

Strategien zur Impfstoffentwicklung gegen das humane Immundefizienz Virus Typ 1 (HIV-1)

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Ursula Nack
aus Schäßburg

Frankfurt am Main, 2003

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

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	AIDS	1
1.2	Das humane Immundefizienz Virus Typ-1 (HIV-1)	3
1.2.1	Aufbau und Genomorganisation des HIV-1	3
1.2.2	Replikationszyklus der Lentiviren	5
1.2.2.1	Bindung und Fusion von HIV-1 an die Zielzelle	6
1.2.2.2	Reverse Transkription	7
1.2.2.3	Integration	9
1.2.2.4	Transkription und Translation	10
1.2.2.5	Virusassemblierung und Freisetzung	10
1.2.3	Spleißen	11
1.2.4	Akzessorische Gene	15
1.2.5	Aufbau und Funktion des HIV-1 Hüllglykoproteins	19
1.3	Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV-1	22
1.4	Aufgabenstellung der Dissertation	25

2 Material

2.1	Proteine	26
2.2	Zelllinien	26
2.3	HuCD4 ⁺ transgene Mäuse	28
2.4	Zellkulturreagentien	28
2.5	Plasmide	28
2.6	Primer	30
2.7	Chemikalien	30
2.8	Verbrauchsmaterialien	31
2.9	Geräte	32

3 Methoden

3.1	Allgemeine Methoden der Zellkultur	34
3.1.1	Oft benötigte Lösungen und Medienzusätze	34
3.1.2	Medien für die Zellkultivierung	35

3.1.3	Kultivierung eukaryotischer Zellen	35
3.1.4	Subkultivierung adhärent wachsender Zellen	35
3.1.5	Subkultivierung von Suspensionszellen	36
3.1.6	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	36
3.1.7	Steriltest auf Mycoplasmen	37
3.1.8	Kalzium-Phosphat-Transfektion	37
3.1.9	Superfect Transfektion	38
3.1.10	Transduktion mit retroviralen Vektoren	39
3.1.11	Spin-Filtration zur Anreicherung von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren	39
3.2	Allgemeine proteinchemische Methoden	40
3.2.1	Ansetzen oft benötigter Lösungen	40
3.2.2	Zellernte und Zellaufschluss	40
3.2.3	Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford	41
3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	42
3.2.5	Elektrotransfer	44
3.2.6	Immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	45
3.2.7	Strippen von Nitrozellulosemembranen	46
3.2.8	Aufreinigung von retroviralen Partikeln durch Ultrazentrifugation	47
3.2.9	Durchflusszytometrie (FACS)	48
3.2.10	X-Gal-Färbung	49
3.2.11	Neutralisierungsassay	50
3.2.11.1	Sammeln der CD4-gp120 Fusionsproteine	50
3.2.11.2	Anlegen eines Vorrats an MLV/HIV-1 Vektorpartikeln	50
3.2.11.3	β-Galactosidase-Assay	51
3.3	Gentechnische Methoden	53
3.3.1	Ansetzen oft benötigter Lösungen	53
3.3.2	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	53
3.3.3	Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen	54
3.3.4	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	54
3.3.5	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> in präparativen Maßstab nach Qiagen	55
3.3.6	Plasmidisolierung im analytischen Maßstab	56
3.3.7	Konzentrationsbestimmung von DNA	57
3.3.8	Restriktion von DNA mit Endonucleasen	57
3.3.9	Agarosegelelektrophorese	58
3.3.10	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	58
3.3.11	Ligation von DNA-Fragmenten	59
3.3.12	Polymerasekettenreaktion	59

3.3.13	Isolierung von DNA aus Zellkulturen	60
3.3.14	Isolierung von RNA aus Zellkulturen	61
3.3.15	Konzentrationsbestimmung von RNA	62
3.3.16	Northern Blot	62
3.3.16.1	Herstellung von DEPC-Wasser	62
3.3.16.2	Agarosegelelektrophorese mit RNA	63
3.3.16.3	RNA-Transfer	64
3.3.16.4	Sonden	65
3.3.16.5	Hybridisierung	65
3.3.16.6	Strippen	67
3.4	Spezielle gentechnische Methoden	68
3.4.1	Endotoxinfreie Mega-Plasmidpräparation für die DNA-Vakzinierung	68
3.4.2	DNA-Vakzinierung	68
3.4.3	Gewinnung von Serum aus Vollblut	69
4	Ergebnisse	
4.1	Expression und Charakterisierung von gp120-CD4 Rezeptor-Fusionsproteinen zur Generierung neutralisierender Antikörper gegen HIV-1	70
4.1.1	Konstruktion der gp120-CD4 Fusionsproteine	70
4.1.2	Überprüfung der gp120-CD4 Fusionsproteine im Immunoblot	73
4.1.3	Etablierung des Neutralisierungsassays	74
4.1.4	Test der Fusionsproteine im Neutralisierungsassay	76
4.2	DNA-Vakzinierung transgener huCD4⁺ Mäuse mit dem CD4.d4-gp120-Fusionsprotein	78
4.2.1	Nachweis von Antikörpern gegen gp120 im Serum huCD4 ⁺ Mäuse	79
4.2.2	Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Serum huCD4 ⁺ Mäuse	80
4.3	Immunisierung transgener huCD4⁺ Mäuse mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln	82
4.3.1	Immunoblot zur Überprüfung HIV-1 gp120 gerichteter Antikörper	83
4.3.2	Neutralisierungsassay zur Untersuchung neutralisierender Antikörper im Serum immunisierter huCD4 ⁺ Mäuse	83
4.3.3	Nachweis von β -Galactosidase-Antikörpern im Serum immunisierter huCD4 ⁺ Mäuse	84
4.4	Konstruktion und Charakterisierung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}	86
4.4.1	Vergleich zweier Plasmide zur Expression des HIV-1 Hüllglykoproteins	86

4.4.2	Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s}	89
4.4.3	HIV-1 Hüllproteinexpression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s}	91
4.4.4	Veränderung der Promotoraktivität durch akzessorische Gene	92
4.4.5	Untersuchung der Infektiosität des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s}	94
4.4.6	Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s}	96
4.4.6.1	Northern Blot Analyse zur Kinetik der Replikation von MLV in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen	96
4.4.6.2	Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s}	97
4.5	Produktion semi-replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren	99
4.5.1	Charakterisierung des verpackbaren MLV gag/pol Expressionsvektors	99
4.5.2	HIV-1 Hüllprotein Expression verschiedener verpackbarer HIV-1 env Konstrukte	100
4.5.3	Kombination der MLV gag/pol verpackenden Vektorpartikel mit HIV-1 env verpackenden Vektorpartikeln	106
4.5.3.1	Direkte Transfektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit MLV gag/pol und HIV-1 env verpackenden Vektorpartikeln	106
4.5.3.2	Generierung von MLV gag/pol oder hiv-1 env verpackenden Verpackungszelllinien	109
4.6	Charakterisierung der MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukte pkAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE	112
4.6.1	Konstruktion der MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukte pkAHIV89.6P und pUCX/C _{7s} WPRE	112
4.6.1.1	Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pkAHIV89.6P	113
4.6.1.2	Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C _{7s} WPRE	114
4.6.2	Ausschluss der Expression des akzessorischen Elementes rev in MLV/HIV-1 Pseudotypviren	115
4.6.3	Nachweis der MLV/HIV-1 Pseudotypviruspartikel mittels Ultrazentrifugation	117
4.6.4	Versuch zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren	119
4.6.4.1	Infektion von NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren	119
4.6.4.2	Synzytienbildung der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen	121
4.6.4.3	Bestimmung der Titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren	123
4.6.4.4	Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen	125
4.6.5	Northern Blot Analyse der MLV/HIV-1 Pseudotypviren	126
4.6.6	Nachweis der spezifischen rezeptorgebundenen Infektion	128

4.6.7	Ausschluss von Rekombination der MLV/HIV-1 Pseudotypviren mit MLV	129
4.6.8	Rescue Versuch	130
5	Diskussion	
5.1	gp120-CD4 Fusionsproteine als Immunogen	134
5.2	MLV/HIV-1 Vektorpartikel als Immunogen	138
5.3	Replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren als Immunogen	139
5.4	Optimierung der MLV/HIV-1 Pseudotypviren	141
5.5	Interpretation der Ergebnisse	147
5.6	Ausblick	150
6	Zusammenfassung	151

1 Einleitung

1.1 AIDS

Die erworbene Immunschwäche AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) entsteht nach Infektion mit dem humanen Immundefizienz Virus (HIV). Die Übertragung der Viren erfolgt über kontaminiertes Blut, zum Beispiel bei Transfusionen oder kontaminierte Injektionsnadeln sowie durch kontaminierte Blutprodukte. Weiterhin wird HIV über Samen- oder Vaginalflüssigkeit bei homo- und heterosexuellen Sexualkontakten übertragen. Bekannt sind auch Übertragungen beim Geburtsvorgang oder über die Muttermilch.

Die Ausbreitung von AIDS erlangt bis in die heutige Zeit pandemische Ausmaße. Den Angaben der WHO (world health organisation) zufolge beläuft sich die Zahl der AIDS-Infizierten im Jahr 2002 auf weltweit 42 Millionen. Die Zahl der Neuinfektionen im vergangenen Jahr beträgt 5 Millionen, davon betroffen sind 800.000 Kinder unter 15 Jahren. Im Jahr 2002 starben bislang 3,1 Millionen Menschen an AIDS (WHO, Dezember 2002).

Die HIV-1 Infektion lässt sich in fünf Stadien unterteilen (Modrow und Falke, 1997):

1. Primäre Infektion mit grippe- oder mononucleoseähnlichen Symptomen, einhergehend mit Lymphknotenschwellungen. Entwicklung einer deutlichen Virämie bis zum Auftreten erster Antikörper.
2. Symptomfreies Latenzstadium, klinisch unauffällig, minimale Virämie und voll ausgebildete HIV-spezifische Antikörper. Diese Phase kann mehrere Jahre andauern und zu einer dauernden Trägerschaft (long-term nonprogressors) führen (Harrer et al., 1996).
3. Lymphadenopathie, gekennzeichnet durch eine mehr als drei Monate andauernde Vergrößerung von mindestens zwei peripheren Lymphknoten. Mehrere Wochen oder Jahre andauerndes Stadium.
4. AIDS-related-complex ist einhergehend mit Fieber, Nachtschweiß, Gewichtsverlust und ersten opportunistischen Infektionen. Die Zahl der CD4-positiven Zellen kann auf unter 400/µl Blut absinken.
5. Vollbild AIDS wird beobachtet bei einem Abfall der CD4 positiven T-Lymphozyten unter 200/µl Blut. Charakteristisch sind sich wiederholende Infekte mit opportunistischen Erregern und das Auftreten von malignen Tumoren, denen die Patienten erliegen.

Die Pathogenese beginnt mit der primären Infektion von CD4-exprimierenden Zellen des lymphatischen Systems. In dieser frühen Phase werden insbesondere Langerhans-Zellen in der Haut sowie Makrophagen infiziert. Erstere transportieren das Virus in die Lymphknoten, wo die rapide Virusvermehrung in T-Lymphozyten erfolgt. Gleichzeitig wird jedoch die humorale und zellvermittelte Immunantwort induziert, so dass die Replikation des Retrovirus zunächst in Schach gehalten wird. In der symptomatischen Phase kann das Immunsystem die Virusabwehr nicht mehr kontrollieren. Aufgrund hoher Mutationsraten des HIV werden kontinuierlich neue Epitope gebildet, die es dem Virus erlauben, der humoralen und zellulären Immunantwort zu entgehen. Weiterhin verändert HIV seinen Zelltropismus von der Infektion der Makrophagen (M-trop) hin zur Infektion der T-Lymphozyten (T-trop). Dabei verändern sich die Replikationseigenschaften des Virus im Sinne einer schnelleren Vermehrung mit höheren Titern. Außerdem erfolgt die zytolytische Zerstörung der Lymphozyten durch Synzytienbildung (SI, syncytium induction) und die Induktion apoptotischer Prozesse in benachbarten Zellen. Während des Infektionsverlaufs werden kontinuierlich mehr CD4-positive Zellen zerstört als nachgebildet werden (Gottlieb *et al.*, 1981). Dies hat zur Folge, dass das Immunsystem immer weniger in der Lage ist, die HIV-Replikation oder andere opportunistische Infektionen zu kontrollieren.

In den letzten Jahren hat es entscheidende Fortschritte im Verständnis der HIV-Infektion und deren Behandlung gegeben. Die antiretrovirale Kombinationstherapie (HAART) zielt auf den gleichzeitigen Einsatz verschiedener therapeutischer Substanzen, die unterschiedliche Wirkgruppen beinhalten, um Resistenzentwicklung des HI-Virus zu vermeiden. Die Hemmung der Virusreplikation durch diese Pharmazeutika wird am Ausmaß der Absenkung der Viruslast und dem Anstieg der CD4-positiven Zellen im Blut bestimmt. Mit Hilfe der Kombinationstherapie kann die Morbiditäts- und Mortalitätsrate bei HIV-Infizierten gesenkt werden. Eine Heilung ist jedoch nicht möglich, da das Virus durch die Behandlung nicht vollständig eliminiert werden kann und daneben in einem latenten Zustand persistieren kann. Eine Unterbrechung der Chemotherapie führt zu einem Anstieg der Viruslast, während die Dauerbehandlung zu resistenten Virusstämmen führen kann (Richman *et al.*, 2001). Die Entwicklung eines Impfstoffs wird dringend erforderlich, da wegen der hohen Kosten und einer lebenslangen Therapie mit starken Nebenwirkungen sowie wegen der Resistenzentwicklung der HIV-Stämme eine medikamentöse Behandlung auf Dauer keine Lösung darstellt.

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

Anfang der achtziger Jahre entdeckten Luc Montagnier am Pasteur-Institut in Paris und Robert Gallo am National Institut of Health in Bethesda das humane Immundefizienz Virus HIV-1 als Erreger der erworbenen Immunschwäche AIDS. Das HI-Virus gehört zur Familie der Retroviren, die sich in die Unterfamilien Onkoviren, Lentiviren und Spumaviren einteilt. In der Gruppe der Lentiviren finden sich die Immundefizienzviren, während beispielsweise das Murine Leukämie Virus (MLV) zu den Onkoviren zählt.

Aufgrund von Sequenzanalysen kann man HIV in drei Typen unterteilen: HIV-1 (weltweite Verbreitung), HIV-2 (Afrika) und HIV-0 (Kamerun). Bei HIV-1 werden die Subtypen A-H unterschieden. Im Folgenden werden der Aufbau der Viruspartikel, die Genomorganisation und der Replikationszyklus des HIV-1 beschrieben. Genauere Beschreibungen finden sich zum komplexen Spleißen des HIV-1, zu den akzessorischen Elementen und zum Hüllglykoprotein.

1.2.1 Aufbau und Genomorganisation des HIV-1

Die HIV-1 Viruspartikel besitzen einen Durchmesser von etwa 100 nm. Immundefizienzviren gehören zu den umhüllten RNA Viren, das heißt, dass deren Kapsid von einer Hüllmembran umgeben ist (Abbildung 1). Die Hüllmembran leitet sich von der zellulären Zytoplasmamembran ab und enthält mit ihr assoziierte Glykoproteine. Die Hüllglykoproteine (Env Proteine) werden als Vorläuferprotein gp160 gebildet und in die Oberflächenkomponente gp120 und den transmembranen Teil gp41 prozessiert. Die Prozessierung in die beiden Untereinheiten erfolgt über eine mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und dem Golgi Apparat assoziierte Furin-Protease. Beide Komponenten sind über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander verbunden. Die Matrixproteine (p17) sind mit der Innenseite der Hüllmembran verbunden. Im Partikelinnern findet sich das Kapsid, das aus Kapsidproteinen (p24) besteht. Matrixproteine sowie Kapsidproteine gehören zu den Gag-Strukturproteinen. Das Kapsid enthält zwei identische einzelsträngige RNA-Moleküle als Virusgenom, die zusammen mit den Nukleokapsidproteinen (p7) einen Komplex bilden. Im Inneren des Kapsids liegen die Enzyme des Viruspartikels: die Reverse Transkriptase, die Integrase und die Protease. Sie werden von den Pol-Strukturgenen kodiert. Die Protease schneidet während der Virusreifung das Gag/Pol Fusionsprotein in seine Bestandteile. Die Reverse Transkriptase vereinigt die Funktionen einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase und einer RNase (Modrow und Falke, 1997).

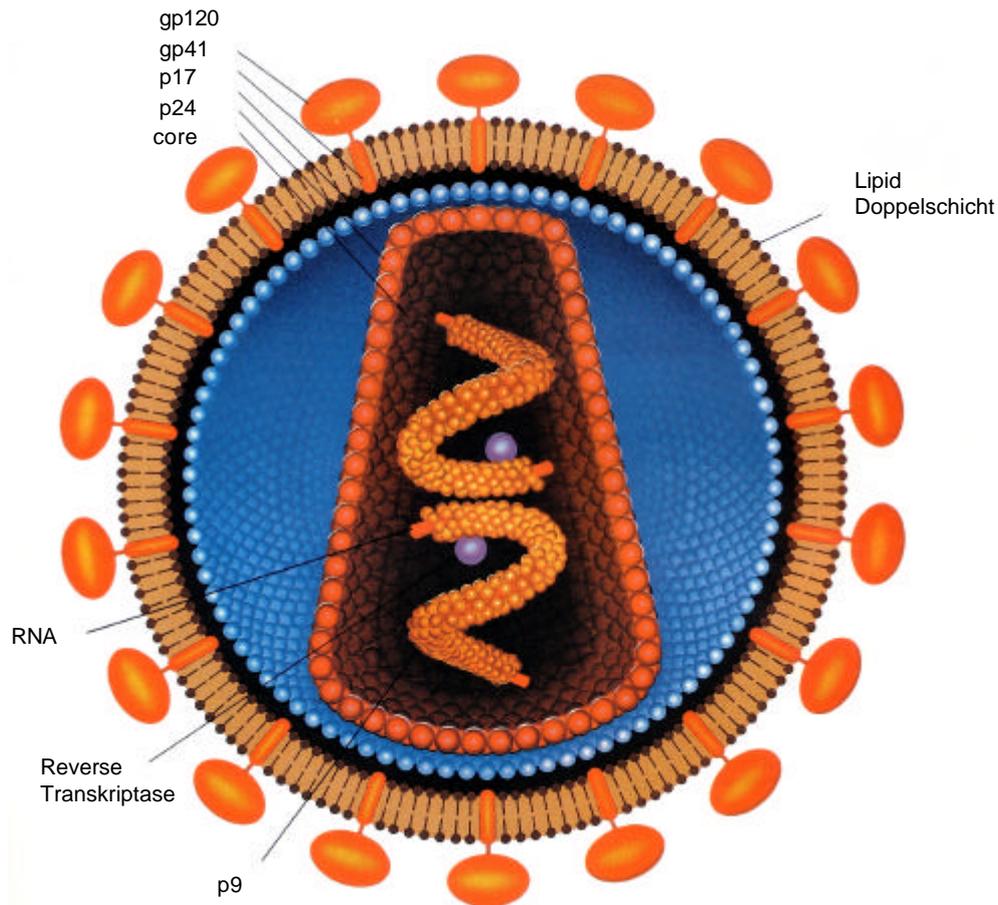


Abbildung 1: Aufbau des HIV Viruspartikels. Gp120 und gp41, Hüllglykoprotein-Untereinheiten; p17, Matrixprotein; p24, Kapsidprotein; „core“, Kapsid; p9, Nukleokapsidprotein; zusätzlich im Kapsid enthalten sind neben Reverser Transkriptase die Integrase und Protease (hier nicht gezeigt) (nach Lodish, Baltimore und Darnell, 1995).

Das HI-Virus gehört wegen seiner Genomorganisation zu den komplexen Retroviren (Abbildung 2). Das Genom besteht aus zwei identischen einzelsträngigen RNA-Molekülen. Diese weisen alle Charakteristika eukaryotischer mRNA auf: Am 5`-Ende befindet sich eine 5`-Cap-Struktur und das 3`-Ende wird polyadenyliert. Die virale RNA kodiert neben den Strukturproteinen Gag, Pol und Env auch sechs zusätzliche Gene, die sogenannten akzessorischen Gene, die zum Teil regulatorische Funktionen ausüben. Sie bestehen häufig aus mehreren Exons, die mit anderen Genen überlappen und werden von mehrfach gespleißten mRNAs translatiert. Die kodierenden Regionen werden am 5`- und 3`-Ende von den Promotorsequenzen flankiert (LTR, long terminal repeats). Zwischen dem 5`-LTR und den gag Genen befindet sich das Verpackungssignal Ψ , das dafür sorgt, dass die genomische RNA in die Viruspartikel verpackt wird.

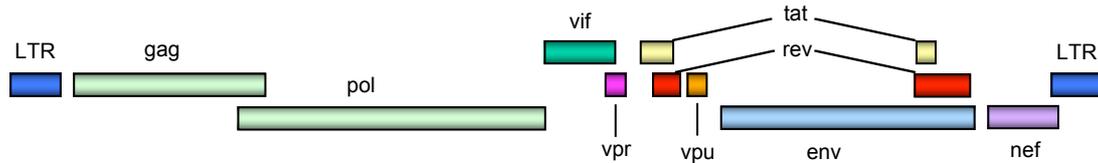


Abbildung 2: Komplexe Genomorganisation des humanen Immundefizienz Virus (HIV-1).

1.2.2 Replikationszyklus der Lentiviren

Der Replikationszyklus von HIV-1 ist in verschiedene Phasen unterteilt. Er beginnt mit dem Anheften des viralen Hüllglykoproteins an zwei spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die Wechselwirkungen der Rezeptoren mit Teilen des Hüllglykoproteins haben die Verschmelzung der Virushülle mit der Zellmembran und den Eintritt des viralen Kapsids zur Folge. Die nachstehende Reversen Transkription erzeugt eine doppelsträngige DNA-Kopie des RNA-Genoms. Diese Kopie wandert in den Zellkern und integriert dort in die chromosomale DNA. Das entstandene Provirus wird dann durch die RNA-Polymerase II transkribiert. Die Transkription erzeugt ungespleißte und gespleißte mRNAs sowie genomische RNA Moleküle, die in neue Virionen verpackt werden. Die Translation der mRNAs erfolgt im Zytoplasma. Die viralen Proteine sammeln sich zusammen mit der genomischen RNA an der Zellperipherie und der Plasmamembran, um nach dem Zusammenbau der unreifen Nachkommenviren durch Ausknospung (engl.: budding) freigesetzt zu werden. Infektiöse Viruspartikel entstehen nach Abschluss der Reifung (Coffin, Hughes und Varmus, 1997). Ein schematischer Ablauf der Virusreplikation ist in Abbildung 3 dargestellt. Die einzelnen Phasen des lentiviralen Replikationszyklus werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

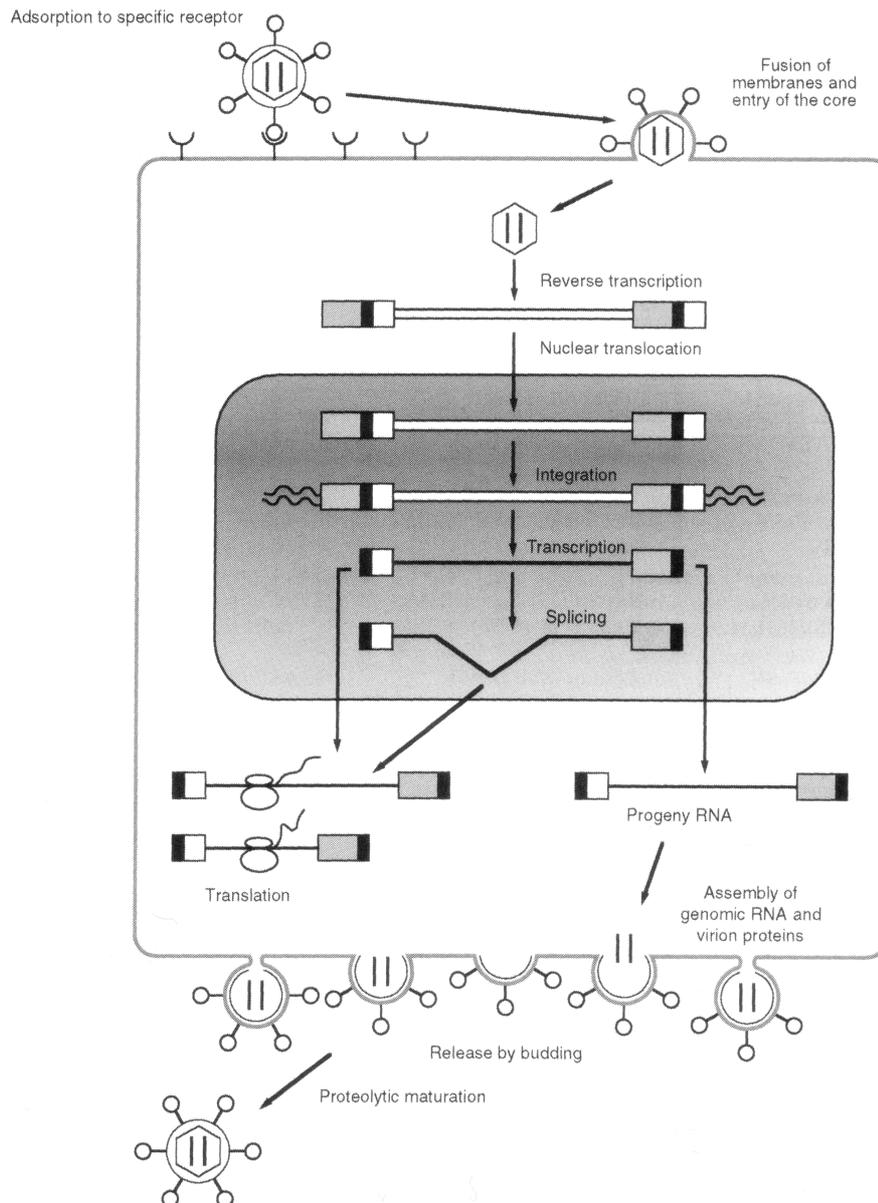


Abbildung 3: Lentiviraler Replikationszyklus (aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

1.2.2.1 Bindung und Fusion von HIV-1 an die Zielzelle

Der Wirtstropismus eines Virus wird über den Rezeptor auf der Zielzelle und das virale Hüllglykoprotein speziell bestimmt. Als Rezeptor für das HIV-1 wurde der zur Immunglobulinsuperfamilie gehörende CD4 Rezeptor entdeckt (Klatzmann *et al.*, 1984). CD4 ist als Marker reifer T-Lymphozyten bekannt, spielt eine bedeutende Rolle bei der Immunantwort sowie der T-Zell-Aktivierung. Die Expression dieses Rezeptors ist vorwiegend auf T-Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten beschränkt.

Der CD4 Rezeptor allein ist nicht ausreichend für eine Infektion mit HIV-1. Die Interaktion mit einem Korezeptor macht den Tropismus komplett aus. Primäre HIV-1 Isolate infizieren vor

allem Makrophagen über den CCR5 Korezeptor (CCR-Chemokinrezeptor). Man nennt sie deshalb M-trope HIV-Stämme. Neben CCR5 kann die HIV-Infektion auch über andere CCR-Chemokinrezeptoren verlaufen, beispielsweise über CCR3. Erfolgt die Infektion hauptsächlich über den CXCR4 Korezeptor (CXC-Chemokinrezeptor) auf T-Zellen, so werden diese Isolate als T-trop bezeichnet. Daneben gibt es dualotrope HIV-Isolate, die sowohl CCR5 als auch CXCR4 tragende Zielzellen infizieren können.

Das native HIV Hüllglykoprotein besteht aus drei gp120-gp41 Heterodimeren. Die Interaktion von HIV-1 Hüllglykoprotein gp120 mit dem CD4 Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung im Hüllprotein und zur Freilegung oder zur Bildung einer Bindungsstelle für den Korezeptor (Rizzuto *et al.*, 1998). Diese Veränderungen des gp120, das aus fünf variablen Regionen (V1 - V5) und fünf konstanten Bereichen (C1 - C5) besteht, involvieren eine Bewegung der V1 - V2 Domänen fort von der Korezeptorbindungsstelle, während die V3 Domäne in Richtung der Bindungsstelle rückt (Wyatt *et al.*, 1995). Die Bindung des Korezeptors an gp120 resultiert in weiteren Konformationsänderungen, die zu einer Aktivierung von gp41 in seinen fusionsaktiven Status führen. Im Einzelnen sind die N- und C-terminalen Leuzin/Isoleuzin Wiederholungssequenzen (HR, leucine/isoleucine heptad segment) im gp41 dafür verantwortlich. Eine von HR1 gebildete Sekundärstruktur mit konservierten Taschen induziert die antiparallele Assoziation von HR2, so dass aufgrund der trimeren Konformation des Hüllproteins das sogenannte „six-helix bundle“ entsteht (Gallo *et al.*, 2001). Dabei wird das hydrophobe Fusionspeptid, welches sich am N-Terminus befindet in Richtung des C-Terminus verschoben und in die Nähe der transmembranen Domäne des gp41 gebracht. Die Membran des Virus und der Zielzelle kommen in dichten Kontakt zueinander und eine Pore wird ausgebildet. Die Arbeitsgruppe um Fredric Cohen konnte zeigen, dass der Fusionsprozess durch die Bildung des „six-helix bundle“ stattfindet und nicht aufgrund der Anwesenheit dieser Sekundärstruktur selbst abläuft (Melikyan *et al.*, 2000). Die konformationellen Veränderungen im gp41 setzen Energie frei, die sofort für die Bildung der Pore verbraucht wird. Die Fusion resultiert in der Entlassung des Viruskapsids in das Zytoplasma der Zielzelle.

1.2.2.2 Reverse Transkription

Die Integration des viralen Genoms in die Chromosomen erfordert das Umschreiben der einzelsträngigen RNA in doppelsträngige DNA. Diese Aufgabe wird bei Retroviren von dem Enzym Reverse Transkriptase erfüllt. Dabei sind zwei Aktivitäten des Enzyms besonders wichtig: Die DNA-Polymerase-Aktivität kann sowohl RNA als auch DNA als Matrize benutzen, während die Aktivität der RNaseH als Nuklease arbeitet, die speziell RNA abbaut. Die einzelnen Schritte der Reversen Transkription stellt Abbildung 4 dar.

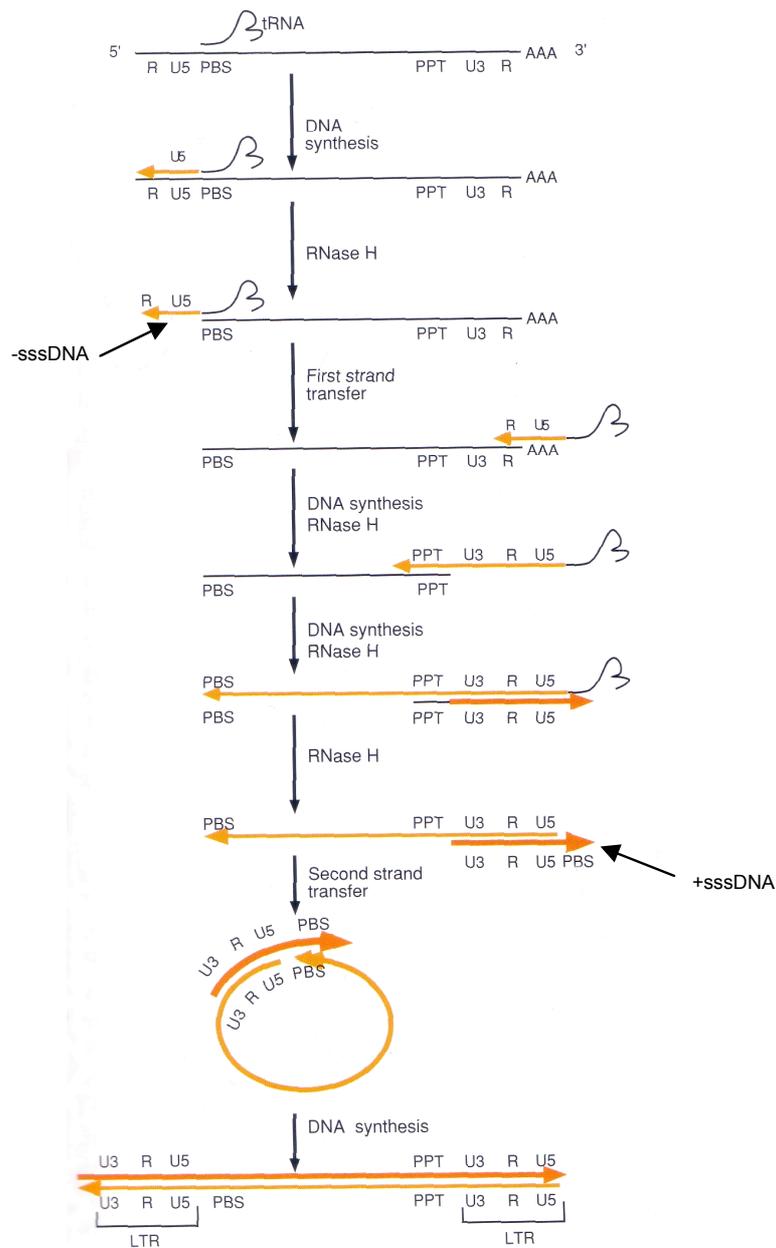


Abbildung 4: Reverse Transkription (aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

Die Minusstrang-DNA-Synthese beginnt mit dem Binden einer Transfer-RNA (tRNA) als Primer an die 3`-Primer-Bindungsstelle (PBS) der genomischen RNA. Die DNA-Synthese endet am 5`-Ende des viralen RNA-Genoms. Die generierte DNA ist nur 100-150 bp lang und wird auch als Minusstrang „strong stop“ DNA (-sssDNA) bezeichnet. Unter Einsatz der RNaseH findet der Abbau der RNA des Hybridstücks aus RNA und -sssDNA statt, so dass sich die verbleibende -sssDNA am 3`-Ende der genomischen RNA als Primer anheften kann. Die genaue Bindung erfolgt an der komplementären R-Region, die sich an beiden Enden befindet. Diesen Schritt nennt man Erststrang-Transfer. Der Abschluss der Minusstrang-

DNA-Synthese findet gleichzeitig mit der Degradation der RNA-Matrize statt. Dennoch bleibt ein kleines Fragment der RNA übrig, der RNaseH resistente Polypurintrakt (PPT), welcher als Primer für die Synthese des Gegenstranges dient. Ausgehend von PPT wird zunächst die Plusstrang „strong stop“ DNA (+sssDNA) generiert. Die RNaseH Aktivität der Reversen Transkriptase entfernt den tRNA Primer und das PPT-Fragment. Im Zweitstrang-Transfer kommt es zum Anfügen der komplementären Primer-Bindungsstellen der +sssDNA und der Minusstrang-DNA. Die Plusstrang- und Minusstrang-DNA-Synthese wird nun vervollständigt, indem jeder Strang als Matrize für den anderen Strang dient (Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

1.2.2.3 Integration

Das retrovirale Genom ist nicht in der Lage selbstständig zu replizieren, deshalb ist es auf die Reproduktionsmechanismen der Wirtszelle angewiesen. Die Integration ist für eine effiziente Transkription der viralen DNA in kodierende mRNAs essentiell. Einmal integriert, erfolgt die Übertragung der Provirus-DNA auf alle Nachkommen der infizierten Zelle, da die virale DNA als ein Element des Wirtsgenoms behandelt wird. Die Integration der Provirus-DNA schützt ferner vor Degradation (Barbosa *et al.*, 1994).

In vivo erfolgt die retrovirale Integration mit Hilfe des sogenannten Präintegrationskomplexes (PIC, preintegration complex). Im Gegensatz zu den meisten Retroviren, die nur in sich teilende Zellen integrieren können und die Auflösung der Kernmembran benötigen, wird der lentivirale PIC während der Interphase aktiv in den Nukleus transportiert (Bukrinsky *et al.*, 1992; Roe *et al.*, 1993). Der HIV-1 Präintegrationskomplex beinhaltet die virale DNA und eine Reihe viraler Proteine: das Matrixprotein p17, die Reverse Transkriptase, die Integrase und das akzessorische Protein Vpr (Miller *et al.*, 1997). Kapsidproteine und Nukleokapsidproteine sind nicht enthalten. Der Kernimport wird über NLS-Sequenzen (nuclear localization sequences) des Matrixproteins und der Integrase vermittelt. Das Vpr Protein erleichtert die Infektion nicht-teilender Zellen, indem es die Kerntranslokation des PIC erhöht (Subbramanian *et al.*, 1998). Nach abgeschlossener DNA-Synthese eliminiert die Integrase zwei Nukleotide am 3`-Ende der viralen DNA. Die resultierende 3`-OH-Gruppe stellt die Bindungsstelle der chromosomalen DNA dar und definiert das Ende des integrierten Provirus. Im Nukleus schneidet die Integrase die zelluläre DNA an willkürlichen Stellen. Hierbei entstehen an gegenüberliegenden Strängen 5`-überhängende Enden, die mit den 3`-Enden der Provirus-DNA verbunden werden. Verbleibende virale 5`-überhängende Enden werden entfernt, einzelsträngige Übergänge werden durch das zelluläre Reparatursystem aufgefüllt und mit Hilfe der Ligase geschlossen. Nach abgeschlossener Integration kann mit der Transkription der viralen Gene gestartet werden (Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

1.2.2.4 Transkription und Translation

Die RNA-Polymerase II transkribiert die integrierte Provirus-DNA mit Hilfe verschiedener zellulärer Faktoren. Bei HIV-1 ist NF κ B solch ein Protein. Steigt die Konzentration von NF κ B an, so findet ein geringes Ausmaß an Transkription statt, so dass die Transkripte nicht vollständig sind. Gelegentlich erreicht ein Transkript dennoch seine volle Länge, wird gespleißt und wird in Zytoplasma in das Tat-Protein translatiert. Dieses regulatorische Protein steigert die Transkriptionsrate hundertfach, indem es in den Nukleus zurückkehrt, sich an die TAR-Elemente bindet, so die Transkripte stabilisiert und deren Elongation ermöglicht. Das regulatorische Protein Rev liegt ebenfalls in der frühen Phase der Transkription vor. Nach seiner Translation wandert es in den Nukleus zurück und bindet an die RRE-Sequenz von ungespleißter und einfach gespleißter mRNA. Rev ermöglicht den Export dieser Transkripte aus dem Nukleus in das Zytoplasma.

Die Translation der Hüllglykoproteine erfolgt an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Polypeptid wird durch die Membran in das Innere des ER geschleust, glykosyliert und zu Trimeren komplexiert. Im Verlauf des Transports über den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche findet die Spaltung in die Oberflächenkomponente gp120 und den transmembranen Teil gp41 statt. Die Translation aller anderen Proteine erfolgt an freien Ribosomen im Zytoplasma (Modrow und Falke, 1997).

1.2.2.5 Virusassemblierung und Freisetzung

Der Zusammenbau der Viren geschieht an der Zellmembran. Zwei genomische mRNA Moleküle binden an die Zinkfinger motive der Nukleokapsidproteine der Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine. Unter Benutzung des Verpackungssignals Ψ wird gewährleistet, dass nur vollständige, ungespleißte mRNA Moleküle in Viruspartikel aufgenommen werden. Allen gespleißten mRNAs fehlt dieses Signalpeptid, das sich zwischen der U5-Region und den gag Genen befindet. Bei Kontakt der Zellmembran mit den RNA-Molekülen stülpt sich die Membran aus und bildet abschnürende Vesikel. In den noch unreifen Viruspartikeln liegen die Gag- und Gag/Pol-Vorläuferproteine vor, die im Verlauf der Virusreifung von der Protease in die Matrix-, Kapsid-, Nukleokapsid- und Linkproteine sowie die Reverse Transkriptase und Integrase prozessiert werden. Die Aktivierung der Protease geschieht erst in der leicht sauren Umgebung der Viruspartikel. Das verhindert die Spaltung der Vorläuferproteine im Zytoplasma und gewährleistet die Verpackung in Partikel. Erst durch strukturelle Umlagerungen und die Ausbildung des Kapsids werden die Viruspartikel infektiös (Modrow und Falke, 1997).

1.2.3 Spleißen

Wie eingangs beschrieben handelt es sich bei HIV um einen komplexen Retrovirus, da es, wie bei Lentiviren üblich, zusätzliche Gene neben den Strukturproteinen Gag, Pol und Env besitzt. Retroviren können eine Vielzahl von Genen in einem kleinen Genom verpacken, so dass einige Gene überlappen. Um die Transkription dieser Gene zu ermöglichen, machen sie sich verschiedene Spleißmuster zu Nutze und verschieben den Leserahmen überlappender Gene. Daraus ergibt sich ein sehr kompliziertes Spleißverfahren für das HIV-1 Genom. Um die Vorgänge zu verstehen, soll zunächst das Spleißmuster der einfachen Retroviren vorgestellt werden, anhand des Murinen Leukämie Virus (MLV) (Abbildung 5).

Das einfache Genom des MLV kodiert die Strukturproteine Gag, Pol und Env. Akzessorische Proteine sind nicht vorhanden. Von der integrierten Provirus DNA wird eine genomische mRNA synthetisiert, die beginnend vom 5`-LTR das gesamte Genom umfasst. Ausgehend von diesem Transkript werden die Gag und Gag/Pol Proteine translatiert. Die Translation der Gag Proteine endet am Stopp-Kodon, die Pol Proteine werden als Fusionsprotein zusammen mit den Gag Proteinen translatiert. Indem in 5 % der Translationsereignisse ein Leserasterschub am 3`-Ende der Gag Gene stattfindet, folgt eine Verschiebung des Leserahmens, die zum Überlesen des Gag Stopp-Kodons führt. Das Ergebnis ist ein Gag/Pol Fusionsprotein, das nach der Prozessierung in das Matrixprotein, das Kapsidprotein, das Nukleokapsidprotein und in die viralen Enzyme gespalten wird. Die genomische mRNA dient allerdings nicht allein der Translation der Strukturproteine, denn sie wird zusätzlich als zukünftiges Genom in entstehende Viruspartikel verpackt.

Die Hüllglykoproteine werden von einer einfach gespleißten mRNA (env mRNA) translatiert, nach Spleißen von einem Spleißdonor (SD) zu einem Spleißakzeptor (SA). Nachfolgend wird das Vorläuferprotein in die Oberflächenkomponente (gp70) und den transmembranen Teil (p15E) prozessiert. Außer der genomischen mRNA und der env mRNA entstehen bei MLV keine weiteren Spleißprodukte (Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

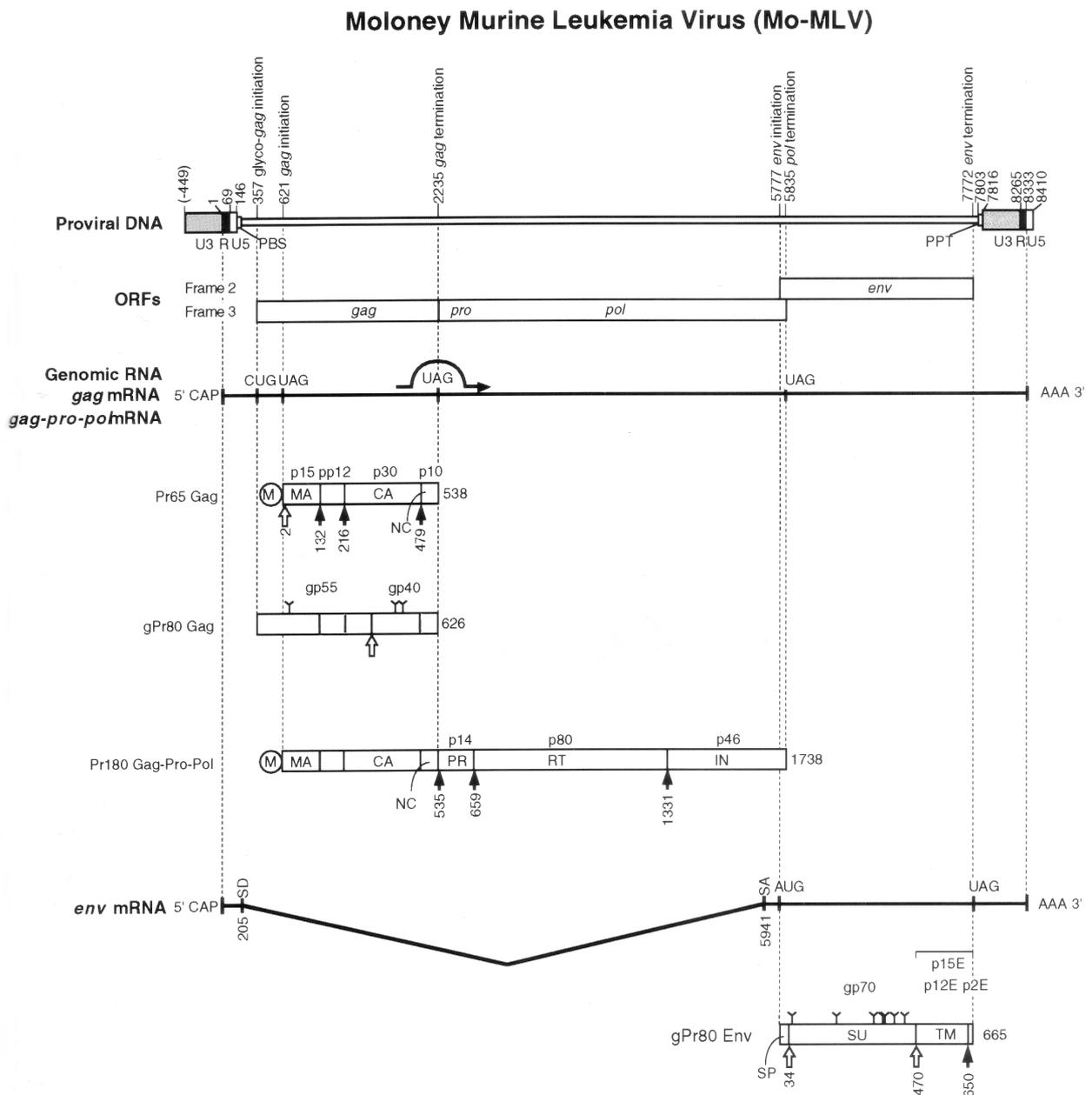


Abbildung 5: Spleißmuster des einfachen Murinen Leukämie Virus (MLV) (aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

Im Unterschied zu MLV gehört HIV-1 mit seinen akzessorischen Genen zu den komplexen Lentiviren. Ausgehend von einem primären genomischen mRNA Transkript (9 kb) wird eine Vielzahl anderer mRNAs synthetisiert. Diese mRNAs können drei Größen zugeordnet werden (Wong-Staal, 1990) (Abbildung 6):

- ungespleißte, 9 kb große mRNA, die für die Gag und Gag/Pol-Proteine kodieren;
- einfach gespleißte, 4 kb große mRNAs, die kodierend sind für Vif, Vpr, Vpu und Env Proteine;
- mehrfach gespleißte, 2 kb große mRNAs, die für Tat, Rev und Nef Proteine kodieren.

