Zhang, H., Hu, B., Dornadula, G., Zhu, M., Kulkosky, J., Bizub-Bender, D., Skalka, A.M., and Pomerantz, R.J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* **70**: 8821-8832.

Lewis, P.F., and Emerman, M. (1994). Passage through mitosis is required for oncoviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* **68**: 510-516.

Li, Z., Duellmann, J., Schiedmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kuehlcke, K., Eckert, H.-G., Fehse, B. and Baum, C. (2002). Murine Leukemia Induced Retroviral Gene Marking. *Science* **296**: 497.

Lieber, A., Kay, M., and Li, Z.-Y. (2000). Nuclear import of moloney leukemia virus DNA mediated by adenovirus preterminal protein is not sufficient für efficient retroviral transduction in nondividing cells. *J. Virol.* **74**: 721-734.

Lu, M., Stoller, M.O., Wang, S., Liu, J., Fagan, M.B. and Nunberg, J.H. (2001). Structural and functional analysis of interhelical intractions in the human immunodeficiency virus type 1 gp41 envelope glycoprotein by alanine-scanning mutagenesis. *J. Virol.* **75**: 11146-11156.

Lusso, P., Cocchi, F., Balotta, C., Markham, P. D., Louie, A., Farci, P., Pal, R., Gallo, R. C. und Reitz, M.S., Jr. (1995). Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J. Virol.* **69**: 3712-3720.

Malim, M.H., Hauber, J., Fenrick, R. and Cullen, B.R. (1988). Immunodeficiency virus rev trans-activator modulates the expression of the viral regulatory genes. *Nature* **335**: 181-183.

Mavilio, F., Ferrari, G., Rossini, S., Nobili, N., Bonini, C., Casorati, G., Traversari, C., and Bordignon, C. (1994). Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* **83**:1988-1997.

Markosyan, R.M., Ma, X., Lu, M., Cohen, F.S. and Melikyan, G.B. (2002). The mechanism of inhibition of HIV-1 env-mediated cell-cell fusion by recombinant cores of gp41 ectodomain. *Virology* **302**: 174-184.

Melikyan, G.B., Markosyan, R.M., Hemmati, H., Delmedico, M.K., Lambert, D.M. and Cohen, F.S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* **151**: 413-423.

Mitsuyasu, R.T., Anton, P.A., Deeks, S.G., Scadden, D.T., Connick, E., Downs, M.T., Bakker, A., Roberts, M.R., June, C.H., Jalali, S., Lin, A.A., Pennathur-Das, R., and Hege, K.M. (2000). Prolonged survival and tissue trafficking following adoptive transfer of CD4 ζ gene-modified autologous CD4⁺ and CD8⁺ T cells in human immunodeficiency virus-infected subjects. *Blood* **96**: 785-793.

Morgan, R.A., Baler-Bitterlich, G., Ragheb, J.A., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., and Anderson, W.F. (1994). Further evaluation of soluble CD4 as an anti-HIV type 1 gene therapy: demonstration of protection of primary human peripheral blood lymphocytes from infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **10**: 1507-1515.

Morgan, R.A., Looney, D.J., Muenchau, D.D., Wong-Staal, F., Gallo, R.C., and Anderson, W.F. (1990). Retroviral vectors expressing soluble CD4: a potential gene therapy for AIDS. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **6**: 183-191.

Munoz-Barroso I., Salzwedel K., Hunter E. and Blumenthal R. (1999). Role of the membrane-proximal domain in the initial stages of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein-mediated membrane fusion. *J. Virol.* **73**: 6089-6092.

Muster, T., Steindl, F., Trkola, A., Klima, A., Himmler, G., Rucker, F., and Katinger, H. (1993). A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* **67**: 6642-6647.

Nakamura, Y., Komano, H., and Nakauchi, H. (1993). Two alternative forms of cDNA encoding CD34. *Exp. Hematol.* **21**: 236.

Naldini, L., Blömer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.

Numa, F., Hirabayashi, K., Tsunaga, N., Kato, H., O'Rourke, K., Shao, H., Stechmann-Lebakken, C., Varani, J., Rapraeger, A. and Dixit, V.M. (1995). Elevated levels of syndecan-1 expression confer potent serum-dependent growth in human 293T cells. *Cancer Res.* **55**: 4676-4680.

Patzel, V., and Sczakeil, G. (1997). The hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element contains a highly stable RNA secondary structure. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **231**: 864-867.

Peisajovich, S.G., Gallo, S.A., Blumenthal, R. and Shai, Y. (2003). C-terminal Octylation rescues an Inactive T20 mutant. *J. Biol. Chem.* **278**: 21012-21017.

Perelson, A.S., Essunger, P., Cao, Y., Vesanen, M., Hurley, A., Sakseka, K., Markowitz, M., and Ho, D.D. (1997). Decay characteristics of HIV-1 infected compartments during combination therapy. *Nature* **387**: 188-191.

Phillips, H.P. (1973). Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture: Methods and Applications*, Editors Kruse, P.F., Patterson, M.K. and Kennel, M.J., Academic Press, New York, 407-408.

Rimsky, L.T., Shugart, D.C. and Matthews, T.J. (1998). Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* **72**: 986-993.

Rizzuto, C., and Sodroski, J. (2000). Fine definition of a conserved CCR5-binding region on the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein gp120. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **16**: 741-749.

Roberts, M.R., Qin, L., Zhang, D., Smith, D.H., Tran, A.C., Dull, T.J., Groopman, J.E., Capon, D.J., Byrn, R.A., and Finer, M.H. (1994). Targeting of human immunodeficiency virus-infected cells by CD8+ T lymphocytes armed with universal T-cell receptors. *Blood* **84**: 2878-2889.

Rübsamen-Waigmann, H., Willems, W.R., Bertram, U. and von Briesen, H. (1989). Reversal of HIV-phenotype to fulminant replication on macrophages in perinatal transmission. *Lancet* **1155**-1156.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory manual*. Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.

Schambach, A., Wodrich, H., Hildinger, M., Bohne, J., Kraeusslich, H.G. and Baum, C. (2000). Context-dependence of different modules for post-transcriptional enhancement of gene expression from retroviral vectors. *Mol. Ther.* **2**: 435-445.

Schols, D., Struyf, S., van Damme, J., Este, J.A., Henson, G., and De Clercq, E. (1997). Inhibition of T-tropic strains by selective antagonization of the chemokine receptor CXCR4. *J. Exp. Med.* **186**: 1383-1388.

Schuurman, R., Nijhuis, M., van Leeuwen, R., Schipper, P., de Jong, D., Collis, P., Danner, S.A., Mulder, J., Loveday, C., Christopherson, et al. (1995). Rapid changes in human immunodeficiency virus type 1 RNA load and appearance of drug-resistant virus populations in persons treated with lamivudine (3TC). *J. Infect. Dis.* **171**: 1411-1419.

Schwartz, O., Marechal, V., Le Gall, S., Lemonnier, F., and Heard, J.M. (1996). Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat. Med.* **2**: 338-342.

Shaheen, F., Duan, L., Zhu, M., Bagasra, O., and Pomerantz, R.J. (1996). Targeting human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J. Virol.* **70**: 3392-3400.

Sharp P.M. (1986). What can AIDS virus codon usage tell us? *Nature* **324**: 114.

Smith III, G.J., Donello, J., Lück, R., Steger, G. and Hope, T.J. (1998). The hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element contains two conserved RNA stem-loops which are required for function. *Nucleic Acids Res.* **26**: 4818-4827.

Stitz, E., Buchholz, C.J., Engelstädter, M., Uckert, W., Bloemer, U., Schmitt, I. and Cichutek, K. (2000). Lentiviral vector pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Gibbon ape leukemia virus and murine leukemia virus 10A1. *Virology* **273**: 16-20.

Stripecke, R., del Carmen Villacres, M., Skelton, D.C., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D.B. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther.* **6**: 1305-1312.

Strizki, J.M., Xu, S., Wagner, N.E., Wojcik, L., Liu, J., Hou, Y., Endres, M., Palani, A., Shapiro, S., Claeder J.W., Greenlee, W.J., Tagat, J.R., McCombie, S., Cox, K., Fawzi, A.B., Chou, C.-C., Pugliese-Sivo, C., Davies, L., Moreno, M.E., Ho, D.D., Trkola, A., Stoddart, C.A., Moore, J.P., Reyes, G.R., and Baroudy, B.M. (2001). SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection *in vitro* and *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12718-12723.