Human Immunodeficiency Virus (HIV)

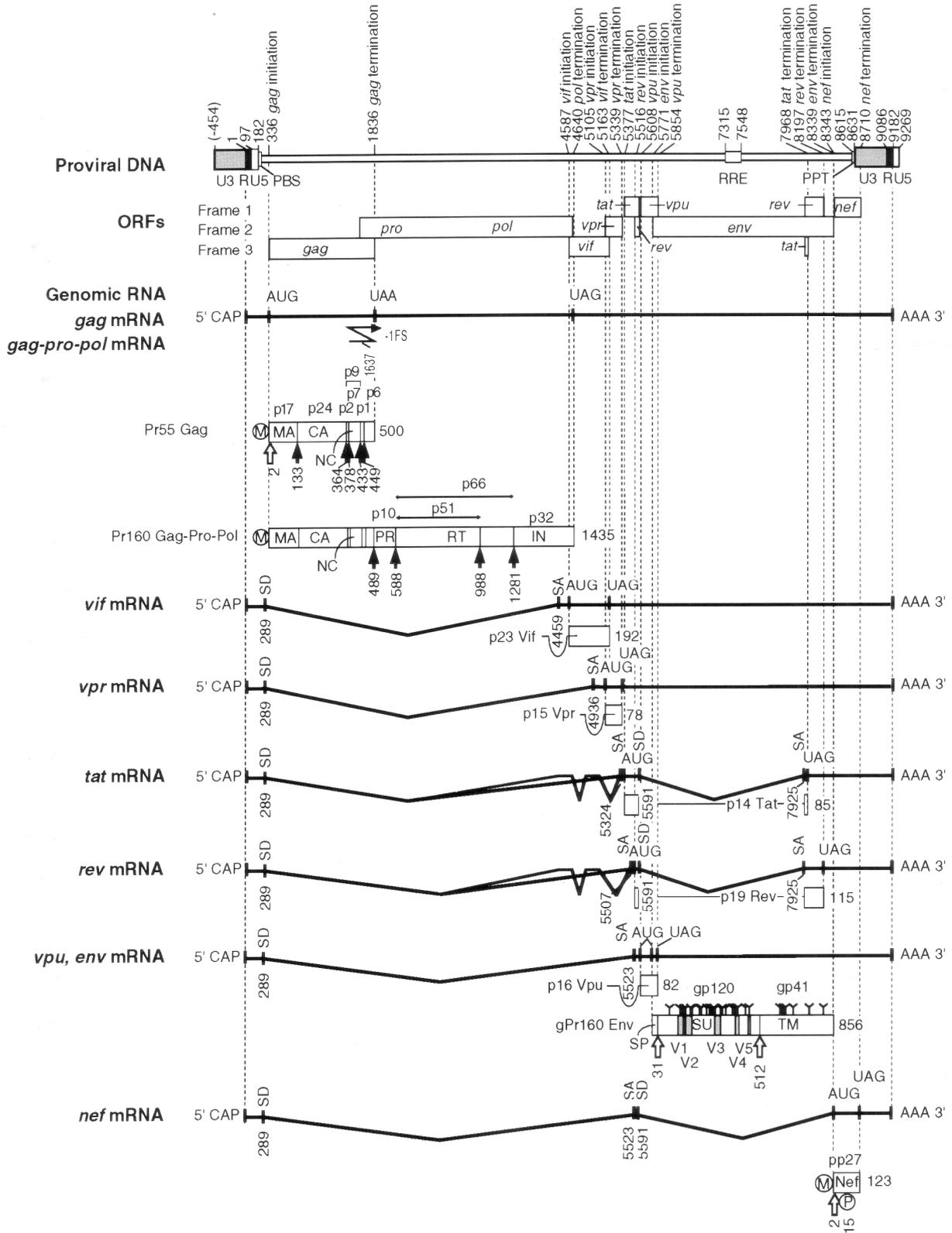


Abbildung 6: Spleißmuster des komplexen humanen Immundefizienz Virus (HIV-1) (aus Coffin, Hughes und Varmus, 1997).

Alle Spleißprodukte beginnen mit demselben Exon, das aus der U5 Region des 5`-LTR besteht. Das letzte Exon enthält die U3 und R Region des 3`-LTR.

Das Spleißen der HIV-1 RNA ist relativ komplex, da sowohl konstitutive als auch alternative Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen vorhanden sind. Für HIV-1 wurden 25 verschiedene mRNAs gefunden (Schwartz *et al.*, 1990). Der Gebrauch verschiedener kryptischer Spleißdonor- oder Spleißakzeptorstellen führt zur Produktion neuer chimärer Proteine, da strukturell differenzierte mRNA Moleküle entstehen, die zur Translation veränderter Proteine führen (Purcell *et al.*, 1993). Dies bewirkt eine erhöhte Variabilität der HIV-1 Isolate. *In vitro* Experimente geben Anlass zu der Hypothese, dass das HI-Virus Regulatoren besitzt, die eine Auswahl über die zu verwendenden Spleißstellen zulassen. Abbildung 6 zeigt das HIV-1 Spleißmuster.

Der Transport aus dem Zellkern in das Zytoplasma der 9 kb und 4 kb großen Transkripte ist absolut abhängig von dem regulatorischen Protein Rev (Malim and Cullen, 1993). Die HIV-1 Genexpression lässt sich in zwei Phasen einteilen: die frühe Phase, in der die Proteine der 2 kb mRNAs exprimiert werden, und die späte Phase, in der alle weiteren Transkripte translatiert werden. Die Proteinbiosynthese der Gag und Gag/Pol Proteine entspricht der bereits beschriebenen MLV Biosynthese dieser Transkripte. Das HIV-1 Hüllglykoprotein wird von demselben Transkript translatiert wie das akzessorische Gen vpu. Die Translation des Hüllglykoproteins resultiert in einem Vorläuferprotein gp160, das in die Oberflächenkomponente gp120 und den transmembranen Teil gp41 prozessiert wird.

1.2.4 Akzessorische Gene

Alle Retroviren kodieren die Strukturgene Gag, Pol und Env. Lentiviren besitzen ferner eine Vielzahl von regulatorischen (tat und rev) und akzessorischen (vif, vpr, vpu und nef) Genen. Die akzessorischen Proteine Vif, Vpr, Vpu und Nef sind für die Virusreplikation *in vitro* nicht essentiell. Im Folgenden findet sich eine Auflistung dieser akzessorischen Proteine und deren Funktion.

Tat (transactivator of transcription)

Tat Proteine werden durch zwei Exons kodiert, ihre Größe schwankt je nach HIV-1 Isolat zwischen 9-14 kD. Sie werden als frühe Gene im Infektionszyklus synthetisiert, in den Zellkern transportiert und wirken dort als Transaktivatoren, indem sie an das sogenannte TAR-Element (trans-activation response) der viralen mRNA binden (Laschia *et al.*, 1989). Die Sekundärstruktur des TAR-Elements ist sehr ausgeprägt und liegt als doppelsträngige RNA-Haarnadelschleife an den 5'-Enden aller viraler mRNAs vor. Die Funktion des Tat Proteins ist die Verstärkung der Transkription aller LTR-Promotor getriebenen mRNAs, in dem der bei der Transkription gebildete Initiationskomplex stabilisiert wird (Jones *et al.*, 1994; Jones, 1997).

Vif (viral infectiosity factor)

Das Vif Protein wird von einer einfach gespleißten mRNA translatiert und besitzt ein Molekulargewicht von 23 kD. Die Wirkung von Vif ist unklar, es spielt aber eine große Rolle in späten Stadien des viralen Infektionszyklus, hauptsächlich bei der Infektiosität der Viruspartikel (Sova *et al.*, 1993). Man unterscheidet dennoch nicht-permissive Zellen, die zur produktiven HIV-1 Replikation Vif benötigen, und permissive Zellen, in denen Vif keine Rolle bei der Virusvermehrung spielt (Sova *et al.*, 1993). Weitere Studien zeigen, dass Vif mit dem Virus-Kapsid assoziiert ist und in 10 - 100 Kopien pro Virion vorkommt (Karczewski, and Strebel, 1996).

Vpr (viral protein rapid)

Das 11 - 15 kD große Vpr Protein wird von einer einfach gespleißten mRNA synthetisiert und nach Interaktion mit dem p6 Protein in die entstehenden Viruspartikel mit eingebaut (Cohen *et al.*, 1990). Vpr fördert die Virusreplikation (Connor *et al.*, 1995) und die Ausbildung eines cytopathischen Effekts bei der Infektion von T-Zellen. Vpr induziert einen Zellzyklusarrest in der G2 Phase, was zum Zelltod durch Apoptose führen könnte (Stewart *et al.*, 1997). Wahrscheinlich wirkt es als Transaktivator in der frühen Phase der tat-unabhängigen Transkription des

Virusgenoms. Die Aktivität des Vpr ist dabei unabhängig von spezifischen Promotorsequenzen, vielmehr scheint das Protein mit zellulären Proteinen zu interagieren (Wang *et al.*, 1995).

Vpu (viral protein out)

Das Vpu Protein wird von einer bicistronischen mRNA translatiert, die außerdem für das Hüllglykoprotein Env kodiert. Sein Molekulargewicht beträgt 16 kD. Eine Funktion dieses akzessorischen Proteins Vpu ist es, die intrazelluläre Komplexbildung des neusynthetisierten Hüllglykoproteins gp160 mit dem CD4 Protein im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat zu verhindern. Dies erlaubt die Prozessierung des Vorläuferproteins gp160 in das Hüllglykoprotein gp120 und in den Transmembranen Teil gp41. Außerdem verringert Vpu die Stabilität des CD4 Rezeptors, so dass es zur Degradation von CD4 über den Ubiquitinweg im Endoplasmatischen Retikulum kommt (Willey *et al.*, 1992). Weitere Studien haben gezeigt, dass vpu defiziente HIV-Varianten infektiöse Nachkommen nur verspätet oder vermindert freisetzen. Außerdem bewirkt Vpu die Abnahme von MHC-I (major histocompatibility complex) auf der Oberfläche der Zellen und verhindert somit eine Erkennung durch zytotoxische T-Lymphozyten (Göttlicher *et al.*, 1989).

Nef (negative factor)

Das von einer mehrfach gespleißten mRNA stammende Nef Protein ist 25 - 27 kD groß und zählt zu den sehr frühen Genen der HIV-Infektion, da seine Translation tat-unabhängig stattfindet. Sein ursprünglich beobachteter negativer Effekt auf die virale Transkription und Replikation (Luciw *et al.*, 1987), wovon sich seine Namensgebung ableitete, wandelte sich mittlerweile zum positiven Effekt (Chowers *et al.*, 1994). Die Funktion des Nef Proteins ist dennoch unklar. Nef Proteine wurden in der Zytoplasmamembran infizierter Zellen nachgewiesen und im Nukleus sowie in gereinigten Viruspartikeln. Es gibt Hinweise, dass dieses akzessorische Protein mit zellulären Kinasen interagiert oder selbst Kinaseaktivität aufweist. Außerdem scheint es bei der Reduktion des CD4 Rezeptors auf der Zelloberfläche von Bedeutung zu sein, um so eine Überinfizierung der Zelle durch weitere HIV zu verhindern. Durch die Interaktion mit dem AP-2 Adapterkomplex bewirkt Nef eine Internalisierung von CD4 in Clathrin-coated-pits und einen Abbau in Lysosomen (Klestler *et al.*, 1991). Studien mit einem nef-defizienten simian Immundefizienz Virus (SIV) in Makaken haben gezeigt, dass Nef für die *in vivo* Infektiosität des Virus essentiell ist, da nur geringe Virustiter und eine geringe Pathogenität beobachtet wurden (Klestler *et al.*, 1991).

Rev (regulator of expression of virion proteins)

Kodiert von zwei Exons wird das 13 kD große Protein während der frühen Infektionsphase gebildet. Das Rev Protein ist ein posttranskriptionell wirkender Transaktivator, der es dem HI-Virus erlaubt die Synthese der Genprodukte auch nach der Transkription zu kontrollieren. Ausnahmen dieser Kontrolle bestehen für das Rev Protein selbst, für Tat und Nef, alle anderen Proteine werden Rev abhängig translatiert. Somit besitzt das Rev Protein eine entscheidende Rolle bei der Virusreplikation (Pollard *et al.*, 1998; Knight *et al.*, 1987).

Im Nukleus bindet das Rev Protein an eine als RRE (rev responsive element) bezeichnete Sequenz, die alle einfach gespleißten oder ungespleißten mRNAs enthalten (Mann *et al.*, 1994). Mehrfach gespleißten mRNAs fehlt die RRE-Sequenz aufgrund der Entfernung der Introns. Daraufhin erfolgt der Transport dieser mRNAs aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo die Proteinbiosynthese stattfindet. Diese Funktion des Rev Proteins ist für die Proteinbiosynthese essentiell, da der Export ungespleißter mRNA Voraussetzung ist für die Translation der Strukturgene gag, pol und env. Darüber hinaus muss für die Entstehung von replikationskompetenten Viren eine ungespleißte RNA als zukünftiges Virusgenom in Viruspartikel verpackt werden. In Abwesenheit des regulatorischen Proteins Rev findet eine Akkumulation von ungespleißter mRNA im Nukleus statt (Malim *et al.*, 1993; Malim *et al.*, 1989). Mit der Zeit käme es zum vollständigen Spleißen dieser mRNAs und zu keiner Virusvermehrung. Ein Modell für den nukleären Transportmechanismus des Rev Proteins ist in Abbildung 7 dargestellt.

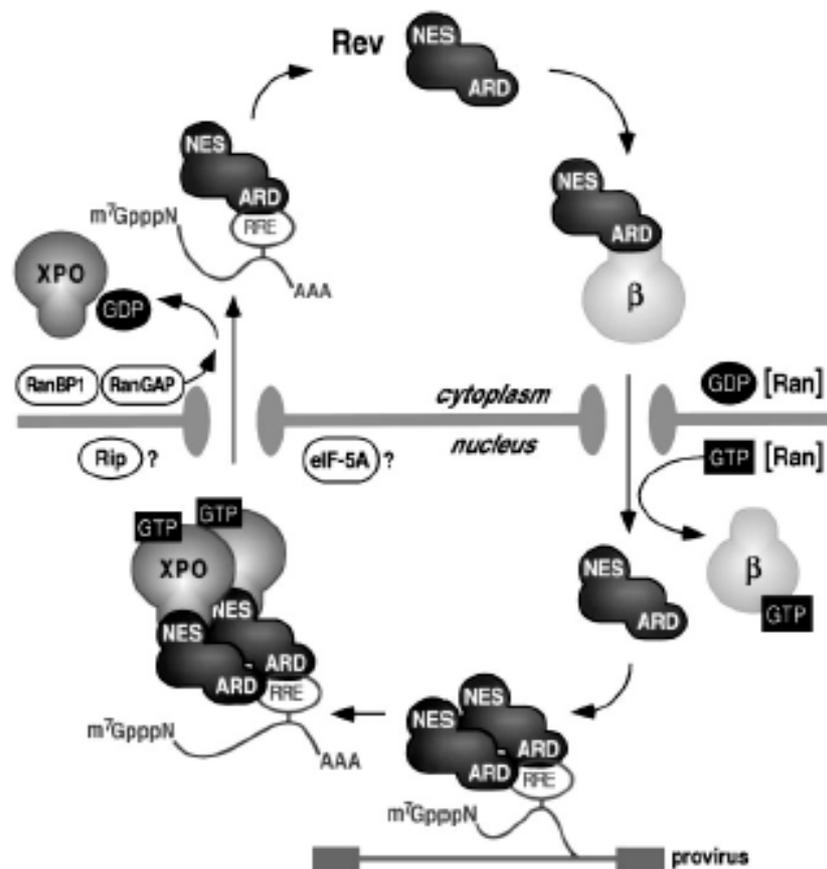


Abbildung 7: Modell zum Rev Transportzyklus. Rev bindet an Importin-β (β) oder das „rev response element“ (RRE) über seine Arginin-reiche Domäne (ARD). Die Bindung an Exportin-1 (XPO) erfolgt über das „nukleare export signal“ (NES) von Rev. Die Rolle der Proteine Rip und eIF-5A ist unklar (aus Pollard und Malim, 1998).

Das Rev Protein fungiert als Transportvehikel zwischen dem Zytoplasma und dem Nucleus, dabei transportiert es ungespleißte und einfach gespleißte mRNAs aus dem Nucleus heraus. Hier ist das Rev Protein mit seinem „nuclear export signal“ (NES) und der Arginin-reichen Domäne (ARD) dargestellt. Der Import des Proteins erfolgt nach Binden des ARD an den Rezeptor Importin-β, der Komplex wird durch die Kernporen (nuclear pore complexes, NPC) in den Nucleus transportiert. Die Interaktion mit RanGTP führt zur Dissoziation von Rev und Importin-β, woraufhin es zur Multimerisierung von Rev kommt. Dies ermöglicht das Binden des Rev Proteins an das RRE der neu synthetisierten mRNA. Der Komplex erfährt eine Erweiterung, indem aktiviertes Exportin-1 gebunden wird. Nach dem Transport ins Zytoplasma dissoziieren Exportin-1/GDP und Rev voneinander, so dass die mRNA translatiert werden kann. Die Beteiligung der Proteine Rip und eIF-5A konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar.

1.2.5 Aufbau und Funktion des HIV-1 Hüllglykoproteins

Das HIV-1 Hüllglykoprotein ist das erste virale Protein, das bei einer HIV-Infektion mit der Zielzelle in Kontakt kommt. Das Binden des Hüllglykoproteins an den CD4 Rezeptor auf der Oberfläche der Wirtszelle führt zu einer Konformationsänderung im Hüllprotein und zur Freilegung oder Bildung der Korezeptorbindungsstelle. Mit der Bindung an den Korezeptor gehen weitere Konformationsänderungen einher, die schließlich die Fusion der viralen und der zellulären Membran zur Folge haben.

Das HIV-Hüllprotein wird als trimeres Vorläuferprotein gp160 synthetisiert und von einer zellulären Protease in die Oberflächenkomponente gp120 und den transmembranen Teil gp41 prozessiert. Beide Proteine sind stark glykosyliert und werden durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten. Die gp120 Untereinheit besteht aus fünf variablen Regionen (V1 - V5) und fünf konstanten Bereichen (C1 - C5) (Starlich *et al.*, 1986). Die variablen Bereiche befinden sich an der Oberfläche des Proteins, während die konservierten Bereiche im Innern („Core“) zu finden sind. Disulfidbrücken in den ersten vier variablen Regionen führen zur Ausbildung von Schleifen ähnlichen Sekundärstrukturen. Das gp120 Core besteht aus zwei Domänen, einer inneren und einer äußeren sowie aus einem β -Faltblatt, welches beide Domänen miteinander verbindet (Wyatt and Sodroski, 1998). Alle Elemente des Cores tragen zur CD4 Bindung bei. Durch die Bindung von gp120 an CD4 findet eine erneute Konformationsänderung statt, die sogenannte CD4-induzierte Konformation (CD4i). Dies hat die Bindung des Chemokin-Korezeptors an die V3-Schleife zur Folge (Poignard *et al.*, 2001).

Mittlerweile unterscheidet man bei HIV gp120 drei Bereiche, die unterschiedliche Antikörperreaktionen auslösen (Poignard *et al.*, 2001):

„Silent face“

Die enorme Glykosylierung des gp120 findet ihre größte Präsenz vor allem auf der äußeren Region des Core. Diese Seite wird gut exponiert, ruft aber eine geringe Immunantwort hervor. Das liegt vor allem daran, dass die Glykosylierungen des Hüllproteins innerhalb der Zelle stattfinden und somit vom Immunsystem als „selbst“ erkannt werden (Wyatt *et al.*, 1998).

„Non-neutralizing face“

Diese Region befindet sich im Innern des gp120 Core, ist relativ konserviert und löst starke Antikörperreaktionen aus (Kwong *et al.*, 1998). Allerdings werden diese Epitope des oligomeren Hüllproteins nicht auf der Oberfläche der Viruspartikel exponiert. Antikörper gegen diese Epitope können das Virus nicht binden und sind deshalb nicht neutralisierend (Wyatt *et al.*, 1998).

„Neutralizing face“

Die Hüllproteinregion, die eine neutralisierende Immunantwort auslöst, befindet sich an der Rezeptorbindungsstelle. Obwohl diese Stelle zugleich konserviert und exponiert ist, ist sie nicht frei zugänglich für Antikörper (Kwong *et al.*, 1998; Wyatt *et al.*, 1998). Zu den neutralisierenden Antikörpern gehören der die CD4 Bindungsstelle überlagernde Antikörper b12 und der Antikörper 2G12, der ein Epitop auf der äußeren Region von gp120 erkennt. Der 17b Antikörper erkennt ein CD4 induziertes Epitop (CD4i) und wirkt nur in Anwesenheit von löslichem CD4 neutralisierend. Primäre HIV Isolate können jedoch nicht neutralisiert werden.

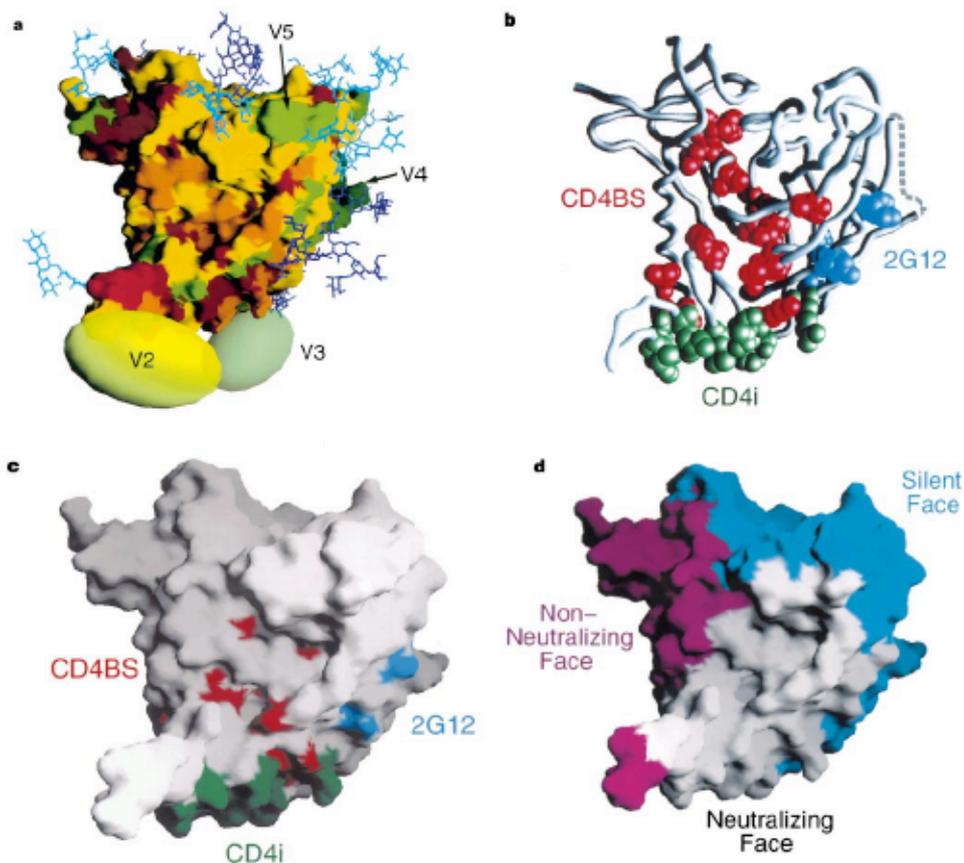


Abbildung 8: Struktur von gp120. a) Darstellung der variablen Regionen V2 - V5; b) und c) zeigen die Bereiche, an die neutralisierende Antikörper binden; d) Einteilung von gp120 in verschiedene Regionen (Poignard *et al.*, 2001).

Das Transmembranprotein gp41 besitzt eine trimere Struktur, die die Distanz zwischen Virusmembran und zellulärer Membran überbrückt (Chan *et al.*, 1997). Leuzin- und Isoleuzin-Wiederholungsmotive befinden sich am N- und C-Terminus des Proteins. In der HR1 Region kommt es zur Ausbildung einer Sekundärstruktur mit konservierten Taschen, in die der HR2-

Bereich antiparallel bindet. Durch diesen Prozess gelangt das Fusionspeptid, welches sich ebenfalls am N-Terminus des gp41 befindet in die Nähe der transmembranen Domäne. Dieses sogenannte „six-helix bundle“ ist für den Fusionsprozess von Virusmembran und zellulärer Membran verantwortlich. Neuere Studien zeigen, dass die Ausbildung des „six-helix bundle“ selbst für die Fusion verantwortlich ist, und nicht wie zuvor vermutet die Anwesenheit dieser Helices (Melikyan *et al.*, 2000).

1.3 Entwicklung eines Impfstoffs gegen HIV-1

Die Entwicklung eines Impfstoffs, der die Infektion von HIV-1 verhindert, muss sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort auslösen. Bislang konnten einige wenige neutralisierende Antikörper im Blut von HIV infizierten Personen entdeckt werden. Ihre Kombination war in der Lage, Infektionen im Modellsystem zu kontrollieren (Baba *et al.*, 2000; Mascola *et al.*, 2000). Diese Antikörper genügen aber nicht um einen ausreichenden Schutz vor einer HIV-Infektion zu verleihen. Ihr Potenzial besteht lediglich darin, die Viruslast zu reduzieren, um so dem Immunsystem Zeit zu verschaffen eine zelluläre Immunantwort auszubilden.

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass eine zelluläre Immunantwort ebenfalls bedeutend ist: CD8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Infektion im Organismus. Chronisch infizierte Patienten, sogenannte Long-term Nonprogressors, weisen eine hohe CTL-Antwort auf, die mit einer geringen Viruslast und einem stabilen klinischen Status korreliert (Ogg *et al.*, 1998).

Es scheint somit sinnvoll zu sein, eine HIV-1 Vakzine zu entwickeln, die sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunität induziert. Es gibt vielseitige Ansätze zur Entwicklung eines HIV-Impfstoffs, die sich zum Teil von bereits existierenden Impfstoffen ableiten. Im Folgenden findet sich eine Zusammenstellung der wichtigsten.

Lebende attenuierte Vakzine

Ein lebendes Virus, dessen Pathogenität abgeschwächt wurde, erzeugt eine humorale und zellvermittelte Immunantwort, die der des Wildtypvirus entspricht. Attenuierte Lebendimpfstoffe kommen bei der Polio- und Masernimpfung zum Einsatz. Das beeindruckendste Beispiel ist das Vaccinia Virus, durch das die Pocken ausgerottet wurden. Erste Studien mit nef deletierten, nicht pathogenen SI-Viren an Makaken, konnten die Tiere vor einer Infektion mit pathogenen SIV schützen (Daniel *et al.*, 1992). Die Übertragung dieses Modells auf HIV gab aufgrund der hohen Mutationsrate Anlass zur Skepsis. Apathogene HI-Viren könnten durch eine Reihe von Mutationen ihr pathogenes Potential zurückerlangen. Die Entstehung eines infektiösen SI-Virus aus einem nef deletierten SIV konnte nachträglich beobachtet werden (Whatmore *et al.*, 1995).

Inaktivierte Viren als Vakzine

Vollständige inaktivierte Viren können, zusammen mit Adjuvantien verabreicht, einen langjährigen Schutz bieten. Dies konnte bereits erfolgreich mit Vaccinia Viren und Polioviren gezeigt werden. Untersuchungen mit inaktivierten SIV in Makaken erzeugten zunächst einen

Schutz gegen eine Infektion mit pathogenen SIV. In anderen Experimenten stellte sich jedoch heraus, dass die Immunantwort nicht virus-spezifisch war. Die generierten Antikörper waren gegen die Zellen gerichtet, in denen das Virus kultiviert wurde (Stott *et al.*, 1991).

Virale Proteine als Impfstoff: gp120

Verwendet wurde hierfür besonders das HIV-1 Hüllglykoprotein, das als Vorläuferprotein gp160 gebildet wird und in das Oberflächenprotein gp120 und das Transmembranprotein gp41 prozessiert wird. Das HIV-1 Hüllglykoprotein stellt den ersten Kontakt zwischen Virus und Wirtszelle dar und ist somit der erste Angriffspunkt für das Immunsystem zur Herstellung von neutralisierenden Antikörpern. Hoch konservierte Epitope des viralen Hüllproteins gp120, die in verschiedenen Virusstämmen konserviert sind, sind jedoch generell für das Immunsystem nicht zugänglich. Interaktionsstellen des gp120 mit dem Transmembranprotein gp41 befinden sich im Innern des Hüllproteins, die CD4 Bindungsstelle sitzt in einer Vertiefung und wird von Zuckerresten flankiert, während die Chemokin-Bindungsstelle von den V2 und V3 Domänen verdeckt wird (Kwong *et al.*, 1998).

Es wurden mehrfach Studien durchgeführt, um die Epitope des Hüllglykoproteins freizulegen und dem Immunsystem zugänglich zu machen. Die Reinigung der Hüllproteine aus Viruspartikeln lieferte jedoch nur monomere gp120 Proteine, da der trimere Komplex mit gp41 bei der Reinigung zerfällt. Immunisierungen mit monomerem gp120 Proteinen, die das „non-neutralizing face“ von gp120 und die Interaktionsstelle mit gp41 exponieren, haben zur Generierung von gp120 gerichteten Antikörpern geführt, die jedoch nur monomeres Hüllprotein binden und nicht das native oligomere Protein. Diese Antikörper sind folglich nicht neutralisierend (Poignard *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1998). Immunisierungen mit nativen trimeren Hüllproteinen könnten das Immunsystem auf neutralisierende Epitope auf der Oberfläche des Trimers lenken und zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern führen. Zum einen wurden Virionen durch die Modifizierung des Nukleokapsid-Zinkfingermotivs chemisch inaktiviert und verloren ihre Infektiosität (Rossio *et al.*, 1998). Zum anderen wurden bislang verschiedene Ansätze versucht, die eine Stabilisierung der gp120/gp41 Interaktion bewirken sollten. Yang *et al.* bewirkten eine Stabilisierung der löslichen Form des Hüllglykoproteins durch Insertion von trimeren Helices (Yang *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um John Moore und William Olson prüft den Einbau von Cysteinen in das Hüllglykoprotein zur Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen gp120 und gp41, um dessen Interaktionen zu stabilisieren (Binley *et al.*, 2000; Schülke *et al.*, 2002; Sanders *et al.*, 2002). Das Entfernen der Kohlenhydrate des Hüllproteins ist ein weiterer Aspekt zur Induktion einer effektiven Immunantwort (Reitter *et al.*, 1998). Es bleibt abzuwarten, ob einer dieser Ansätze den durchgreifenden Erfolg in der Entwicklung eines HIV-Impfstoffs erzielt.

Ein anderer Aspekt ist die Bildung sogenannter Fusionsintermediate, die beim Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle entstehen. Ein solches Intermediat ist der gp120-CD4 Komplex. Diese Intermediate enthalten die CD4 induzierte Konformation (CD4_i) des Hüllglykoproteins und ermöglichen die Bildung neutralisierender Antikörper. Einzelne wenige Studien haben gezeigt, dass neutralisierende Antikörper generiert werden, sobald transgene CD4⁺ und CCR5⁺ Mäuse mit fixierten Zell-Zell-Fusionen immunisiert wurden, die einerseits Hüllprotein gp120 und andererseits CD4 Rezeptor exprimierten (LaCasse *et al.*, 1999). Die Immunisierung von Mäusen mit CD4 und gp120 Proteingemischen führte ebenfalls zur Bildung neutralisierender Antikörper (De Vico *et al.*, 1999).

Lebende Vektor-basierende Vakzine

Die Insertion viraler Gene in das Genom anderer Viren oder Vektorpartikel und deren Expression auf der Oberfläche, führen zur Produktion rekombinanter Organismen, die eine Immunantwort gegen das Trägervirus oder den Vektor selbst und das Fremdprotein auf seiner Oberfläche induzieren. Die am besten untersuchten Vektoren sind Vaccinia Viren. Ausgestattet mit wenigen HIV-Genen konnten humorale und zelluläre Immunantworten in Makaken stimuliert werden. Immungeschwächte HIV infizierte Patienten entwickelten allerdings nach einer Vaccinia-Impfung lebensbedrohende Infektionen (Redfield *et al.*, 1998). Ein auf der Grundlage von Vaccinia Virus bestehender Impfstoff könnte wenig effizient sein, da ein Großteil der Bevölkerung bis 1965 gegen Vaccinia Virus immunisiert wurde. Ebenso wurden andere Vektoren zur Entwicklung eines Impfstoffs verwendet, durchgreifende Erfolge wurden bisher jedoch noch nicht erzielt.

DNA Vakzine

Eine weitere Vakzinierungsstrategie ist die direkte Injektion von Plasmid-DNA, die für ein pathogenes Gen kodiert. Mit Hilfe einer „gene gun“ wird die DNA intramuskulär oder intradermal appliziert, von einer Zelle aufgenommen, prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieser Mechanismus ruft sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor. In Makaken wurde beispielsweise eine Immunisierung mit einem DNA-Vakzin in Kombination mit einem Vaccinia Virus erfolgreich getestet. Beide Impfstoffe kodierten für HIV Proteine und schützten die Affen vor einer weiteren Virusinfektion (Amara *et al.*, 2001). Andere Ansätze benutzen DNA Vakzine, die Rev und Env Proteine exprimieren, aber nur nicht-neutralisierende Antikörper induzieren und zu keiner CTL Antwort des Immunsystems führen, während Tat, Rev und Nef exprimierende DNA-Vakzine eine CTL Antwort induzieren (Reviewed by McMichael and Hanke, 2002).

1.4 Aufgabenstellung der Dissertation

In dieser Arbeit sollen verschiedene präventive Strategien untersucht werden, die einen Schutz vor einer Infektion durch das humane Immundefizienz Virus HIV-1 bieten sollen. Bei einer HIV-Infektion ist der erste Schritt die Bindung des Hüllglykoproteins gp120 an den CD4 Rezeptor der Zielzelle. Diese Bindung induziert verschiedene Konformationsänderungen im Hüllprotein, die zu einer Freilegung von konservierten CD4 induzierten (CD4i) Epitopen führen. Die konservierten Bereiche des gp120 können nachfolgend mit den Korezeptoren aus der Familie der Chemokinrezeptoren interagieren, um die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran zu ermöglichen. Vor der Rezeptorbindung liegen alle CD4 induzierten Epitope im Inneren des Hüllproteins und sind für das Immunsystem nicht zugänglich. Da es sich bei den CD4 induzierten Epitopen um konservierte Bereiche handelt, eignen sich diese Antigene für Vakzinierungsansätze. In dieser Arbeit sollen gp120-CD4 Fusionsproteine entwickelt werden, die die soeben vorgestellten CD4 induzierten Epitope präsentieren. In DNA-Immunisierungsstudien in transgenen Mäusen, die den humanen CD4 Rezeptor exprimieren, soll die Entstehung von neutralisierenden Antikörpern getestet werden.

Ferner sind in der Arbeitsgruppe von PD Dr. B. Schnierle CD4 spezifische retrovirale MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren konstruiert worden, die einen gerichteten Gentransfer in humane CD4 exprimierende Zellen ermöglichen (Schnierle *et al.*, 1997). Die Zellspezifität des murinen Vektors konnte durch Austausch des murinen Hüllproteins gegen das HIV-1 Hüllprotein erreicht werden. Die Expression des HIV-1 Hüllglykoproteins auf der Oberfläche des Pseudotypvektors macht den Vektor zu einer Imitation des infektiösen HIV mit abgeschwächter Pathogenität. Seine Verwendung in Immunisierungsstudien in den oben vorgestellten transgenen Mäusen soll die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren.

Alternativ soll zur Generierung von nativem, trimerem Hüllglykoprotein ein replikationskompetentes MLV/HIV-1 Pseudotypvirus entwickelt werden, das anstelle des murinen Hüllproteins das HIV-1 Hüllprotein trägt. Ein replikationskompetentes abgeschwächtes Virus sollte durch Replikation in der Zielzelle zur Stimulation der humoralen und zellvermittelten Immunantwort führen. Beide sind notwendig, um einen ausreichenden Schutz vor einer HIV-Infektion zu gewährleisten.

2 Material

2.1 Proteine

Primäre Antikörper:

Ziege-anti-HIV-1 gp120, Konzentration: 4-5 mg/ml	Dunn Labortechnik, Asbach
Maus-anti-HIV-1 rev	Intracel, USA
Ziege-anti-MLV env	Quality Biotech, Camden, NJ, USA
Kaninchen-anti-MLV gag	PD Dr. J. Schmidt, GSF, München
Maus-anti-human-c-myc [9E10]	Pharmingen, Hamburg
Kaninchen-anti-GFP	Becton Dickinson, San Jose
Maus-anti-CXCR4	Pharmingen, Hamburg
Kaninchen anti- β -Galactosidase	Chemikon, Hofheim
Anti-CD4	Becton Dickinson, San Jose
Anti-CD4-PE	Becton Dickinson, San Jose

Sekundäre Antikörper:

Kaninchen-anti-Ziege-IgG-HRP, Konzentration: 0,8 mg/ml	Dianova, Hamburg
Schaf-anti-Maus-IgG-HRP	Amersham, Braunschweig
Protein A-HRP	Amersham, Braunschweig
Ziege-anti-Maus-IgG-FITC	Dunn, Asbach

2.2 Zelllinien

<u>Name</u>	<u>Herkunft/Eigenschaften</u>	<u>Referenz/ATCC-Nr.</u>
BHK	Embryonale Hamsternierenzellen	CRL-1632
293 T	Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus 5 und SV40-T Antigen	CRL-1573

Name	Herkunft/Eigenschaften	Referenz/ATCC-Nr.
293 CD4/CCR5	Humane embryonale Nierenzellen mit stabiler humaner CD4 und CCR5 Expression	Dietrich, U. unveröffentlicht
NIH 3T3	Embryonale Mausfibroblasten	CRL-1658
NIH 3T3 CD4	Embryonale Mausfibroblasten mit stabiler humaner CD4 Expression	Deng <i>et al.</i> , 1997
NIH 3T3 CD4/ CXCR4	Embryonale Mausfibroblasten mit stabiler humaner CD4 und CXCR4 Expression	Deng <i>et al.</i> , 1997
NIH 3T3 CD4/ CCR5	Embryonale Mausfibroblasten mit stabiler Humaner CD4 und CCR5 Expression	Deng <i>et al.</i> , 1997
Hela CD4	Humane Zervixkarzinomzelllinie mit CD4 Expressionsplasmid	CCL2
HT 29	humane Colorectale Adenocarcinomzelllinie	HB-8247
Anjou 65	Derivat der 293 T Zellen mit Plasmid für stabile MLV gag/pol Expression	CRL-11269 Pearl <i>et al.</i> , 1993
Anjou lacZ	Anjou mit stabiler β -Galactosidase-Expression	Höhne <i>et al.</i> 1999
Phoenix	Derivat der 293 T Zellen mit Plasmid für MLV gag/pol Expression	Nolan <i>et al.</i> 1998
B6-128-17	exprimiert stabil MLV/HIV-1 Lac Z Vektoren	Schnierle <i>et al.</i> , 1997
TELCeB6/ Tr712-17	TELCeB6 + p β Ac/envTr712-neo exprimiert stabil MLV/HIV-1- Lac Z Vektoren	Schnierle <i>et al.</i> , 1997

2.3 HuCD4⁺ transgene Mäuse

Die in den Tierversuchen verwendeten transgenen Mäuse tragen anstelle des murinen CD4 Rezeptors auf den T-Lymphozyten den humanen Rezeptor. In der Arbeitsgruppe um Dan Littman wird dazu zunächst das murine CD4 Gen durch eine Neomycinkassette inaktiviert, so dass eine CD4 „knock out“ Maus entsteht. Ausgehend von diesem Mausstamm B6/SJL F1x CD4^{-/-} wird das Transgen, bestehend aus dem humanen CD4 Gen und dem Maus Promotor/Enhancer, in das Mausgenom eingebaut (Killeen *et al.* 1993). Es entstehen huCD4⁺ transgene Mäuse.

2.4 Zellkulturreagenzien

DMEM	Bio Whittaker, Belgien
RPMI	Bio Whittaker, Belgien
PBS	Bio Whittaker, Belgien
Trypsin/EDTA	Gibco/BRL, UK
Penicillin/Streptomycin	Bio Whittaker, Belgien
L-Glutamin	Bio Whittaker, Belgien
G418	Calbiochem, San Diego
Puromycin	Sigma, Deisenhofen
Hygromycin	Gibco/BRL, UK

2.5 Plasmide

Name	Referenz
pEF-IRES-P	Hobbs <i>et al.</i> , 1998
pcz-CFG5-IEGZ	Lindemann, D., Würzburg
pBabe puro	Morgenstern <i>et al.</i> , 1990
pBS-WPRE	Donello <i>et al.</i> , 1998
pSG-5	Green <i>et al.</i> , 1988
pEF-89.6P-L-CD4-mycHIS	Nack, U., unveröffentlicht
pEF-gp120-L-CD4.d4-myc-His	Bittner, A., unveröffentlicht
pEF-gp120-L-myc-His	Bittner, A., unveröffentlicht
pEF-CD4-L-myc-His	Bittner, A., unveröffentlicht
pSG-CD4.d4-gp120	Mitnacht-Kraus, R., unveröff.

pSG-CD4.d2-gp120	Mittnacht-Kraus, R., unveröff.
pSG-gp120	Mittnacht-Kraus, R., unveröff.
pwt-HX	Erlwein <i>et al.</i> , 2002
pMOV-3	Harbers <i>et al.</i> , 1981
pSG-X/C _{7s}	Dudda, J., Diplomarbeit 1998
pSG-X/C _{7d}	Dudda, J., Diplomarbeit 1998
pUCX/C _{7s}	Dudda, J., Diplomarbeit 1998
pUCX/X _{7s} WPRE	Nack, U., unveröffentlicht
pC480	Strebel <i>et al.</i> , 1987
pCMV-128-vpu/rev	Schnierle, B., unveröffentlicht
pCMV-tat-IRES-rev	Schnierle, B., unveröffentlicht
pCMV-rev	Ham-Rek Laboratories, Buffalo
p-revGFP	Neumann, GSF, München
pJF-HIV-1-nef	Lang, S., Erlangen
pCMV-vif	Nack, U., unveröffentlicht
pBabe-vpr	Schnierle, B., unveröffentlicht
pHIT 60	Miller <i>et al.</i> , 1989
pKA \square envEGFP	Cichutek, K., Langen
pCMX-128	Schnierle, B., unveröffentlicht
pL128 HIV-1 env	Wilk <i>et al.</i> , 1996
pMX-HIV-1env (mit Intron)	Nack, U., unveröffentlicht
pMX-HIV-1env-IRES-GFP	Nack, U., unveröffentlicht
pBabe-HIV-1env	Nack, U., unveröffentlicht
pcz-CFG5-IEGF-pL128	Josefowski, K. unveröff.
pcDNA89.6P-syn-CD5-Tmneu	Wagner, R., Regensburg
pcDNA89.6P+Oligo1b	Nack, U., unveröffentlicht
pcDNA89.6P/MluI	Nack, U., unveröffentlicht
pcz-CFG5-IEGF-syn89.6P	Nack, U., unveröffentlicht
pKAHIV89.6P	Nack, U., unveröffentlicht
pMX-IRES-EGFP	Döll, F., unveröffentlicht
UTR-GFP-RRE	Wagner, R., Regensburg
pBAG	Price <i>et al.</i> , 1987
pKex-CD4	Sparacio <i>et al.</i> , 2000

2.6 Primer

BS-5	5'-TCTGAGTCG GAT CCC AAA TGT AAG-3'
BS-8	5'-AAT GAA TAG AAC CAT CAA GGA G-3'
5'-CD4.d2	5'-AGT CGA ATT CAT GAA CCG GGG AGT CCC TTT TAG-3'
3'-CD4.d2	5'-GAT CTC GAG AGC TAG CAC CAC GAT-3'
5'-CD4.d4	5'-AGT CGA ATT CAT GAA CCG GGG AGT CCC TTT TAG-3'
3'-CD4.d4	5'-GAT CTC GAG TGG CTG CAC CGG GGT GGA CCA TG-3'
CD4.d4-EcoRI	5'-ATG CGA ATT CAT GAA CCG GGG AGT CCC TTT TAG-3'
CD4.d4-Mlu3'	5'-GAT CAC GCG TTG GCT GCA CCG GGG TGG ACC ATG-3'
CD4-Xba-5'	5'-GAT CTC TAG AAA GAA AGT GGT GCT GGG C-3'
Env-Mlu-3'	5'-GAT CAC GCG TTC TTT TTT CTC TCT GCA CCA C-3'
gp120-Cla	5'-AGC ATC GAT TCA CAC TGC TCT TTT TTCT CTC TGC ACC ACT C-3'
HIV-Eco	5'-GAT GAA TTC ATG AGA GTG AAG GAG AAA TAT CAG-3'
HIV-Xho	5'-GAT CTC GAG ACA GAA AAA TTG TGG GTC ACA GTC-3'
HSE1	5'-AGC TTG GCC CAG CCG GCC G-3'
HSE2	5'-AAT TCG GCC GGC TGG GCC A-3'
5'-mycHIS	5'-GAT CAT CGA TGA ACA AAA ACT CAT CTC AG-3'
3'-mycHIS	5'-GAT CGC GGC CGC TAG CGT GTG ATG GTG ATG-3'
Mlu-Xba-L-antisense	5'-CGC GTG GCG GAG GCG GTT CTG GTG GCG GTG GCT CCG GCG GTG GTG GCG GTT-3'
Mlu-Xba-I-sense	5'-GAT CAA CCG CCA CCG CCG GAG CCA CCG CCA CCA GAA CCG CCT CCG CCA-3'
5'-MLV-Hind	5'-GATCAA GCT TGT GCA CAA GT-3'
3'-MLV-Sfi	5'-GAT CGG CCA TGG GGG CCC GG-3'
Not-Cla-CD4.d4-3'	5'-GAT CGC GGC CGC ATT ATC GAT TGG CTG CAC CGG GGT GGA CCA TGT G-3'

2.7 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien liefern die Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg). Die Radiochemikalien werden von der Firma Amersham/Pharmacia (Braunschweig) bezogen.

2.8 Verbrauchsmaterialien

DEPC	AppliChem, Darmstadt
DNA-Marker, 1 kb □	Gibco, Eggenstein
DNA-Oligonucleotide	MWG Biotech, Ebersberg
ECL	Amersham/Pharmacia, Braunschweig
Endotoxinfreie Plasmidpräparation	Qiagen, Hilden
ELISA-Platten	Greiner, Frickenhausen
Glasgeräte (Labor)	Schott, Mainz
Hybridisierungslösung	Ambion, Milton Abingdon
Kryoröhrchen (1,8 ml)	Nunc, Idstein
Lektinol	Madaus, Köln
Mikrotiterplatten	Greiner, Frickenhausen
Minipräparationskit	Macherie und Nagel
Nitrocellulosemembran (0,45 und 0,22µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
PCR Reinigungs Kit	Qiagen, Hilden
Pipettenspitzen (0,1 bis 1000 µm)	Greiner, Frickenhausen
Plasmid DNA Isolierung	Qiagen, Hilden
Proteinmarker (prestained)	Invitrogen, Groningen
RNA Isolierung	Peqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs, Schwalbach und Boehringer, Mannheim
Röntgenfilm Fujifilm Super RX	Fuji
Röntgenfilm Hyperfilm MP	Amersham, Braunschweig
Rotiszint eco plus	Roth, Karlsruhe
Skalpell	Swann-Morton, Sheffield, England
Spritzen, steril (1 bis 50 ml)	Dahlhausen, Köln
Spritzenvorsatzfilter, steril, 0,22 µm und 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Staphylococcus Enterotoxin B	Sigma, Deisenhofen
StripAble DNA probe Kit	Ambion, Milton Abingdon
Superfect	Qiagen, Hilden
Whatmannpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Qiaquick Gel Extraktions Kit	Qiagen, Hilden

Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur werden von den Firmen Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Becton Dickinson (Heidelberg) oder Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen.

2.9 Geräte

Analysenwaage PM 4600	Mettler
Autoklav	Tuttnauer, Wettenberg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Elektrophoreseappatur Mini-Protean-II	BioRad, München
Elektrotransferapparatur, Trans-Blot-SD-SemiDry	BioRad, München
ELISA-Messgerät (340 ATTC)	MWG Biotech, Ebersberg
Entwicklermaschine Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch
FACSort	Beckton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop, Nikon TE 300	Nikon, Düsseldorf
Glasgeräte	Schott, Mainz
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen
Laborzentrifuge Varit K	Heraeus, Hanau
„liquid scintillation analyser“	Canberra Pakard, Frankfurt
Luminometer LB 96 P	Perkin Elmer, Freiburg
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe
Mikropipetten	Eppendorf, Hamburg
	Gilson, Villiers Le Bel (Frankreich)
Mikroskop Nikon TS 100	Nikon, Düsseldorf
Milli-Q-Wasserreinigungssystem	Millipore, Eschborn
PCR-Gerät	Biometra, Göttingen
pH-Messgerät	Hanna
Phosphoimager FX	BioRad, München
Pipettierhilfe Pipettus, elektrisch	IBS
Screen Eraser K	BioRad, München
Schüttler	E. Bühler, Tübingen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge, Beckmann L8-80M	Beckmann, USA

Videokamera, GelDoc 2000

BioRad, München

Vortex-Labormischer

Heidolph, Deutschland

Wasserbad

BFL, Burgwedel

Zentrifuge Beckmann Avanti J-25

Beckmann, USA

Zellzähler

Couter Electronics

3 Methoden

3.1 Allgemeine Methoden der Zellkultur

Materialien

Die in der Zellkultur eingesetzten Materialien und Geräte, die mit Zellen in Berührung kommen, werden entweder steril bezogen oder durch Autoklavieren (121°C, 2 bar, 20 min) oder durch Behandlung mit 45 % (v/v) i-Propanol sterilisiert.

3.1.1 Oft benötigte Lösungen und Medienzusätze

Alle Reagenzien werden in reiner Form beziehungsweise mit dem Hinweis „zellkulturgetestet“ verwendet.

PBS 140,0 mM NaCl; 3,0 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄;
1,5 mM KH₂PO₄;

Trypanblau 0,5 % (w/v) Trypanblau, 9,0 % (w/v) NaCl

Glutamin 200 mM Stammlösung, 2 mM eingesetzt

Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 % (w/v) Trypsin / 0,02 % (w/v) EDTA

Penicillin/Streptomycin 10000 U Penicillin/ml, 100 U/ml eingesetzt
10000 µg Streptomycin/ml, 100 µg/ml eingesetzt

G 418 (Neomycin) Stammlösung 50,7 mg/ml (Roche, Penzberg)

Hygromycin Stammlösung 50 mg/ml (Roche, Penzberg)

Puromycin Stammlösung 2,5 mg/ml (Roche, Penzberg)

3.1.2 Medien für die Zellkultivierung

DMEM-Komplettmedium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS;

RPMI-Komplettmedium 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FCS;

FCS

Das verwendete Serum wird vor Verwendung durch eine 30 Minuten dauernde Inkubation bei 56 °C hitzeinaktiviert. Nach Portionierung in sterile 50 ml Röhren wird es bis zum Gebrauch bei –20°C gelagert. Im Komplettmedium wird 10 % FCS eingesetzt.

3.1.3 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zellen werden im Inkubator bei 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Der CO₂-Gehalt richtet sich nach dem verwendeten Medium und beträgt 10% (v/v) bei RPMI und 5% (v/v) bei DMEM Medium. Das Kulturmedium wird alle zwei bis drei Tage durch frisches Medium ersetzt. Bilden adhärent wachsende Zellen einen geschlossenen Zellrasen, erfolgt die Subkultivierung.

3.1.4 Subkultivierung adhärent wachsender Zellen

Lösungen und Materialien:

- PBS
- Trypsin/EDTA-Lösung
- Zellkulturmedium
- Zellkulturgefäße

Durchführung:

Das Kulturmedium wird entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Trypsin/EDTA wird auf der Zelloberfläche gleichmäßig verteilt und überschüssige Lösung sofort wieder abgezogen. Das Ablösen der Zellen wird mikroskopisch verfolgt und die vollständig suspendierten Zellen werden in Kulturmedium aufgenommen. Für eine Neuaussaat wird ein Teil der Zellsuspension verwendet.

3.1.5 Subkultivierung von Suspensionszellen

Lösungen und Materialien:

- PBS
- Zellkulturmedium
- Zellkulturgefäße

Durchführung:

Die Zellsuspension wird für 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit PBS gewaschen, wodurch tote Zellen entfernt werden und anschließend in Kulturmedium aufgenommen. Für eine Neuaussaat wird ein Teil der Zellsuspension verwendet.

3.1.6 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen [Doyle & Morris, 1988]

Lösungen und Materialien:

- Lagermedium: 10% (v/v) DMSO in FCS, 4°C
- Kulturmedium, 37°C
- Kryoröhrchen (1,8 ml)

Durchführung:

Kryokonservierung:

0,5 ml auf Eis vorgekühltes Lagermedium werden in ein Kryoröhrchen vorgelegt und die nach Trypsinierung erhaltene Zellsuspension mit 10 % DMSO + FCS auf einen Titer von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 ml Zellsuspension je Kryoröhrchen werden 1×10^6 Zellen/ml in 10 % DMSO in FCS eingefroren. Die Kryoröhrchen werden in einer Kryobox über Nacht bei -80°C eingefroren und anschließend in der Gasphase über flüssigem Stickstoff bei -120°C gelagert.

Auftauen:

Beim Auftauen von Zellen ist auf zügiges Entfernen des DMSO zu achten. Hierzu werden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37°C bis zum Verschwinden des letzten Eisrestes inkubiert und der Inhalt mit 1 ml vorgewärmtem Kulturmedium versehen. Anschließend wird das Volumen in einem Zentrifugenröhrchen (15 ml) mit Medium auf 10 ml ergänzt. Die Zellen werden zentrifugiert (5 min, 1000 rpm), in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturgefäßen ausgesät.

3.1.7 Sterilttest auf Mycoplasmen

Lösungen:

- PBS
- Methanol, 4°C
- DAPI-Lösung: 60 nM DAPI in Methanol, 4°C

Durchführung:

Das Medium wird abgezogen, die zu untersuchende Kultur einmal mit PBS gewaschen und 15 min mit 0,2 ml/cm² Methanol fixiert. Der Zellrasen wird für 15 min mit 0,2 ml/cm² DAPI-Lösung gefärbt, die Lösung entfernt und einmal mit PBS gewaschen. Die mit PBS befeuchtete Kultur wird unter dem Fluoreszenzmikroskop mit einem 40x Objektiv bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm untersucht. Vorhandene Mycoplasmen sind als gleichmäßig geformte, kleine, hell leuchtende Punkte im Zytosol erkennbar und unterscheiden sich von den angefärbten Zellkernen deutlich durch ihre Größe.

3.1.8 Kalzium-Phosphat-Transfektion

Lösungen:

- Lösung A: 0,5 M CaCl₂; 0,1 M HEPES; pH 6,95 mit NaOH einstellen;
- Lösung B: 0,28 M NaCl; 0,05 M HEPES; 0,75 mM Na₂HPO₄; 0,75 mM NaH₂PO₄;
Beide Lösungen müssen für den Zellkulturgebrauch sterilfiltriert werden.

Durchführung:

Einen Tag vor der Transfektion werden 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen in neue Kulturschalen ausgebracht, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70 % erreicht haben. In diesen 10 cm Zellkulturschalen werden die Zellen mit 6 ml Komplettmedium versehen. 10 µg DNA und 240 µl steriles Wasser werden gemischt, mit 240 µl Lösung A versetzt und der Reaktionsansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 480 µl Lösung B werden tropfenweise und unter vortexen hinzupipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Präzipitatbildung wird das Transfektionsgemisch tropfenweise in das Kulturmedium gegeben und es folgt eine Inkubation bei 37 °C von 6 - 12 Stunden. Anschließend werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Komplettmedium versorgt.

3.1.9 Superfect Transfektion

Lösungen:

- Superfect™ (Qiagen, Hilden)
- Plasmid-DNA

Durchführung:

Je nach Zelltyp werden am Vortag der Transfektion 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgebracht. Reichen kleinere Mengen an transfizierten Zellen aus, so können $0,5-5 \times 10^5$ Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät werden. 10 µg Gesamt-DNA wird pro Transfektionsansatz und 10 cm Zellkulturschale vorgelegt und mit 300 µl Kulturmedium (ohne Antibiotika- und ohne FCS-Zusätze) versehen. 60 µl Superfect werden zugegeben und der Ansatz wird gemischt. Für eine 6-Loch-Platte genügen 2 µg DNA und 100 µl Medium ohne Zusätze, sowie 20 µl Superfect. Die Mischung bleibt 5–10 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Anschließend folgt die Zugabe von 3 ml Komplettmedium für den größeren Transfektionsansatz oder 600 µl Komplettmedium im Fall der 6-Loch-Platte. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wird abgenommen und durch den Transfektionsansatz ersetzt. Die Inkubationszeit beträgt 2–3 Stunden bei 37°C. Im Anschluss werden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Komplettmedium versorgt.

3.1.10 Transduktion mit retroviralen Vektoren

Material:

- 0,45 µm Filter (steril)

Durchführung:

Am Tag vor der Transduktion werden je nach Zelltyp 2–5 x 10⁵ Zellen in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Zur Transduktion wird der Kulturüberstand von vektorproduzierenden Zellen mit einer Spritze aufgezogen, durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und auf die zu transduzierenden Zellen gegeben. Die Dauer der Inkubation beträgt 6 bis 12 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Anschließend folgt ein Medienwechsel mit frischem Komplettmedium.

3.1.11 Spin-Filtration zur Anreicherung von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren (Thaler *et al*, 2001)

Material:

- Sterilfilter (0,45 µm)
- Viva-spin Filter

Durchführung:

Die Konzentrierung der Vektorüberstände erfolgt mit Viva-spin-Filtern. Das Prinzip des Filters beruht auf dem Durchlaufen von Medium und Proteinen, die ein geringeres Molekulargewicht als 100000 kD besitzen, und dem Zurückhalten der Viruspartikel. Für die Anreicherung wird die Verpackungszelllinie FLY-HIV-87-LacZ in 750 ml Zellkulturschalen kultiviert, bis die Zellen konfluent sind. 16 Stunden vor Ernten der Viruspartikel wird das FCS-haltige Kulturmedium durch FCS-freies und 1 % L-Glutamin-haltiges DMEM ersetzt. 500 ml serumfreie Vektorüberstände werden sterilfiltriert und auf Viva-spin-Filter überführt. Die Zentrifugation der Überstände bei 3000 rpm und 4°C dauert solange an, bis das Restvolumen im Filter 1 ml beträgt.

3.2 Allgemeine proteinchemische Methoden

3.2.1 Ansetzen oft benötigter Lösungen

Bei proteinchemischen Verfahren werden Chemikalien in reiner Form verwendet. Das Ansetzen der Lösungen erfolgt, falls nicht anders darauf hingewiesen, in bidestilliertem Wasser.

PBS 140,0 mM NaCl; 3,0 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄;

100mM Tris/HCl, pH 8,5

Es werden 6,06 g Tris in 400 ml Wasser gelöst, der pH-Wert mit konzentrierter Salzsäure auf 8,5 eingestellt und das Volumen auf 500 ml ergänzt.

3.2.2 Zellernte und Zellaufschluss

Lösung:

- Lysispuffer: 1 % NP 40; 50 mM Tris HCl, pH 7,5; 5 mM EGTA; 150mM NaCl;
 Proteaseinhibitoren frisch zugeben:
 0,5 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin; 100µM Pefabloc (PMSF);

Material:

- sterile Zellschaber
- vorgekühlte Reaktionsgefäße

Durchführung:

Der Zellrasen wird einmal mit PBS gewaschen. Pro Vertiefung einer 6 Loch-Zellkulturplatte werden 100 µl Lysispuffer zugegeben, während auf einer 10 cm Zellkulturschale 500 µl Lysispuffer verteilt werden. Nach kurzer Inkubationszeit werden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gekühlt. Es folgt eine 15 minütige Zentrifugation bei 10000 rpm und 4°C. Ein Teil des Überstandes wird zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt, während das restliche Zelllysate in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verbraucht wird.

3.2.3 Kolorimetrische Proteinbestimmung nach Bradford

Material:

- Farbkonzentrat der Firma BioRad, München

Durchführung:

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge wird mit Hilfe des Farbkonzentrats der Firma BioRad durchgeführt. Dazu wird das Reagenz 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und zu 5µl Zellysat gegeben. Nach 5 minütiger Inkubation erfolgt die Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 595nm. Die Konzentration der Proben wird anhand einer Standard-Eichkurve ermittelt.

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Lösungen:

- 70 % (v/v) Ethanol
- SDS-Gelelektrophoresepuffer: 250 mM Glycin; 0,1 % SDS; 25 mM Tris-HCl
- Acrylamidlösung: 30 % Acrylamid; 0,8 % Bisacrylamid
- 10 % APS
- TEMED
- Trenngelpuffer: 0,1 % (w/v) SDS; 375 mM Tris-HCl pH 8,8
- Sammelgelpuffer: 0,1 % (w/v) SDS; 125 mM Tris-HCl pH 6,8
- Zusammensetzung des Trenngels:

	7,5 %	10 %	12,5 %
Trenngelpuffer	2 ml	2 ml	2 ml
Acrylamidlösung	2 ml	2,66 ml	3,32 ml
Wasser	4 ml	3,32 ml	2,66 ml
10 % APS	30µl	30µl	30µl
TEMED	10µl	10µl	10µl

- Zusammensetzung des Sammelgels:

Sammelgelpuffer	1 ml
Acrylamidlösung	400 µl
Wasser	2,6 ml
10 % APS	15 µl
TEMED	5 µl

- 4x Probenauftragspuffer: 50 % Glycerin; 10 % SDS;
(reduzierend) 0,005 % Bromphenolblau;
312,5 mM Tris-HCl, pH 6,8;
5 % β-Mercaptoethanol
- prestained Proteinmarker; Zusammensetzung des Molmassenstandards:
176,5; 113,7; 80,9; 63,8 (rot gefärbt); 49,5; 37,4 kD.

Durchführung:

Die Bauteile der Mini-Protean-II-Elektrophoreseapparatur, die mit der Gellösung in Kontakt kommen, werden mit 70 % (v/v) Ethanol, p.A. fettfrei gereinigt. Der Zusammenbau des Gelgießstandes erfolgt nach Herstellerangaben. Die SDS-Polyacrylamidgele werden in einer Stärke von 0,75 mm hergestellt. Nach Einfüllen der Trenngellösung erfolgt Überschichten mit Wasser bis die Polymerisation abgeschlossen ist (Dauer ca. 1 Stunde). Anschließend wird das Wasser entfernt und das Sammelgel gegossen. Der Probenkamm wird nun luftblasenfrei in das Sammelgel eingesetzt. Nach einer Polymerisationsdauer von etwa 45 min wird der Probenkamm vorsichtig entfernt und die Taschen, sowie die untere Gelseite mit bidestiliertem Wasser gespült. Die Elektrophoreseapparatur wird nach Herstellerangaben zusammengebaut, anschließend wird das innere Reservoir (Kathodenkammer) mit SDS-Gelelektrophoresepuffer befüllt, bei dichter Appatur wird auch das äußere Reservoir (Anodenkammer) befüllt. Mittels einer Pasteurpipette werden sämtliche Luftblasen entfernt.

Die Vorbereitung der Proben wird auf Eis durchgeführt. Zuerst erfolgt die Proteinkonzentrationsmessung nach Bradford. Die vermessenen Proben werden 1:4 mit 4x reduzierenden Probenauftragspuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Jeweils gleiche Proteinmengen werden in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 30 mA pro Gel.

3.2.6 Immunologische Detektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Antikörper und Verdünnungen:

• anti HIV-1 env:	1. Antikörper	Ziege-anti-HIV-1 gp120	1:2000
	2. Antikörper	Kaninchen-anti-Ziege-HRP	1:30000
• anti HIV-1 rev:	1. Antikörper	Maus-anti-HIV-1 rev	1:2000
	2. Antikörper	Schaf-anti-Maus-HRP	1:10000
• anti HIV-nef:	1. Antikörper	Kaninchen-anti-HIV-1 nef	1:500
	2. Antikörper	Protein A-HRP	1:10000
• anti MLV env:	1. Antikörper	Ziege-anti-MLV env	1:2000
	2. Antikörper	Kaninchen-anti-Ziege-HRP	1:30000
• anti MLV gag:	1. Antikörper	Kaninchen-anti-MLV gag	1:5000
	2. Antikörper	Protein A-HRP	1:20000
• anti c-myc:	1. Antikörper	Maus-anti-human-c-myc	1:250
	2. Antikörper	Schaf-anti-Maus-HRP	1:4000
• anti GFP:	1. Antikörper	Kaninchen-anti-GFP	1:100
	2. Antikörper	Protein A-HRP	1:20000

Durchführung:

Sämtliche Schritte werden, sofern nicht gesondert darauf hingewiesen wird, bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt. Nach Beendigung des Elektrotransfers wird die Nitrozellulosemembran in PBS + 0,05 % Tween 20 + 3 % Magermilchpulver für 30 min abgesättigt. Alternativ kann das Absättigen der Membran über Nacht bei 4°C erfolgen. Anschließend wird die Membran 3 x 5 Minuten mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Inkubation mit dem primären Antikörper findet in PBS + 0,05 % Tween 20 + 3 % Magermilchpulver in einem 50 ml Röhrchen auf einem Rollinkubator für zwei Stunden statt. Dabei ist darauf zu achten, dass die proteintragende Seite der Nitrozellulosemembran im Röhrchen nach innen zu liegen kommt. Die Membran wird in gleicher Weise gewaschen. Die

Wahl des sekundären Antikörpers ist abhängig von der Verwendung des primären Antikörpers, die Inkubation beträgt 45 Minuten. Vor der Nachweisreaktion wird die Membran erneut 3 x gewaschen. Die Bindung des HRP-konjugierten Antikörpers wird mit dem ECL-Plus Chemilumineszenzsystem von Amersham nachgewiesen. Dabei wird entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren.

3.2.7 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Lösung:

- „Stripping“ Puffer: 62 mM Tris HCl, pH 6,7; 2 % SDS;
100 mM β -Mercaptoethanol

Durchführung:

Die Nitrozellulosemembran wird mit 20 ml „Stripping“ Puffer für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Alternativ kann die Inkubation für 30 Minuten bei 45°C erfolgen. Anschließend wird die Membran 3 x 10 Minuten mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen und für 30 min mit PBS + 0,05 % Tween 20 + 3 % Magermilchpulver abgesättigt.

3.2.8 Aufreinigung von retroviralen Partikeln durch Ultrazentrifugation

Material:

- 0,45 µm Filter (steril)
- SW 41 Rotor und Beckmann Ultrazentrifuge L8-80M0
- Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (14x89 cm)

Durchführung:

Der Zellkulturüberstand von Vektor oder Virus produzierenden Zellen wird mit Hilfe eines Filters mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und in Polyallomer-Zentrifugenröhrchen (14x89 cm) überführt. Die Röhrchen werden austariert und in den Beckmann-Rotor SW 41 eingesetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass jedes Röhrchen seinen vorgesehenen Platz im Rotor erhält. Die Ultrazentrifugation läuft 2 Stunden bei 35000 rpm und 4°C. Nach dem Lauf ist die Beckmann-Ultrazentrifuge L8-80 mit Desinfektionsmittel zu reinigen. Das Kulturmedium wird vorsichtig abgesaugt und die einzelnen Proben werden für eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese vorbereitet: das unsichtbare Pellet wird in 50 µl 1 x reduzierenden Probenauftragspuffer resuspendiert, 3-5 Minuten bei 95°C denaturiert und bei -80°C gelagert.

3.2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

A. GFP Expression

Material:

- GFP exprimierende Zellen
- 3 % (v/v) Formaldehyd in PBS

Durchführung:

Durchflusszytometriestudien werden hier benutzt, um die Titer der Retroviren in transduzierten Zellen anhand von GFP Expression zu ermitteln. Hierzu werden meist 293 T Zellen mit Proviruskonstrukten und mit verpackbaren GFP-Konstrukten cotransfiziert. Nach Transduktion der Überstände in Zielzellen, kann man die GFP Expression letzterer im FACS analysieren und auf die Titer der Retroviren schließen. Adhärent wachsende Zellen werden mit Trypsin von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst, in Polypropylenröhrchen verteilt, 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert und in 500 µl 3 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Die GFP Expression kann gegen eine negativ Kontrolle direkt im FACSort Gerät als Fluoreszenz im FL-1 Kanal analysiert werden.

B. Nachweis von Oberflächenrezeptoren

Material:

- Zellen
- 0,2 % (w/v) EDTA
- PBS + 1 % (v/v) FCS
- Maus-anti-CXCR4-IgG
- Ziege-anti-Maus-IgG-FITC
- Anti-CD4-IgG-PE

Durchführung:

Adhärent wachsende Zellen werden mit 0,2 % (w/v) EDTA von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst. Bei Suspensionszellen entfällt dieser Schritt. Mit Hilfe eines Zellzählers wird die Zellzahl bestimmt und 1×10^6 Zellen werden pro Ansatz auf 5 ml Polypropylenröhrchen verteilt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 1000 rpm für 5 Minuten. Der primäre Antikörper Maus-anti-CXCR4-IgG wird 1:50 verdünnt in PBS + 1 % (v/v) FCS mit den Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Waschen werden 2 ml PBS zugegeben und die Zellen wie bereits erwähnt zentrifugiert. Der sekundäre Antikörper Ziege-anti-Maus-IgG ist mit Fluorescein (FITC) markiert und muss 1:50 verdünnt eingesetzt werden. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis und einem Waschschrift können die Zellen im FACSort auf ihre CXCR4 Expression hin analysiert werden. Findet eine Zweifachfärbung statt, so kommt im nächsten Schritt zum Beispiel ein 1:50 verdünnter anti-CD4-PE Antikörper zum Einsatz. Letzterer ist bereits Phycoerythrin (PE) gekoppelt und benötigt keinen sekundären Antikörper. Die Inkubation beträgt erneut 30 Minuten auf Eis und ist gefolgt von einem Waschschrift. Die Zellen werden am Schluss in 500 µl PBS + 1 % (v/v) FCS aufgenommen und im FACSort analysiert.

3.2.10 X-Gal-Färbung

Lösungen:

- Fixierlösung: 0,05 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS
- Färbelösung: 5 mM $K_3Fe(CN)_6$; 5 mM $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$; 1 mM $MgCl_2$ in PBS
- 100mg/ml X-Gal in Dimethylformamid (DMF)

Durchführung:

Die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale werden 1 x mit PBS gewaschen und mit 2 ml 0,05 % (v/v) Glutaraldehyd für 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Der Zellrasen wird nun 3 x vorsichtig mit PBS gewaschen, um die Fixierlösung vollständig zu entfernen. 10 µl X-Gal und 1 ml Färbelösung werden gemischt, auf die Zellen gegeben und 1 bis 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wird der Zellrasen 1 x mit PBS gewaschen. Die Zellen können im Durchlichtmikroskop angeschaut und blaue Zellkerne ausgezählt werden. Die Platte lässt sich für eine Auswertung zu einem späteren Zeitpunkt bei 4°C lagern.

3.2.11 Neutralisierungs-Assay

3.2.11.1 Sammeln der CD4-gp120 Fusionsproteine

Materialien:

- 293 T Zellen
- Plasmid-DNA der Fusionsproteine
- sterile Filter (0,45µm)

Durchführung:

Einen Tag vor der Transfektion werden 1×10^6 293T Zellen ausgesät. Die Transfektion wird mit der Plasmid-DNA der Fusionsproteine und mit Superfect ausgeführt. Nach 72 stündiger Kultivierung wird der Kulturüberstand sterilfiltriert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgt bei -80°C . Die Proteinexpression wird im SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

3.2.11.2 Anlegen eines Vorrats an MLV/HIV-1-Vektorpartikeln

Materialien:

- B6-128-17 Zellen
- sterile Filter (0,45µm)

Durchführung:

Bei B6-128-17 Zellen handelt es sich um eine Verpackungszelllinie, die stabil MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren herstellt. Diese Vektoren verpacken das β -Galactosidase-Gen und übertragen es auf CD4/CXCR4 positive Zielzellen. B6-128-17 Zellen werden 24 Stunden vor dem Anlegen eines Vektorstocks in G418-freien Kompletmedium kultiviert. Das Kulturmedium wird sterilfiltriert, aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C . Zur Titerbestimmung werden 5×10^4 NIH 3T3 CD4/CXCR4 pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgebracht. Nach 24 Stunden werden diese Zellen mit verschiedenen Verdünnungen der B6-128-17 Kulturüberständen transduziert und 48 Stunden kultiviert. Im Anschluss daran findet eine X-Gal-Färbung statt.

3.2.11.3 β -Galactosidase-Assay

Materialien:

- HeLa CD4
- Zellkulturüberstände der Fusionsproteine
- MLV/HIV-1Vektorpartikel mit verpackbarem lac-Z-Gen
- Mikrotiterplatte Lumitrac 200 (Dynex)
- sterile Zellschaber
- 1 x PBS
- Lysispuffer: 25 mM Glycylglycin pH 7,8; 1 mM DTT; 15 % (v/v) Glycerin;
8 mM MgSO₄; 1 mM EDTA; 1 % (v/v) Triton X-100;
Kurz vor Gebrauch erfolgt die Zugabe von DTT (1:1000).
- Reaktionspuffer: 1M MgCl₂; 0,5 M NaPo₄ pH8,0; 100 fach Galacton;
Der Reaktionspuffer wird vor Gebrauch frisch angesetzt.
- Amplifierer: 5 M NaOH; 10 fach Amplifierer (Emerald)

Durchführung:

8 x 10⁴ HeLa CD4 Zellen werden pro Vertiefung zweier 12-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag werden entweder 200 μ l der Fusionsproteine, 200 μ l Medium als negativ Kontrolle oder 200 μ l Medium für die positiv Kontrolle pro Vertiefung zugegeben. Die Ansätze werden in Triplets durchgeführt. Nach einer Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 37°C werden 20 μ l des MLV/ HIV-1 Vektorüberstands in alle Vertiefungen der 6-Loch-Platte gegeben, außer in die Vertiefungen der negativ Kontrolle, die unbehandelte Zellen enthalten. Die Inkubationsdauer beträgt zunächst eine Stunde bei 37°C, es folgt die Zugabe von 1 ml Kompletmedium pro Vertiefung und eine Verlängerung der Inkubationszeit über Nacht. Das Medium wird am nächsten Tag durch 1 ml Kompletmedium ersetzt. Die β -Galactosidase-Enzymaktivität wird 48 Stunden nach der Transduktion mit Virus durchgeführt. Die Zellen werden 2 x mit 1 x PBS gewaschen, anschließend verbleibt 1 ml 1 x PBS auf den Zellen. Diese werden mit sterilen Zellschabern abgeschabt, in frische Reaktionsgefäße überführt und 5 Minuten bei 3000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 50 μ l Lysispuffer 10 min auf Eis inkubiert. Die Zentrifugation des Zelllysates dauert 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C. Der Überstand kann bereits an dieser Stelle bei -20°C gelagert werden oder für die Reaktion eingesetzt werden. In eine spezielle Mikrotiterplatte werden pro Ansatz 33,3 μ l Reaktionspuffer vorgelegt und mit 3,3 μ l Überstand für 1 Stunde in Dunkelheit bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. In der Zwischenzeit wird das Luminometer vorbereitet. Zur Messung fügt das Luminometer automatisch etwa 60 µl Amplifier der β -Galactosidase-Reaktion hinzu. Die Daten werden in Triplets ermittelt und auf die Proteinkonzentration der Proben bezogen.

3.3 Gentechnische Methoden

3.3.1 Ansetzen oft benötigter Lösungen

LB-Medium: 1 % (w/v) NaCl; 1 % (w/v) Trypton;
0,5 % (w/v) Hefeextrakt pH 7,0;

Die Komponenten liegen als Gemisch von Gibco vor werden mit Wasser gemischt und autoklaviert. Die Lagerung der Lösung erfolgt bei 4°C.

LB-Agar:

LB-Agar nach Herstellerangaben (Gibco) ansetzen und autoklavieren. Anschließend Agar im Wasserbad auf 60°C temperieren, Ampicillin (Konzentration: 100 mg/ml) 1:1000 verdünnt zugeben und den Agar in Platten gießen. Die Lagerung der Platten erfolgt bei 4°C.

3.3.2 Herstellung kompetenter *E.coli* Zellen

Lösungen:

- Lösung 1: 100 mM RbCl₂; 50 mM MnCl₂; 30 mM KOAc; 10 mM CaCl₂;
13 % (v/v) Glycerin;
pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen (ca. 3 ml);
- Lösung 2: 10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl₂; 75 mM CaCl₂;
13 % (v/v) Glycerin;
pH 7,0 mit NaOH einstellen (ca. 25 µl 10 N NaOH);

Die Lösungen werden sterilfiltriert und sollen nicht autoklaviert werden!

- flüssiger Stickstoff

Durchführung:

Es wird eine Übernachtskultur bei 37°C von 100 µl kompetenten *E.coli* Zellen in 50 ml LB-Medium angesetzt. Diese wird 1:100 in LB-Medium verdünnt (2 ml Bakteriensuspension + 200 ml LB-Medium) und bis zu einer OD von 0,48-0,5 bei einer Wellenlänge von 600 nm

weiter kultiviert. Die Bakterienkultur wird auf Eis abgekühlt und 10 Minuten bei 2200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Resuspension der Zellen erfolgt mit 67 ml eiskalter Lösung 1. Es folgt eine Inkubation auf Eis für 1-2 Stunden. Anschließend wird die Suspension wie oben beschrieben zentrifugiert und das Bakterienpellet in 5 ml Lösung 2 resuspendiert. Die Zellen werden in Aliquots von 100 µl in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Stamm	Genotyp	Referenz
XL-1 Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F'proAB lacI ^q Z ^Δ M15 Tn10 (Tet ^r)	Stratagene, Heidelberg
Sure	e14 ⁻ (McrA ⁻)(mcrCB-hsdSMR-mrr)121endA1supE44 thi-1gyrA96relA1lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan ^r) uvcC [F'proAB lacI ^q Z ^Δ M15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene, Heidelberg

Die Abkürzungen der Genotypen beziehen sich auf die Nomenklatur von Bachmann [Bachmann, 1990]. Plasmidhaltige Bakterien werden über Nacht bei 37°C und 220 rpm in LB-Medium mit Antibiotikazusatz angezogen. Hierfür werden 100 µg Ampicillin/ml Medium zugesetzt. Die langfristige Lagerung von plasmidhaltigen Bakterienstämmen erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 10 % Glycerin.

3.3.4 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli*

Material:

- Kompetente *E.coli*
- LB-Medium
- LB-Amp-Platten

Durchführung:

Kompetente *E.coli* –Zellen werden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension werden mit 10-100 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz vermischt und 30 Minuten auf Eis

inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C mit anschließender 2 minütiger Inkubation auf Eis. Den Transformationsansätzen werden 500µl LB-Medium ohne Antibiotikazugabe hinzugefügt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach werden die Bakterien auf ampicillinhaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Für die Plasmidisolation im präparativen Maßstab erfolgt am nächsten Tag das Picken einer Kolonie von der LB-Platte und die Anzucht in 200-300 ml ampicillinhaltigen LB-Medium wiederum über Nacht. Zur Plasmidisolierung im analytischen Maßstab werden 10-20 Kolonien von der LB-Platte genommen und in jeweils 2 ml ampicillinhaltigen LB-Medium über Nacht angezogen.

3.3.5 Plasmidisolierung aus *E.coli* in präparativen Maßstab nach Qiagen

Material:

- 200-300 ml Bakteriensuspension
- Qiagen Maxi Kit
- 100 % Isopropanol
- 70 % Ethanol
- Beckmann Avanti J-25 Zentrifuge mit Einsätzen

Durchführung:

200-300 ml Bakteriensuspension, die über Nacht gewachsen war, werden 10 Minuten bei 4°C und 3500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 10 ml RNase-haltigen Puffer P1 resuspendiert und nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 vorsichtig gemischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Zugabe von 10 ml Puffer P3 neutralisiert das Lysat nach kräftigen Schütteln für 20 Minuten auf Eis. Das Entfernen der Zelltrümmer erfolgt durch eine 30 Minuten andauernde Zentrifugation bei 20000 x g und 4°C. Währenddessen wird eine Qiagen Säule mit 10 ml Puffer QBT äquilibriert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand auf die Säule gegeben und durchläuft mittels Gravitationskraft die Säule. Zwei Waschschriffe folgen mit jeweils 30 ml Puffer QC, im Anschluss wird die Plasmid-DNA mit Puffer QF eluiert. Das Ausfällen der DNA erfolgt durch Zugabe von 10,5 ml 100 % Isopropanol mit nachgeschalteter Zentrifugation bei 15000 x g für 30 Minuten bei 4°C. Die präzipitierte DNA wird mit 70 % Ethanol p.A. gewaschen und erneut 10 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Nachdem die Plasmid-DNA luftgetrocknet ist, wird sie in 100-500µl destillierten Wasser ausgenommen und bei -20°C gelagert.

3.3.6 Plasmisolisierung im analytischen Maßstab

Material:

- Minipräparationskit (Macherie und Nagel)
- 2 ml Bakteriensuspension
- Oder:
 - Puffer 1: 50 mM Tris HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 ml/l RNase A
 - Puffer 2: 200 mM NaOH; 1 % SDS
 - Puffer 3: 3 M Kaliumacetat pH 5,5 mit Eisessig
 - 6 M Guanidiniumisothiocyanat
 - eiskaltes Butanol
 - 70 % (v/v) Ethanol

Durchführung:

Die Durchführung des Minipräparationskits der Firma Macherie und Nagel entspricht den Herstellerangaben. Alternativ steht die Isolation von Mini-DNA mit 6 M Guanidiniumisothiocyanat zur Verfügung (Nelson *et.al.*, 1992):

Für die ersten Schritte werden die Puffer 1, 2 und 3 des Qiagen Plasmid Maxi-Kits verwendet. Einzelkolonien von *E.coli* werden in 2 ml antibiotikahaltigen LB-Medium inokuliert und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Davon werden 1,5 ml abgenommen, 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und die Zellen in 50 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl Puffer 2 folgt eine 5 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend werden 75 µl kalter Puffer 3 hinzugegeben, gefolgt von kräftigem Schütteln und einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis. Die Lösung wird 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Währenddessen werden pro Ansatz 330 µl Guanidiniumisothiocyanat in frische Reaktionsgefäße vorgelegt und der klare Überstand nach Zentrifugation zugesetzt. 450 µl eiskaltes Butanol werden den Fällungsansätzen hinzugefügt und erneut 10 Minuten bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wird mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 3 Minuten bei 14000 rpm, 4°C zentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl destilliertem Wasser aufgenommen.

3.3.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen bedient man sich einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Hierzu wird die DNA-Lösung 1:100 verdünnt und gegen Wasser als Referenz gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei 50 µg/ml Doppelstrang-DNA, 40 µg/ml Einzelstrang-DNA oder 20 µg/ml Oligonucleotid. Der Quotient aus der OD_{260} und OD_{280} gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA, da Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol bei einer Wellenlänge von 280 nm stärker absorbieren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten größer als 1,8.

3.3.8 Restriktion von DNA mit Endonucleasen

Material:

- Plasmid-DNA
- Restriktionsendonucleasen und Puffer
- destilliertes Wasser
- Heizblock

Durchführung:

Die Restriktion von Plasmid-DNA wird mit Restriktionsendonucleasen in speziellen Puffern durchgeführt. Diese spalten die DNA an spezifischen Stellen, so dass stumpfe oder überhängende DNA-Enden entstehen. Im Agarosegel zeigt die restringierte DNA ein charakteristisches reproduzierbares Muster. Die Spaltung wird nach den empfohlenen Bedingungen des Herstellers durchgeführt. Dabei werden pro µg DNA 1-5 U Restriktionsendonuclease eingesetzt. Die Inkubationszeit beträgt meist 1-2 Stunden bei der für die Endonuclease optimalen Temperatur (meist 37°C).

3.3.9 Agarosegelelektrophorese

Material:

- Plasmid-DNA
- Probenauftragspuffer: 30 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
- 1 kb λ -DNA-Leiter: 10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,5; 1,0; 0,5 kb;
- TAE-Laufpuffer: 40 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0 mit Essigsäure eingestellt
- Agarosegelgießvorrichtung
- Agarosegelapparatur

Durchführung:

Beim Agarosegelelektrophorese handelt es sich um ein kontinuierliches Trennverfahren, mit dem DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. 0,8–2 % (w/v) Agarose wird in TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und 1:20000 mit Ethidiumbromidlösung versetzt. Als Längenstandard diente die „1 kb λ -DNA-Leiter“. Die DNA-Proben werden vor dem Auftrag in die Geltaschen 1:10 mit Probenauftragspuffer versetzt. Nach erfolgter Elektrophorese bei konstanter Spannung von 60-100 V, werden die DNA-Fragmente im Transilluminator unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und von einer Videokamera fotografiert.

3.3.10 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Material:

- Qiaquick Gel Extraktions Kit

Durchführung:

Die DNA-Fragmente, die zur weiteren Klonierung benötigt werden, werden nach abgeschlossener Agarosegelelektrophorese zügig unter UV-Licht mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die Isolierung der DNA aus dem Gel erfolgt nach Herstellerangaben mit dem Qiaquick Gel Extraktions Kit von Qiagen.

3.3.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Material:

- Restringierte und gereinigte Vektor- und Insert-DNA
- T4-DNA-Ligase
- Ligase-Puffer
- destilliertes Wasser

Durchführung:

Für die Ligation wird Vektor-DNA und Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 1:10 eingesetzt. In einem Agarosegel wird die Konzentration der DNA-Fragmente abgeschätzt und das molare Verhältnis beider Komponenten bestimmt. Die Ligation erfolgt bei 16°C für 2 Stunden oder über Nacht in einem Volumen von 20 µl, in dem 2 µl 10 x Ligasepuffer, 1 µl Ligase sowie Wasser enthalten sind. 10 µl des Ligationsansatzes werden zur Transformation von kompetenten *E.coli* eingesetzt.

3.3.12 Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Material:

- DNA-Matrize
- dNTP (jedes 10 mM)
- sense und antisense Primer (50 pmol/µl)
- 10 x PCR-Puffer
- 25 mM MgCl₂
- destilliertes Wasser
- Taq Polymerase
- gestopfte Pipettenspitzen

Durchführung:

Die Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente findet in einem Reaktionsvolumen von 100 µl statt. Darin enthalten ist eine DNA-Vorlage von weniger als 1 µg pro Reaktion, 1 x PCR-Puffer, 2,5 mM MgCl₂, 200 µM Desoxyribonucleotid-Mix, jeweils 0,5 µM sense und antisense

Oligonucleotidprimer, sowie 2,5 U DNA-Polymerase. Die Denaturierung der DNA-Matrize erfolgt für 1 Minute bei 94°C. Die „Annealing“-Temperatur der Primer liegt 5°C niedriger als deren Schmelztemperatur (meistens zwischen 55-68°C) und wird für 1 Minute gehalten. Die Extensionszeit beträgt 1 Minute bei 72°C, sie wird aber bei PCR-Produkten von mehr als 1 kb Länge um jeweils 1 min pro kb erhöht. In der Regel werden 25-35 Zyklen gefahren. Die PCR endet mit einer 10 minütigen Extension bei 72°C.

3.3.13 Isolierung von DNA aus Zellkulturen

Material:

- Tail-Lysis-Puffer: 100 mM Tris pH8,0; 200 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5 % SDS; 1,0 mg/ml Proteinase K vor Gebrauch frisch zugeben;
- 5M NaCl
- Phenol/Chloroform (2:5)
- 100 % (v/v) Isopropanol
- 70 % (v/v) Ethanol
- TE-Puffer

Durchführung:

Die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale werden mit Trypsin von der Platte abgelöst, zentrifugiert und mit 1 x PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in 500 µl Tail-Lysis-Puffer aufgenommen und über Nacht bei 55°C inkubiert. Anschließend werden 200 µl 5 M NaCl und unter dem Abzug 500 µl Phenol/Chloroform pro Ansatz zugegeben. Die Reaktionsgefäße werden durch Umdrehen 1 Minute gemischt und 10 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Währenddessen werden 360 µl Isopropanol in Reaktionsgefäße vorgelegt. Nach der Zentrifugation werden 600 µl der zähen Flüssigkeit aus der oberen wässrigen Phase in die mit Isopropanol vorbereiteten Gefäße überführt. Zum Durchmischen werden die Reaktionsgefäße mehrmals umgedreht und anschließend für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für jeden Ansatz werden inzwischen 2 Reaktionsgefäße vorbereitet: eines mit 500 µl 70 % Ethanol und ein weiteres mit 400 µl TE-Puffer. Die ausgefällte DNA wird mit Hilfe einer Pipettenspitze aus dem Reaktionsgefäß entnommen, kurz in das mit Ethanol gefüllte Gefäß getaucht und schließlich in TE-Puffer gelöst. Nachdem die Konzentration der einzelnen Proben bestimmt ist, erfolgt die Lagerung bei -20°C.

3.3.14 Isolierung von RNA aus Zellkulturen

Material:

- Peqlab Trifast™
- sterile Zellschaber
- Chloroform
- 100 % (v/v) Isopropanol
- 70 % (v/v) Ethanol
- DEPC-Wasser
- Handschuhe
- gestopfte Pipettenspitzen

Durchführung:

Beim Umgang mit RNA ist darauf zu achten RNase-frei zu arbeiten. Dabei empfiehlt es sich den Arbeitsplatz mit 70 % (v/v) Ethanol zu reinigen, Handschuhe zu tragen und diese beim Arbeiten mehrmals zu wechseln. Die hier verwendeten Plastikmaterialien werden von den Herstellern RNase-frei bezogen.