Suda, J., Sudo, T., Ito, M., Ohno, M. Yamaguchi, Y., and Suda T. (1992). Two types of murine CD34 mRNA generated by alternative splicing. *Blood* **79**: 2288.

Sullenger, B.A., Gallardo, H.F., Ungers, G.E., and Gilboa, E. (1990). Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. *Cell* **63**: 601-608.

Tan., K., Liu, J.-H., Wang, J.-H., Shen, S. and Lu, M. (1997). Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12303-12308.

Thorner, A., and Rosenberg, E. (2003). Early versus delayed antiretroviral therapy with HIV infection: a review of the current guidelines from an immunological perspective. *Drugs* **63**: 1325-1327.

- Trkola, A., Ketas, T.J., Nagashima, K.A., Zhao, L., Cilliers, T., Morris, L., Moore, J.P., Maddon, P.J., and Olson, W.C. (2001). Potent, broad-spectrum inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by the CCR5 monoclonal antibody PRO 140. *J. Virol.* **75**: 579-588.
- Trono, D., Feinberg, M.B., and Baltimore, D. (1989). HIV Gag mutants can dominantly interfere with the replication of wild type virus. *Cell* **59**: 113-120.
- Vandendriessche, T., Chuah, M.K., Chiang, L., Chang, H.K., Ensoli, B., and Morgan, R.A. (1995). Inhibition of clinical human immunodeficiency virus (HIV) type 1 isolates in primary CD4+ T lymphocytes by retroviral vectors expressing anti-HIV genes. *J. Virol.* **69**: 4045-4052.
- Vocero-Akbani, A.M., Heyden, N.V., Lissy, N.A., Ratner, L., and Dowdy, S.F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat. Med.* **5**: 29-33.
- Von Laer, D. and Brandenburg, G. (2001). Gene therapy for HIV infection by 'intracellular immunization' with antiviral genes. *AIDS Rev.* **3**: 61-69.
- Von Laer, D., Hasselmann, S., and Hasselmann, K. Mathematical modeling of virus and T cells modified with HIV inhibitory genes. In preparation.
- Wada, K., Aota, S., Tsuchiya, R., Ishibashi, F., Gojobori, T. and Ikemura, T. (1990). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **18**: Suppl. 2367-411
- Wei, X., Decker, J., Liu, H., Zhang, Z., Arani, R.B., Kilby, J.M., Saag, M.S., Wu, X., Shaw, G.M. and Kappes, J.C. (2002). Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrobial Agents Chemother.* **46**: 1896-1905.
- Weiss, A., Wiskocil, R.L. and Stobo, J.D. (1984). The role of T3 surface molecules in the activation of human T-cells: A two-stimulus requirement for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J. Immunol.* **133**: 123-128.
- Weng, Y. and Weiss, C.D. (1998). Mutational analysis of residues in the coiled-coil domain of human immunodeficiency virus type 1 transmembrane protein. *J. Virol.* **72**: 9676-9682.
- Weng, Y., Yang, Z. and Weiss, C.D. (2000). Structure-function studies of the self assembly domain of the human immunodeficiency virus typ1 1 transmembrane protein gp41. *J. Virol.* **74**: 5268-5372.
- Wild, C., Oas, T., McDanal, C., Bolognesi, D. and Matthews, T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10537-10541.

Wild, C.T., Shugars, D.C., Greenwell, T.K., McDanal, C.B. and Matthews, T.J. (1994). Peptides corresponding to a predictive α -helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 9770-9774.

Woffendin, C., Yang, Z.Y., Udaykumar, Lu, X., Yang, N.S., Sheehy, M.J. and Nabel, G.J. (1994). Nonviral and viral delivery of a human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11581-11585.

Wyatt, R., Kwong, P.D., Desjardins, E., Sweet, R.W., Robinson, J., Hendrickson, W.A. and Sodroski, J.G. (1998). The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**: 705-711.