Das Kulturmedium einer 10 cm Zellkulturplatte wird abgesaugt und 1,5 ml Peqlab Trifast™ Lösung werden auf dem Zellrasen verteilt. Mit Hilfe eines sterilen Zellschabers schabt man die Zellen von der Schale und mischt das Lysat durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette. Das Lysat wird in ein Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. An dieser Stelle des Protokolls kann eine Lagerung des Lysates bei -80°C erfolgen. Nach Zugabe von 0,3 ml Chloroform wird der Ansatz 15 Sekunden kräftig geschüttelt, 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich 5 Minuten bei 12000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Im Anschluss an die Phasentrennung wird die obere wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 0,75 ml Isopropanol versetzt, kurz geschüttelt und 10 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Präzipitat mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol versehen und 10 Minuten bei 12000rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend folgt ein zweiter Waschschrift mit 70 % (v/v) Ethanol und das Trocknen des Präzipitates für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur. Die RNA wird in 30-50 μl DEPC-Wasser aufgenommen und zum vollständigen Lösen 5 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Lagerung der RNA erfolgt bei -80°C . Von mehrmaligem Auftauen und Einfrieren ist abzuraten, da eine Fragmentierung der RNA durch eventuell vorhandene RNasen stattfinden kann. Eine langfristige Lagerung ist in Ethanol möglich.

3.3.15 Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Bestimmung der Konzentration von RNA-Lösungen bedient man sich ebenso wie bei der DNA-Konzentrationsbestimmung einer photometrischen Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Hierzu wird die RNA-Lösung 1:100 verdünnt und gegen Wasser als Referenz gemessen. Dabei bedient man sich einer speziellen Küvette, die ein Volumen von 100 µl erfasst, um den Verbrauch größerer RNA-Mengen zu verhindern. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei 40 µg/ml RNA.

3.3.16 Northern Blot

Sämtliche Lösungen werden mit DEPC-Wasser hergestellt und autoklaviert. Die Arbeiten werden mit Handschuhen durchgeführt, die mehrmals gewechselt werden. Diese Maßnahmen sind erforderlich, da die RNA nicht mit RNasen kontaminiert werden soll.

3.3.16.1 Herstellung von DEPC-Wasser

Lösung:

- DEPC (Aplichem, Darmstadt)
- destilliertes Wasser

Durchführung:

DEPC wird 1:1000 in autoklaviertem Wasser verdünnt, durch kräftiges Schütteln vermischt und 12 Stunden bei Raumtemperatur unter dem Abzug stehen gelassen. Das Wasser wird anschließend autoklaviert, um restliches DEPC zu entfernen.

3.3.16.2 Agarosegelelektrophorese mit RNA

Material:

- Elektrophoreseapparatur, Agarose und Ethidiumbromid
- 0,5 % (w/v) SDS
- 100 % Ethanol
- RNase freies Wasser: DEPC-Wasser
- 5 x RNA-Ladungspuffer: 16 µl gesättigte Bromphenolblau Lösung
80 µl 500 mM EDTA pH 8,0
720 µl 37 % Formaldehyd
2 ml Glycerin
3084 µl Formamid
4 ml 10 x FA-Puffer
100 µl RNase-freies Wasser
- 10 x FA-Puffer: 200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA
- 1 x FA-Puffer: 100 ml 10 x FA-Puffer
20 ml 37 % Formaldehyd
880 ml RNase-freies Wasser
37 % Formaldehyd

Durchführung:

Zunächst wird die Elektrophoreseapparatur für die Benutzung von RNA gereinigt: die Apparatur wird gründlich mit 0,5 % (w/v) SDS gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült, mit 100 % Ethanol geputzt und nochmals mit destilliertem Wasser gespült. Im letzten Schritt folgt ein Spülvorgang mit RNase-freiem Wasser. Für die Elektrophorese wird ein 1,2 % iges Gel gegossen. 1,2 g Agarose werden abgewogen, mit 10 ml 10 x FA Gelpuffer und 100 ml RNase-freiem Wasser versetzt. Die Agarose wird in der Mikrowelle geschmolzen, mit 1,8 ml 37 % Formaldehyd und 1 µl Ethidiumbromid versetzt. Nachdem das Gel gegossen und erkaltet ist, wird es in 1 x FA Gelpuffer für 30 Minuten äquilibriert.

Die RNA-Proben werden folgendermaßen vorbereitet: 10 – 18 µg RNA werden mit 5 x RNA Ladungspuffer versetzt, so dass dieser 1 x konzentriert ist. Die Proben werden 3–5 Minuten bei 65°C inkubiert, auf Eis abgekühlt und auf das Gel geladen. Die Elektrophorese findet bei 60 V in 1 x FA-Laufpuffer statt. Nach fast 2 Stunden ist diese beendet, die 28S rRNA und die 18S rRNA werden im Transilluminator unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und von einer Videokamera fotografiert.

3.3.16.3 RNA-Transfer

Material:

- DEPC-Wasser
- 20 x SSC: 3 M NaCl; 0,3 M Na₃Citrat x 2H₂O; pH 7,0 mit 1 M HCl einstellen
- Hybond-Membran
- Whatmannpapiere
- Papiertücher und Frischhaltefolie

Durchführung:

Das Gel wird nach der Elektrophorese 1 x in DEPC- Wasser gewaschen und 1 x 15 Minuten in 10 x SSC-Puffer. Für den Transfer der RNA wird folgender Blot zusammengebaut: Auf einen Stapel Papiertücher folgen 4 trockene Whatmannpapiere und ein in 20 x SSC getränktes Whatmannpapier. Darauf kommt eine Hybond-Membran zunächst in Wasser befeuchtet und anschließend in 20 x SSC getränkt zu liegen. Das Agarosegel wird bündig aufgelegt, gefolgt von 3 in 20 x SSC getränkten Whatmannpapieren. Über den Stapel wird eine Frischhaltefolie gelegt, in der ein Fenster ausgeschnitten ist, das die Whatmannpapiere frei lässt. Rechts und links neben den Papierstapel werden zwei Puffervorratsgefäße aufgestellt, die 20 x SSC beinhalten. Zwei lange Whatmannpapiere werden so über den Stapel gelegt, dass sie auf beiden Seiten in den Puffer eintauchen und auf den Whatmannpapieren zu liegen kommen. Am Schluss wird eine Plastikfolie über den ganzen Papierstapel gelegt. Der Blot bleibt über Nacht stehen. Das Agarosegel wird nach dem Transfer erneut fotografiert, um den vollständigen Transfer der RNA zu überprüfen.

3.3.16.4 Sonden

1,4 kb MLV env Sonde:

Das Plasmid pSGEA2II/I enthält die komplette Hüllproteinsequenz des MLV. Mit BamHI und Bgl II geschnitten fällt ein 1,4 kb großes MLV env Fragment aus dem Vektor aus (Nucleotide 1822-3060), das zur Hybridisierung im Northern Blot verwendet wird.

3,1 kb HIV-1 env Sonde (T-trop):

Das Expressionsplasmid pL128 HIV-1env wird mit Xho I und Sal I geschnitten, so dass das 3,1 kb große HIV-1 env Fragment entsteht (Nucleotide 0-3100). Es handelt sich hierbei um eine Sonde, die nur T-trope HIV-1 Stämme erkennt.

1,4 kb HIV-1 env Sonde (dualotrop):

Eine EcoRI und Mlu I Restriktion des Plasmids pcDNA89.6P/MluI liefert ein 1,4 kb großes Fragment, das einem Teil des dualotropen HIV-1 entspricht (Nucleotide 1-1480). Diese Sonde ist nur für die Erkennung dualotroper HIV-1 Stämme bestimmt.

3.3.16.5 Hybridisierung

Material:

- Hybridisierungslösung (Ambion)
- Stripable DNA Kit (Ambion)
- DEPC-Wasser
- [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
- Nick columns von Pharmacia
- Rotiszint eco plus (Roth)
- TE-Puffer: 10 mM Tris HCl pH 7,5; 1 mM EDTA
- Waschlösung 1: 2 x SSC + 0,1 % SDS
- Waschlösung 2: 0,1 % SSC + 0,1 % SDS
- Phosphoimager-Filme oder Röntgenfilm

Durchführung:

Im Isotopenlabor wird ein Hybridisierungssofen auf 68°C vorgeheizt. Die Membran wird in ein Glasröhrchen überführt und mit 5-10 ml auf 68°C vorgewärmter Hybridisierungslösung versehen. Die Äquilibrierung der Membran mit Hybridisierungslösung findet für 30-60 Minuten im Hybridisierungssofen bei 68°C statt. Währenddessen wird die DNA-Sonde radioaktiv markiert. Im S1-Labor werden 25 ng der DNA-Sonde in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit DEPC-Wasser auf 9 µl aufgefüllt. Die Denaturierung der DNA-Sonde findet auf einem Heizblock bei 95°C für 5 Minuten statt. Anschließend wird die Sonde in flüssigem Stickstoff oder in einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch schockgefroren, aufgetaut und sofort auf Eis gelegt. Aus dem Stripable DNA Kit werden folgende Komponenten zu der denaturierten Sonde gegeben: 2,5 µl 10 x Decamer-Lösung; 5,0 µl 5 x Puffer –dATP/-dCTP und 2,5 µl 10 x dCTP. Dieser Reaktionsmix wird in der Tischzentrifuge niedergeschlagen und mit 1,0 µl Exonuclease-freiem Klenow-Enzym versetzt. Im Isotopenlabor erfolgt die Zugabe von 5,0 µl [γ -³²P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 nCi/ml) und eine 30 minütige Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1,0 µl 0,5 M EDTA aus dem Kit gestoppt. Zur Bestimmung der Radioaktivität wird 1,0 µl des Reaktionsmixes zu 5 ml Rotiszint eco plus-Lösung gegeben. Zur Reinigung der radioaktiv markierten Sonde werden sogenannte „Nick columns“ der Firma Pharmacia verwendet. Die Durchführung richtet sich nach den Angaben des Herstellers, als Äquilibrierungspuffer kommt TE-Puffer zum Einsatz. Nach der Reinigung der Sonde wird auch hier 1,0 µl zur Bestimmung der Radioaktivität entnommen. Beide Proben, die vor und nach der Reinigung der DNA-Sonde entnommen wurden, werden im „liquid scintillations analyser“ mit Hilfe des Protokolls 3 gemessen. Für die Hybridisierung werden 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung verwendet. Die gereinigte Probe wird 10 Minuten im Wasserbad bei 90°C denaturiert und 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Hybridisierungssofen wird auf 42°C abgekühlt. Die radioaktiv markierte Probe wird zu den 5-10 ml Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung findet über Nacht im Hybridisierungssofen bei 42°C statt. Nach der Inkubation wird die Hybridisierungslösung in den radioaktiven Flüssigabfall geschüttet. Die Membran wird 2 x 5 Minuten mit 2 x SSC + 0,1 % SDS und 2 x 15 Minuten mit 0,1 % SSC + 0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Diese Waschschrirte entfernen ungebundene Sonde von der Membran und verringern so den Hintergrund. Die Membran darf nun nicht mehr austrocknen und wird deshalb zur Detektion der Signale auf ein nasses Filterpapier gelegt, in Folie gewickelt und über Nacht exponiert. Die Exposition findet bei Benutzung eines Phosphoimager-Films bei Raumtemperatur statt oder bei Verwendung herkömmlicher Röntgenfilme bei –80°C statt. Phosphoimager-Filme werden im Phosphoimager gescannt, während Röntgenfilme in der Entwicklermaschine entwickelt werden.

3.3.16.6 Strippen

Material:

- Stripable DNA Kit (Ambion)
- autoklaviertes, destilliertes Wasser
- Frischhaltefolie

Durchführung:

Das Strippen der radioaktiv markierten Membran wird nach Herstellerangaben durchgeführt. Die verschiedenen Lösungen werden jeweils 10 Minuten mit der Membran bei 68°C inkubiert und nach Gebrauch im radioaktiven Flüssigabfall entsorgt. Zur Lagerung wird die Membran in Frischhaltefolie verpackt und bei –20°C im Isotopenlabor aufbewahrt.

3.4 Spezielle gentechnische Methoden

3.4.1 Endotoxinfreie Mega-Plasmidpräparation für die DNA-Vakzinierung

Material:

- endotoxinfreier Mega-Plasmidpräparationskit

Durchführung:

Der Mega-Kit für die endotoxinfreie Plasmidpräparation wird von Qiagen bezogen. Die DNA-Isolierung erfolgt nach den Angaben des Herstellers.

3.4.2 DNA-Vakzinierung

Material:

- endotoxinfreie Plasmid-DNA
- Superfect
- sterile 1 ml Spritzen

Durchführung:

Alle huCD4⁺ transgenen Mäuse, die vakziniert werden sollen, sind gleich alt und haben das gleiche Geschlecht. Zu Beginn der Immunisierung und vor jeder Vakzinierung wird den Mäusen unter Betäubung etwas Blut aus einer Kapillare hinter dem Auge entnommen. Für die DNA-Vakzinierung einer Maus werden 50 µg endotoxinfreie Plasmid-DNA mit 100 µl Superfect gemischt (Verhältnis 1:2) und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Vakzine wird subcutan in den Nacken der Maus injiziert. Die Immunisierung findet 3 mal im Abstand von 10 Tagen statt. Nach 20 Tagen erfolgt eine 4. Vakzinierung mit doppelter DNA-Menge im Verhältnis 1:2 mit Superfect. 5 Wochen nach der letzten Vaccinierung werden die Mäuse unter Betäubung getötet und das Blut aus dem Herzen entnommen.

3.4.3 Gewinnung von Serum aus Vollblut

Lösungen:

- Vollblut
- Natriumacid

Durchführung:

Das Vollblut wird einige Stunden oder über Nacht bei 4°C gelagert. Nach der Blutgerinnung wird das Serum durch 15 minütige Zentrifugation bei 10000rpm und 4°C von den Blutzellen getrennt. Das Serum wird vorsichtig entnommen, mit 0,05 % Natriumacid versetzt und aliquotiert. Ein Aliquot wird bei 4°C gelagert, alle anderen lagern bei -80°C.

4 Ergebnisse

4.1 Expression und Charakterisierung von gp120-CD4-Rezeptor-Fusionsproteinen zur Generierung neutralisierender Antikörper gegen HIV-1

Die Generierung eines Impfstoffes gegen HIV-1 richtet sich unter anderem auf Intermediate, die bei dem Eintritt von HIV-1 in die Zielzelle entstehen (De Vico *et al.*, 1999). Ein solches Intermediat ist der gp120-CD4 Komplex, der bei der Bindung von HIV-1 Hüllglykoprotein an den CD4-Oberflächenrezeptor der Zelle entsteht (Wyatt *et al.*, 1998). Bei dieser Bindung verändert sich die Konformation des HIV-1 Hüllglykoproteins, so dass konservierte Bereiche freigelegt werden. Diese Bereiche können Angriffspunkte für die Herstellung neutralisierender Antikörper sein (Wyatt *et al.*, 1997). Einige wenige Studien haben gezeigt, dass neutralisierende Antikörper generiert werden, sobald Mäuse mit gp120 und CD4 Proteingemischen immunisiert wurden. Allerdings richteten sich diese Antikörper gegen interagierende Bereiche von gp120 und CD4. In dieser Studie sollen gp120-CD4-Fusionsproteine synthetisiert werden, die eine Konformationsänderung durchführen, welche zur Freilegung konservierter Regionen des HIV-1 Hüllproteins führt. In Vakzinierungsstudien in transgenen huCD4⁺ Mäusen soll die Bildung neutralisierender Antikörper untersucht werden.

4.1.1 Konstruktion der gp120-CD4 Fusionsproteine

Die in Abbildung 9 dargestellten gp120-CD4 Fusionsproteine unterscheiden sich hinsichtlich eines Linkers, der als Abstandhalter zwischen das HIV-1 Hüllprotein (gp120) und den CD4-Rezeptor eingesetzt wurde. Der Linker soll den Abstand zwischen den Proteinen vergrößern, um eine vollständige Konformationsänderung beim Binden der Proteine aneinander zu ermöglichen, um so konservierte Epitope freizusetzen. Ein weiterer Unterschied findet sich im Gebrauch der vier Domänen des zur IgG-Familie gehörenden CD4. Das gp120 Hüllprotein täuscht die Bindung von MHC II (major histocompatibility complex class II) an den CD4-Rezeptor vor und bindet an die D1-Domäne. Aufgrund dessen sollten gp120-CD4 Fusionsproteine bestehend aus zwei oder vier Domänen des CD4 konstruiert und getestet werden.

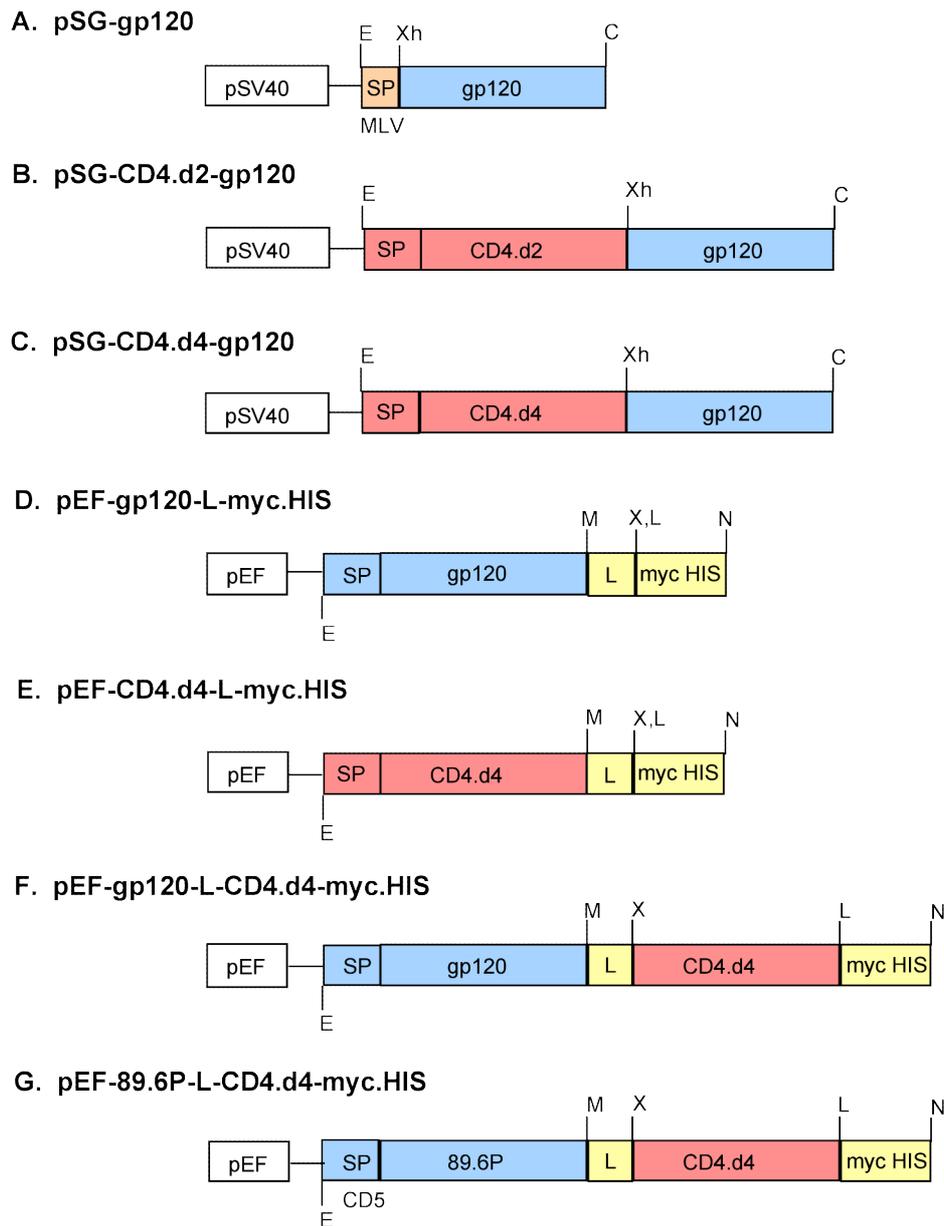


Abbildung 9: Schematische Darstellung der gp120-CD4 Fusionsproteine. A.-C. gp120-CD4 Fusionsproteine ohne Abstandhalter zwischen dem Hüllprotein und dem Rezeptor. D.-G. Sämtliche Fusionsproteine besitzen einen Abstandhalter (L) und sind mycHIS markiert. Abkürzungen der Restriktionsschnittstellen: Xh (Xho \square), B (Bgl \square), E (EcoR \square), M (Mlu \square), X (Xba \square), C (Cla \square) und N (Not \square).

Die Konstruktion der einzelnen gp120-CD4 Fusionsproteine ist nachfolgend aufgelistet.

pSG-gp120

Das HIV-1 gp120 Fragment wurde mittels der Primer HIV-Xho und gp120-Cla aus dem Vektor pCMX-128 amplifiziert. Die Insertion erfolgte über die Restriktionsschnittstellen Xho \square und Cla \square in den Vektor pwt-HX (Erlwein *et al.*, 2002)

pSG-CD4.d2-gp120 und pSG-CD4.d4-gp120

Ausgehend von dem Plasmid pKex-CD4 wurden die Fragmente CD4.d2 und CD4.d4 mittels PCR amplifiziert. Die Amplifikation des CD4.d2 Konstruktes erfolgte mit den Primern 5'-CD4.d2 und 3'-CD4.d2, während für das CD4.d4 Konstrukt die Primer 5'-CD4.d4 und 3'-CD4.d4 verwendet wurden. Alle Primerpaare enthalten Restriktionsschnittstellen für EcoR \square und Xho \square über die die Klonierung in den Vektor pSG-gp120 verlief.

pEF-gp120-L-myc-HIS

Mit Hilfe der Oligonucleotide Mlu-Xba-linker-sense und Mlu-Xba-linker-antisense konnte ein 54 bp großer Linkerbereich in den mit Mlu \square und Xba \square geschnittenen Vektor pEF-IHRES-P eingesetzt werden. Der Linker besteht aus der Aminosäureabfolge (G₄S)₃. Das HIV-1 gp120 Fragment stammte aus dem Plasmid pCMX-128 und wurde mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer waren HIV Eco und Env-Mlu-3'. Die Insertion des PCR-Produkts gelang über die Schnittstellen EcoR \square und Mlu \square in den Zwischenvektor pEF-IRES-Linker, so dass pEF-gp120-Linker entstand. Der mycHIS-Anhang wurde mit den Primern 5'-mycHIS und 3'-mycHIS amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Cla \square und Not \square eingefügt, wodurch pEF-gp120-L-myc-HIS entstand.

pEF-CD4.d4-L-myc.HIS

Die Amplifikation des CD4-Inserts erfolgte mit den Primern CD4.d4-EcoR \square und CD4.d4-Mlu3', als Vorlage diente der Vektor pKexCD4. Eingefügt wurde das CD4.d4-Fragment über die Restriktionsschnittstellen EcoR \square und Mlu \square in den Zwischenvektor pEF-IRES-Linker. Der mycHIS-Anhang wurde mit den Primern 5'-mycHIS und 3'-mycHIS amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Cla \square und Not \square eingefügt.

pEF-gp120-L-CD4.d4-myc-His

Der Ausgangsvektor für diese Klonierung war pEF-gp120-Linker. Das Insert wurde mittels PCR aus dem Vektor pKexCD4 amplifiziert, indem die Primer CD4-Xba-5' und Not-Cla-CD4.d4-3' Verwendung fanden. Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen Xba \square und Not \square in den Vektor inseriert. Der mycHIS-Anhang wurde mit den Primern 5'-mycHIS und 3'-mycHIS amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen Cla \square und Not \square eingefügt.

pEF-89.6P-L-CD4.d4-myc-His

Das dualotrope gp120 stammte aus pcDNA89.6PsynCD5.TMneu, in das anstelle der BstX \square eine Mlu \square Schnittstelle eingefügt wurde somit konnte das synthetische gp120 mit EcoR \square /Mlu \square ausgeschnitten und gegen das T-trope gp120 von pEF-gp120-L-CD4.d4-myc-His ausgetauscht werden.

4.1.2 Überprüfung der gp120-CD4 Fusionsproteine im Immunoblot

Die Produktion der gp120-CD4 Fusionsproteine sollte in BHK oder 293 T Zellen stattfinden, anschließend sollten die Proteine in löslicher Form in den Zellkulturüberstand sekretiert werden. 48 Stunden nach Transfektion der Plasmid-DNA verschiedener gp120-CD4 Fusionsproteine in BHK oder 293 T Zellen erfolgte das Ernten des Zellkulturüberstandes. Anschließend wurden 45 µl Kulturüberstand auf ein 7,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Immunoblot wurden die gp120-CD4 Fusionsproteine ohne Linker und ohne mycHIS-Anhang mit dem 1:2000 verdünntem Ziege-anti-HIV-1gp120 Antikörper und dem 1:30000 verdünnten Peroxidase-gekoppelten Kaninchen-anti-Ziege Antikörper sichtbar gemacht (Abbildung 10 A.). Die Fusionsproteine mit einem myc-Anhang wurden mit dem 1:300 verdünntem Maus-anti-c-myc Antikörper und dem sekundären 1:4000 verdünnten Schaf-anti-Maus-HRP Antikörper detektiert (Abbildung 10 B.). Das erwartete Molekulargewicht der Fusionsproteine ist in Tabelle 1 dargestellt.

Protein	Molekulargewicht (kD)	Protein	Molekulargewicht (kD)
pSG-gp120	120	pEF-gp120-L-CD4.d4-mycHIS	175
pSG-CD4.d2-gp120	155	pEF-89.6P-L-CD4.d4-mycHIS	170
pSG-CD4.d4-gp120	170	pEF-gp120-L- mycHIS	120
		pEF-CD4.d4-L-mycHIS	50

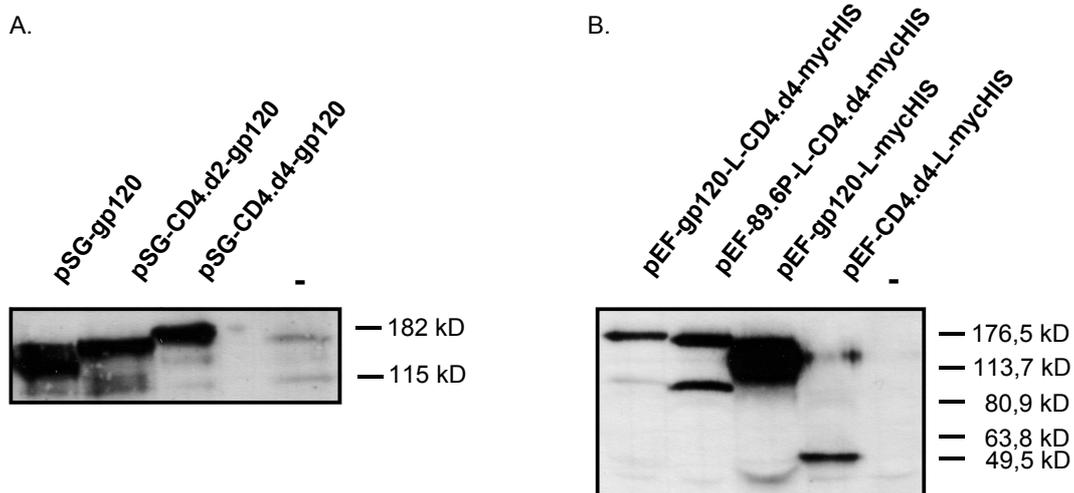


Abbildung 10: Immunoblots der verschiedenen gp120-CD4 Fusionsproteine. A. Die Produktion der gp120-CD4 Fusionsproteine fand in BHK Zellen statt, der Nachweis erfolgte mit dem anti-HIV-1gp120 Antikörper. B. gp120-CD4 Fusionsproteine mit Linker und mycHIS-Anhang wurden in 293 T Zellen produziert, die immunologische Detektion erfolgte mit dem anti-c-myc Antikörper.

Die in Abbildung 10 A. dargestellten gp120-CD4 Fusionsproteine wurden alle exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert. Die Varianten der Fusionsproteine mit den verschiedenen Domänen des CD4-Rezeptors konnten außerdem voneinander unterschieden werden. Sämtliche gp120-CD4 Fusionsproteine mit eingebautem Linker sind in Abbildung 10 B aufgeführt. Das pEF-gp120-L-CD4.d4-myc-His Fusionsprotein wurde bei einem Molekulargewicht von 176 kD exprimiert. Das aus einem primären HIV-1 Isolat stammende pEF-89.6P-L-CD4-myc-His Fusionsprotein zeigte eine zu erwartende Bande bei 175 kD und eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kD. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine Abbaubande. Die Expression des löslichen gp120 war im Vergleich zu den anderen Signalen sehr stark. Lösliches CD4 hingegen, zeigte eine den Fusionsproteinen ähnlich starke Proteinexpression bei 50 kD.

4.1.3 Etablierung des Neutralisierungsassays

Zur Untersuchung der Entstehung neutralisierender Antikörper auf Grund einer Immunisierung mit gp120-CD4 Fusionsproteinen wurde ein Neutralisierungsassay entwickelt. Die Überprüfung von Antikörpern hinsichtlich einer inhibierenden Wirkung auf die HIV-1 Infektion wurde mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren untersucht. MLV/HIV-1 Vektorpartikel übertragen das β -Galactosidasegen spezifisch auf CD4- und CXCR4-exprimierende Zielzellen, da sie das HIV-1 env benutzen (Schnierle *et al.*, 1997). Folglich kann eine erfolgreiche Transduktion anhand des Substratumsatzes der exprimierten β -Galactosidase in den Zielzellen 48 Stunden nach Transduktion gemessen werden. Hela CD4 Zellen wurden in 12-Loch-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Zur Etablierung des Assays standen drei neutralisierende Antikörper zur Verfügung: der anti-CD4 Antikörper und zwei Seren (1610 und 1612) von HIV-1 positiven Spendern mit neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1. Jeweils 2 μ l Antikörper oder Serum wurden zu 200 μ l Komplettmedium gegeben und zusammen mit den Zellen 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Ansätze erfolgten in Triplets. Die MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren wurden von B6-128-17 Zellen synthetisiert und in den Kulturüberstand sekretiert (Schnierle *et al.*, 1997). Die Titer liegen normalerweise zwischen $1-5 \times 10^5$ IU/ml, in diesem Fall lagen sie bei $3,5 \times 10^5$ IU/ml. Zur Etablierung des Neutralisierungsassays wurden verschiedene Vektorkonzentrationen getestet: Die B6-128-17 Überstände wurden 1:2, 1:10 und 1:100 in dem bereits vorliegenden Komplettmedium verdünnt. Nach einstündiger Inkubation wurde 1 ml Komplettmedium zu jedem Ansatz hinzugefügt und über Nacht inkubiert. Die Menge an gebildeter β -Galactosidase konnte 48 Stunden nach der Transduktion im sogenannten β -Galactosidase-Assay ermittelt werden. Als Bezugswert diente die Proteinkonzentration der einzelnen Ansätze.

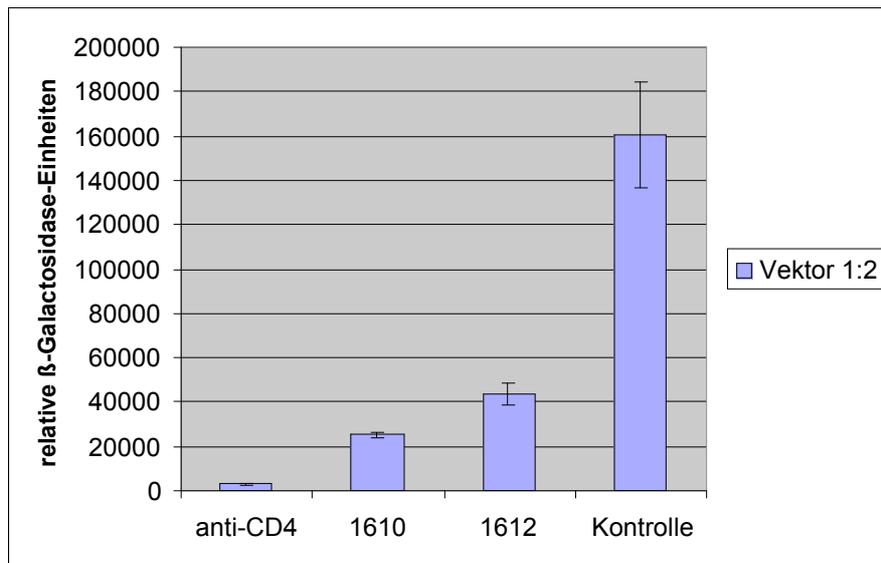


Abbildung 11: Neutralisierungsassay. β -Galactosidase-Werte nach Transduktion von Hela CD4 Zellen mit 1:2 verdünnten MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern.

Abbildung 11 zeigt die β -Galactosidase-Werte, die nach Transduktion von 1:2 verdünnten MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren auf Hela CD4 erreicht wurden. Der anti-CD4-Antikörper inhibierte die Vektorinfektion am besten, die Seren von HIV-1 positiven Spendern hatten ebenfalls eine neutralisierende Wirkung.

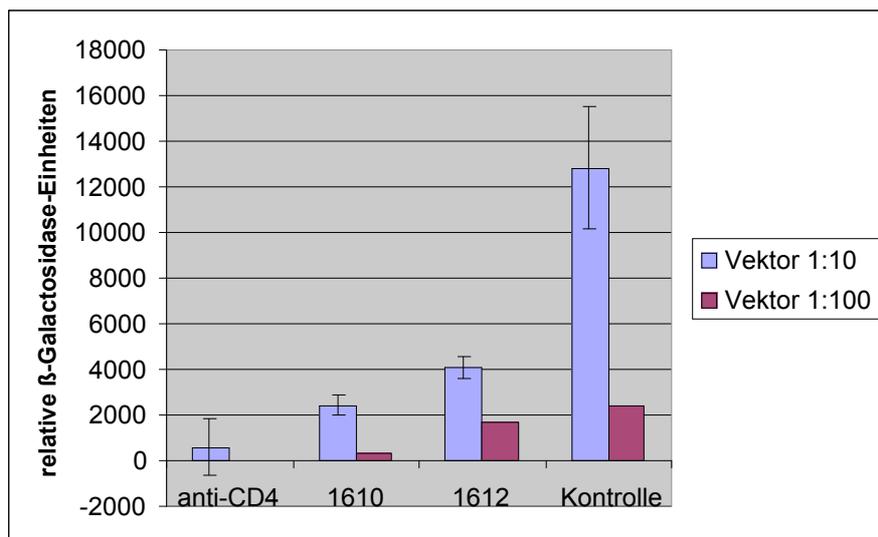


Abbildung 12: Neutralisierungsassay β -Galactosidase-Werte nach Transduktion von Hela CD4 Zellen mit 1:10 und 1:100 verdünnten MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern.

Dasselbe Ergebnis konnte bei einer 1:10 Verdünnung der Vektoren festgestellt werden (Abbildung 12), allerdings waren die β -Galactosidase-Werte wesentlich niedriger im Vergleich zu der 1:2 Verdünnung der Vektorpartikel. Bei einer 1:100 Verdünnung der Vektoren lagen die Messwerte an der Nachweisgrenze. Aus diesen Gründen und um den Verbrauch von Vektoren einzuschränken, wurde in allen weiteren Versuchen eine Verdünnung der MLV/HIV-1 Vektorpartikel von 1:10 verwendet.

4.1.4 Test der Fusionsproteine im Neutralisierungsassay

Der Neutralisierungsassay sollte untersuchen, ob die Fusionsproteine einen inhibitorischen Effekt auf die Infektion der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren haben. Durch Binden der gp120-CD4 Fusionsproteine an den CD4-Rezeptor auf der Oberfläche von Hela CD4 Zellen soll die Infektion mit Vektorpartikeln verhindert werden. Dazu wurden Hela CD4 Zellen mit 200 μ l der Fusionsproteine in einer 12-Loch-Platte inkubiert. Anschließend folgte die Transduktion mit 20 μ l MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren ($3,5 \times 10^5$ IU/ml). Der Substratumsatz der β -Galactosidase wurde nach 48 Stunden im β -Galactosidase-Assay ermittelt.

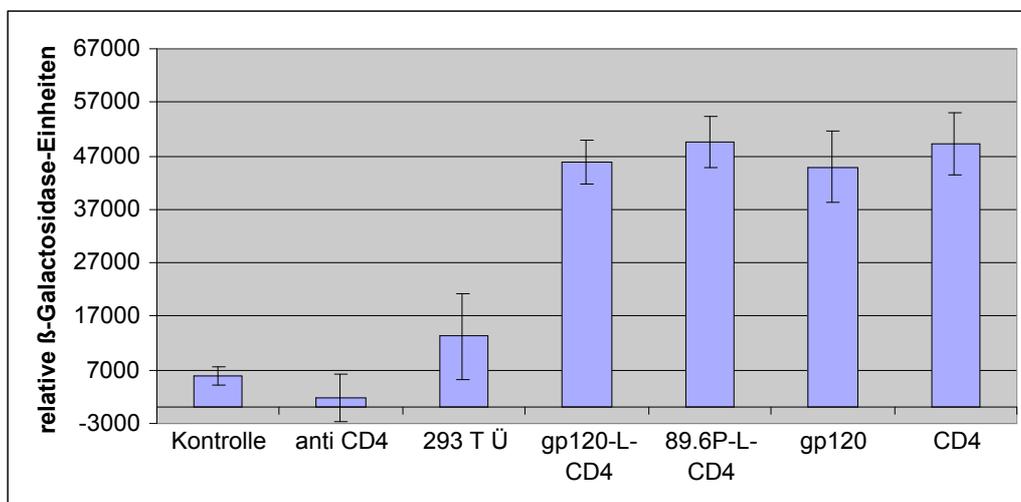


Abbildung 13: Neutralisierungsassay mit gp120-CD4 Fusionsproteinen. β -Galactosidase-Werte nach Transduktion von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren auf Hela CD4 Zellen in Gegenwart der gp120-CD4 Fusionsproteine mit Linker.

Der anti-CD4 Antikörper inhibierte die Infektion der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren. Alle gp120-CD4 Fusionsproteine mit Linker erhöhten die Infektiosität der Vektoren (8,5 fach). Selbst zwei Tage alter Kulturüberstand von untransfizierten 293 T Zellen führte zu einer Erhöhung der β -Galactosidase-Genexpression um den Faktor zwei. Derselbe Test wurde mit

Fusionsproteinen durchgeführt, die keinen Linker-Bereich zwischen gp120 und CD4 besitzen. Das Ergebnis war das gleiche. Diese Ergebnisse zeigen, dass gp120-CD4 Fusionsproteine mit oder ohne Linker keine Inhibition der MLV/HIV-1-Infektion bewirken konnten.

4.2 DNA-Vakzinierung transgener huCD4⁺ Mäuse mit dem CD4.d4-gp120 Fusionsprotein

Die Identifizierung von HIV-1 Hüllproteinstrukturen, die die Bildung neutralisierender Antikörper bewirken können, ist ein Ziel der HIV Vakzin-Entwicklung. Eine Studie von J. Seagal und Mitarbeitern konnte zeigen, dass die Immunisierung von humanen CD4⁺ transgenen Mäusen mit dem HIV-1 Hüllprotein gp120 allein in einer Immunantwort endete (Seagal *et al.*, 2001). Die sekundäre Immunantwort dieser transgener Mäuse war allerdings schwach und verzögert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass gp120-CD4 Intermediate, die beim Binden des HIV-1 Hüllproteins gp120 an den Oberflächenrezeptor CD4 entstehen, eine große Rolle spielen könnten. Die Arbeitsgruppe um De Vico produzierte kreuzvernetzte gp120-CD4 Komplexe, die in Rhesus Makaken zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern führte (Fouts *et al.*, 2002). In unserem Experiment sollte die Bildung neutralisierender Antikörper nach Immunisierung huCD4⁺ transgener Mäuse mit CD4.d4-gp120 Fusionsproteinen untersucht werden. Der gp120-CD4 Komplex sollte durch das Immunsystem der transgenen Maus die gp120 Komponente als fremd und die CD4-Komponente als selbst erkennen und zur Antikörperbildung führen. Weiterhin ist bekannt, dass gp120 direkt an CD4-exprimierende T-Zellen bindet. Da in bisherigen Studien kontroverse Einflüsse von gp120 auf die Stimulierung von T-Lymphozyten beobachtet wurden (Seagal *et al.*, 2001), empfiehlt sich in Immunisierungsstudien die Anwesenheit des humanen CD4-Rezeptors. Das huCD4⁺ Mausmodell ist somit geeignet die Bildung neutralisierender Antikörper infolge einer Immunisierung mit gp120-CD4 Komplexen zu studieren.

Die Immunisierung wurde mit Plasmid-DNA und Superfect durchgeführt. Für die DNA-Vakzinierung wurden das Plasmid pSG-CD4.d4-gp120 und der Kontrollvektor pSG-5 in endotoxinfreier Form benötigt. Die DNA wurde mit Hilfe des endotoxinfreien Mega-Plasmidpräparationskits von Qiagen gewonnen. Zu Beginn des Versuchs und vor jeder Vakzinierung wurde den transgenen huCD4⁺ Mäusen Blut entnommen. Jeweils zwei transgene Mäuse wurden entweder mit 50 µg DNA des Fusionsproteins (Maus 1 und 2) oder mit 50 µg DNA des Kontrollplasmids (Maus 3 und 4) immunisiert. Die DNA wurde 1:2 mit Superfect gemischt, kurz bei Raumtemperatur inkubiert und subkutan im Nacken der Tiere appliziert. Die ersten drei Injektionen wurden im Abstand von 10 Tagen gegeben, die vierte Injektion wurde mit doppelter DNA-Menge und nach einer drei wöchigen Pause gegeben. Fünf Wochen nach der letzten Immunisierung wurden die Versuchstiere unter Betäubung getötet und das Blut zur Gewinnung von Serum entnommen. Im folgenden wurde die Bildung von Antikörpern gegen HIV-1 gp120 und neutralisierender Antikörper im Serum untersucht.

4.2.1 Nachweis von Antikörpern gegen gp120 im Serum huCD4⁺ transgener Mäuse

An die Serumgewinnung schloss sich die Untersuchung des Serums nach spezifischen Antikörpern gegen das HIV-1 Hülloberflächenprotein an. Das Serum aller Mäuse, das vor und nach der Immunisierung mit pSG-CD4.d4-gp120 und dem Kontrollvektor pSG-5 entnommen wurde, wurde im Immunoblot auf die Anwesenheit von gp120 gerichteten Antikörpern untersucht. Dazu wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit HIV-1 gp120 Hüllprotein durchgeführt. Dieses stammte von pSG-gp120 transfizierten 293 T Zellen, die lösliches gp120 in den Kulturüberstand abgaben. Nach dem Elektrotransfer wurde die Nitrozellulosemembran in Streifen geschnitten und abgesättigt. Ein Streifen wurde als positiv Kontrolle mit 1:2000 verdünnten Ziege-anti-HIV-1gp120 Antikörper inkubiert. Für jedes Mausserum, das vor oder nach der Immunisierung entnommen wurde, wurde ein Streifen der Nitrozellulosemembran verwendet. Hierzu wurden alle Mausseren 1:500 verdünnt. Der sekundäre Antikörper für die positiv Kontrolle war der Peroxidase-gekoppelte Antikörper Kaninchen-anti-Ziege, der 1:30000 verdünnt eingesetzt wurde. Zur Detektion der Mausseren wurde 1:10000 verdünntes Schaf-anti-Maus-HRP benützt (Abbildung 14).

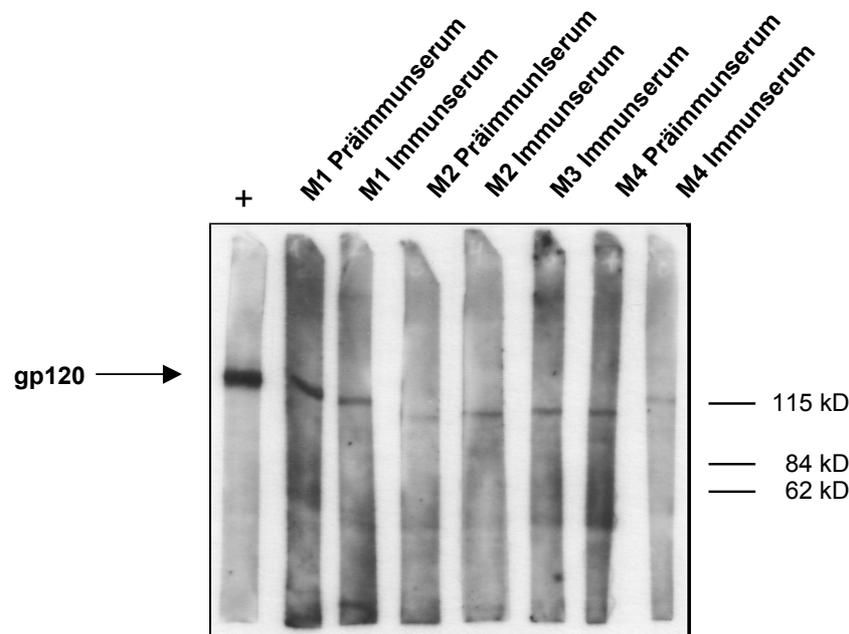


Abbildung 14: Immunoblot zum Nachweis gp120 gerichteter Antikörper in den Mausseren immunisierter Mäuse. (+) mit anti-HIV-1 gp120 Antikörper inkubierter Membranstreifen; die Kontrollseren und die Immunseren der einzelnen Mäuse sind der Reihe nach dargestellt (M1 - M4). Maus 1 und 2 wurden mit pSG-CD4.d4-gp120 vakziniert, Maus 3 und 4 wurden mit pSG-5 immunisiert.

Anhand der Verwendung des anti-gp120-Antikörpers konnte die Größe der HIV-1 gp120 Hüllproteinuntereinheit exakt bestimmt werden, nämlich bei 120 kD. Alle getesteten Mausseren zeigten eine etwas kleinere Bande bei 115 kD. Dabei handelte es sich nicht um ein spezifisches Signal, da es sowohl im Serum beider Kontrollmäuse (Maus 3 und 4), als auch im Präimmunserum aller Mäuse vorkam. Somit ließen sich in allen getesteten Mausseren keine gegen gp120 gerichteten Antikörper nachweisen.

4.2.2 Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Serum huCD4⁺ transgener Mäuse

Nach abgeschlossener Vakzinierung der huCD4⁺ transgenen Mäuse mit dem CD4.d4-gp120 Fusionsprotein und dem Kontrollvektor folgte der Test aller gesammelten Mausseren im Neutralisierungsassay. Hierzu wurden wie bereits beschrieben Hela CD4 Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren in Gegenwart der Mausseren transduziert. Als positiv Kontrolle diente ein Antikörper gegen CD4, der die Infektion der Vektoren durch Bindung an den CD4-Rezeptor inhibierte. Es wurden alle Seren der vakzinierten, transgenen Mäuse getestet, indem jeweils 2 µl Serum zum Transduktionsansatz zugegeben wurden. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

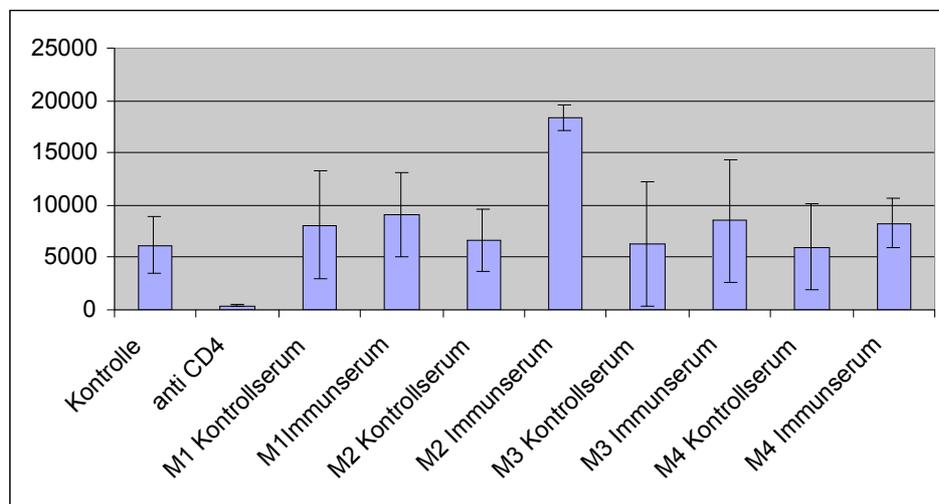


Abbildung 15: Neutralisierungsassay: β -Galactosidase-Werte nach Transduktion von MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren auf Hela CD4 Zellen in Gegenwart der transgenen CD4⁺ Mausseren, die mit CD4.d4-gp120 DNA vakziniert wurden.

In den mit CD4.d4-gp120 Fusionsprotein DNA vakzinieren Mausseren konnten keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden, da die Vektorinfektion nicht inhibiert werden konnte. Allein der anti-CD4 Antikörper hatte einen inhibitorischen Effekt auf die Infektion der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren. Sämtliche Mausseren, unabhängig, ob die Mäuse mit der DNA des Fusionsproteins CD4.d4-gp120 oder mit dem Kontrollvektor pSG-5 immunisiert wurden, zeigten ähnliche β -Galactosidase-Werte wie die Kontrolle. Eine Ausnahme bildete das Immunserum der Maus 2, dessen Serum die Infektion der MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren begünstigte. Die β -Galactosidase-Werte waren um den Faktor drei höher als die Kontrollwerte.

4.3 Immunisierung transgener huCD4⁺ Mäuse mit MLV-HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln (Thaler *et al.*, 2001)

Für die hier durchgeführte Immunisierung wurden Vektorpartikel verwendet, die aus dem MLV-Kapsid bestehen und von einer HIV-1 Hülle umgeben sind. Entwickelt wurden diese Vektoren von Frau Thaler, die sie in Gentransferstudien einsetzte. Diese MLV/HIV-1 Vektorpartikel können an CD4-positive Zellen binden (Thaler *et al.*, 2001). Aufgrund des Bindens von HIV-1 gp120 an den CD4-Rezeptor werden durch Konformationsänderung konservierte Bereiche des gp120 freigelegt, gegen die das Immunsystem der huCD4⁺ transgenen Maus neutralisierende Antikörper generieren soll. Im Gegensatz zu der DNA-Vakzinierung mit den gp120-CD4 Fusionsproteinen wurde hier eine Vektorimmunisierung durchgeführt.

Die in der Immunisierung eingesetzten MLV/HIV-1 Vektorpartikel stammten von der Verpackungszelllinie TELCeB6/Tr712-17, die das lacZ Gen, das für die β -Galactosidase kodiert, verpackt (Thaler *et al.*, 2001). Die Virusanreicherung erfolgte mit Viva-Spin Filtern wie im Methodenteil beschrieben. MLV/HIV-1 Vektorpartikel transduzieren nur sich teilende Zellen, da es sich bei den Vektorpartikeln um MLV-basierende, retrovirale Vektoren handelt. Die Proliferation der T-Lymphozyten musste vor Versuchsbeginn angeregt werden. Die T-Lymphozyten der transgenen Mäuse wurden zum einen mit Lektinol und zum anderen mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimuliert. Bei Lektinol handelt es sich um eine Mischung von Lektinen, die aus Mistelextrakten gewonnen wird. Lektinol führt zu einer Multimerisierung des CD3 T-Zellrezeptors. Die T-Lymphozyten werden unspezifisch durch Lektinol aktiviert. Staphylococcus Enterotoxin B ist ein Superantigen, das an die V α 8+ Domäne von T-Zellrezeptoren bindet und nur T-Zellen aktiviert, die diese Rezeptoren tragen. Für beide Ansätze standen je vier huCD4⁺ transgene Mäuse zur Verfügung. Einer Gruppe von Tieren wurden 10 μ l Lektinol (1:10 verdünnt in PBS) subkutan injiziert, die Tiere der anderen Gruppe wurden mit 50 μ g SEB gelöst in 50 μ l PBS intravenös gespritzt. Drei Mäuse aus jeder Gruppe wurden 24 Stunden später mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln ($2,25 \times 10^5$ IU) immunisiert, die das β -Galactosidasegen übertrugen, während ein Versuchstier zur Kontrolle unbehandelt blieb. Im Abstand von 3 Tagen erfolgte die zweite und dritte Immunisierung (je $3,45 \times 10^5$ IU). Nach drei Wochen wurden die Tiere unter Betäubung getötet und das Blut sowie alle lymphatischen Organe entnommen. Aus dem Vollblut wurde Serum gewonnen. Das Serum wurde im folgenden Verlauf auf Antikörper untersucht, die speziell gegen HIV-1 gp120 Hüllprotein oder β -Galactosidase gerichtet waren. Die Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern konnte im Neutralisierungsassay getestet werden.

4.3.1 Immunoblot zur Überprüfung HIV-1 gp120 gerichteter Antikörper

MLV/HIV-1 Vektorpartikel tragen auf ihrer Oberfläche das native HIV-1 Hüllglykoprotein, bestehend aus einem zytoplasmatischen Anteil (gp41) und einer Oberflächenkomponente (gp120). Die Bildung von Antikörpern, die gegen die gp120 Komponente gerichtet waren, wurde nach abgeschlossener Immunisierung untersucht. Hierzu wurde, wie bereits in Kapitel 4.2.1. beschrieben, ein SDS-Polyacrylamidgel, das nur eine einzige große Geltasche besaß, mit gp120 Protein geladen. Die Nitrozellulosemembran wurde nach erfolgtem Elektrotransfer in gleichmäßige Streifen geschnitten, die in einer speziellen Schale separiert wurden. Jeweils ein Nitrozellulosemembranstreifen wurde mit einem 1:500 verdünnten Präimmunserum oder einem Immunserum der verschiedenen transgenen huCD4⁺ Mäuse inkubiert. Zur Kontrolle wurde der Ziege-anti-HIV-1gp120 Antikörper 1:2000 verdünnt eingesetzt. Als sekundäre Antikörper kamen der 1:10000 verdünnte Schaf-anti-Maus-IgG-HRP Antikörper und der Kaninchen-anti-Ziege-IgG-HRP Antikörper zum Einsatz. Das Ergebnis dieser Untersuchung war allerdings negativ, da außer mit Hilfe des speziellen gegen HIV-1 gp120 gerichteten Antikörpers kein Signal detektiert werden konnte. Keine der immunisierten Mäuse hatte Antikörper gegen die HIV-1 Oberflächenkomponente gp120 generiert somit konnte keine Immunantwort gegen den pseudotypisierten Vektor induziert werden.

4.3.2 Neutralisierungsassay zur Untersuchung neutralisierender Antikörper im Serum immunisierter huCD4⁺ Mäuse

Nach der abgeschlossenen *in vivo* Transduktion der huCD4⁺ transgenen Mäuse mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln sollte das Serum der Versuchstiere auf die Bildung neutralisierender Antikörper untersucht werden. Hela CD4 Zellen wurden über Nacht auf 12-Loch-Platten kultiviert und am folgenden Tag mit 2 µl Mausserum in 200 µl Komplettmedium für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Jeder Ansatz wurde in Triplets durchgeführt. Die Infektion erfolgte mit 7×10^3 MLV/HIV-1 Vektorpartikeln, die das β -Galactosidasegen übertragen. Wurde die Infektion der Vektorpartikel durch neutralisierende Antikörper inhibiert, so reduzierte sich die Expression der β -Galactosidase und der Substratumsatz des Enzyms wurde geringer im Vergleich zum Kontrollwert. Für die Kontrolle wurden Hela CD4 Zellen ohne Zugabe eines Inhibitors mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren infiziert. Abbildung 16 zeigt die β -Galactosidase-Werte der mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln immunisierten transgenen huCD4⁺ Mäuse, von denen vor der Immunisierung vier mit Lektinol und vier mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimuliert wurden.

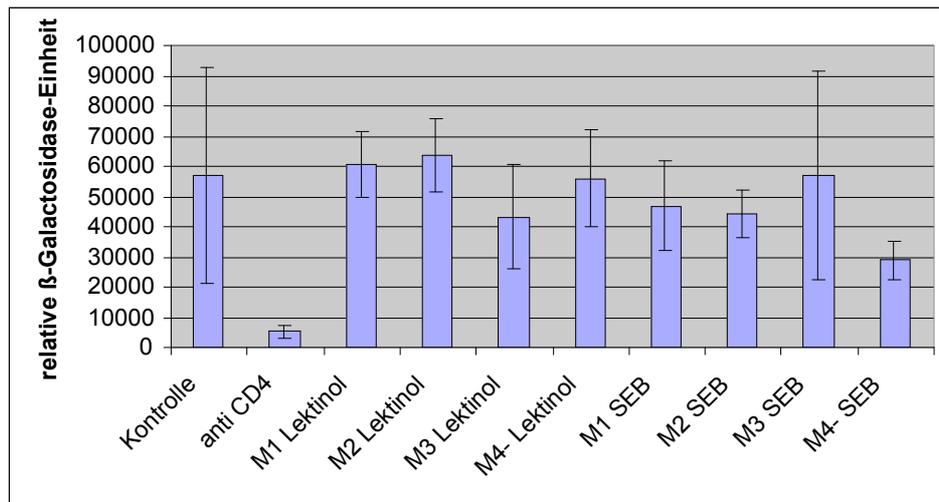


Abbildung 16: Neutralisierungsassay: Hela CD4 Zellen wurden mit anti-CD4 Antikörper, mit vakzinierter Mauseren oder mit Medium [Kontrolle] inkubiert. Die Messung des β -Galactosidase-Substratumsatzes erfolgte nach Zugabe von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren. M1 – M4 bezeichnet die vier zu einer Gruppe gehörenden huCD4⁺ Mäuse, die entweder mit Lektinol oder mit SEB stimuliert wurden. M4- stellt die nicht immunisierte Kontrollmaus jeder Gruppe dar.

Alle getesteten Seren der immunisierten Mäuse zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf die Infektion der MLV/HIV-1 Vektorpartikel. Die β -Galactosidase-Werte der beiden Gruppen schwankten annähernd um den gleichen Wert, nur der Wert der Maus 4 aus der Gruppe der SEB stimulierten Mäuse war niedriger als die anderen Werte. Da es sich hierbei aber um die Kontrollmaus der Gruppe handelte, die nicht mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln behandelt wurde, konnte es sich um keine wirkliche Inhibition der Vektortransduktion handeln. Allein der anti-CD4 Antikörper war in der Lage die Infektion durch Binden an den CD4-Rezeptor zu unterdrücken. Somit konnten keine neutralisierenden Antikörper in den Seren, der mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektoren immunisierten huCD4⁺ Mäuse, nachgewiesen werden.

4.3.3 Nachweis von β -Galactosidase-Antikörpern im Serum immunisierter huCD4⁺ Mäuse

Die *in vivo* Transduktion der huCD4⁺ transgenen Mäuse mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln war erfolgreich verlaufen, da ein Gentransfer stattgefunden hatte. β -Galactosidaseaktivität konnte in verschiedenen lymphatischen Organen nachgewiesen werden (Thaler, Dissertation 2002, Universität Frankfurt am Main). Zum Nachweis polyklonaler Antikörper gegen

β -Galactosidase im Serum immunisierter Mäuse wurde ein Immunoblot durchgeführt. Dazu wurden Anjou lacZ Zelllysate in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Bei Anjou lacZ Zellen handelt es sich um eine Verpackungszelllinie, die das β -Galactosidasegen verpackt und als Protein exprimiert (Höhne *et al.*, 1999). Nach dem Transfer des Proteins auf die Nitrozellulosemembran wurde letztere in Streifen geschnitten. Die Membranstreifen wurden entweder mit unterschiedlichen Mausseren inkubiert oder zur Kontrolle mit dem β -Galactosidase-Antikörper. Alle Mausseren wurden 1:500 verdünnt in Absättiger eingesetzt, während der primäre anti- β -Galactosidase-Antikörper 1:1000 verdünnt wurde. Als sekundärer Antikörper kam der Peroxidase gekoppelte Schaf-anti-Maus-Antikörper gegen die Mausseren zum Einsatz, während Protein A-HRP den β -Galactosidase-Antikörper detektierte. Die Abbildung 17 zeigt die Nitrozellulosemembranstreifen des Immunoblots nach der immunologischen Detektion.

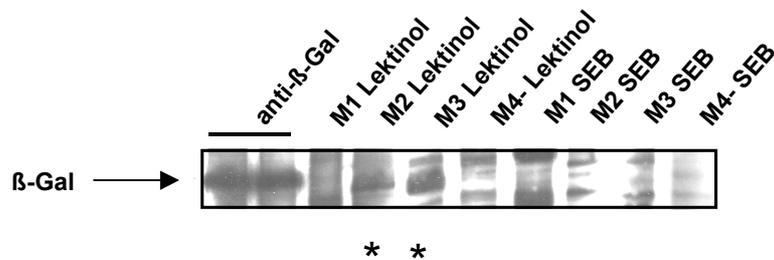


Abbildung 17: Immunoblot zum Nachweis von β -Galactosidase-Antikörpern im Serum immunisierter huCD4⁺ Mäuse. Acht Mäuse wurden vor der Immunisierung mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln entweder mit Lektinol oder mit SEB stimuliert (M1 – M4), jeweils eine Maus aus jeder Gruppe wurde nicht vakziniert (M4-).

Der anti- β -Galactosidase-Antikörper konnte das β -Galactosidase-Protein von 115 kD nachweisen. Ebenso konnte ein positives Signal bei 115 kD mit dem Serum der Lektinol stimulierten Mäuse Nr. 2 und Nr. 3 nachgewiesen werden. Die zugehörige nicht immunisierte Maus zeigte wie zu erwarten kein Signal. Die Staphylococcus Enterotoxin B stimulierten Mäuse produzierten keine gegen β -Galactosidase gerichteten Antikörper. Hieraus konnte geschlossen werden, dass eine Übertragung des lacZ Gens durch *in vivo* Transduktion mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln zumindest in zwei Fällen erfolgreich stattgefunden hatte. Die Lektinol stimulierten T-Lymphozyten schienen den Gentransfer zu erlauben, während in Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimulierten T-Zellen kein Gentransfer beobachtet werden konnte.

4.4 Konstruktion und Charakterisierung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

Die Applikation von CD4-HIV-1gp120 Fusionsproteinen in huCD4⁺ transgenen Mäusen führte zu keiner Bildung von neutralisierenden Antikörpern gegen HIV-1. Ebenso konnte keine Immunreaktion nach Injektion von MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikel nachgewiesen werden. Weder neutralisierende Antikörper noch direkte, gegen das HIV-1 Hüllprotein gerichtete Antikörper, konnten nach der Immunisierung mit Vektorpartikeln detektiert werden. Die native Konformation des HIV-1 Glykoproteins scheint für die Bildung von Antikörpern von entscheidender Bedeutung zu sein (Earl *et al.*, 2001; Pognard *et al.*, 2001; Sattentau *et al.*, 1995). Um ausreichende Mengen HIV-1 Hüllglykoprotein in nativer Konformation zu exprimieren, sollte das Gen in den Kontext des MLV-Retrovirus gestellt werden und das ursprüngliche MLV-Hüllprotein ersetzen. Ein replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypvirus hätte den Vorteil als attenuiertes Virus in huCD4⁺ transgenen Mäusen die Bildung von neutralisierenden Antikörpern zu bewirken. Neben dieser humoralen Immunantwort, sollte zusätzlich durch die Reifung des replikationskompetenten Virus in der infizierten Zielzelle die zelluläre Immunantwort aktiviert werden. Die transgene huCD4⁺ Maus wäre für diese Art der Studien besonders geeignet, da in einem einfachen Tiermodell gearbeitet werden könnte, Studien an Primaten würden erst zu späteren Zeitpunkten nötig. Weiterhin könnten MLV/HIV-1 Pseudotypviren die Möglichkeit bieten, die Bindung des HIV-1 Glykoproteins an den humanen CD4-Rezeptor im Mausmodell zu studieren. Das Studium der HIV-1 Rezeptorbindung und HIV-1 Infektion könnte im transgenen Mausmodell erleichtert werden. Beispielsweise könnten Inhibitoren, die die Infektion von HIV-1 hemmen sollen, auf ihre Wirkung hin untersucht werden. Im folgenden wurde der MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} konstruiert und hinsichtlich seiner HIV-1 gp120 Expression, sowie seiner Infektiösität untersucht.

4.4.1 Vergleich zweier Plasmide zur Expression des HIV-1 Hüllglykoproteins

Für den Einbau des HIV-1 Hüllglykoproteins in den MLV-Retrovirus standen zwei HIV-1 Hüllglykoprotein exprimierende Plasmide zur Verfügung, denen alle akzessorischen Elemente des komplexen HIV-1 Genoms fehlen (Abbildung 18). Bei beiden Konstrukten wurde das HIV-Signalpeptid durch das von MLV ersetzt. Das hatte zur Folge, dass die Spleiß-Akzeptor-Stelle des MLV intakt blieb und somit das Spleißmuster des Virus unverändert blieb. Außerdem wurde durch den Austausch der Signalpeptide das Gen für das akzessorische Protein Rev entfernt. Des weiteren waren beide Konstrukte zytoplasmatisch

auf 7 Aminosäuren verkürzt, um den Einbau des Hüllproteins in Viruspartikel zu gewährleisten (Schnierle *et al.* 1997). Das pSG-X/C_{7s} Konstrukt unterschied sich von der pSG-X/C_{7d} Variante durch den Einbau eines Stopp-Kodons bei Aminosäure 712, so dass der Stopp-Variante der Zytoplasmatische Bereich des MLV Env fehlte. Beide Konstrukte wurden in Anjou lacZ Zellen auf Funktionalität getestet und es wurde eine Titerbestimmung durchgeführt.

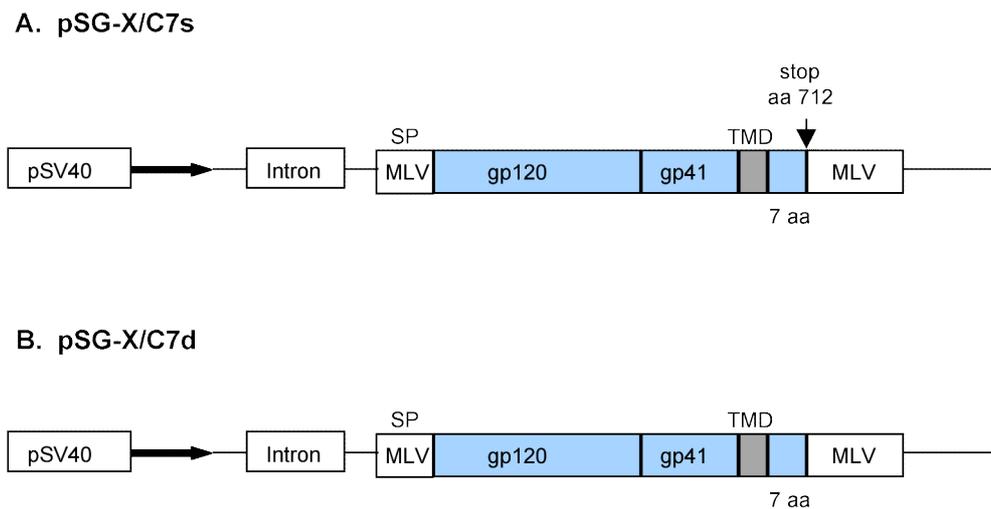


Abbildung 18: Schematische Darstellung der HIV-1 Env-Expressionskonstrukte: A. pSG-X/C_{7s}, verkürzte Variante des gp41 mit Stopp-Kodon; B. pSG-X/C_{7d}, verkürzte Variante des gp41 ohne Stopp-Kodon;

Bei Anjou lacZ Zellen handelt es sich um eine Verpackungszelllinie, die stabil gag/pol von MLV synthetisiert und das lacZ Gen überträgt (Höhne *et al.*, 1999). Die MLV Viruspartikel werden ohne Hüllprotein gebildet, so dass nur das Kapsid in den Kulturüberstand entlassen wird. Eine Infektion kann erst stattfinden, wenn Hüllprotein DNA transfiziert wird. In diesem Fall wurden die HIV-1 Hüllprotein Konstrukte pSG-X/C_{7s} und pSG-X/C_{7d}, sowie zur positiv Kontrolle pCMX-128, ein auf 7 Aminosäuren verkürztes HIV-1 Hüllprotein mit den akzessorischen Genen vpu und rev, zur Transfektion in Anjou lacZ Zellen verwendet. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in Lysispuffer lysiert und 80 µg Protein in einem 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte zunächst mit dem anti-gp120 Antikörper, der 1:2000 verdünnt zum Einsatz kam, anschließend wurde der Blot gestrippt und die Detektion mit dem 1:2000 verdünnten anti-rev Antikörper durchgeführt (Abbildung 19).

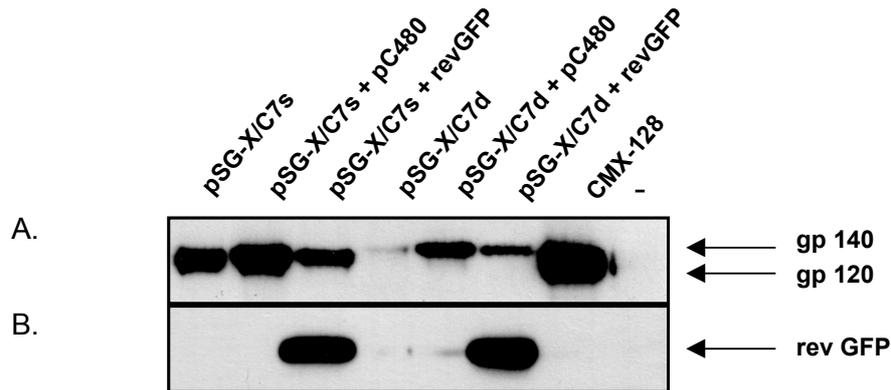


Abbildung 19: Immunoblot der HIV-1 Env-Expressionsplasmide pSG-X/C_{7s} und pSG-X/C_{7d}. A. Anti-HIV-1gp120-Antikörper; B. Anti-HIV-1rev-Antikörper.

Die Proteinexpression des HIV-1 Hüllglykoproteins unterschied sich bei beiden Expressionsplasmiden: das pSG-X/C_{7d} Konstrukt wies eine deutlich schwächere Proteinexpression auf als die pSG-X/C_{7s} Variante. Mit pSG-X/C_{7d} konnte nur die unprozessierte gp140 Vorläuferbande des HIV-1 Hüllglykoproteins detektiert werden, während die pSG-X/C_{7s} Variante sowohl prozessiertes HIV-1 gp120 als auch unprozessiertes HIV-1 gp140 exprimierte (eindeutige Daten hier nicht gezeigt). Eine Erhöhung der Proteinexpression konnte durch Kotransfektion aller akzessorischer Gene des HIV-1 Genoms (Plasmid pC480) für beide Expressionsplasmide erreicht werden. Die Kotransfektion des akzessorischen Elements rev zu pSG-X/C_{7s} schien keinen Einfluss auf dessen Proteinexpression zu haben. Im Gegensatz dazu steigerte sich die Proteinexpression des pSG-X/C_{7d} Konstrukts mit der Kotransfektion von rev. Somit war die HIV-1 Hüllproteinexpression des Plasmids pSG-X/C_{7d} abhängig von dem akzessorischen Element rev. Die pSG-X/C_{7s} Variante hingegen zeigte eine starke und Rev-unabhängige Proteinexpression mit dem MLV-Signalpeptid.

Der sterilfiltrierte Zellkulturüberstand der transfizierten Anjou lacZ Zellen wurde 48 Stunden nach Transfektion auf Hela CD4 Zellen gegeben. Diese Zellen besitzen neben dem CD4-Rezeptor ebenfalls den für die Infektion von T-tropen Vektorpartikeln wichtigen CXCR4-Rezeptor. Die Infektiosität der Partikel wurde 48 Stunden später durch die Übertragung des β -Galactosidasegens in der X-Gal-Färbung gezeigt. Die Titer konnten durch Auszählen blau gefärbter Zellen bestimmt werden (Dudda, J. Diplomarbeit 1998, Universität Freiburg).

Plasmide	+ rev	-rev
pHIT-66 (amphotropes MLV env)	4 x 10 ² IU/ml	5 x 10 ² IU/ml
pCMX-128	79 IU/ml	103 IU/ml
pSG-X/C _{7s}	10 ² IU/ml	10 ² IU/ml
pSG-X/C _{7d}	28 IU/ml	52 IU/ml

Tabelle 2: Titer (IU/ml) der HIV-1 Hüllproteinkonstrukte: Infektionsereignisse nach Transfektion von Anjou lacZ Zellen mit MLV oder HIV-1 Hüllprotein und Transduktion auf Hela CD4 Zellen; Titer nach Auszählen von X-Gal-gefärbten Zellen.

Tabelle 2 zeigt die Zusammenfassung der ausgezählten Titer in An- oder Abwesenheit des akzessorischen Proteins Rev. Das HIV-1 env Konstrukt pSG-X/C_{7d} zeigte als einziges Plasmid eine Abhängigkeit des Titers und der Proteinexpression von dem akzessorischen Element rev. Sowohl die MLV env, als auch HIV-1 Env-Expression von dem Plasmid pSG-X/C_{7s} waren unabhängig von rev. Das Konstrukt CMV-128 kodierte bereits für das akzessorische Gen rev und zeigte keine wesentlichen Unterschiede der Titer. Das als Stopp-Variante bezeichnete HIV-1 Hüllglykoprotein pSG-X/C_{7s} wurde aufgrund der Titerbestimmung in das MLV-Retrovirus eingebaut.

4.4.2 Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

Das erfolgreich in der Partikelbildung getestete HIV-1 Hüllprotein Konstrukt pSG-X/C_{7s} sollte in dem replikationskompetenten MLV-Retrovirus das MLV-Hüllprotein ersetzen. Der entstehende MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} sollte das HIV-1 Hüllglykoprotein in seiner nativen Konformation exprimieren.

Aufgrund ungünstiger Restriktionsschnittstellen waren mehrere Klonierungsschritte zur Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} notwendig (Dudda, J., Diplomarbeit 1998): Das MLV-Genom wurde aus dem Ausgangskonstrukt pMOV-3 (pBR322-MLV) über EcoR¹ in den Vektor pUC-19 gesetzt. Anschließend konnten 4 kb die das MLV-Hüllprotein flankieren über Sal¹ und Cla¹ in den Vektor pBS-KS⁻ umgesetzt werden. Es entstand pBS-S/C4. Dieser Klonierungsschritt war notwendig, um die Hpa¹ Schnittstelle im MLV-Genom nutzen zu können. Nun konnte das HIV-1 Hüllprotein aus dem pSG-X/C_{7s} Konstrukt über Hpa¹ und Cla¹ in die MLV Sequenz des pBS-S/C4 integriert werden. Um die durch

Methylierung geschützte 5'Clal-Schnittstelle für die Klonierung nutzbar zu machen, wurde das pBS-S/C4 Plasmid in einen nichtmethylierenden *E.coli* Stamm synthetisiert. Danach konnte das HIV-1 Hüllprotein als 3 kb großes Clal-Fragment in das vollständige MLV-Genom integriert werden. Zur Übersicht sind die Klonierungsschritte in Abbildung 20 schematisch dargestellt.

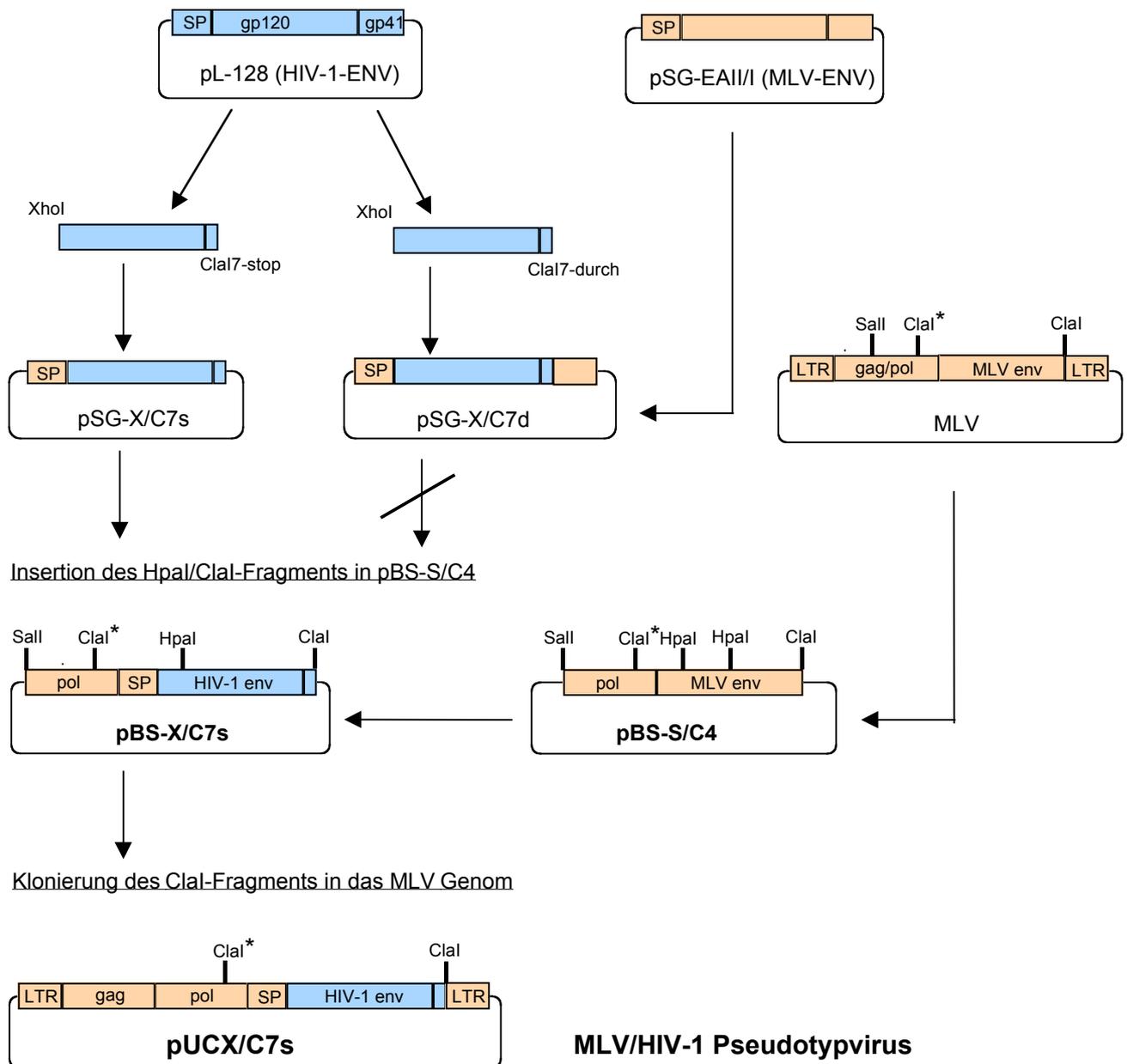


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Klonierung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C7s.

4.4.3 HIV-1 Hüllproteinexpression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} zeichnet sich durch das Fehlen aller akzessorischen Gene des komplexen HIV-1 aus. Das Genom entspricht der einfachen Organisation des MLV. Das HIV-1 Hüllglykoprotein ist charakterisiert durch das MLV-Signalpeptid und ist zytoplasmatisch auf 7 Aminosäuren verkürzt, um den Einbau des Hüllproteins in Viruspartikel zu gewährleisten (Abbildung 21).

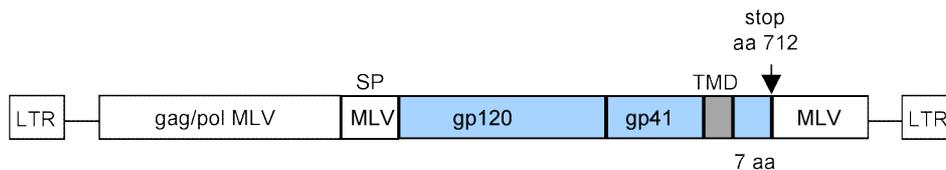


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Konstrukts des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}.

Zur Überprüfung der Proteinexpression des HIV-1 Hüllglykoproteins wurde das Proviruskonstrukt in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen transfiziert. Für die Transfektion einer 6-Loch-Platte wurde 1 µg DNA pro Plasmid eingesetzt. Nach 3 Tagen wurden die NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen lysiert und 80 µg Protein in einem 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion des HIV-1 Hüllproteins wurde mit dem anti-gp120 Antikörper wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Transfektion des Proviruskonstruktes führte zu einer starken Expression des HIV-1 Hüllproteins, die allerdings durch Kotransfektion des Plasmids pC480, das für alle HIV-1 akzessorischen Elemente kodiert, noch verstärkt wurde. Die HIV-1 Hüllproteinexpression im Kontext des Provirus ist im Gegensatz zur Expression im pSG-5 Plasmid abhängig von den HIV-1 akzessorischen Elementen (Abbildung 22).

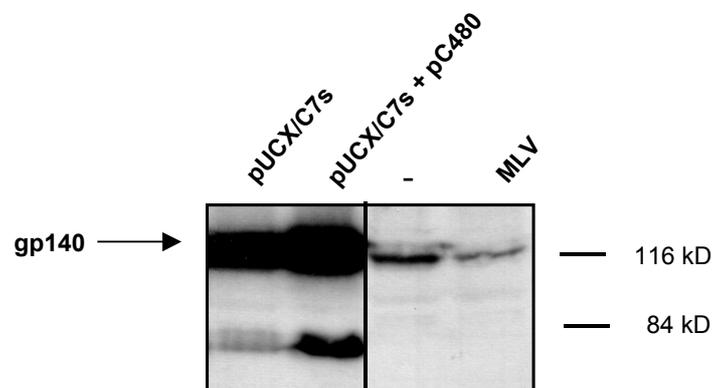


Abbildung 22: Nachweis der HIV-1 Hüllglykoprotein Expression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} im Immunoblot.

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus-Konstrukt pUCX/C_{7s} zeigte HIV-1 Hüllproteinexpression, allerdings nur die unprozessierte gp140 Variante des Hüllproteins. Eine Erhöhung der Proteinexpression des HIV-1 Hüllglykoproteins konnte durch Kotransfektion des Provirus mit dem Plasmid pC480 erreicht werden. Das Plasmid pC480 kodiert für sämtliche akzessorische Proteine des HIV-1 Genoms. Die Kotransfektion des Plasmids pL391, das für die Gene *tat* und *rev* kodiert, erhöhte die Proteinexpression nur in begrenztem Maße. Die Proteinexpression konnte mit pC480 am besten gesteigert werden. Um herauszufinden, ob einzelne Hilfsgene für die Steigerung der Proteinexpression verantwortlich zu machen waren, wurde das Provirus in Kombination mit einzelnen akzessorischen Genen transfiziert. Abbildung 23 zeigt die Proteinexpression von NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen nach Transfektion von 2 µg DNA je Plasmid und Auftrennung über ein 7,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel. Die beste Proteinexpression wurde mit allen akzessorischen Elementen erreicht (pC480). Kein einzelnes akzessorisches Protein oder eine Kombination von zweien konnte die Proteinexpression derart erhöhen.

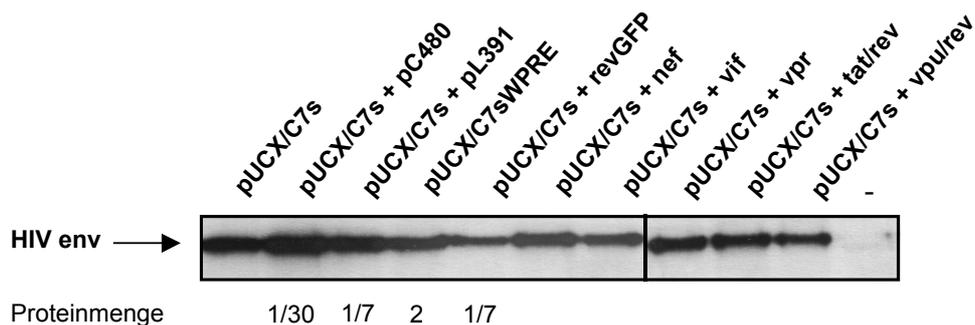


Abbildung 23: Untersuchung des Einflusses der HIV-1 akzessorischen Proteine auf die HIV-1 Hüllproteinexpression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} im Immunoblot.

4.4.4 Veränderung der Promotoraktivität durch akzessorische Gene

Verschiedene akzessorische Gene können beispielsweise als Transaktivatoren auf retrovirale Promotoren wirken und die Proteinexpression des HIV-1 Hüllproteins verändern. So bindet beispielsweise *Tat* an Sekundärstrukturen der HIV-RNA, die sogenannte TAR-Sequenz (*tat* activation region) und aktiviert die Bildung des Initiationskomplex bei der Transkription (Laspia *et al.*, 1989). Das akzessorische Protein *Rev* fungiert als posttranskriptioneller Transaktivator (Pollard *et al.*, 1998). In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob einzelne HIV-1 akzessorische Gene einen Einfluss auf die Promotoraktivität von Retroviren haben. Hierzu wurde der retrovirale Vektor pBAG

verwendet, der das lacZ Gen enthält, das unter der Kontrolle der retroviralen LTR's (long terminal repeats) steht. Wird der Promotor aktiviert, steigt die Proteinexpression der β -Galactosidase und die Werte können anhand eines β -Galactosidase-Assays gemessen werden. Zu Beginn wurden 5×10^4 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in 12-Loch-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Zunächst folgte die Transfektion von 1 μ g pBAG Vektor mit 1 μ g des Plasmids pC480, das für alle akzessorischen Proteine des HIV-1 kodiert. Die Proteinexpression der β -Galactosidase wurde mit dem β -Galactosidase-Assay bestimmt und in Abbildung 24 dargestellt. Das Plasmid pC480 erhöhte die Transkription des lacZ Gens ungefähr 10 fach im Vergleich zu der Hintergrundexpression des pBAG Vektors. Daraus ließ sich zunächst schließen, dass ein akzessorisches Element oder eine Kombination von mehreren die Aktivierung des Promotors bewirkten.

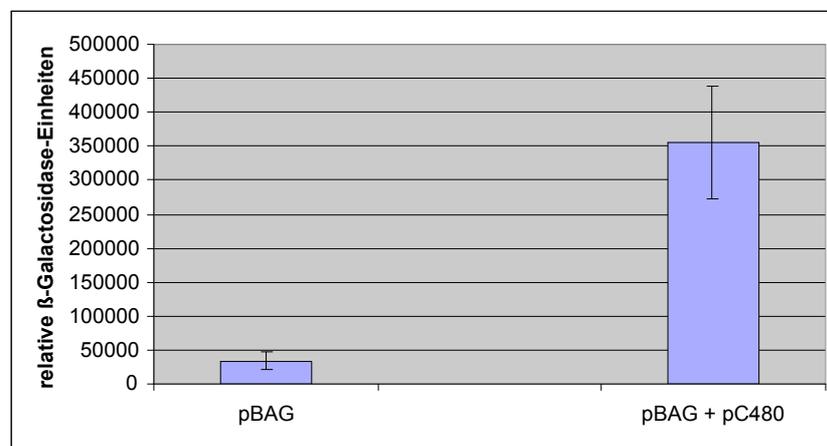


Abbildung 24: Substratumsatz der β -Galactosidase nach Kotransfektion des pBAG Vektors mit allen akzessorischen Genen (pC480).

Bis jetzt konnte nur gezeigt werden, dass die Gesamtheit der HIV-1 akzessorischen Gene das LTR aktivierte. Der Einfluss der einzelnen akzessorischen Elemente auf den Promotor musste noch untersucht werden. Die Kotransfektion des pBAG Vektors mit den verschiedenen Hilfselementen fand in 12-Loch-Platten mit NIH 3T3 CD4/CXCR4 statt. 48 Stunden nach der Transfektion wurde der β -Galactosidase-Assay durchgeführt (Abbildung 25). Alle Hilfselemente schienen nach diesem Experiment eine Aktivierung des LTR zu bewirken. Die stärkste Induktion der β -Galactosidase wurde durch Kombination der akzessorischen Gene vpu und rev erreicht. Allerdings konnten diese Daten nicht in Übereinstimmung gebracht werden mit der HIV-1 Hüllproteinexpression aus den Immunoblots. Dort wurde die höchste Proteinexpression mit der Kotransfektion aller akzessorischer Elemente erreicht. Im Falle des β -Galactosidase-Assays überstieg die Promotoraktivierung jedes einzelnen Hilfselements die des Plasmids pC480. Das konnte im

Immunoblot nicht gezeigt werden, so dass mit Hilfe dieser Methode keine weiteren Aussagen getroffen werden konnten.

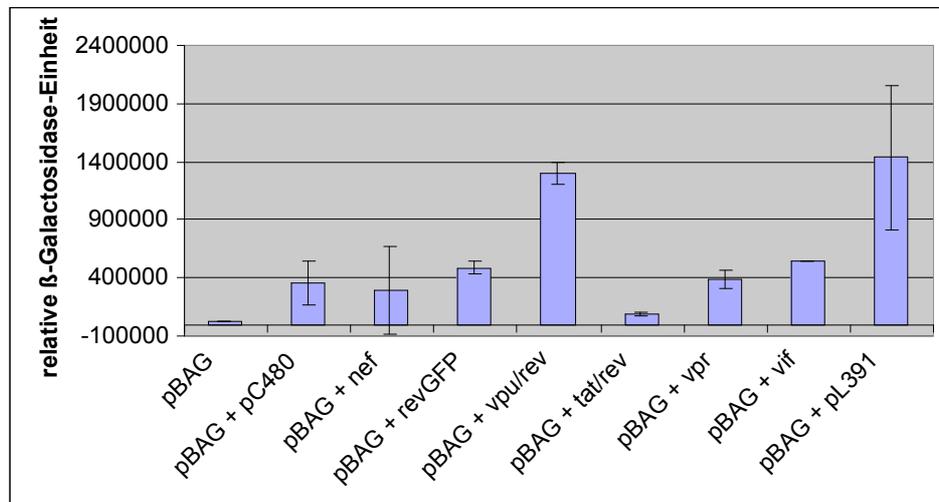


Abbildung 25: Substratumsatz der β -Galactosidase nach Kotransfektion des pBAG Vektors mit Plasmiden, die für einzelne akzessorische Gene kodieren.

4.4.5 Untersuchung der Infektiosität des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

Um die Infektiosität des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} zu untersuchen, wurde ein indirekter Nachweis mit Hilfe der Mobilisierung des lacZ Gens geführt (Abbildung 26). Es wurden 5×10^4 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in 6-Loch-Platten verteilt und über Nacht kultiviert. Transfiziert wurden jeweils 2 μ g Plasmid-DNA des Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} allein, in Gegenwart aller akzessorischer Gene (pC480) oder in Gegenwart des rev Gens. Als positiv Kontrolle wurde der MLV-Retrovirus benutzt. Nach 48 Stunden zeigten die mit dem Pseudotypvirus transfizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 bereits Synzytien, diese traten allerdings vermehrt bei den pC480 kotransfizierten Zellen auf. Als Transduktionszielzellen wurden NIH 3T3 lacZ Zellen 48 Stunden nach der Transfektion ausgesät, am nächsten Tag mit allen akzessorischen Genen transfiziert und mit den Provirusüberstand transduziert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Infektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit Überständen der NIH 3T3 lacZ Zellen. Replikationskompetente Pseudotypviren sollten nach Produktion in den transfizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen die lacZ tragenden NIH 3T3 lacZ Zellen infizieren können, das lacZ Gen verpacken und schließlich auf neue Zielzellen übertragen können. Die lacZ-Färbung in den Zielzellen sollte Aufschluss geben über das Vorhandensein replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren.