Wyatt, R. and Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens and immunogens. *Science* **280**: 1884-1888.

Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D. and Hope, T.J. (1999). Woodchuck Hepatitis B Virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* **73**: 2886-2892.

6. Abkürzungen

°	Grad
%	Prozent
A	Nukleotid Adenosin bzw. Ampere
Abb.	Abbildung
AIDS	<i>Acquired immunodeficiency syndrome</i>
Amp	Ampicillin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Nukleotid Cytosin
°C	Grad Celsius
C36	Konsensussequenz des T20 aus C-terminaler Heptadwiederholung
C46	Konsensussequenz des T20 und C34 aus C-terminaler Heptadwiederholung
CCR5	Membranrezeptor für CC-Chemokine (MIP-1 α)
CD	„ <i>Cluster of differentiation</i> “
CD4	Membranglykoprotein der Immunglobulinsuperfamilie
ca.	circa
CIP	Alkalische Phosphatase („ <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> “)
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalusvirus
CXCR4	Membranrezeptor für das CXC-Chemokin SDF-1
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuretriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Env	Hüllprotein (Envelope)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluoreszenaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G	Nukleotid Guanosin
g	Gravitationskonstante

gag	Gruppenspezifisches Antigen
GALV	<i>Gibbon ape leukemia virus</i>
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
gp41	41 kDa großes Transmembranglykoprotein von HIV-1
gp120	120 kDa großes peripheres Glykoprotein von HIV-1
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HR	Heptadwiederholung („ <i>heptad repeat</i> “)
Ig	Immunglobulin
IRES	Interne Ribosomen-Eintrittsstelle („ <i>internal ribosomal entry site</i> “)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LAV	<i>lymphadenopathy-associated virus</i>
LAS	Lipid-arretiertes Stadium
LB	Luria Bertani
LNGFR	<i>Low affinity nerval growth factor receptor</i>
LPC	L-Lysophatidylcholin
LTR	Lange terminale Wiederholungssequenz (<i>long terminal repeat</i>)
M	Molar
min	Minute
Mio	Millionen
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MLV	Maus-Leukämievirus
mM	Millimol
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	messenger RNA
MSD	Transmembrandomäne (<i>Membrane spanning domain</i>)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Nef	„ <i>negative factor</i> “ (HIV-Regulatorprotein)
ng	Nanogramm
ORF	Offener Leserahmen(<i>open reading frame</i>)
PBMC	Periphere mononukleare Zellen der Blutbahn
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)

PCR	Polymase-Kettenreaktion
PHA	Phytohämagglutinin
Pol	Polymerase
REV	<i>regulator of expression of virion proteins</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute Medium
RRE	<i>Rev-responsive element</i>
S	Signalpeptid von LNGFR
s	Sekunde
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIV	Simian Immundefizienzvirus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TAT	<i>Transactivator of transcription</i>
TAS	Temperatur-arretiertes Stadium
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Trishydroxyaminomethan
U	Enzymeinheit (<i>Units</i>)
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
VSV-G	<i>vesicular stomatitis virus glycoprotein G</i>
v/v	Verhältnisangabe Volumen zu Volumen (<i>volume per volume</i>)
w/v	Verhältnisangabe Gewicht zu Volumen (<i>weight per volume</i>)
WHO	World health organization