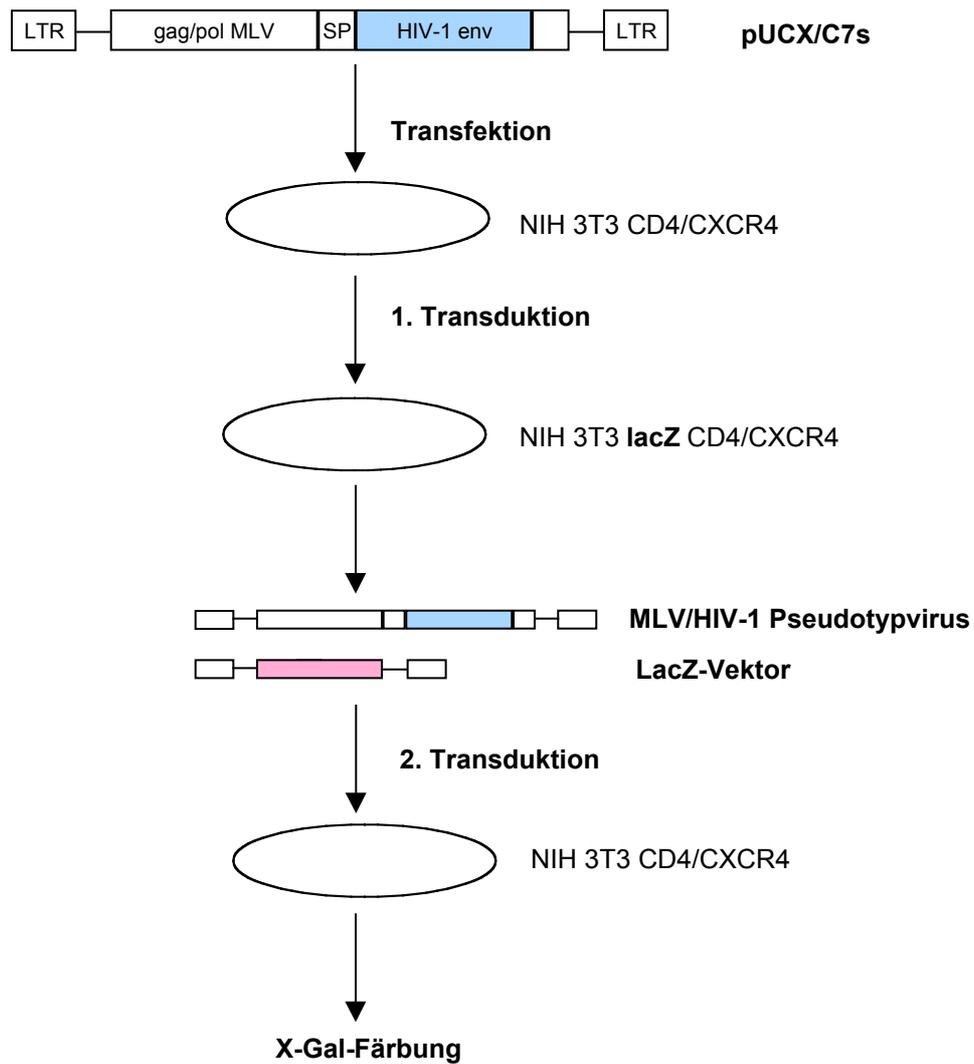


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Überprüfung der Infektiösität des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}.

Die X-Gal-Färbung der transduzierten Zielzellen lieferte folgendes Ergebnis: Eine Blaufärbung der Zellkerne der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen konnte nur für das MLV gezeigt werden. Die mit dem Pseudotypvirus transduzierten Zellen waren lacZ negativ. Eine Langzeitinkubation transfizierter Zellen zeigte keine Zunahme der Synzytien. Folglich ließen sich mit dem MLV/HIV-1 Pseudotypviruskonstrukt pUCX/C_{7s} keine replikationskompetenten Viren nachweisen.

4.4.6 Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

In den vorangegangenen Untersuchungen hatte sich gezeigt, dass die HIV-1 Hüllprotein-expression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} nicht vollständig stattfand, da das Hüllprotein nur in der unprozessierten Form, nämlich als gp140 Vorläuferprotein, exprimiert wurde. Infektiöse Viruspartikel konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Aus diesen Gründen sollte eine Northern Blot Analyse Aufschluss über die Spleißprodukte der Provirus mRNA geben. Das Genom des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus hat den einfachen Aufbau des Murinen-Leukämie-Virus (Dejardin *et al.*, 2000). Akzessorische Gene sind nicht vorhanden, deshalb unterscheidet sich MLV von dem komplexen Genom der Lentiviren (Schwartz *et al.*, 1990; Seguin *et al.*, 1998). Zwei Spleißprodukte sind zu erwarten: die genomische mRNA und die env mRNA. Zunächst wurde eine Northern Blot Analyse des replikationskompetenten MLV anhand einer Kinetik durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für die Isolierung der gesamt RNA zu bestimmen. Im Anschluss folgte die Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}.

4.4.6.1 Northern Blot Analyse zur Kinetik der Replikation von MLV in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen

Dieser Northern Blot sollte untersuchen, zu welchem Zeitpunkt nach Transfektion des MLV in Zielzellen sich die virale mRNA nachweisen lässt. Hierzu wurden mehrfach 1×10^6 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht kultiviert. Alle Kulturschalen wurden mit 12 µg MLV Plasmid-DNA (pMOV-3) und Superfect transfiziert und solange kultiviert bis sie entweder für die RNAisolierung herangezogen wurden oder bis sie konfluent waren und die Subkultivierung erfolgte. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die ersten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit Trypsin abgelöst und das Zellpellet bei -80°C gelagert. Anschließend folgte für die Kinetik alle 24 Stunden die Ernte eines anderen Zellpellets. Das Sammeln der Proben wurde 216 Stunden nach Transfektion abgeschlossen und die RNA-Isolierung sämtlicher Proben fand statt. Der Northern Blot wurde mit 15 µg gesamt RNA pro Probe durchgeführt und mit einer 1,4 kb MLV env Sonde hybridisiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt. Die Verlauf der MLV-Replikation zeigte, dass bereits 48 Stunden nach Transfektion der Plasmid-DNA die genomische mRNA (8 kb groß) und die gespleißte MLV-Hüllprotein mRNA (2 kb groß) nachweisbar waren. Nach 72 Stunden waren die mRNA-Transkripte deutlich stärker vorhanden, allerdings fand im Verlauf der Kinetik keine Steigerung der Transkription mehr statt. Das Verhältnis von genomischer mRNA und env mRNA zueinander war wie erwartet ca. 10:1. Das replikationskompetente MLV-

Retrovirus war somit bereits 48-72 Stunden nach der Transfektion im Northern Blot nachweisbar.

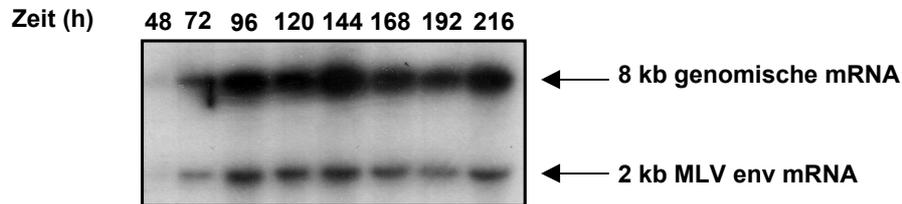


Abbildung 27: Northern Blot Analyse des Murinen-Leukämie-Virus (MLV). Kinetik der Replikation von MLV in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen.

4.4.6.2 Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}

Die Northern Blot Analyse des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus wurde ebenfalls mit 1×10^6 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in 10 cm Zellkulturschalen durchgeführt. Transfiziert wurden die Zellen entweder mit dem Proviruskonstrukt pUCX/C_{7s} allein, oder zusammen mit allen akzessorischen Genen (pC480), als Kontrolle diente das MLV. Für die Transfektion wurden 10 µg Plasmid-DNA und 80 µl Superfect eingesetzt. Bereits 48 Stunden nach der Transfektion wurde die gesamte RNA isoliert und 10 µg RNA je Probe in einem Northern Gel aufgetrennt. Die Hybridisierung der Membran fand zunächst mit der 1,4 kb MLV env Sonde statt, die sowohl mit der MLV mRNA hybridisieren sollte, als auch mit einer 300 bp großen MLV-Sequenz am C-Terminus des MLV/HIV-1 Provirus. Die Hybridisierung der Sonde mit der genomischen mRNA und der env mRNA des MLV funktionierte gut (bessere RNA Expression als in Abbildung 27, da die Transfektion mit einer neuen Plasmidpräparation durchgeführt wurde). Das Verhältnis von erhöhten Mengen genomischer mRNA zu env mRNA konnte im Northern Blot für MLV gezeigt werden (Abbildung 28 A). Die Hybridisierung der MLV env Sonde mit den Proben des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus war dagegen sehr schwach. Die geringe mRNA-Menge wies außerdem darauf hin, dass das MLV/HIV-1 Provirus im Gegensatz zu dem MLV wahrscheinlich nicht replikationskompetent war. Erst nach Strippen der Membran und Hybridisierung mit der 3,1 kb HIV-1 env Sonde konnten die Signale verstärkt werden. Für den MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} war das Verhältnis von genomischer mRNA und env mRNA gestört (Abbildung 28 B). Es schien vielfach mehr Hüllprotein mRNA vorzuliegen als genomische mRNA. Die Kotransfektion aller akzessorischer Gene (Plasmid pC480) mit dem Provirus Konstrukt pUCX/C_{7s} hob dieses Missverhältnis auf: Überwiegend genomische mRNA als env mRNA wurde von der Zelle

transkribiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Northern Blot des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus ein Missverhältnis von genomischer mRNA zu env mRNA aufzeigte. Erst die Zugabe aller akzessorischer Elemente sorgte für ein korrektes Verhältnis von genomischer mRNA zu env mRNA im Falle des MLV/HIV-1 Provirus, allerdings war die allgemeine RNA-Expression geringer als das bei MLV der Fall war.

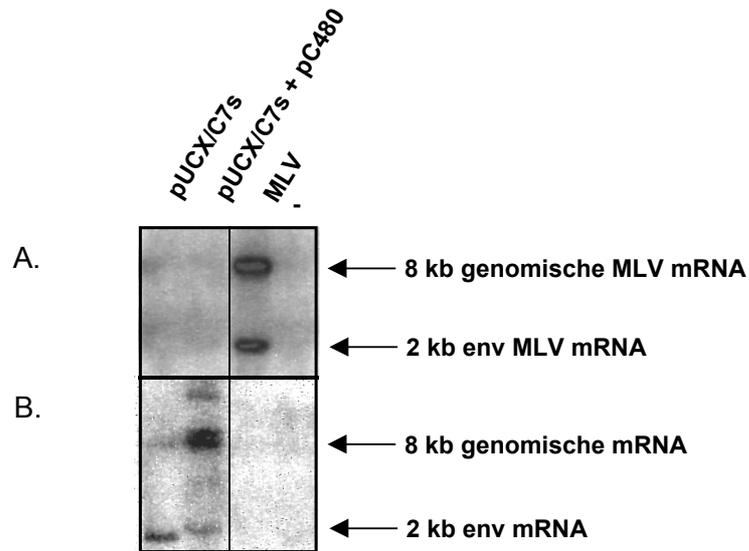


Abbildung 28: Northern Blot des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}. A. Hybridisierung mit der MLV env Sonde; B. Detektion mit der HIV-1 env Sonde.

4.5 Produktion semi-replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren

Als Alternative zu einem einzigen MLV/HIV-1 Pseudotypvirus Konstrukt steht die Produktion zweier Verpackungszelllinien, die entweder die Gene gag und pol von MLV oder das HIV-1 env Gen in Vektorpartikel verpacken. Die Transduktion beider Vektorpartikel in eine CD4- und CXCR4-exprimierende Zielzelle sollte zur Produktion eines Gemisches aus replikationskompetenten MLV/HIV-1 Pseudotypviren führen. Zunächst wurden die einzelnen MLV gag/pol und HIV-1 env Konstrukte kloniert und deren Proteinexpression überprüft. Anschließend folgte die Generierung von Verpackungszelllinien, die Titerbestimmung und die Transduktion beider Vektorpartikel in die Zielzellen (siehe Abbildung 29).

4.5.1 Charakterisierung des verpackbaren MLV gag/pol Expressionsvektors

Zur Expression der MLV Proteine gag und pol wurde der retrovirale Vektor pKA \square envEGFP verwendet, der ein Verpackungssignal trägt und neben den bereits erwähnten Genen das „grüne fluoreszierende Protein“ (EGFP) exprimiert. Die Funktionalität des Vektors wurde in 293 T Zellen untersucht. 2×10^5 Zellen wurden über Nacht auf 6-Loch-Platten kultiviert und am nächsten Tag nach folgendem Schema transfiziert:

<p>A. \square MLV gag/pol + MLV env 1,5 μg pKA\squareenvEGFP + 0,5 μg pSG-EA2 II/I → Titer $3,3 \times 10^3$ IU/ml</p>	<p>B. \square MLV gag/pol + HIV env 1,5 μg pKA\squareenvEGFP + 0,5 μg pCMX-128 → Titer $7,2 \times 10^2$ IU/ml</p>
<p>C. MLV gag/pol + MLV env + \square EGFP 1,5 μg pHIT 60 + 0,5 μg pSG-EA2 II/I + 2 μg pMX-EGFP → Titer $3,9 \times 10^3$ IU/ml</p>	<p>D. MLV gag/pol + HIV env + \square EGFP 1,5 μg pHIT 60 + 0,5 μg pCMX-128 +2 μg pMX-EGFP → Titer $9,0 \times 10^2$ IU/ml</p>

Abbildung 29: Titer der MLV gag/pol verpackenden und nicht-verpackenden MLV-Vektorpartikel, sowie der MLV/HIV-1 Vektorpartikel.

Um einen Vergleich des MLV gag/pol verpackenden Vektors (pKA \square envEGFP) mit nicht verpackbaren gag/pol MLV exprimierenden Vektoren zu bekommen, wurde das Konstrukt pHIT 60 benützt, das kein Verpackungssignal enthält. Die Transduktion der 293 T Überstände auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion. Die transduzierten Zellen wurden nach weiteren 72 Stunden mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst und im FACSsort nach GFP-Fluoreszenz durchgeschaut. Die Titer, die sich aus den FACS Daten berechnen, sind in Abbildung 29 dargestellt.

Alle MLV-Vektorpartikel zeigten die gleiche Transduktionseffizienz gleichgültig, ob die gag und pol Gene ein Verpackungssignal trugen oder nicht. Dasselbe Ergebnis traf auf die Transduktionseffizienz der HIV-1 env tragenden MLV-Vektorpartikel zu: es machte keinen Unterschied, ob die Vektorpartikel das Verpackungssignal der gag und pol Gene hatten, die Titer waren die gleichen. Somit war das MLV gag/pol Konstrukt mit Verpackungssignal (pKA \square envEGFP) funktionsfähig und entsprach bei der Transduktion den Werten des nicht-verpackbaren Konstruktes pHIT 60. Im Allgemeinen waren die Titer der MLV-Vektorpartikel höher ($3,3 \times 10^3$ IU/ml), als die der MLV/HIV-1 Vektorpartikel ($7,2 \times 10^2$ IU/ml). In ähnlichen Experimenten konnten Titer von $1,3 \times 10^4$ IU/ml für MLV-Vektorpartikel und $2,9 \times 10^3$ IU/ml für MLV/HIV-1 Vektorpartikel erreicht werden. Immer jedoch blieb die Transduktion mit MLV-Hüllprotein erfolgreicher als mit HIV-1 Hüllprotein. Für weitere Studien wurden MLV-Vektorpartikel generiert, die gag/pol von MLV (pKA \square envEGFP) verpacken konnten.

4.5.2 HIV-1 Hüllprotein Expression verschiedener verpackbarer HIV-1 env Konstrukte

Um eine Zelllinie zu etablieren, die MLV/HIV-1 Vektorpartikel produziert, welche das HIV-1 Hüllproteingen verpacken, wurden verschiedene HIV-1 env verpackende Konstrukte kloniert und ausgetestet. Die folgende Abbildung 30 zeigt die verschiedenen HIV-1 env Konstrukte schematisch.

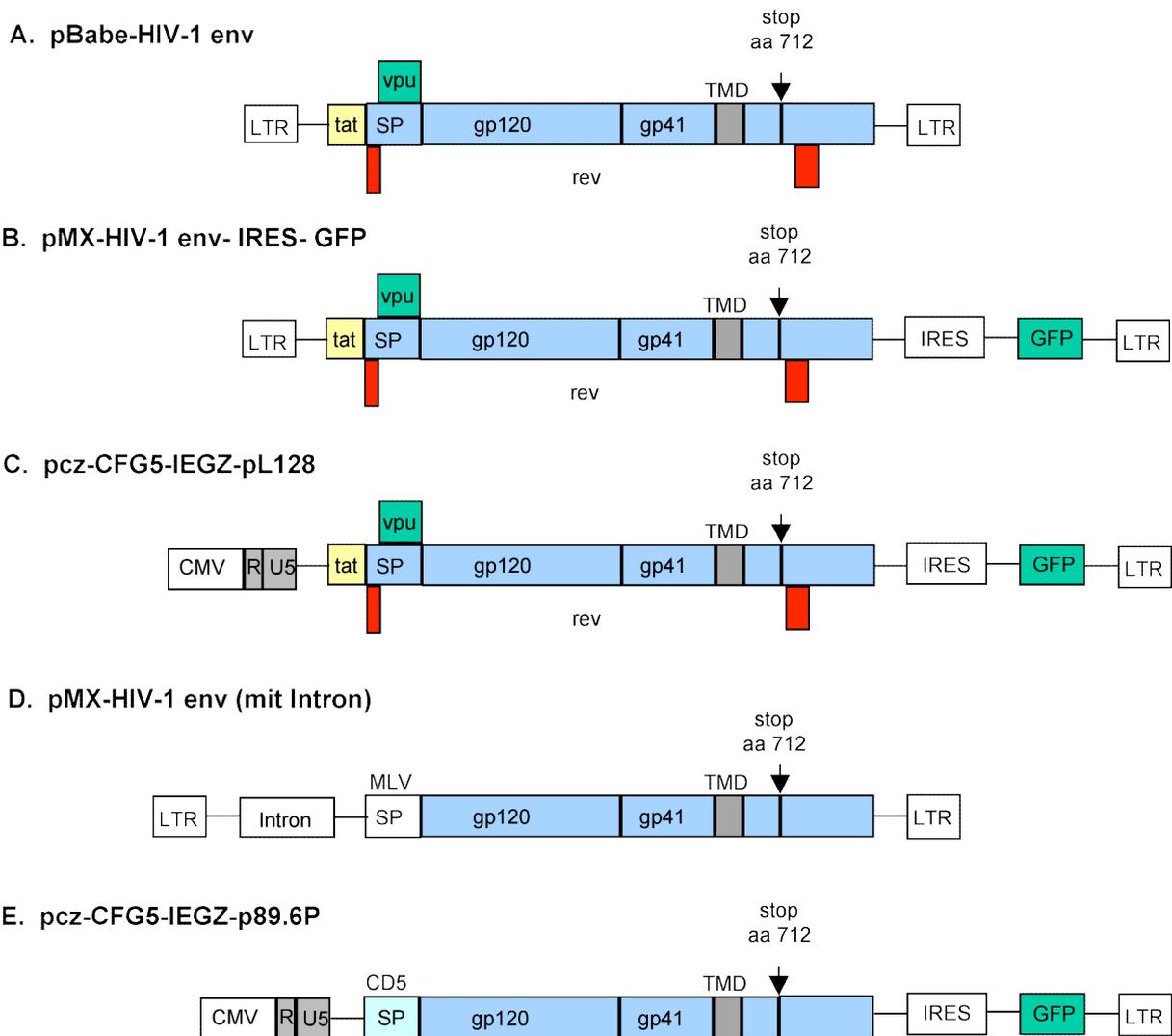


Abbildung 30: Darstellung unterschiedlicher HIV-1 env verpackender retroviraler Plasmide: A.-C. alle Konstrukte mit akzessorischen Genen *rev*, *tat* und *vpu*; D. HIV-1 env mit Intron für alternatives Spleißen, ohne akzessorische Gene; E. synthetisches HIV-1 env ohne akzessorische Gene;

Mit diesen 5 unterschiedlichen Konstrukten sollten drei verschiedene Strategien zur HIV-1 Hüllprotein Expression verfolgt werden. Sämtliche Konstrukte kodieren für die zytoplasmatisch auf 7 Aminosäuren verkürzte Variante des HIV-1 env. Dies garantiert den Einbau des HIV-1 Hüllproteins in Vektorpartikel (Schnierle *et al.*, 1997). Die erste Gruppe umfasst die in Abbildung 30 A.-C. dargestellten retroviralen Konstrukte. Die Gemeinsamkeit dieser Konstrukte besteht darin, dass sie neben HIV-1 env die akzessorischen Gene *rev*, *tat* und *vpu* exprimieren. Diese zusätzlichen Gene entstehen durch alternatives Spleißen der mRNA. Besonders wichtig erscheint das akzessorische Element *rev*. Die Funktionsweise dieses Proteins bewirkt, dass ungespleißte und einfach gespleißte mRNAs durch Binden an die RRE-Sequenz (*rev responsive element*) aus dem Zellkern in das Zytoplasma

transportiert werden, wo die Proteinbiosynthese stattfindet (Pollard *et al.*, 1998; Nasioulas *et al.*, 1994). Fehlt *rev*, können diese mRNAs nicht transportiert werden und es würde mehrfaches Spleißen dieser mRNAs im Nukleus erfolgen. Unterschiede zwischen dem Konstrukt A und den Konstrukten B und C finden sich im Gebrauch des „grün fluoreszierenden Proteins“ (GFP). Weiterhin enthält das Plasmid *pcz-CFG5-IEGZ-pL128* (Konstrukt C) einen verstärkten Promotor. Das 5'-LTR wird durch einen CMV-Promotor ergänzt und somit zu einem stärkeren Promotor umfunktioniert, der die Proteinexpression erhöhen soll. Das in Abbildung 30 D dargestellte Konstrukt gehörte zur zweiten Familie. Diesem Konstrukt fehlen jegliche akzessorische Elemente. Durch den Einbau eines β -Globulintrons vor das HIV-1 *env* Gen soll das akzessorische Element *rev* in seiner Funktion ersetzt werden (Hammarskjöld *et al.*, 1994). Ein starkes Spleißsignal kann *Rev* ersetzen. Dieser Vektor unterscheidet sich von den anderen Konstrukten weiterhin dadurch, dass er als einziger das MLV-Signalpeptid enthält. Der dritten Gruppe gehörte das in Abbildung 30 E gezeigte Konstrukt an. Es handelte sich hierbei um ein synthetisches HIV-1 *env* Gen, das durch alternativen Kodongebrauch einen erhöhten GC-Gehalt aufweist. Im synthetischen Gen soll kein Spleißen auftreten, die Gene sind *Rev*-unabhängig (Schwartz *et al.*, 1990) und weisen eine erhöhte Proteinexpression auf. In diesem Konstrukt sind keine akzessorischen Gene vorhanden. Der Tropismus des HIV-1 *env* ist dualotrop, das heißt, dass zur Infektion von CD4-positiven Zielzellen sowohl CXCR4 als auch CCR5 als Korezeptor benutzt werden können.

Klonierung der HIV-1 *env* Konstrukte:

pBabe-HIV-1 *env*

Das HIV-1 *env* Fragment wurde aus dem Vektor pL128 über *Sal*I und *Xho*I herausgeschnitten und in den Vektor pBabe-puro, der zuvor mit *Sal*I restringiert wurde, gesetzt. Das war möglich, da die *Sal*I und *Xho*I Schnittstelle kompatibel sind.

pMX-HIV-1 *env*-IRES-GFP

Das Insert HIV-1 *env* stammte aus dem Plasmid pL128, der mit *Sal*I und *Xho*I geschnitten wurde und durch eine „blunt end“ Ligation in den *Eco*R¹/*Not*I restringierten Vektor pMX-IRES-GFP integriert wurde.

pcz-CFG5-IEGZ-pL128

Durch *Sal*I und *Xho*I Restriktion konnte das HIV-1 *env* Fragment aus dem Plasmid pL128 entfernt werden. Die Integration erfolgte mit einer „blunt end“ Ligation in den mit *Bam*H¹ linearisierten Vektor *pcz-CFG5-IEGZ*.

pMX-HIV-1 *env* (mit Intron)

Das komplette Insert, bestehend aus einem β -Globulintrons und dem HIV-1 *env* mit dem Signalpeptid von MLV, konnte nach Synthese des Ausgangsvektors pSG-X/C_{7s}

in nichtmethylierenden *E.coli* durch ClaI Restriktion entfernt werden. Die Insertion erfolgte in den Vektor pMX, der ebenfalls in nichtmethylierenden *E.coli* synthetisiert und mit ClaI geschnitten wurde.

pcz-CFG5-IEGZ-p89.6P

Das Plasmid pcDNA89.6PsynCD5TMneu wurde XhoI geschnitten, geblundet und EcoRI verdaut. Das entstandene synthetische Insert HIV-1 env konnte in den BamHI geschnittenen, mit Nucleotiden aufgefüllten und EcoRI geschnittenen Vektor pcz-CFG5-IEGZ inseriert werden.

Für die Untersuchung der HIV-1 Hüllproteinexpression der einzelnen Konstrukte wurden 5×10^5 Anjou lacZ Zellen oder Phoenix Zellen über Nacht in 6-Loch-Platten kultiviert und anschließend mit jeweils 4 μg der unterschiedlichen Konstrukte und 15 μl Superfect transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und 30 oder 40 μg Protein in einem 7,5 %igen Gel (Abbildung 31) aufgetrennt. Die immunologische Detektion erfolgte mit dem 1:2000 verdünnten Ziege-anti-gp120 Antikörper. Der sekundäre HRP-gekoppelte Kaninchen-anti-Ziege Antikörper wurde 1:30000 verdünnt eingesetzt.

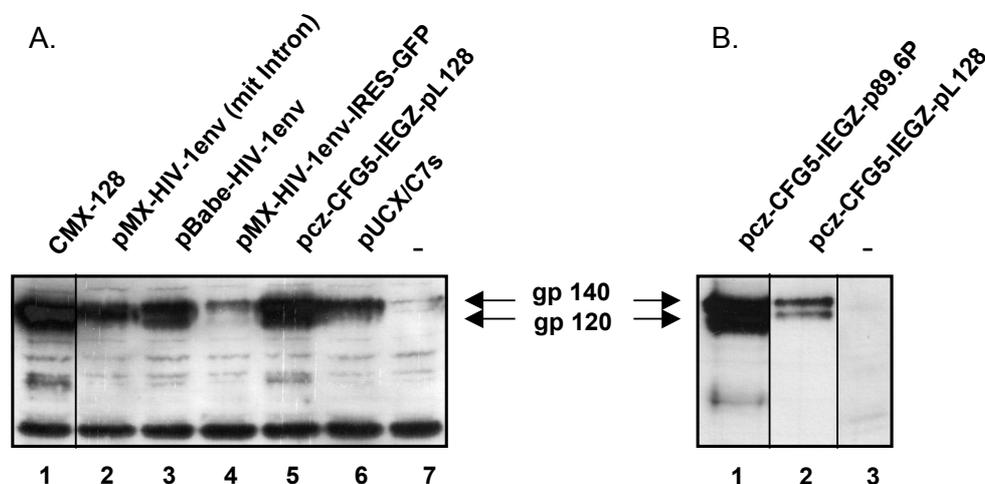


Abbildung 31: HIV-1 env Proteinexpression verschiedener HIV-1 env Konstrukte in Anjou lacZ Zellen (A) oder Phoenix Zellen (B). In A. wurden 30 μg Zelllysate geladen, in B. wurden 40 μg Zelllysate elektrophoretisch getrennt. Die immunologische Detektion erfolgte mit dem 1:2000 verdünnten anti-HIV-1 gp120 Antikörper und dem 1:30000 verdünnten anti-Ziege-HRP Antikörper.

Die HIV-1 Env-Expression war mit den verschiedenen Konstrukten recht unterschiedlich. Als positiv Kontrolle wurde die HIV-1 Env-Expression des Plasmids pCMX-128 herangezogen, da das Hüllglykoprotein die unprozessierte gp140 Vorläuferbande und die prozessierte

gp120 Bande zeigte (Abbildung 31 A, Spur 1). Betrachtet man zunächst die Anjou lacZ Zelllysate, so exprimierte das pMX-HIV-1env (mit Intron) Plasmid (Konstrukt siehe Abbildung 30 D) nur die unprozessierte gp140 Vorläuferbande (Abbildung 31 A, Spur 2). Das β -Globulintron innerhalb des Konstruktes und das Spleißen der Gene bewirkte keinen positiven Einfluss bezüglich der HIV-1 Proteinexpression. Die der ersten Gruppe von HIV-1 env Plasmiden angehörenden Konstrukte pBabeHIV-1env (Abbildung 30 A) und pcz-CFG5-IEGZ-pL128 (Abbildung 30 C) zeigten im Immunoblot sowohl das unprozessierte gp140 als auch das prozessierte gp120 HIV-1 Protein (Abbildung 31 A, Spur 3+5). Die Proteinexpression des pcz-CFG5-IEGZ-pL128 Konstrukts war am stärksten, was wahrscheinlich auf den zusätzlichen CMV-Anteil des 5'LTR-Promotors zurückzuführen ist. Die Proteinexpression des pMX-HIV-1env-IRES-GFP Konstruktes (Abbildung 30 B) war im Vergleich zu den eben genannten Konstrukten schwächer: Die gp140 Vorläuferbande war schwach exprimiert, die prozessierte gp120 Bande kaum detektierbar (Abbildung 31 A, Spur 4). Zusammenfassend lässt sich über die erste Gruppe der HIV-1 env Konstrukte sagen, dass die Anwesenheit des akzessorischen Gens rev zur korrekten Expression des HIV-1 Hüllproteins in das Vorläuferprotein und das prozessierte Protein führte. Zum Vergleich wurde das Zelllysate des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} im SDS-PAGE mit analysiert (Abbildung 31 A, Spur 6). Die HIV-1 Env-Expression war nicht sehr stark, außerdem wurde nur die gp140 Vorläuferbande vom Antikörper detektiert. Abbildung 31 B zeigt die HIV-1 Env-Expression des synthetischen HIV-1 env Konstrukts pc-CFG5-IEGZ-89.6P (Konstrukt siehe Abbildung 30 E) in Phoenix-Verpackungszellen. Dieses Konstrukt zeigte die stärkste HIV-1 Env-Expression aller getesteter HIV-1 env Konstrukte, was im Vergleich mit dem pcz-CFG5-IEGZ-pL128 Konstrukt deutlich wird. Die Spaltung des Vorläuferproteins in das prozessierte Protein war ebenfalls erfolgt (Abbildung 31 B, Spur 1). Zur Kontrolle wurde das pcz-CFG5-IEGZ-pL128 Konstrukt in Phoenix Zellen transfiziert und im SDS-PAGE mit aufgetragen (Abbildung 31 B, Spur 2). Die HIV-1 env Proteinexpression gleicht der in Anjou lacZ Zellen. Aus den Ergebnissen des Immunoblots lässt sich schließen, dass sich die Konstrukte mit der stärksten HIV-1 env Proteinexpression und mit vollständiger Prozessierung, nämlich das pcz-CFG5-IEGZ-pL128 Plasmid und das synthetische pcz-CFG5-IEGZ-89.6P Konstrukt, am besten zur Produktion von Vektorpartikeln eignen.

Da die verschiedenen HIV-1 env-exprimierenden Plasmide in den Verpackungszelllinien Anjou lacZ und Phoenix produziert wurden, konnten die Überstände mit Vektorpartikeln auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen transduziert werden. Die aus Anjou lacZ Zellen stammenden Vektorpartikel übertrugen das lacZ Gen, das für die β -Galactosidase kodierte. Mittels X-Gal-Färbung sollten transduzierte Zellen blau gefärbt werden und die Titer durch Auszählen bestimmt werden. Im Fall der Phoenix Zellen wurde verpackbares EGFP kotransfiziert und

wenige Tage nach der Transduktion im FACSort ausgewertet. Mit diesem Versuch sollte die Bildung von MLV/HIV-1 Vektorpartikeln mit verschiedenen HIV-1 Env-Expressionsplasmiden überprüft werden, was außerdem als Nachweis für den korrekten Einbau des HIV-1 Glykoproteins in die Vektorpartikel dienen sollte. Tabelle 3 stellt die Titer der einzelnen HIV-1 env Konstrukte in einer Übersicht dar.

Konstrukte	Transduzierte	
	NIH 3T3 CD4/CXCR4	
wt MLV env (pSG-EA ₂ II/I)	4,0 · 10 ⁴ IU/ml	X-Gal-Färbung
pCMX-128	5,3 · 10 ³ IU/ml	X-Gal-Färbung
p-Babe-HIV-1env	< 1	X-Gal-Färbung
pMX-HIV-1env-IRES-GFP	< 1	X-Gal-Färbung
pcz-CFG5-IEGZ-pL128	1,8 · 10 ⁴ IU/ml	X-Gal-Färbung
pMX-HIV-1env (mit Intron)	< 1	X-Gal-Färbung
pcz-CFG5-IEGZ-p89.6P	2,2 · 10 ³ IU/ml	GFP

Tabelle 3: Übersicht über die Titer, die mit den einzelnen HIV-1 env Konstrukten erzielt wurden. Verschiedene HIV-1 env Konstrukte wurden in Anjou lacZ Zellen oder Phoenix Zellen (hier Kotransfektion von □ EGFP) transfiziert. Die Bestimmung der Titer (IU/ml) erfolgte durch Auszählen X-Gal gefärbter NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen oder GFP-fluoreszierender Zielzellen.

Als Kontrolle für die Titer der HIV-1 env Konstrukte wurde wildtyp MLV env benützt und ergab einen Titer von 4,0 · 10⁴ IU/ml auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen. Das Plasmid pCMX-128 kodiert für das HIV-1 env Plasmid mit den akzessorischen Genen rev, vpu und tat und lieferte einen weiteren Kontrollwert (5,3 · 10³ IU/ml), der niedriger war als der des MLV env. Mit Ausnahme der Konstrukte pcz-CFG5-IEGZ-pL128 und pcz-CFG5-IEGZ-p89.6P konnten alle anderen HIV-1 Env-Expressionsplasmide zu keiner Produktion von Vektorpartikeln führen, deshalb kamen diese Konstrukte für weitere Untersuchungen nicht mehr in Betracht. Die Werte des Konstrukts pcz-CFG5-IEGZ-pL128 lagen fast bei denen des wildtyp MLV env, nämlich bei 1,8 · 10⁴ IU/ml. Allerdings bildeten die transduzierten Zellen keine Synzytien. Das synthetische HIV-1 env Konstrukt lieferte trotz der enormen HIV-1 env Proteinexpression nur Titer von 2,2 · 10³ IU/ml. Im Gegensatz zu dem anderen Konstrukt konnte allerdings sowohl auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, als auch auf NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen 48 Stunden nach Transduktion Synzytienbildung beobachtet werden (Abbildung 32), was für eine korrekte Prozessierung des HIV-1 Hüllproteins in den transduzierten Zellen sprach. Normalerweise bilden M-trope HIV-1 Stämme keine Synzytien, bei dem dualotropen HIV-1 env scheint es

sich um eine Ausnahme zu handeln. Hier zeigte sich, dass die HIV-1 env Proteinexpression nicht allein für die Höhe der Titer verantwortlich zu sein scheint. Die Titer des pcz-CFG5-IEGZ-pL128 Konstruktes waren deutlich höher, obwohl die Proteinexpression der des synthetischen Glykoproteins unterlegen war. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das pcz-CFG5-IEGZ-pL128 und das synthetische HIV-1env Konstrukt für weitere Studien verwendet.

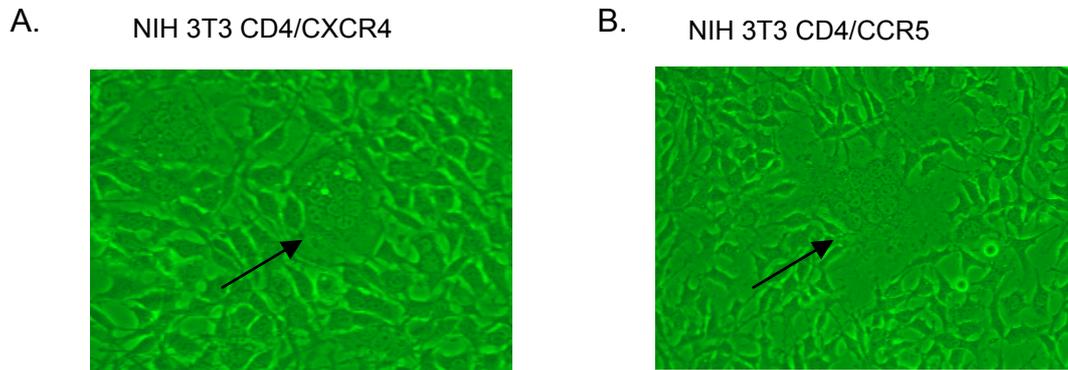


Abbildung 32: Synzytienbildung infizierter NIH 3T3 CD4/CXCR4 (A.) und NIH 3T3 CD4/CCR5 (B.) mit MLV/HIV-1 Pseudotyppartikeln unter Verwendung des dualotropen synthetischen HIV-1 env.

4.5.3 Kombination der MLV gag/pol verpackenden Vektorpartikel mit HIV-1 env verpackenden Vektorpartikeln

Aus den vorangegangenen Experimenten ging hervor, dass das Proviruskonstrukt pUCX/C_{7s} nicht in der Lage war replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren herzustellen. In diesen Studien sollte überprüft werden, ob die Verteilung der Gene MLV gag/pol und HIV-1 env auf zwei verschiedene Plasmide zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren führt.

4.5.3.1 Direkte Transfektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit MLV gag/pol und HIV-1 env Konstrukten

Werden die Gene, die für MLV gag/pol und HIV-1 env kodieren, in CD4- und CXCR4-exprimierende Zielzellen gebracht, so wird zunächst die Produktion der MLV/HIV-1 Pseudotyppartikel erwartet, die eines der beiden Vektorkonstrukte verpacken. Letztere würden in den Kulturüberstand entlassen werden und benachbarte Zellen infizieren, bis

beide Vektorgenome in einer Zelle wären, die wieder replizierenden Retroviren entlässt und so die ganze Zellkultur infiziert hätte (Abbildung 33).

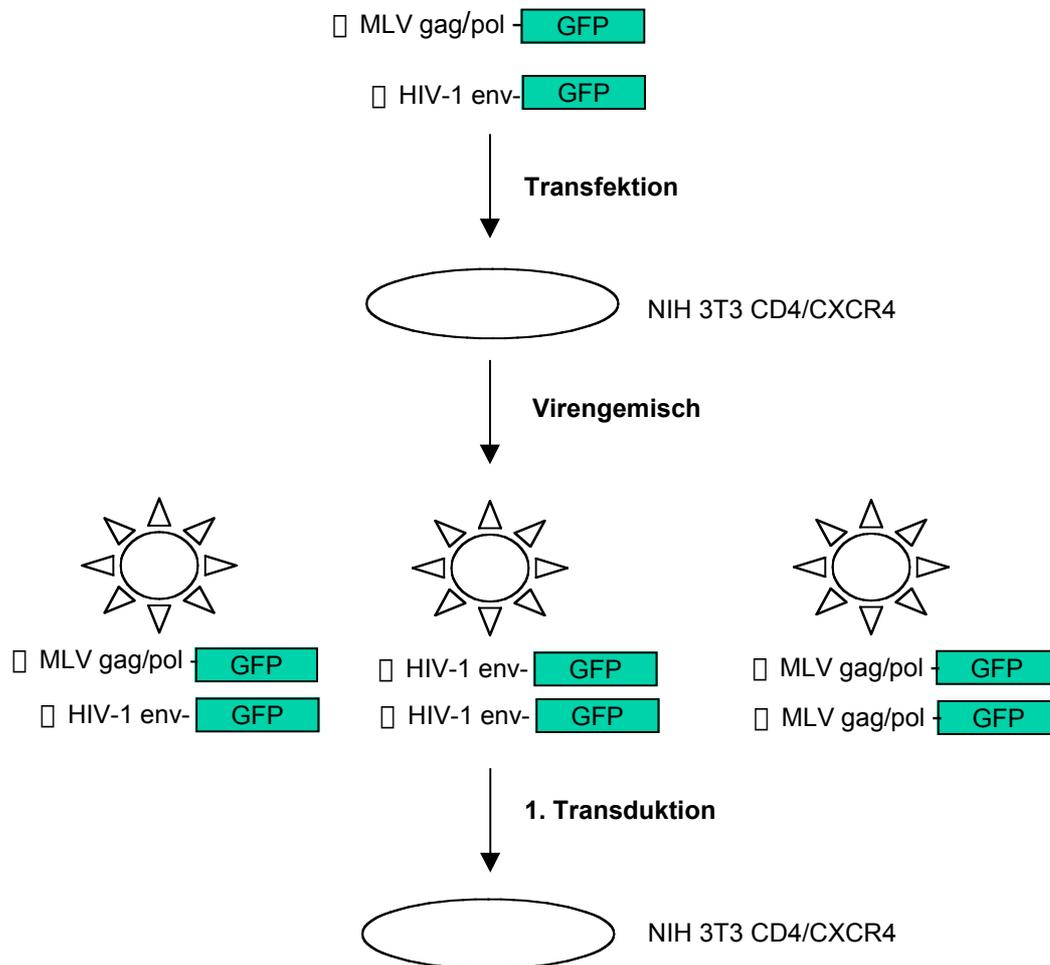


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Eine Zielzelle soll mit zwei Plasmiden transfiziert werden, die entweder für verpackbares MLV gag/pol oder HIV env kodieren. Ein Gemisch verschiedener Viren wird in den Zellkulturüberstand abgegeben, darunter befinden sich auch replikationskompetente Pseudotypviren (seltenes Ereignis). Im nächsten Schritt erfolgt die Transduktion auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, in denen die Proviren replizieren sollen.

Die Produktion der MLV/HIV-1 Pseudotypviren sollte in NIH 3T3 Zellen stattfinden, die den CD4-Rezeptor und den CXCR4-Korezeptor für das HIV-1 Hüllprotein exprimieren. Die Zellen wurden gezählt, 1×10^6 Zellen wurden auf 10 cm Kulturschalen ausgebracht und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag folgte die Transfektion: 5 µg des HIV-1 env Plasmids pcz-CFG5-IEGZ-pL128 und 5 µg des MLV gag/pol Konstruktes pKA \square envEGFP wurden zusammen mit 60 µl Superfect transfiziert. Die transfizierten Zellen zeigten viele große Synzytien, die allerdings innerhalb von 10 Tagen von benachbarten Zellen überwachsen wurden. Ebenso

verhielt es sich mit der GFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen. Die schwache GFP-Fluoreszenz, die von beiden Konstrukten herrührte, betrug ca. 1 % und wurde im Laufe der Zeit immer schwächer und war letztendlich kaum noch detektierbar. Zur Kontrolle wurde nicht verpackbares wildtyp MLV env (pSG-EA₂ II/I) anstelle des HIV-1 env in die NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen transfiziert. Diese transfizierten Zellen zeigten wie erwartet keine Synzytien und ca. 30 % GFP-positive Zellen. Nach 48 Stunden fand die erste Infektion der am Vortag ausgesäten NIH 3T3 CD4/CXCR4 mit 2,5 ml Kulturüberstand statt. Dieser Vorgang wurde im Rahmen einer Kinetik alle weiteren 48 Stunden wiederholt. Bei der Produktion replikationskompetenter Pseudotypviren sollte es zur Übertragung von GFP auf die Zielzellen kommen, da sowohl das verpackbare MLV gag/pol als auch das HIV-1 env Konstrukt für GFP kodierten. Die GFP-positiven Zielzellen sollten im FACSsort quantitativ bestimmt werden. Die, mit den MLV/HIV-1 Pseudotypviren transduzierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, zeigten für alle untersuchten Zeitpunkte keine GFP-Fluoreszenz und keine Synzytienbildung (Abbildung 34). Im Fall der mit MLV-Vektorpartikeln transduzierten Zielzellen konnte für die erste Transduktion ein Titer von $9,6 \cdot 10^3$ IU/ml berechnet werden. Da es sich bei den MLV-Vektorpartikeln nicht um replikationskompetente Viren handelte, waren weitere Transduktionen negativ verlaufen. Schlussfolgernd ließen sich keine replikationskompetenten MLV/HIV-1 Pseudotypviren nachweisen. Das Prinzip, zwei Plasmide zu benützen, die entweder für MLV gag/pol kodieren oder für HIV-1 env, schien an der schlechten Transfektionseffizienz in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen zu scheitern. Dies verringerte die Wahrscheinlichkeit, eine Zielzelle mit beiden Konstrukten zu transfizieren, um Nachkommen zu produzieren.

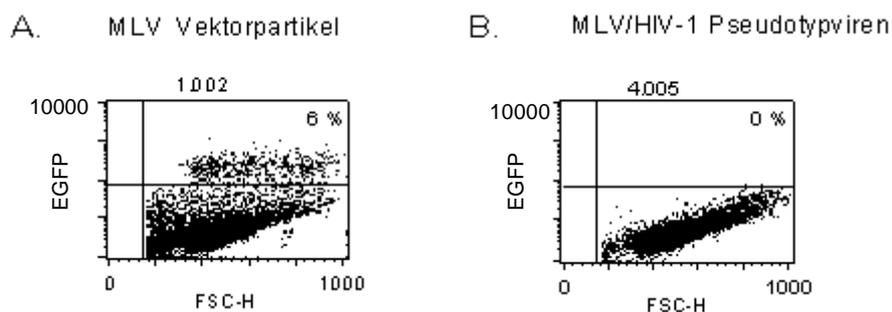


Abbildung 34: GFP-Fluoreszenz der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit A. MLV-Vektorpartikeln (pKA Δ envGFP + pSGEA₂II/I) oder B. MLV/HIV-1 Pseudotypviren (pKA Δ envGFP + pcz-CFG5-IEGZ-pL128).

4.5.3.2 Generierung von MLV gag/pol oder HIV-1 env verpackenden Verpackungszelllinien

Die Transfektion der einzelnen Provirusgene MLV gag/pol und HIV-1 env in NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen führte nicht zur Vermehrung der MLV/HIV-1 Pseudotypviren. Aus diesem Grunde sollten Verpackungszelllinien etabliert werden, die entweder MLV gag/pol oder HIV-1 env in Vektorpartikel verpacken sollten. Die Transduktion beider Vektorpartikel auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen oder NIH 3T3 CD4/CCR5 Zielzellen sollte zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren führen. Abbildung 35 zeigt schematisch den Verlauf des Experiments.

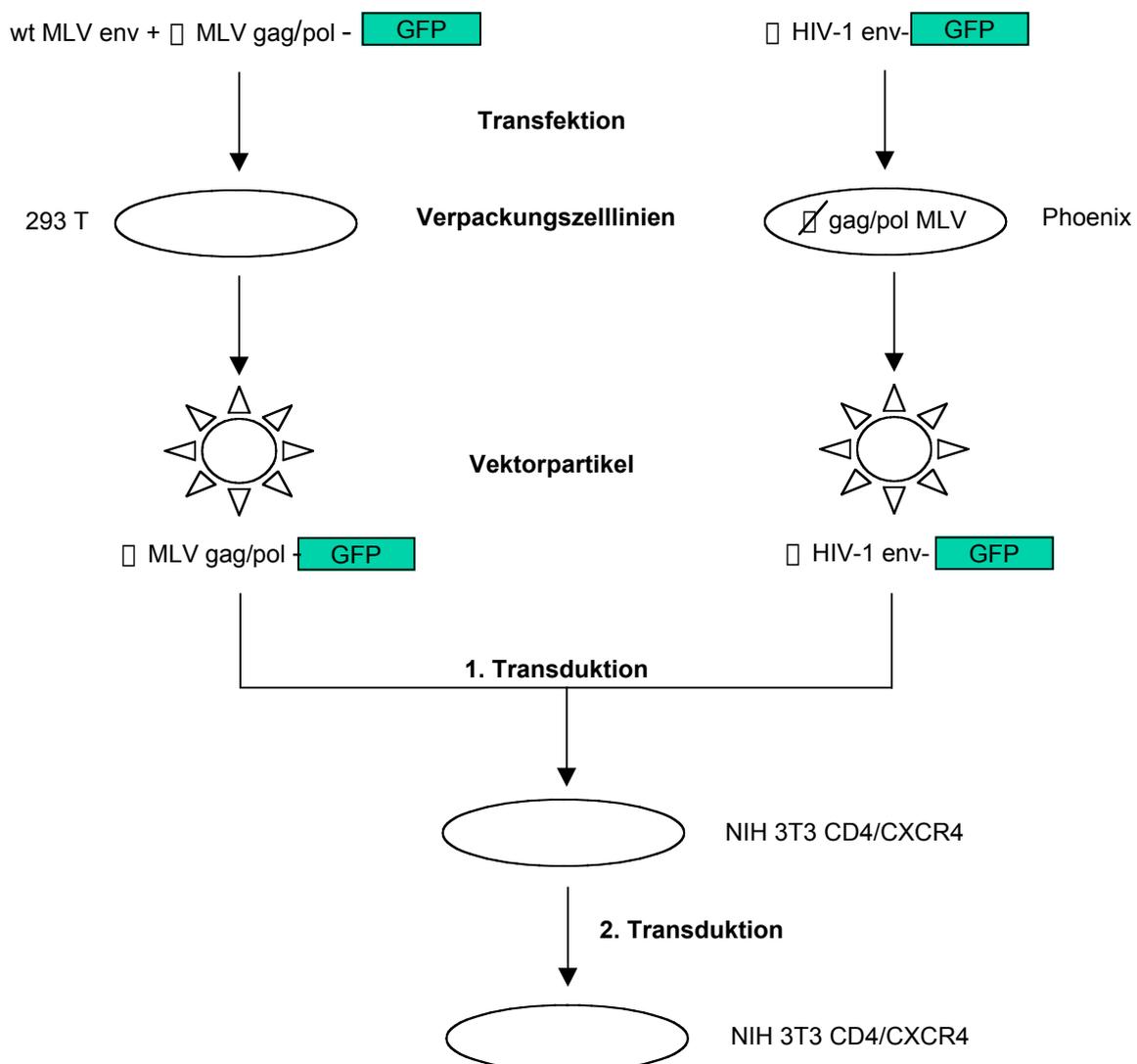


Abbildung 35 Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung. Es werden zwei Verpackungszelllinien generiert, die entweder MLV gag/pol oder HIV-1 env in MLV-Vektorpartikel verpacken. Die Transduktion beider Vektorpartikel auf NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen soll zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren führen.

Zur Produktion der MLV gag/pol verpackenden Vektoren wurden 1×10^6 293 T Zellen über Nacht in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und am folgenden Tag mit $10 \mu\text{g}$ pKA \square envEGFP (\square MLV gag/pol) und $4 \mu\text{g}$ pSG-EA2 II/I (MLV env) transfiziert. Es entstanden MLV-Vektorpartikel, die gag/pol von MLV verpackten. Parallel dazu wurden $1,5 \times 10^6$ Phoenix Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und mit $5 \mu\text{g}$ pcz-CFG5-IEGZ-89.6P transfiziert. HIV-1 env verpackende MLV/HIV-1 Vektorpartikel entstanden im Kulturüberstand der Zellen. Die Titerbestimmung wurde in einer 6-Loch-Platte durchgeführt, die mit 1×10^5 NIH 3T3 CD4/CXCR4 und NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen ausgesät wurde. Die Transduktion für die Titerbestimmung fand mit 1 ml Kulturmedium statt. Nach drei Tagen konnte die GFP-Fluoreszenz, die aus den zu verpackenden Plasmiden MLV gag/pol und HIV-1 env stammte, im FACSsort nachgewiesen werden. In nachstehender Tabelle sind die einzelnen Titer verschiedener Zielzellen aufgelistet.

	NIH 3T3 CD4/CXCR4	NIH 3T3 CD4/CCR5
HIV-1env verpackende Vektorpartikel	$2,2 \cdot 10^3$ IU/ml	$4,1 \cdot 10^3$ IU/ml
Gag/pol verpackende Vektorpartikel	$1,3 \cdot 10^4$ IU/ml	$1,5 \cdot 10^4$ IU/ml

Tabelle 4: Angabe der Titer (IU/ml) für HIV-1 env und MLV gag/pol verpackende Vektorpartikel.

Zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden 24 Stunden vor der Transduktion 5×10^4 NIH 3T3 CD4/CXCR4 und NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät. Die Transduktion erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion, wobei zuerst 3 ml HIV-1 env verpackende Vektorpartikel auf die Zellen gegeben wurden und 7 Stunden später, nach einem Medienwechsel, 3 ml MLV gag/pol verpackende Vektorpartikel auf dieselben Zellen gegeben wurden (1. Infektionsrunde). Die infizierten Kulturen wurden zur Bildung replikationskompetenter Pseudotypviren weiterkultiviert. Am dritten Tag nach erfolgter Transduktion wurden erneut 1×10^5 NIH 3T3 Zellen mit CD4/CXCR4 oder CD4/CCR5 Korezeptoren ausgesät. Das Kulturmedium der transduzierten Zellen aus der 1. Infektionsrunde wurde gegen frisches Medium ausgewechselt, über Nacht auf den Zellen belassen und anschließend auf die tags zuvor ausgesäten Zellen transduziert (2. Infektionsrunde). Die transduzierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der ersten Infektionsrunde zeigten Synzytien, das gleiche Bild war bei NIH 3T3 CD4/CCR5 Zielzellen zu sehen (Abbildung 36). Allerdings konnte bei keiner der beiden Zelllinien eine Vergrößerung der Synzytien oder die komplette Lyse des Zellkulturrasens beobachtet werden. Im Gegenteil, nach mehrtägiger Kultur wurden die Synzytien von Nachbarzellen überwachsen. Als negativ Kontrolle wurden Phoenix Überstände verwendet, die von untransfizierten Zellen stammten, hierbei handelte es sich um MLV-Kapsidpartikel, die keine Proteinhülle trugen und keine

Infektion bewirken sollten. Wie erwartet, zeigten die so behandelten Zellen keine Synzytien. Eine Verbreitung von GFP in der Zellkultur der 1. Infektionsrunde war ebenfalls nicht zu beobachten. In sämtlichen Zellen der 2. Infektionsrunde konnten keine Synzytien oder GFP-positive Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Infektion von NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen und den CD4/CCR5-tragenden Zellen in der ersten Runde stattgefunden hat. Synzytien und GFP-positive Zielzellen konnten gezeigt werden, eine Virusvermehrung konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

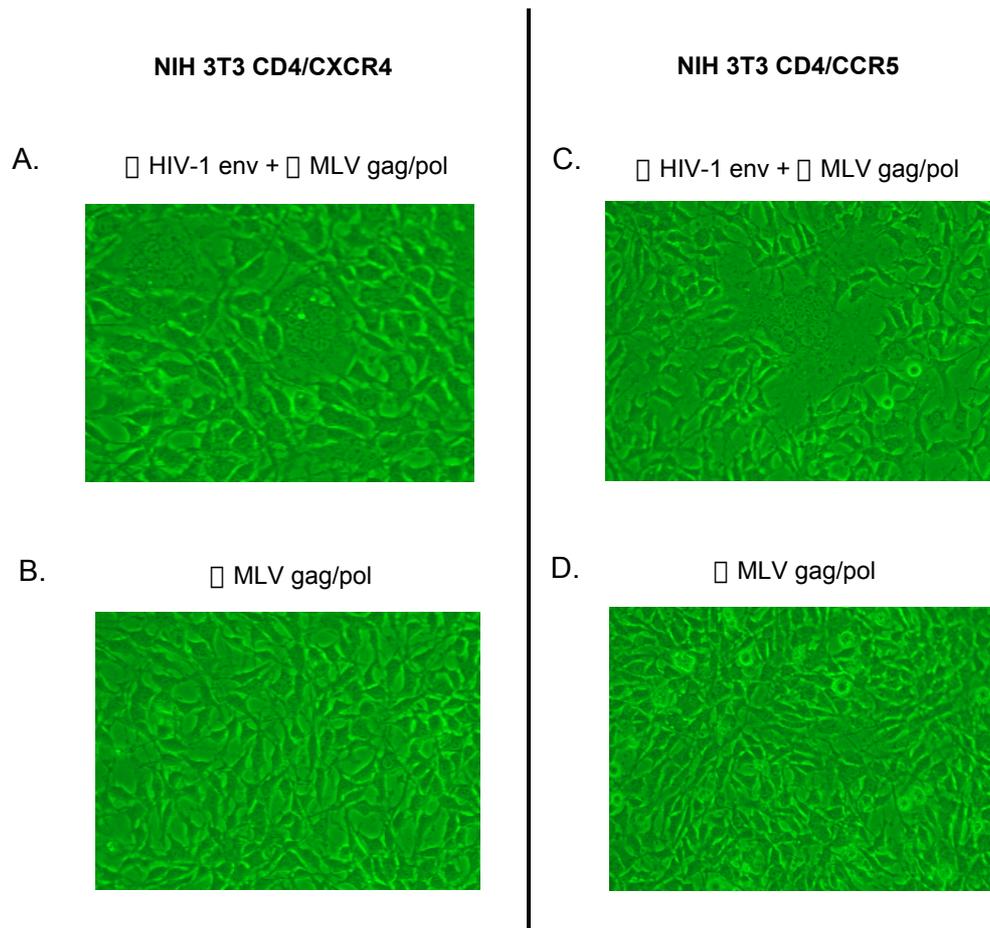


Abbildung 36: Synzytienbildung der mit MLV/HIV-1 Vektorpartikeln infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 (A.) und NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen (B.). Die Vektorpartikel verpacken entweder HIV-1 env oder MLV gag/pol. Synzytienbildung war nur bei den mit HIV-1 env infizierten Zellen zu beobachten.

4.6 Optimierung des MLV/HIV-1 Pseudotypkonstruktes

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Titer einzelner Vektorpartikel nicht hoch genug waren, um eine Zielzelle gleichzeitig sowohl mit MLV gag/pol verpackenden Vektorpartikeln als auch mit HIV-1 env verpackenden Vektorpartikeln zu transduzieren. Mit dieser Methode konnten keine replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren produziert werden. Mit Hilfe des synthetischen dualotropen HIV-1 env 89.6P sollte die Konstruktion eines weiteren MLV/HIV-1 Provirus versucht werden. Die enorme HIV-1 Hüllproteinexpression könnte im direkten Kontext mit den gag und pol exprimierenden Genen von MLV von Nutzen sein. Außerdem ist die Expression des synthetischen HIV-1 env von dem akzessorischen Element Rev-unabhängig. Studien an synthetischen HIV gag Genen lassen vermuten, dass „cis-aktive inhibitorische Sequenzen“ (INS) im kodierenden Bereichen die Proteinexpression negativ regulieren und den Export der mRNA aus dem Nukleus rev abhängig machen. Das synthetische gag besitzt durch alternativen Kodongebrauch einen erhöhten GC-Gehalt, der INS-Sequenzen inaktiviert und die Proteinexpression rev-unabhängig gestaltet (Graf et al., 2000). Für das synthetische HIV-1 env könnten die gleichen Eigenschaften zutreffen. Außerdem sollte das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} dahingehend modifiziert werden, das durch Einfügen des posttranskriptionellen Elementes des „woodchuck hepatitis virus“ (WPRE) die Funktion des rev Gens *in trans* eingefügt würde (Zufferey et al., 1999).

4.6.1 Konstruktion der MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukte pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE

Zusätzlich zu dem bereits existierenden MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} wurden zwei weitere MLV/HIV-1 Proviren konstruiert: pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE. Das erste Konstrukt sollte das dualotrope synthetische HIV-1 89.6P Hüllglykoprotein in das MLV-Genom integrieren und das MLV-Hüllprotein ersetzen. Im zweiten Fall sollte das vorhandene MLV/HIV-1 Proviruskonstrukt pUCX/C_{7s} durch das Anfügen des posttranskriptionellen Elementes des „woodchuck hepatitis virus“ ergänzt werden.

4.6.1.1 Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P besitzt das Env des primären SHIV-1 Isolates 89.6P. Simian/humanes Immundefizienz Virus (SHIV) entstand durch Austausch der Gene *env*, *tat* und *rev* von SIVmac239 durch die entsprechenden Gene des HIV-1. Die Variante 89.6P zeichnet sich durch einen dualotropen Wirtstropismus aus. Das bedeutet, dass sowohl die Infektion von T-Lymphozyten als auch die von Makrophagen möglich ist. Der Buchstabe „P“ steht für die Passage des SHIV-1 Isolates in Makaken und dessen Isolation aus Zellen (Crawford *et al.*, 1999). Das dualotrope HIV-1 Hüllprotein 89.6P Gen wurde synthetisch hergestellt. Das synthetische HIV-1 *env* ist durch alternativen Kodongebrauch entstanden und besitzt daher einen hohen GC-Anteil in seiner Sequenz. Der C-Terminus enthält bei Aminosäure 712 ein Stopp-Kodon und verkürzt den zytoplasmatischen Teil auf 7 Aminosäuren. Außerdem geht dem HIV-1 *env* in diesem Pseudotypkonstrukt ein CD5-Signalpeptid voraus. Abbildung 37 zeigt schematisch den Aufbau des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P.

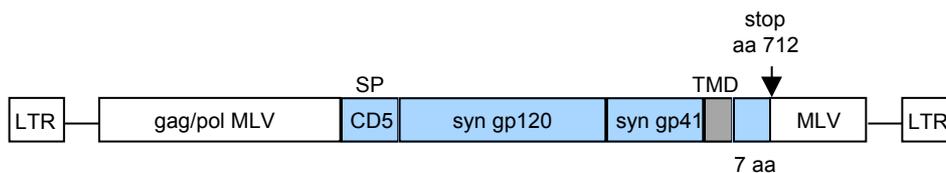


Abbildung 37: Schematische Darstellung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P.

Das dualotrope synthetische HIV-1 Hüllprotein wurde aus dem Expressionsplasmid pcDNA89.6PsynCD5-TMneu in den MLV gag/pol exprimierenden retroviralen Vektor pKA \square envEGFP eingesetzt. Da zur Klonierung nur die Sfi \square Schnittstelle zur Verfügung stand, musste diese Schnittstelle in das HIV-Ausgangsplasmid eingefügt werden. Hierzu wurde das Plasmid pcDNA89.6PsynCD5-Tmneu mit EcoR \square und Hind \square restringiert. Die Oligos HSE1 und HSE2 (Konzentration 100 pmol/ μ l), bestehend aus den Schnittstellen Hind \square Sfi \square und EcoR \square wurden 1:10 verdünnt, gemischt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend folgte für die Dimerisierung eine Inkubation von 10 Minuten bei 37°C und bei Raumtemperatur. Der Vektor wurde mit 5 μ l Oligos für 2 Stunden bei 16°C ligiert. Aus dieser Klonierung resultierte das Plasmid pcDNA89.6P+Oligo1b, das eine 5'-Sfi \square Schnittstelle vor dem HIV-1 *env* Gen aufwies. Letzteres wurde nun BamH \square geschnitten, die überhängenden Enden geblundet und Sfi \square geschnitten. Das 2,2 kb große HIV-1 *env* Fragment wurde in den Vektor pKA \square envEGFP, der Cla \square geschnitten, geblundet und Sfi \square restringiert wurde, inseriert. Das MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukt pKAHIV89.6P war entstanden (Abbildung 38).

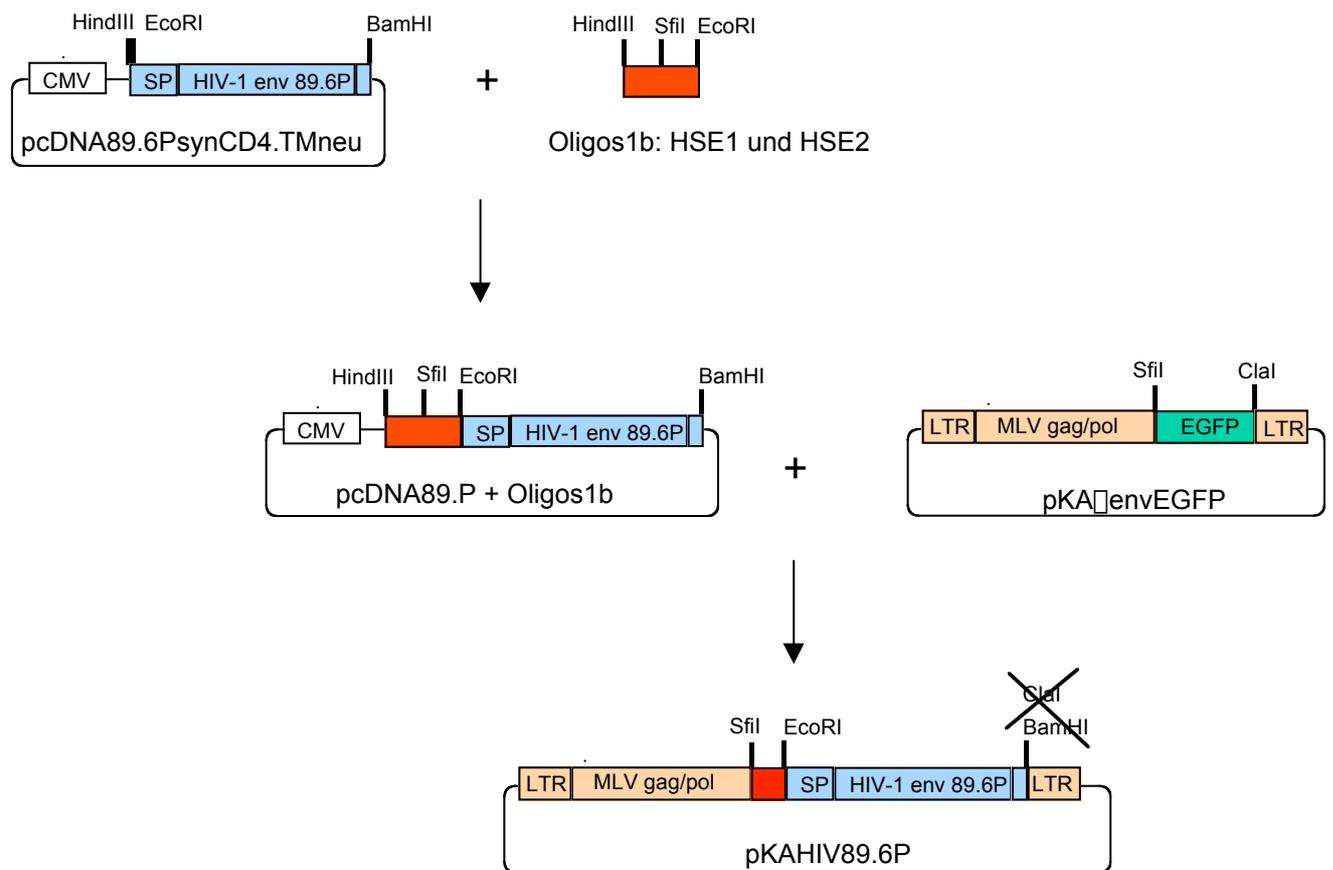


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Klonierung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P.

4.6.1.2 Konstruktion des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE entstand durch Anfügen des WPRE-Elements in die unmethylierte Clal Schnittstelle des bereits vorgestellten Proviruskonstrukt pUCX/C_{7s}. Das Einbringen des posttranskriptionellen WPRE-Elements sollte die Funktion des akzessorischen Gens *rev in trans* ersetzen. Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE ist in Abbildung 39 schematisch dargestellt.

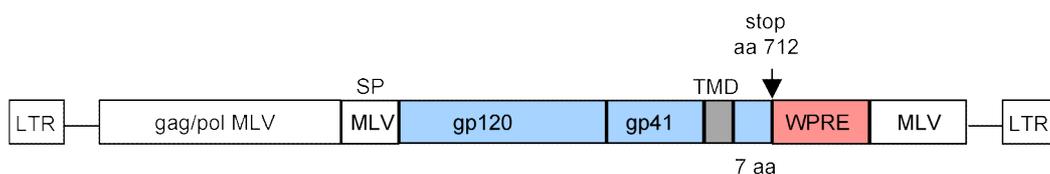


Abbildung 39: Schematische Darstellung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE.

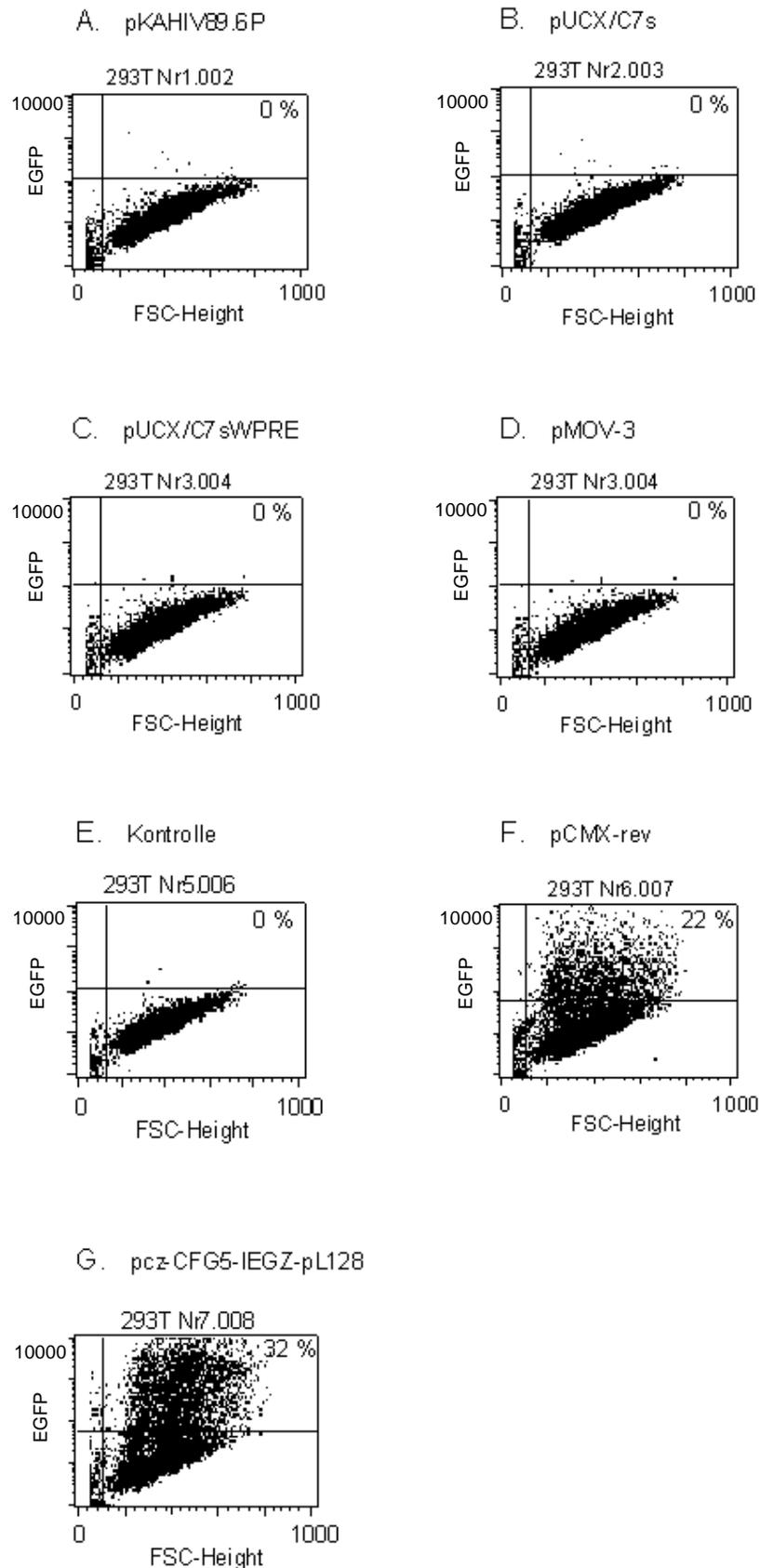


Abbildung 40: Nachweis der rev exprimierenden Plasmide mittels GFP-Fluoreszenz nach Transfektion von UTR-RRE-GFP mit A.-C. MLV/HIV-1 Pseudotypviren; D. MLV; E. nur UTR-RRE-GFP; F. pCMV-rev; G. pcz-CFG5-IEGZ-pL128.

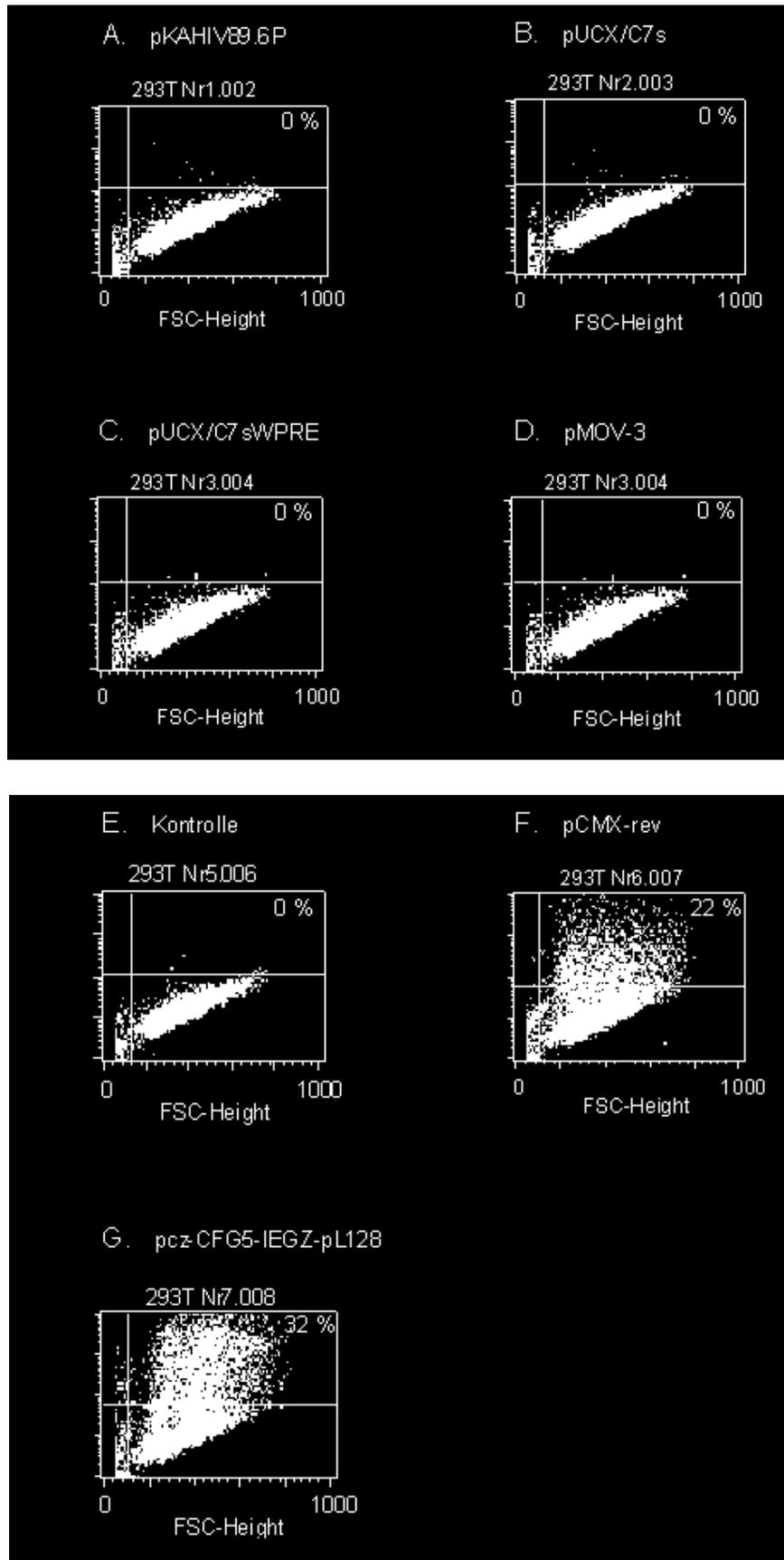


Abbildung 40: Nachweis der rev exprimierenden Plasmide mittels GFP-Fluoreszenz nach Transfektion von UTR-RRE-GFP mit A.-C. MLV/HIV-1 Pseudotypviren; D. MLV; E. nur UTR-RRE-GFP; F. pCMV-rev; G. pcz-CFG5-IEGZ-pL128.

Alle drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren zeigten wie erwartet keine GFP-Fluoreszenz und besitzen somit kein akzessorisches Element *rev*. Das Plasmid pCMV-*rev*, das für das akzessorische Gen *rev* kodiert, zeigte dagegen eine GFP-Fluoreszenz bei 20 % der 293 T Zellen. Im Fall des Plasmids pcz-CFG5-IEGZ-pL128, das für HIV-1 *env*, *vpu* und *rev* kodiert konnten 32 % fluoreszierende Zellen beobachtet werden. Der Test war generell funktionsfähig und bestätigte, dass alle drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren das akzessorische Gen *rev* nicht exprimierten.

4.6.3 HIV-1 Hüllproteinexpression und Nachweis der MLV/HIV-1 Pseudotypviren mittels Ultrazentrifugation

Die drei verschiedenen MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden in 293 T Zellen synthetisiert und sollten als reife Retroviren in den Zellkulturüberstand entlassen werden. Um die Pseudotypviren im Zellkulturüberstand nachzuweisen, wurde eine Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Hierzu wurden 1×10^6 293 T Zellen in 10 cm Zellkulturschalen bereits am Vortag ausgesät und mit jeweils 8 μ g Virus-DNA und 60 μ l Superfect transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurde der gesamte Zellkulturüberstand mit 0,45 μ m Filtern sterilfiltriert und nach den Angaben im Methodenteil ultrazentrifugiert. Die 293 T Zellen wurden lysiert und 30 μ g Protein wurde zur Überprüfung der Proteinexpression neben den Proben des Zellkulturüberstands auf ein 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die HIV-1 Hüllproteinexpression wurde mit dem Ziege-anti-HIV-1 gp120 Antikörper detektiert, während die MLV gag/pol Proteine mit dem Kaninchen-anti-MLV gag Antikörper nachgewiesen wurden (Abbildung 41).

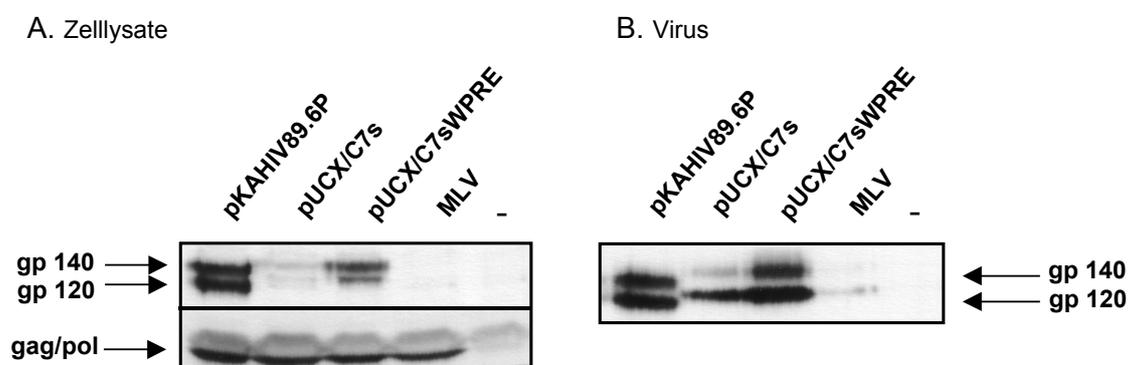


Abbildung 41: Immunoblots detektiert mit anti-HIV-1gp120 oder anti-MLVgag Antikörpern; A. 293 T Zelllysate nach Transfektion mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren; B. Nachweis der MLV/HIV-1 Pseudotypviren im Kulturüberstand nach Ultrazentrifugation.

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE zeigte eine vollständige Prozessierung der HIV-1 Proteinexpression in den 293 T Zelllysaten (Abbildung 41, A.). Hierbei war das unprozessierte gp140 Vorläuferprotein stärker exprimiert als das prozessierte gp120 HIV-1 Hüllprotein. Das Retrovirus pUCX/C_{7s} hingegen zeigte eine äußerst schwache HIV-1 Env-Expression. Das Vorläuferprotein wurde in diesem Fall nur in geringen Mengen exprimiert, während in anderen Experimenten eine weitaus bessere Expression beobachtet werden konnte (hier nicht gezeigt). Die HIV-1 Env-Expression des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P war die stärkste der drei Proviren. Das MLV gag/pol Vorläuferprotein wurde von allen Proviren ähnlich stark exprimiert. Sämtliche MLV/HIV-1 Pseudotypviren konnten mittels Ultrazentrifugation im Zellkulturüberstand transfizierter 293 T Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 41 B.). Die HIV-1 gp120 Proteinexpression konnte bei allen drei MLV/HIV-1 Proviren gezeigt werden. Außergewöhnlich war jedoch der Nachweis des HIV-1 Vorläuferproteins gp140 in allen drei Viruspartikeln, da das Vorläuferprotein normalerweise nicht in Virionen verpackt wird. Von Verunreinigungen ist hierbei nicht auszugehen, da der Zellkulturüberstand sterilfiltriert wurde. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit Hilfe der Ultrazentrifugation alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren im Kulturüberstand der transfizierten 293 T Zellen nachgewiesen werden konnten.

4.6.4 Versuch zur Produktion replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 293 T Zellen die MLV/HIV-1 Pseudotypviren produzieren können, wurde die Infektiosität dieser Viren untersucht. Für diesen Zweck wurden NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen verwendet, die die für die Infektion von HIV-1 Hüllglykoprotein wichtigen Rezeptoren CD4 und CXCR4 trugen. Bei infektiösen Pseudotypviren sollten die Titer bestimmt und Synzytienbildung der infizierten Zielzellen detektiert werden.

4.6.4.1 Infektion von NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren

Zunächst wurde überprüft, ob die MLV/HIV-1 Pseudotypviren in der Lage waren NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen zu infizieren. Die Pseudotypviren sollten durch die HIV-1 Hüllproteinexpression und die Expression der gag/pol Proteine in den infizierten Zellen nachgewiesen werden. Hierzu wurden die Viren zuerst in 293 T Zellen produziert und anschließend NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zielzellen infiziert. Für die Transfektion wurden 1×10^6 293 T Zellen über Nacht auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und am folgenden Tag mit 8 μg Provirus-DNA und mit 4 μg verpackbarem EGFP (Plasmid pMX-EGFP) transfiziert. Nach 48 Stunden wurde der Zellkulturüberstand mit 0,45 μm Filtern sterilfiltriert und auf 4×10^5 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen gegeben. Zur Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand untransfizierter Zellen verwendet. Zelllysate der infizierten Zellen wurden 72 Stunden nach der Transduktion angefertigt und 30 μg in einem 7,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Es folgte die immunologische Detektion des HIV-1 Glykoproteins und der gag/pol Proteine von MLV, die in Abbildung 42 dargestellt ist.

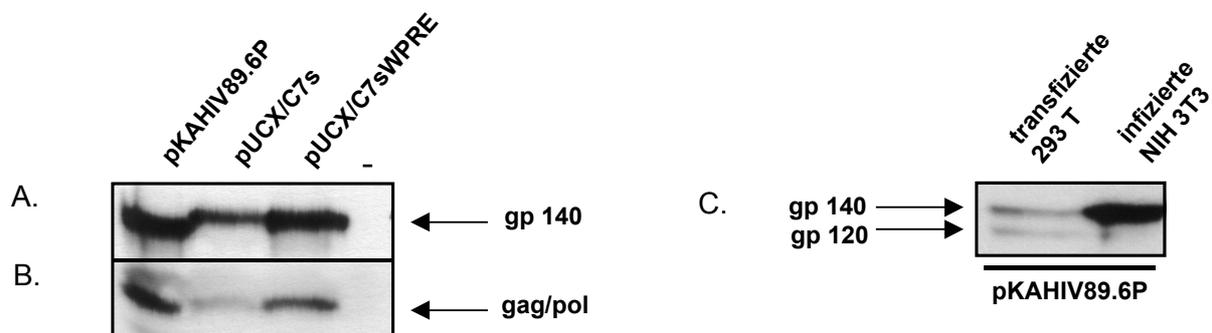


Abbildung 42: Immunoblot von MLV/HIV-1 Pseudotypvirus infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen. A./C. Anti-HIV-1gp120 Antikörper; B. Anti-MLVgag Antikörper. C. Kontrolle: pKAHIV89.6P transfizierte 293 T Zelllysate neben infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 aufgetrennt.

Alle NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen, die mit den verschiedenen MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P, pUCX/C_{7s} oder pUCX/C_{7s}WPRE infiziert wurden, zeigten HIV-1 Hüllproteinexpression. Allerdings konnte nur das gp140 Vorläuferprotein nachgewiesen werden, das nicht prozessiert wurde. Dass es sich hierbei um das unprozessierte gp140 Hüllprotein handelte, zeigt Abbildung 40 C. Dort sind zur Kontrolle des Molekulargewichts das dualotrope MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P aus transfizierten 293 T Zellen neben infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen analysiert. In transfizierten Zellen konnte sowohl das unprozessierte als auch das prozessierte HIV-1 env nachgewiesen werden, während in infizierten Zellen nur das gp140 Protein detektiert wurde. Somit konnte gezeigt werden, dass die infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen kein prozessiertes Hüllprotein exprimierten. Die Retroviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE zeigten die stärkste gp140 Expression, pUCX/C_{7s} exprimierte das Glykoprotein nur schwach (Abbildung 42, A). Dasselbe Muster spiegelte sich in der MLV gag/pol Expression wieder (Abbildung 42, B). Sämtliche NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der zweiten Infektionsrunde, das waren Zellen, die mit den Überständen der infizierten Zellen aus der ersten Infektionsrunde inkubiert wurden, zeigten keine HIV-1 Hüllproteinexpression (Daten nicht gezeigt).

Dieses Experiment zeigte, dass alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren in der Lage waren, die NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in der ersten Infektionsrunde zu infizieren. Nach dem Immunoblot schien die Prozessierung des HIV-1 Hüllproteins in den infizierten Zellen jedoch bei allen Proviren nicht vollständig zu sein. In den Zellen der zweiten Infektionsrunde konnte keine HIV-1 Hüllproteinexpression nachgewiesen werden.

4.6.4.2 Synzytienbildung der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen

Ein weiterer Hinweis auf eine Infektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren war die Bildung von Synzytien. Das HIV-1 Hüllglykoprotein gp120 erreicht nach Synthese in der Wirtszelle die Zelloberfläche und führt zur Verschmelzung benachbarter Zellen und somit zur Bildung mehrkerniger Zellen, sogenannter Synzytien. Bei der Replikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren würde eine komplette Lyse der Zielzellen erwartet werden. Die Beobachtung der Synzytien erfolgte im Mikroskop bei Durchlicht. Die Abbildung 43 zeigt neben der GFP Expression der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen auch die Bildung von Synzytien in der ersten Infektionsrunde. Viele Synzytien waren bei den mit pKAHIV89.6P (A) infizierten Zellen zu beobachten, während der Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE (C) fast keine Synzytien zeigte und der Provirus pUCX/C_{7s} (B) keine Synzytien verursachte. Das Maus-Leukämie-Virus induzierte wie erwartet keine Synzytienbildung (D). In der zweiten Infektionsrunde konnten noch vereinzelt Synzytien für die MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE nachgewiesen werden, in der dritten Runde konnten keine Synzytien beobachtet werden. Die Vergrößerung der Synzytien oder eine komplette Lyse der Zielzellen konnte in keinem der Fälle beobachtet werden. Infolgedessen konnten durch die Beobachtung der Synzytien keine replikationskompetenten MLV/HIV-1 Pseudotypviren nachgewiesen werden.

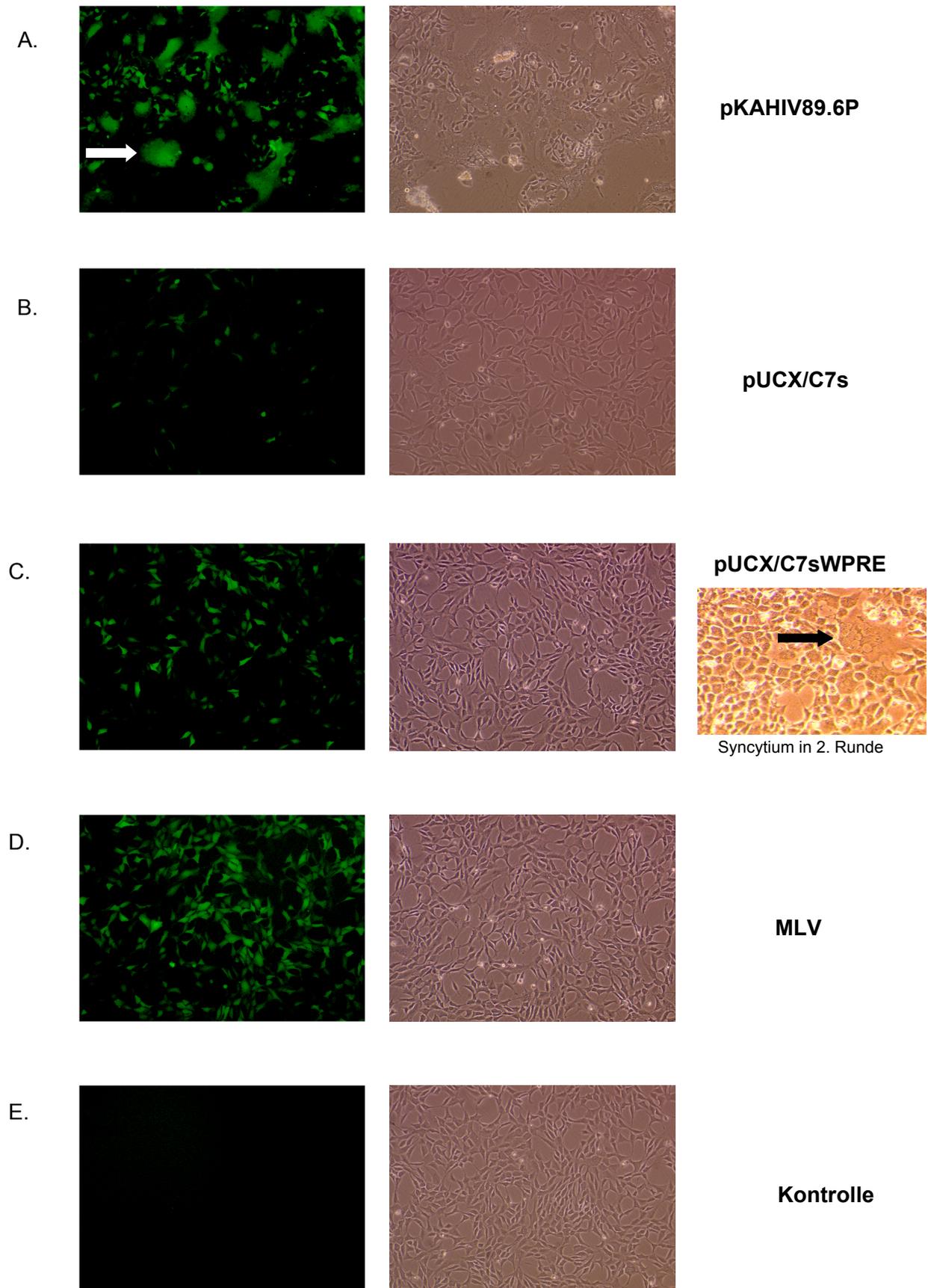


Abbildung 43: GFP-Fluoreszenz und Synzytienbildung der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen: Infektion mit den drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren (A.-C.) oder mit MLV (D.). Nicht infizierte Zellen dienten als Kontrolle (E.).