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Zahl der weltweiten Infektionen mit HIV.	4
Abb. 1.2:	Schematische Abbildung eines HIV-Partikels.	5
Abb. 1.3:	Der Replikationszyklus von HIV.	7
Abb. 1.4:	Struktureller Aufbau des gp41-Moleküls und Ableitung der inhibitorischen Peptide.	9
Abb. 1.5:	Modell der Membranfusion.	10
Abb. 1.6:	Architektur des retroviralen Vektors M87-Ineo.	19
Abb. 3.1:	Aufbau des retroviralen Vektors M87-Ineo.	45
Abb. 3.2:	Strategie zur Klonierung der Linker-Varianten.	48
Abb. 3.3:	Expression der verschiedenen Linkerkonstrukte.	50
Abb. 3.4:	Hemmung der HIV-Replikation durch Expression der verschiedenen Linkerkonstrukte in PM-1.	51
Abb. 3.5:	Strategie zur Klonierung des Konstruktes mit der tCD34-Transmembrandomäne.	53
Abb. 3.6:	Expression des C36-Peptids mit der Transmembrandomäne von Δ LNGFR (M87-Ineo) und tCD34 (M87/CD34-Ineo).	54
Abb. 3.7:	C36/T20-resistente HIV-Stämme besitzen im HR1 Mutationen des GIV-Motifs.	55
Abb. 3.8:	Strategie zur Klonierung des Vektors mit dem N-terminal verlängerten C46-Peptid.	56
Abb. 3.9:	Expression des C36-Peptides versus des verlängerten C46-Peptids.	57
Abb. 3.10:	Hemmung der HIV-Replikation durch Expression der verschiedenen C-Peptide.	58
Abb. 3.11:	Schematische Darstellung des 3-Plasmid-Systems zur Herstellung von pseudotypisierten lentiviralen Vektoren.	60
Abb. 3.12:	Infektion der Zelllinien PM-1 M87-Ineo und PM-1 M87/C46-Ineo im Vergleich zur Kontrolle PM-1 MP1-neo mit pseudotypisierten lentiviralen Vektoren.	60

Abb. 3.13: Strategie zur Klonierung des retroviralen Konstruktes mit allen optimierten Modulen	63
Abb. 3.14: Strategie zur Klonierung des Vektors M87o/MP1-Ineo mit dem optimierten Peptid sowie Adaption der Codon Usage.	64
Abb. 3.15: Expression des optimierten C-Peptides mit und ohne Codon Usage Optimierung im Vergleich zum Basiskonstrukt M87-Ineo.	65
Abb. 3.16: Strategie zur Klonierung der beiden Vektoren M87o und M87o- Δ PRE.	67
Abb. 3.17: Die retroviralen Vektoren M87o, M87o- Δ PRE und M87o/MP1.	68
Abb. 3.18: Expression des C46-Peptids mit optimiertem Leader und PRE im Vergleich zum MP1-Leader ohne PRE.	69
Abb. 3.19: Strategie zur Klonierung des Vektors M87o-RRE.	70
Abb. 3.20: Expression des inhibitorischen Peptids mit den beiden Vektoren M87o und M87o-RRE.	71
Abb. 3.21: Hemmung der HIV-Replikation mit M87o und M87o-RRE.	72
Abb. 3.22: Die beiden retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo.	73
Abb. 3.23: Expression des C-Peptides mit dem Basiskonstrukt M87-Ineo und dem optimierten Konstrukt M87o-RRE-Ineo.	74
Abb. 3.24: Hemmung der HIV-Replikation von HIV _{NL4-3} durch die retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo.	74
Abb. 3.25: Hemmung der HIV-Replikation von HIV _{D117-II} durch die retroviralen Vektoren M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo.	75
Abb. 3.26: Expression des optimierten Konstruktes mit bzw. ohne IRES-neo-Element.	76
Abb. 3.27: Zell-Zell-Fusionsexperimente unter dem Fluoreszenzmikroskop.	78
Abb. 3.28: Kinetik der Fusion der PM-1 Zellen MP1-neo, M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo.	79

Abb. 3.29:	Fusion von PM-1 MP1-neo nach Etablierung des TAS-Stadiums.	80
Abb. 3.30:	Fusion von MP1-neo, M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo nach Etablierung von TAS.	81
Abb. 3.31:	Schema zur Etablierung von LAS.	82
Abb. 3.32:	Kinetik der Fusion von PM-1 MP1-neo und PM-1 M87-Ineo nach Etablierung des Lipid-arretierten Stadiums (LAS).	82
Abb. 4.1:	Modell zur Wirkung des Linker-Austauschs.	86
Abb. 4.2:	Schema des HIV-Hüllproteins gp41.	90
Abb. 4.3:	Sequenz des Signalpeptids ohne sowie mit adaptierte Codon Usage.	93
Abb. 4.4:	Architektur des Leaderbereiches.	94
Abb. 4.5:	Architektur der beiden Konstrukte M87-Ineo und M87o-RRE-Ineo.	96
Abb. 4.6:	Der retrovirale Vektor M87o-RRE für die klinische Studie der Phase I.	99

8. Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Verwendete Kits in der Molekularbiologie.	21
Tab. 2.2:	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	22
Tab. 2.3:	Verwendete Oligonucleotide	23
Tab. 2.4:	Verwendete Enzyme und Hersteller	24
Tab. 2.5:	Verwendete Plasmide und Vektoren	25
Tab. 2.6:	Genotyp der verwendeten Bakterienstämme	26
Tab. 2.7:	Verwendete Zelllinien	27
Tab. 2.8:	Verwendete Laborgeräte	28
Tab. 3.1.:	Aminosäure-Sequenzen und Längen der verwendeten Linker sowie deren Konstruktnamen.	47
Tab. 3.2:	Verwendung der Codons bei hochexprimierten Genen, bei HIV-1 env, dem inhibitorischen Peptid ohne und mit Codon Usage-Optimierung.	62
Tab. 4.1:	Mittlere Fluoreszenzen der verschiedenen Linker-Konstrukte	85

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marc Andreas Egelhofer
Geburtsdaten: 26.3.1973 in Frankenthal/Pfalz
Adresse: Königslacherstrasse 48
60528 Frankfurt am Main
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1979 – 1983 Grundschule in Frankenthal/Pfalz
1983 – 1989 Albert-Einstein-Gymnasium Frankenthal/Pfalz,
Mittlere Reife
1989 – 1992 Gauß-Gymnasium Worms/Rhein, Abitur

Studium

1992 – 1998 Diplomstudiengang Chemie an der Technischen
Universität Darmstadt
1992 – 1995 Grundstudium mit Diplomvorprüfung
1995 – 1998 Hauptstudium mit Diplomarbeit im Institut f. Biochemie,
TU Darmstadt, Prof. A. Skerra: „Gentechnische
Herstellung von rekombinantem Annexin V in
Escherichia coli“
29.9.1998 Studienabschluss als Dipl. Ing. Chemie

Zivildienst

1998 – 1999 Zivildienst an „Landesanstalt f. Umweltschutz“ Karlsruhe

Promotion

Seit 09/2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter (Doktorand) am „Georg
Speyer Haus“, Arbeitsgruppe Frau Prof. Dr. D. von Laer

10. Publikationsliste

Wissenschaftliche Publikationen

- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Melikyan, G., Kunert, R., Baum, C., Choi, I., Alexandrov, A., and von Laer D. (2004). Inhibition of HIV-1 Entry in Cells Expressing gp41-derived peptides. *J. Virol.* angenommen.
- Martinius, H., Egelhofer, M., Herrmann, F., Brandenburg, G., Schult-Dietrich, P., and von Laer, D. Optimization of a retroviral vector for the gene therapy of HIV-infection. In Vorbereitung

Wissenschaftliche Vorträge

- Egelhofer M, Martinius H, Brandenburg G, Schult-Dietrich P, Thaler S, Schnierle BS, and von Laer D. (2001). Retroviral Vectors for Inhibition of HIV Entry and Replication. Oral presentation; 9th Annual Meeting of the European Society of Gene Therapy Antalya, 02.-04.11.2001.

Poster

- Egelhofer, M., Martinius, H., Brandenburg, G., Schult-Dietrich, P., Vorpahl, F., von Laer, D. (2002). Retroviral Vectors for Inhibition of HIV Entry and Replication. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Erlangen, 08.-11.04.2002.
- Egelhofer, M., Martinius, H., Brandenburg, G., Schult-Dietrich, P., Vorpahl, F., and von Laer, D. (2002). Retroviral vectors for inhibition of HIV entry and replication. Poster presentation; 14th International AIDS Conference, Barcelona, Spain, 07.-12.07.2002.
- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Hermann, F., Baum, C., Alexandrov, A., and von Laer, D. (2003). Development of a retroviral vector for protection of T cells from HIV infection. Poster presentation; Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie Berlin, 26.-29.03.2003.
- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Baum, C., Choi, I., Alexandrov, A., and von Laer, D. (2003). Entry Inhibition in Gene Therapy of HIV Infection. Poster presentation; 6th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, Washington, DC., USA, 04.-08.06.2003.