4.6.4.3 Bestimmung der Titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren

Die infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen sollten bei erfolgreicher Infektion mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren GFP-fluoreszierende Zellen zeigen, da die Viruspartikel aufgrund der Kotransfektion von GFP, das Gen neben ihrer eigenen genomischen RNA mit übertragen sollten. Replizierende Pseudotypviren sollten durch das Ausbreiten von GFP über die gesamte Zellkulturschale nachgewiesen werden. In Abbildung 43 ist die GFP-Fluoreszenz der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen für alle drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren dargestellt.

Anhand der Übertragung von GFP konnte beobachtet werden, dass die Infektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit dem MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P am besten war (Abbildung 43, A). Der Provirus pUCX/C_{7s}WPRES konnte fast annähernd so viele Zielzellen infizieren wie der pKAHIV89.6P Provirus, während der Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} nur wenige GFP-fluoreszierende NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen aufweisen konnte. Das replikationskompetente ecotrope MLV infizierte die meisten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen. Durch das Auszählen der GFP-fluoreszierenden Zellen konnten die Titer der einzelnen Proviren erfasst werden. Zusätzlich zu den infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen aus der ersten Infektionsrunde wurden die Titer der über 2 Tage infizierten Zellen aus der zweiten Infektionsrunde bestimmt, bis hin zur dritten Runde. Die zweite Infektion wurde mit Überständen der infizierten Zellen der ersten Runde auf neu ausgesäte NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen durchgeführt, die der dritten durch Infektion der Überstände aus der zweiten Runde. Die Titer der ersten und zweiten Infektion sind in Tabelle 5 zusammen gefasst.

MLV/HIV-1 Pseudotypvirus	1. Infektionsrunde	2. Infektionsrunde
	NIH 3T3 CD4/CXCR4	NIH 3T3 CD4/CXCR4
pKAHIV89.6P	$5.2 \cdot 10^4$ ($5,2 \cdot 10^4$)	$3.0 \cdot 10^3$
pUCX/C _{7s}	$6,7 \cdot 10^3$ ($2,2 \cdot 10^4$)	-
pUCX/C _{7s} WPRE	$2,1 \cdot 10^4$ ($4,2 \cdot 10^4$)	$2,6 \cdot 10^3$
MLV	$5.3 \cdot 10^4$ ($6,3 \cdot 10^4$)	$2,0 \cdot 10^4$
Kontrolle	-	-

Tabelle 5: Titer (IU/ml) der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der ersten und zweiten Infektionsrunde aus einem Experiment. Die Titer wurden durch Auszählen von GFP-positiven Zellen bestimmt. Die in Klammern dargestellten Werte stellen die Mittelwerte aus drei Experimenten dar, alle anderen Werte stammen aus einem Experiment.

Die Titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE waren in der ersten Infektionsrunde nur geringfügig schlechter als die Titer des replikationskompetenten MLV. Das Provirus pUCX/C_{7s} erlangte nur halb so hohe Titer wie die anderen beiden Pseudotypviren. In der zweiten Infektionsrunde waren die MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE um den Faktor 10 schlechter als MLV ($2,0 \cdot 10^4$ IU/ml), das Provirus pUCX/C_{7s} ließ sich nicht nachweisen. Die beiden MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE ließen sich durch GFP-Expression der infizierten Zellen bis zur dritten Infektionsrunde nachweisen. Allerdings waren die Titer der ersten Infektionsrunde am höchsten ($2-5 \times 10^4$ IU/ml) und nahmen über die zweite Infektion ($2,6-3,0 \times 10^3$ IU/ml) bis hin zur dritten Infektionsrunde ab, bis sich in den Zielzellen der 3. Runde nur noch einzelne GFP-positive Zellen nachweisen ließen (> 1). Somit war die Infektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit allen drei Viren generell möglich, die Replikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren ließ sich jedoch nicht nachweisen, da eine Verbreitung von GFP über die gesamte Zellkulturschale nicht gezeigt werden konnte. Im Gegenteil, die GFP-Fluoreszenz und die daraus resultierenden Titer der Pseudotypviren waren im Verlauf der Infektionen rückläufig.

4.6.4.4 Ultrazentrifugation des Kulturüberstandes der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen

Die Aufreinigung des Zellkulturüberstands der mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen sollte zeigen, ob aus den Wirtszellen der ersten Infektionsrunde Pseudotypviren freigesetzt werden. Die Aufreinigung wurde mittels Ultrazentrifugation durchgeführt. Der gesamte Zellkulturüberstand wurde 72 Stunden nach der Infektion mit 0,45 µm Filtern sterilfiltriert und nach den Angaben im Methodenteil ultrazentrifugiert. Die vorbereiteten Proben wurden nach der Ultrazentrifugation in einem 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-HIV-1gp120 Antikörper, sowie anti-MLVgag Antikörpern immunologisch detektiert (Abbildung 44).

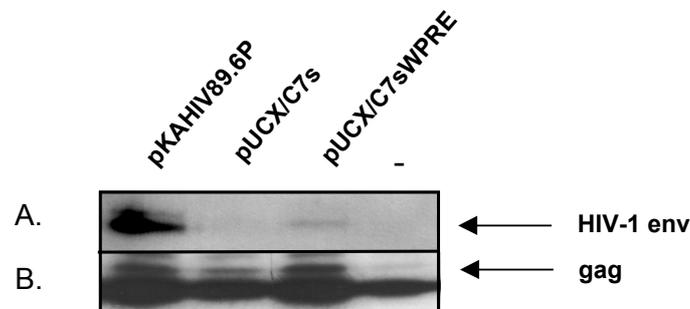


Abbildung 44: Nachweis der MLV/HIV-1 Pseudotypviren im Kulturüberstand infizierter NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen nach Ultrazentrifugation. Die Immunoblots wurden mit Ziege-anti-HIV-1-gp120 (A.) oder Kaninchen-anti-MLVgag Antikörpern (B.) detektiert.

Die MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE konnten im Zellkulturüberstand von infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen nachgewiesen werden. Beide Viren zeigten HIV-1 Env und MLV Gag Inkorporation, wobei die HIV-1 Hüllproteinaufnahme des Provirus pUCX/C_{7s}WPRE sehr schwach war im Gegensatz zu dem synthetischen Proviruskonstrukt. Im Vergleich dazu war die Bildung von Gag beider MLV/HIV-1 Pseudotypviren gleich stark ausgeprägt. Für das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} konnte die Aufnahme des HIV-1 Hüllproteins nicht nachgewiesen werden, das MLV Gag Protein hingegen wurde gebildet. Somit konnte gezeigt werden, dass die infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der ersten Infektionsrunde die MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE produzieren konnten. Der Nachweis des MLV/HIV-1 Provirus pUCX/C_{7s} im Kulturüberstand infizierter Zellen bleibt ungeklärt. Ein Vergleich der HIV-1 Env Aufnahme in Viruspartikel aus infizierten Zellen und aus 293T Zellen verdeutlicht aber die geringe Menge an HIV-1 Env in Viruspartikel aus infizierten Zellen.

4.6.5 Northern Blot Analyse der MLV/HIV-1 Pseudotypviren

Das ML-Virus gehört zu den einfachen Retroviren und führt nur einfache Spleißvorgänge durch, während das HI-Virus zu den komplexen Retroviren gehört und ein kompliziertes Spleißmuster aufweist (Seguin *et al.*, 1998; Purcell *et al.*, 1993). Um zu klären, ob die RNA der MLV/HIV-1 Pseudotypviren korrekt gespleißt wurde, nämlich wie die einfacher Retroviren, sollte eine RNA-Analyse durchgeführt werden. Ein Northern Blot von infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen sollte überprüfen, ob weitere Spleißstellen auftreten und zu unerwünschten Spleißprodukten führen können. Alle drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden wie gewohnt in 293 T Zellen produziert, indem $1,5 \times 10^6$ Zellen über Nacht auf 10 cm Zellkulturschalen kultiviert und am nächsten Tag mit 8 μg Provirus-DNA und 60 μl Superfect transfiziert wurden. Die Infektion der 1×10^6 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen in 10 cm Schalen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion. Die Isolierung der Gesamt-RNA der infizierten Zellen wurde nach weiteren 48 Stunden durchgeführt. Die Art und Weise des Vorgehens wurde im Methodenteil beschrieben. Die RNA-Konzentration wurde bestimmt, 15 oder 18 μg RNA wurden schließlich im denaturierenden Agarosegel getrennt und auf eine Hybond-Membran transferiert. Bei den drei MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukten handelt es sich um T-trope (pUCX/C_{7s} und pUCX/C_{7s}WPRE) und dualotrope (pKAHIV89.6P) HIV-1 env Varianten. Aus diesem Grund konnten nicht alle Proviren gleichzeitig miteinander verglichen werden. Der Nachweis der mRNA erfolgte mit einer T-tropen oder einer dualotropen HIV-1 env Sonde oder zur Kontrolle mit einer MLV env Sonde (siehe Methodenteil). Die beiden Northern Blots wurden nach der Hybridisierung mit einer Sonde gestrippt und neu hybridisiert. Die verschiedenen hybridisierten Membranen wurden in der Abbildung 45 zusammengefasst.

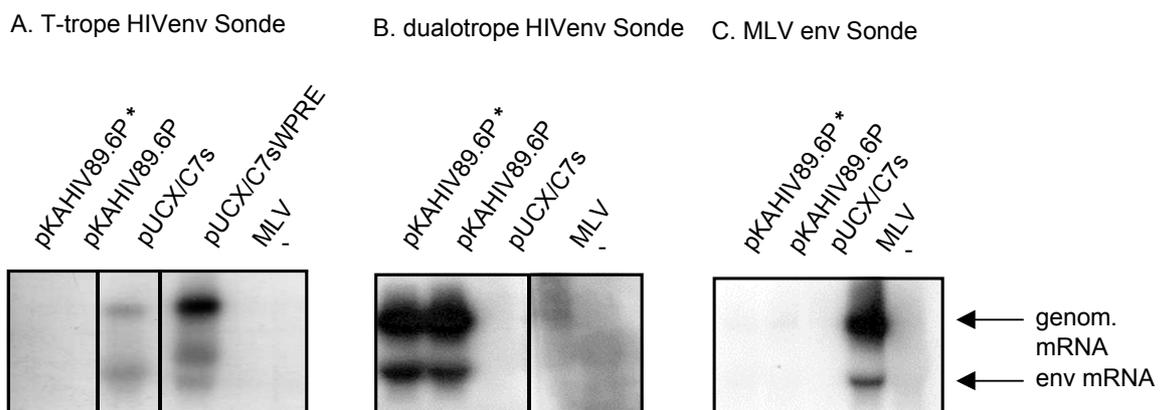


Abbildung 45: Northern Blot Analyse der mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen (* NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen). A. Detektion mit T-troper HIV-1 env Sonde (24 h); B. Hybridisierung mit dualotroper HIV-1 env Sonde (24 h); C. MLV env Sonde (2 h);

Abbildung 45 A zeigt einen Northern Blot, der mit der T-tropen 3,1 kb HIV-1 env Sonde detektiert wurde. Die mRNA des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} zeigte das schon bekannte Muster: Es kam zuviel HIV-1 env mRNA im Gegensatz zu der Menge an genomischer mRNA vor. Im Vergleich dazu produzierte der MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE größere Mengen genomischer mRNA als env mRNA. Der Northern Blot in Abbildung 45 B wurde mit einer dualotropen 1,4 kb HIV-1 env Sonde hybridisiert und zeigt deshalb die mRNA des Provirus pKAHIV89.6P. Die erste Spur des Blots wurde mit RNA-Proben aus NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen geladen, während die zweite Spur mit NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen beladen wurde. Beide mRNA-Proben besaßen das gleiche Verhältnis von genomischer mRNA zu env mRNA und zeigten nach einer Expositionszeit von 24 Stunden die größte Menge an mRNA von allen drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren. Die radioaktiv markierten Sonden zeigten dabei gleiche Aktivitäten. Zur Kontrolle wurde ein Northern Blot mit einer 1,4 kb MLV env Sonde hybridisiert (Abbildung 45 C). Da die NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit einem ecotropen replikationskompetenten MLV infiziert wurden, waren erhebliche Mengen an retroviraler mRNA in den Zellen vorhanden. Die Expositionszeit des Röntgenfilms betrug in diesem Fall nur 2 Stunden, bei einer längeren Exposition wurden sämtliche Spuren von dem Signal überladen. Das Bild zeigt die Verhältnisse eines replikationskompetenten Virus: Überwiegend genomische mRNA war gegenüber der env mRNA vorhanden. Abschließend lässt sich sagen, dass das mRNA-Muster des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P dem Muster des replikationskompetenten MLV entsprach. Wenn auch die Menge der pKAHIV89.6P mRNA geringer war als die des MLV, so zeigte der MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P unter allen anderen Pseudotypviren die beste mRNA-Expression. Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE wies ebenfalls ein korrektes mRNA-Muster auf, die Menge an gebildeter mRNA war jedoch geringer als die des pKAHIV89.6P Konstruktes. Das in dieser Studie zuerst verwendete MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} produzierte höhere Mengen der env mRNA anstelle der genomischen mRNA, so dass das Verhältnis umgekehrt wurde. Die Mengen an gebildeter mRNA waren außerdem sehr gering. Somit besitzt das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} einen Defekt in der mRNA-Prozessierung, während die beiden anderen Proviren keinen Defekt auf der RNA-Ebene hatten, sich aber in der RNA-Expressionsstärke unterschieden.

4.6.6 Nachweis der spezifischen rezeptorgebundenen Infektion

Dieses Experiment sollte den spezifischen Tropismus der MLV/HIV-1 Pseudotypviren nachweisen. Durch das HIV-1 Hüllglykoprotein sollten nur CD4- und CXCR4-exprimierende Zielzellen infiziert werden. Die Proviren wurden in 293 T Zellen produziert und anschließend auf NIH 3T3 Zellen mit oder ohne Rezeptoren gegeben. Die Übertragung des kotransfizierten GFP konnte im FACSsort gemessen werden und war ein Indiz für die Infektion der Zielzellen. 6×10^4 293 T Zellen wurden pro Vertiefung einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit 3 µg Provirus-DNA (pKAHIV89.6P, pUCX/C_{7s} oder pUCX/C_{7s}WPRES) oder MLV-DNA. 1,5 µg des verpackbaren GFP (pMX-EGFP) wurde zu jedem Ansatz kotransfiziert. Zur negativ Kontrolle wurde ein Ansatz nur mit dem pMX-EGFP Plasmid transfiziert. Nach 24 Stunden wurden 5×10^4 NIH 3T3, NIH 3T3 CD4 und NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen pro Vertiefung auf jeweils eine 6-Loch-Platte ausgebracht. Einen Tag später folgte die Infektion der frisch ausgebrachten Zellen mit 1 ml der 293 T Zellkulturüberstände. Weitere 48 Stunden später wurden die Zielzellen im FACSsort nach GFP-Fluoreszenz durchgeschaut. Tabelle 6 fasst die Titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren in verschiedenen Zellen zusammen.

	NIH 3T3	NIH 3T3 CD4	NIH 3T3 CD4/CXCR4
pKAHIV89.6P	0	0	$1,2 \cdot 10^4$ IU/ml
pUCX/C _{7s}	0	0	$2,5 \cdot 10^4$ IU/ml
pUCX/C _{7s} WPRES	0	0	$3,6 \cdot 10^4$ IU/ml
MLV	$2,2 \cdot 10^4$ IU/ml	$3,5 \cdot 10^4$ IU/ml	$3,5 \cdot 10^4$ IU/ml
Negativ Kontrolle	0	0	0

Tabelle 6: Titer (IU/ml) der MLV/HIV-1 Pseudotypviren auf verschiedenen NIH 3T3 Zellen mit oder ohne HIV-1 Rezeptoren. Das ecotrope Murine Leukämie Virus (MLV) diente als positiv Kontrolle, da es alle NIH 3T3 Zellen infizieren konnte.

Das Murine Leukämie Virus (MLV) diente als positiv Kontrolle, da es als ecotropes Virus alle Nagerzellen über den ecotropen Rezeptor mCAT-1 (cationic amino acid transporter) infizieren kann. Sämtliche NIH 3T3 Zellen mit oder ohne die Rezeptoren CD4 und CXCR4 konnten mit Titern von $2,2-3,5 \times 10^4$ IU/ml infiziert werden. Die MLV/HIV-1 Pseudotypviren konnten nur NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen infizieren, die beide Rezeptoren für das HIV-1 Hüllprotein tragen. Der CD4-Rezeptor allein war nicht ausreichend für eine Infektion der Proviren, da NIH 3T3 CD4 Zellen nicht infiziert werden konnten. NIH 3T3 Zellen trugen

keinen der HIV-1 Rezeptoren und konnten infolge dessen ebenfalls nicht von den Pseudotypviren infiziert werden. Die MLV/HIV-1 Pseudotypviren besitzen den Wirtstropismus des HIV-1, sie können nur CD4- und CXCR4-exprimierende Zielzellen exprimieren. In diesem Experiment waren die Titer des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE die besten, gefolgt von dem Provirus pUCX/C_{7s} und an letzter Stelle von pKAHIV89.6P. Diese Unterschiede zu den sonst üblichen Werten gehen wahrscheinlich auf die Transfektionseffizienz zurück.

4.6.7 Ausschluss von Rekombination der MLV/HIV-1 Pseudotypviren mit MLV

Für die Infektion von MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden in den meisten Fällen NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen oder NIH 3T3 CD4/CCR5 Zellen verwendet. Bei diesen Zellen handelt es sich um Mausfibroblasten, in denen möglicherweise persistierende Viren vorkommen, unter anderem MLV. Infektiöse Viren könnten durch die Rekombination von persistierendem MLV mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren entstehen und zur Bildung von replikationskompetenten wildtyp MLV führen. Um eine Rekombination der MLV/HIV-1 Pseudotypviren mit MLV auszuschließen, wurde eine PCR der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen 72 Stunden nach der Infektion mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst, zentrifugiert und das Zellpellet in 500 µl Proteinase K-Lysis-Puffer aufgenommen. Nachdem die Zellen über Nacht lysiert wurden, konnte die DNA isoliert werden. Im Anschluss daran folgte eine PCR mit den Primern BS-5 und BS-8, die zur Amplifikation eines 1,2 kb großen pol/env Fragments des MLV führte. Abbildung 46 A zeigt dieses Fragment nur für MLV infizierte Zellen, nicht für Zellen, die mit den drei verschiedenen Pseudotypviren infiziert wurden. Da die Primer spezifisch waren für MLV pol und MLV env, konnte in den mit Pseudotypvirus infizierten Zellen kein PCR-Produkt nachgewiesen werden, außer, wenn die Zellen mit MLV verunreinigt wären, was nicht der Fall war.

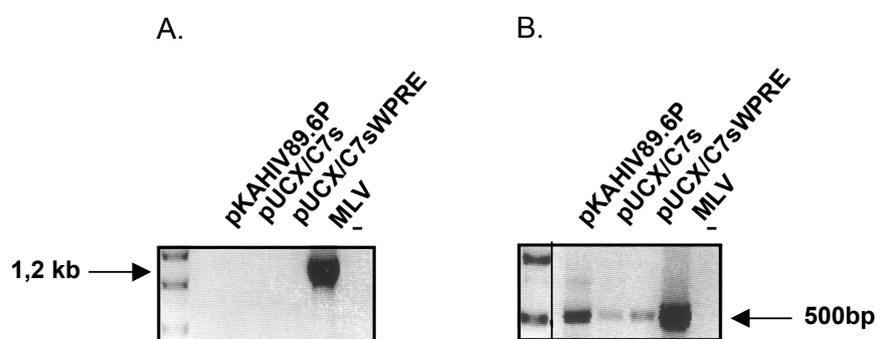


Abbildung 46: PCR zur Überprüfung von Rekombinationsereignissen. A. amplifiziertes MLVgag-MLVenv Fragment (1,2 kb); B. amplifiziertes MLV gag/pol Fragment (500 bp).

In einer zweiten PCR konnte mit Hilfe der Primer 5'-MLV-Hind und 3'-MLV-Sfi die Amplifikation eines 500 bp großen MLV gag/pol Fragments für alle Viren nachgewiesen werden (Abbildung 46 B). Letzteres Fragment kommt in allen hier verwendeten Proviren vor, da die MLV/HIV-1 Pseudotypviren das MLV-Genom besitzen, das durch Austausch des MLV env Genes mit HIV-1 env entstanden ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass keine Rekombination von MLV/HIV-1 Pseudotypviren mit MLV stattgefunden hatte.

4.6.8 Rescue Versuch

Das folgende Experiment sollte Aufschluss darüber geben, was der Grund für die schlecht Infektion der Zellen der zweiten Infektionsrunde mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren der ersten Infektionsrunde sein konnte. Um zu klären, ob die Produktion des MLV-Kapsids der Proviren vollständig war, sollten die Pseudotypviren aus der ersten Infektionsrunde mit Hilfe von MLV-Hüllproteinen mobilisiert werden, so dass eine weitere Infektion möglich wäre. Hierzu mussten die Zielzellen der ersten Runde mit MLV env transfiziert werden. Das Experiment wurde, um einen Vergleich zu ermöglichen, ebenso mit nicht transfizierten Zielzellen durchgeführt. Die MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden in 293 T Zellen produziert, indem 1×10^6 am Vortag in 10 cm Zellkulturschalen ausgesäte Zellen mit 8 μg Provirus-DNA (pKAHIV89.6P, pUCX/C_{7s}WPRES oder pUCX/C_{7s}) und 4 μg pMX-EGFP Plasmid-DNA transfiziert wurden. Replikationskompetentes MLV (pMOV-3) wurde zur Kontrolle genauso transfiziert, während andere Kontrollzellen nur mit pMX-EGFP transfiziert wurden. Weiterhin wurden 10 x 10 cm Zellkulturschalen mit 1×10^5 NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen ausgebracht. Fünf dieser Schalen wurden am folgenden Tag mit 7 μg MLV env Plasmid-DNA (pSGEA₂II/I) und 40 μl Superfect transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese und die restlichen 5 nicht transfizierten Platten mit NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit jeweils 4,5 ml Virus-Überstand der 293 T Zellen infiziert (1. Infektionsrunde). Die zweite Infektion geschah mit 10 ml Virus-Überstand der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen aus der ersten Runde auf am Vortag ausgebrachte NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen (8×10^5 Zellen/ 10 cm Kulturschale). Die GFP-fluoreszierenden Zielzellen der ersten und zweiten Infektionsrunde wurden im FACSsort ausgewertet und deren Titer bestimmt (Tabelle 6).

Proviren	1. Infektionsrunde	2. Infektionsrunde
	<u>NIH 3T3 CD4/CXCR4</u>	<u>NIH 3T3 CD4/CXCR4</u>
pKAHIV89.6P	$4,7 \cdot 10^4$ IU/ml	0
pUCX/C _{7s}	$3,2 \cdot 10^4$ IU/ml	0
pUCX/C _{7s} WPRE	$5,5 \cdot 10^4$ IU/ml	0
MLV	$5,5 \cdot 10^4$ IU/ml	$2,9 \cdot 10^4$ IU/ml
pMX-EGFP allein	0	0
	<u>NIH 3T3 CD4/CXCR4</u>	<u>NIH 3T3 CD4/CXCR4</u>
	<u>(mit MLV env)</u>	
pKAHIV89.6P	$3,6 \cdot 10^4$ IU/ml	$2,3 \cdot 10^2$ IU/ml
pUCX/C _{7s}	$3,0 \cdot 10^4$ IU/ml	$2,4 \cdot 10^2$ IU/ml
pUCX/C _{7s} WPRE	$5,1 \cdot 10^4$ IU/ml	$1,7 \cdot 10^3$ IU/ml
MLV	$5,1 \cdot 10^4$ IU/ml	$1,9 \cdot 10^4$ IU/ml
pMX-EGFP allein	0	0

Tabelle 6: Titer (IU/ml) der mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren oder MLV infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen aus der ersten und zweiten Infektionsrunde. Zu beachten ist, dass ein Teil der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen vor der Infektion mit den Proviren mit MLV env transfiziert wurde, um eine Mobilisierung zu ermöglichen.

Die Titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren und von MLV waren in der ersten Infektionsrunde bei den NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen mit oder ohne MLV Env-Expression gleich gut: Die Proviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE infizierten die Zielzellen mit der gleichen Effizienz wie das replikationskompetente MLV. Die Titer des Provirus pUCX/C_{7s} waren in der ersten Infektionsrunde geringfügig schlechter. In der zweiten Infektionsrunde dagegen war die Infektion mit MLV/HIV-1 Pseudotypviren, die von nicht MLV env transfizierten Zellüberständen stammten, unterhalb der Nachweisgrenze. Die Virusüberstände der MLV env transfizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen aus der ersten Runde konnten Zellen der zweiten Runde infizieren. Die Provirus-titer der MLV/HIV-1 Pseudotypviren ($2,3 \times 10^2$ bis $1,7 \times 10^3$ IU/ml) waren im Vergleich zu MLV ($1,9 \times 10^4$ IU/ml) gering. Dennoch zeigte dieses Experiment, dass alle MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukte durch die Zugabe von MLV-Hüllprotein zur Partikelbildung fähig waren. Dieser Schluss gab einen Hinweis darauf, dass die Bildung infektiöser MLV/HIV-1 Viruspartikel möglicherweise durch einen Defekt des HIV-1 Hüllproteins verursacht wurde. Die MLV gag und pol Genexpression der Pseudotypviren musste intakt sein, da durch Transfektion der MLV env Gene eine Mobilisierung stattfinden konnte und die Infektion der Zielzellen möglich war.

5 Diskussion

Die epidemische Ausbreitung der Immunschwäche AIDS verlangt nach einem wirksamen Impfstoff. Weltweit kommen pro Jahr ca. 5 Millionen Neuinfektionen hinzu und jährlich sterben ca. 3 Millionen Menschen an der Krankheit. Eine medikamentöse Behandlung kann die Viruslast zwar senken und den Patienten zeitweise in ein symptomfreies Stadium bringen, eine vollständige Heilung ist zur Zeit jedoch nicht möglich.

Das humane Immundefizienz Virus (HIV) stellt ein schwieriges Ziel für die Impfstoffentwicklung dar. Die hohen Mutationsraten des Retrovirus im Verlauf einer Infektion führen zu Veränderungen des Hüllglykoproteins, die eine ständige Anpassung des Immunsystems erforderlich machen und schließlich dazu beitragen, dass HIV einer Immunantwort entgehen kann. Selbst nach erfolgreicher medikamentöser Therapie kann HIV als latentes Virus im Organismus persistieren und zu einem späteren Zeitpunkt erneut zum Krankheitsausbruch führen.

Ein Impfstoff gegen HIV muss idealerweise die Infektion verhindern oder das Virus effizient bekämpfen und muss deshalb in der Lage sein, sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort hervorzurufen. Eine CTL Immunantwort ist mit toten Viruspartikeln, rekombinanten Proteinen oder synthetischen Peptiden schwer zu induzieren, da eine zellvermittelte Immunantwort die endogene Prozessierung und Antigenpräsentation benötigt (Ho *et al.*, 2002). Lebende attenuierte Viren können am besten eine solche Immunantwort induzieren.

Die hohe Mutationsrate des HIV führt zu Unterschieden des Hüllglykoproteins innerhalb eines Subtypes von bis zu 20 % und zwischen Subtypen bis hin zu 30 % (Gaschen *et al.*, 2002). Um diese Unterschiede in Vakzinierungsstudien zu berücksichtigen, die innerhalb eines Subtypes und zwischen Subtypen auftreten, suchen Wissenschaftler nach konservierten Epitopen innerhalb des HIV-1 Hüllglykoproteins, die in mehrere Subtypen auftreten. Vakzine müssen mit verschiedenen Subtypen kreuzreagieren und Immunreaktionen induzieren.

Es sind nur wenige neutralisierende Antikörper bekannt, die in der Lage sind mehrere HIV-1 Stämme zu neutralisieren (Mascola *et al.*, 2000; Baba *et al.*, 2000). Es gibt Hinweise, dass eine CTL Antwort gegen einen HIV-1 Subtyp mit anderen Subtypen kreuzreagiert (Mc Michael and Hanke, 2002), so dass das Immunogen eines Subtypes auch bei anderen zu finden ist. Andererseits sind auch Fälle bekannt, bei denen die Immunisierung gegen einen HIV-Subtyp schützt, andere Subtypen zur Infektion führen (Gaschen *et al.*, 2002). Es wird ein großer Aufwand betrieben, diese konservierten Epitope des Hüllglykoproteins zu finden,

durchgreifende Erfolge wurden noch nicht verzeichnet. Ein Ansatz, der in dieser Arbeit verfolgt wurde, ist die Fixierung oder Nachahmung von Intermediaten, die beim Eintritt von HIV in die Zielzelle entstehen. Durch Konformationsänderungen des Hüllproteins beim Binden an den CD4-Rezeptor werden konservierte Epitope freigelegt. Diese könnten das Immunsystem aktivieren und die Bildung neutralisierender Antikörper induzieren. Als DNA-Vakzine injiziert würde außerdem die zelluläre Immunantwort angeregt.

Weiterhin sind Tiermodelle für die Prüfung der Effizienz antiviraler Impfstoffe nötig. Mit Ausnahme der Großfamilie der Affen können keine weiteren Tiere mit HIV infiziert werden. Schimpansen gehören zu den am besten studierten Tieren. Sie entwickeln jedoch nach einer HIV-Infektion kein Krankheitsbild und produzieren nur eine geringe Anzahl replizierender Viren. Alternativ können Untersuchungen mit simianen Immundefizienz Virus (SIV) an Makaken durchgeführt werden. Das SI-Virus unterscheidet sich aber in einigen Sequenzen von HIV, so dass beide Hüllglykoproteine Unterschiede aufweisen, deshalb waren Ergebnisse aus Experimenten mit SIV nicht unbedingt auf HIV zu übertragen. Die Einführung des simianen/humanen Immundefizienz Virus (SHIV) sollte das SI-Virus dem HIV angleichen, indem der Austausch des SIV Hüllproteins gegen das des HIV-1 zusammen mit den HIV-1 akzessorischen Genen tat und rev erfolgte. Das Krankheitsbild der infizierten Makaken unterscheidet sich allerdings in einigen Punkten vom klinischen Bild einer humanen Infektion (Letvin *et al.*, 1998).

Sämtlichen Studien an Affen sind mit einem hohen Kostenaufwand verbunden, außerdem stehen nicht genügend Tiere zur Verfügung um ausgedehnte Untersuchungen zuzulassen. Ein Kleintiermodell, das Experimente mit HIV erlaubt, steht derzeit nicht zur Verfügung. Einige Arbeitsgruppen haben transgene Mäuse mit humanen CD4 und CXCR4 oder CCR5 Rezeptoren auf deren T-Lymphozyten ausgestattet. Die HIV-1 Infektion der murinen Zellen war möglich, die Replikation des Lentivirus erfolgte nicht. Somit ist es dem HI-Virus generell nicht möglich sich in murinen Zellen zu vermehren. Ein MLV/HIV-1 Pseudotypvirus, der basierend auf dem murinen Leukämievirus (MLV) das HIV-1 Hüllprotein trägt, könnte in einem transgenen Mausmodell replizieren und Studien des HIV-1 Eintritts in die Zielzelle ermöglichen. Ein transgenes CD4⁺ Mausmodell mit einem replikationskompetenten MLV/HIV-1 Pseudotypvirus könnte als Kleintiermodell für HIV nützlich sein.

5.1 gp120-CD4 Fusionsproteine als Immunogen

Die Ansätze zur Generierung eines HIV-1 Impfstoffs sind sehr vielfältig. Neben lebenden auf Vektoren basierenden Vakzinen und DNA-Vakzinen kommt der Gruppe der viralen Proteine als Impfstoff eine größer werdende Bedeutung zu. Die Aufmerksamkeit richtet sich hierbei vor allem auf das HIV-1 Hüllglykoprotein, da es den Kontakt zwischen Virus und Zielzelle herstellt. Die Bildung von Intermediaten, die beim Eintritt von HIV in die Zielzelle entstehen, könnten die Produktion von neutralisierenden Antikörpern stimulieren. Ein wichtiges Intermediat ist der gp120-CD4 Komplex, der bei der Bindung des Hüllproteins gp120 an den CD4-Rezeptor auf der Zielzelle entsteht. Das gp120 Hüllprotein bindet hauptsächlich mit seiner V3 Domäne an die D1 Domäne des CD4-Rezeptors. Zusätzliche Bindungen von gp120 an CD4 finden ebenfalls statt, wobei die V1/V2 und V5 Domänen involviert sind (Wang *et al.*, 2001). Dies führt dazu, dass die gp120-CD4 Bindung wesentlich stärker ist, als die übliche Bindung von CD4 an den MHC (major histocompatibility complex) einer Antigen präsentierenden Zellen. Mit der Komplexbildung von gp120 und CD4 geht eine Konformationsänderung einher, die zur Freilegung von konservierten Bereichen führt, die zuvor im Inneren des Hüllglykoproteins verborgen waren. Es ist anzunehmen, dass diese neu zugänglichen Epitope die Bildung von neutralisierenden Antikörpern ermöglichen.

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine enthielten entweder das T-trope HIV-1 gp120 Hüllprotein oder das dualotrope HIV-1 gp120 Oberflächenprotein. Das gp120 Peptid wurde sowohl an den aus vier Domänen bestehenden CD4-Rezeptor fusioniert, als auch an das verkürzte CD4, bestehend aus den Domänen D1 und D2. Des Weiteren besaßen die meisten Fusionsproteine einen $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ Linker zwischen dem gp120 und dem CD4 Bereich, um ein vollständiges Binden der beiden Proteine aneinander zu ermöglichen.

Sämtliche Fusionsproteine wurden exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert. Die Wirkungsweise der Proteine in Bezug auf die Inhibierung einer HIV-1 Infektion wurde in einem eigens etablierten Neutralisierungsassay untersucht. Dieser Neutralisierungsassay benutzt die Transduktion von CD4-exprimierenden Zellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren anstelle von HIV-1, um die Infektion zu untersuchen. Dadurch konnte der Test unter geringem Sicherheitsrisiko durchgeführt werden. Das Ergebnis sollte jedoch nicht nur für die MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren gelten, sondern auch für HIV-1, da die Infektion in beiden Fällen über das HIV-1 Hüllglykoprotein erfolgt. Ein inhibitorischer Effekt hinsichtlich der Infektion der Zielzellen mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren konnte allerdings für kein gp120-CD4 Fusionsprotein beobachtet werden. Im Gegenteil, alle Fusionsproteine mit Linker trugen zu einer Erhöhung der Infektion bei. Die Umstände, die zu diesem Phänomen führten,

blieben vorerst ungeklärt. Erwartungsgemäß sollten die gp120-CD4 Fusionsproteine in der Lage sein die Vektortransduktion zu inhibieren, indem sie über ihren gp120-Anteil an den CD4-Rezeptor und infolgedessen den CXCR4 Korezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen binden oder mit Hilfe des CD4-Anteils das trimere Hüllprotein des Vektors binden, um so eine Infektion der Zelle zu verhindern. Allein der anti-CD4 Antikörper war in der Lage die Infektion der MLV/HIV-1 Vektorpartikel durch Binden an den CD4-Rezeptor auf den Zielzellen zu inhibieren.

Im Arbeitskreis um De Vico wurde ein ähnliches, chimäres Polypeptid hergestellt. Es besteht aus einem M-tropen gp120 Anteil, einem Linker und den Domänen D1 und D2 des CD4-Rezeptors (Fouts *et al.*, 2000). Zusätzlich zu diesem Polypeptid wurde eine gp120 verkürzte Variante erzeugt, die beide Komponenten für eine Komplexbildung näher zueinander bringen sollte. Beide Moleküle exprimierten Epitope in der von CD4 induzierten (CD4i) Korezeptorbindungsstelle, die von den 17b und 48b Antikörpern erkannt wurden. Außerdem banden beide Peptide an den CCR5-Korezeptor und inhibierten eine über den CCR5-Korezeptor verlaufende HIV-Infektion. Vakzinierungsstudien mit diesen Fusionsproteinen, die die Bildung von neutralisierenden Antikörpern überprüfen, wurden nicht durchgeführt.

Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten, die eine Blockierung des CCR5 Korezeptors und somit eine Inhibierung der HIV-Infektion durch die gp120-CD4 Polypeptide zeigen konnten, zeigten die in dieser Arbeit verwendeten gp120-CD4 Fusionsproteine keinen inhibitorischen Einfluss auf die MLV/HIV-1 Vektortransduktion. Obwohl der Aufbau der benützten Fusionsproteine ähnlich war, lassen sich dennoch Unterschiede feststellen. So bestand der Linker der Polypeptide von De Vico aus 20 Aminosäuren mit der Wiederholungssequenz Gly-Ser-Ala, während der hier verwendete Linker 16 Aminosäuren mit dem Wiederholungsmotiv (Gly₃Ser)₄ umfasste. Laut den Studien von De Vico sollte ein 20 Aminosäurenlinker für eine intramolekulare Bindung ausreichen. Eventuell erlaubt ein kleinerer Abstandhalter die intramolekulare Bindung nicht. Studien, die die Konformation des hier verwendeten gp120-CD4 Fusionsproteins untersuchen, wurden nicht durchgeführt. Allerdings weist das Fehlen einer Inhibition der MLV/HIV-1 Vektortransduktion im Neutralisierungsassay darauf hin, dass strukturelle Schwierigkeiten vorgelegen haben könnten. Die Konzentration der Fusionsproteine könnte zudem zu gering gewesen sein, da die Fusionsproteine nicht wie in den veröffentlichten Daten über Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden.

Die Fusionsproteine zeigten in den vorangegangenen Experimenten keinen Effekt in Bezug auf die Inhibierung der Vektortransduktion. Diese *in vitro* durchgeführten Studien schließen allerdings ein verändertes Verhalten der Fusionsproteine *in vivo* nicht aus. Deshalb wurden

weitere Ansätze mit Fusionsproteinen zur DNA-Vakzinierung in transgenen huCD4⁺ Mäusen ausgeführt.

Die transgene huCD4⁺ Maus eignet sich besonders gut für diese Vakzinierungsstudien, da sie anstelle des murinen CD4-Rezeptors auf den T-Lymphozyten den humanen Rezeptor exprimiert (Killeen *et al.*, 1993). Dies ermöglicht einerseits das Binden der gp120 Domäne des Fusionsproteins an den humanen CD4-Rezeptor und andererseits die Erkennung der CD4 Domäne als „selbst“, so dass keine Antikörper gegen humanes CD4 generiert werden sollten.

Die Vakzinierung mit Plasmid-DNA gehört mittlerweile zu den erfolgversprechenden Methoden der Immunisierung, da sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Immunantwort induziert werden. Beide sind notwendig um einen ausreichenden Schutz vor HIV zu gewährleisten. Die Durchführung erfolgt hauptsächlich mit der sogenannten „gene gun“, welche die DNA an Goldpartikel bindet und in die Zelle appliziert. Eine günstigere und einfachere Variation der DNA-Vakzinierung stellt die Methode mit Transfektionsreagenzien dar. Hierbei kann Plasmid-DNA zusammen mit einem Transfektionsreagenz intramuskulär oder subkutan verabreicht werden.

Für die DNA-Vakzinierung wurde das CD4.d4-gp120 Fusionsprotein und der Kontrollvektor pSG-5 ausgewählt, letzterer diente als Ausgangsvektor für die Expression des Fusionsproteins. Die Vakzinierung erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Superfect. Zu Beginn des Versuchs und vor jeder Vakzinierung wurde den Mäusen Blut entnommen. Nach viermaliger Immunisierung der transgenen huCD4⁺ Mäuse in einem Zeitraum von 7 Wochen, wurden die Tiere nach weiteren 5 Wochen getötet und das Blut zur Gewinnung von Serum entnommen.

Die Untersuchung des Serums befasste sich zunächst mit dem Nachweis von Antikörpern, die gegen das Hüllprotein gp120 gerichtet waren. Allerdings ließen sich keine Antikörper im Immunoblot nachweisen. Die Detektion neutralisierender Antikörper im Neutralisierungsassay verlief ebenfalls negativ. Das Ergebnis zeigt, dass mit Hilfe des Fusionsproteins CD4.d4-gp120 keine neutralisierenden Antikörper in der transgenen huCD4⁺ Maus induziert werden konnten. Vermutlich kommt es in dem Fusionsprotein zu keiner vollständigen Konformationsänderung, die konservierte Epitope freisetzen würde. Möglicherweise hätte die Anwesenheit eines Linkers dieses Problem behoben. Dennoch hätten nach erfolgreicher Immunisierung zumindest Antikörper gegen das Hüllglykoprotein gp120 generiert werden sollen, da es von dem Immunsystem der Maus als fremd erkannt werden sollte. Das Fehlen dieser Immunreaktion blieb unklar.

Mittlerweile veröffentlichte Ergebnisse mit kreuzvernetzten gp120-CD4 Komplexen zeigen, dass immunisierte Rhesus Makaken zur Bildung neutralisierender Antikörper fähig sind (Fouts *et al.*, 2002). Das Vernetzen des löslichen CD4 mit gp120 erfolgte mit der Substanz

Bis(sulfosuccinimidyl)suberat, die beide Komponenten kovalent miteinander vernetzt. Das Ergebnis der Immunisierung war ein Serum, das eine Reihe primärer HIV-1 Isolate neutralisieren konnte. Hier zeigt sich, dass das Fixieren der Konformation der Intermediate, die beim Eintritt des HI-Virus in die Zielzelle entstehen, die Generierung einer humoralen Immunantwort mit neutralisierenden Antikörpern zur Folge haben kann. Dasselbe Ergebnis konnte mit chimären gp120-CD4 Fusionsproteinen bisher nicht erreicht werden.

5.2 MLV/HIV-1 Vektorpartikel als Immunogen

Bei MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln handelt es sich um Vektoren, die basierend auf MLV das HIV-1 Hüllprotein tragen. Die Partikel transduzieren infolgedessen speziell CD4-exprimierende Zielzellen (Schnierle *et al.*, 1997). Die Hülle des Pseudotypvektors gleicht der des HI-Virus, so dass das Hüllglykoprotein in seiner nativen, membranverankerten, trimeren Konformation in der Lipiddoppelschicht sitzt. Immunisierungsstudien in transgenen huCD4⁺ Mäusen sollten zur Bildung von Antikörpern gegen die Oberflächenkomponente gp120 oder zur Generierung neutralisierender Antikörper führen. Da MLV/HIV-1 Vektorpartikel nur sich teilende Zellen transduzieren, mussten die T-Lymphozyten der transgenen Mäuse vor Versuchsbeginn zur Proliferation angeregt werden. Jeweils vier Tiere einer Gruppe wurden mit Lektinol stimuliert, während die T-Lymphozyten der Tiere der anderen Gruppe mit Enterotoxin B stimuliert wurden. Anschließend folgten drei Immunisierungen mit MLV/HIV-1 Pseudotypvektoren im Abstand von drei Tagen. Nach drei Wochen wurden die Mäuse getötet und Serum gewonnen. Das Serum der immunisierten Mäuse enthielt jedoch weder gegen gp120 gerichtete Antikörper noch neutralisierende Antikörper.

Da die Immunisierung der Mäuse mit Vektorpartikeln stattfand, die das Gen für die Expression der β -Galactosidase trugen, sollten Antikörper gegen dieses Protein generiert werden. In der Tat ließen sich im Immunoblot in den mit Lektinol stimulierten transgenen Mäuse Nr.2 und Nr.3 Antikörper gegen β -Galactosidase nachweisen. Dieselben Mäuse zeigten in Gewebeschnitten einiger lymphatischer Organe die Expression der β -Galactosidase (Thaler, Dissertation 2002, Universität Frankfurt). Somit hatte mit Hilfe der MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikel ein erfolgreicher Gentransfer stattgefunden. Eine Immunreaktion gegen den Vektor erfolgte nicht. Das Ergebnis stellt einen großen Schritt in Richtung der Gentherapie dar, da dort Immunreaktionen gegen die eingesetzten Gentransfervehikel nicht erwünscht sind. In Bezug auf eine Immunreaktion gegen das HIV-1 Hüllglykoprotein eignen sich die pseudotypisierten MLV/HIV-1 Vektorpartikel in dieser Form nicht. Die Menge der eingesetzten MLV/HIV-1 Vektorpartikel könnte jedoch eine Rolle spielen, da eventuell zu wenig Partikel zur Immunisierung eingesetzt wurden. Aber auch die Art und Weise der Applikation ist von Bedeutung. Eine subkutane Injektion könnte sich im Gegensatz zu einer intravenösen Injektion besser für eine Immunisierung eignen, da unter der Haut vermehrt Antigen präsentierende Zellen auftreten.

5.3 Replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren als Immunogen

Die Verwendung eines replikationskompetenten MLV/HIV-1 Pseudotypvirus sollte die Menge an Antigenen erhöhen. Wie bei den Vektorpartikeln sollte durch die Pseudotypisierung des murinen Leukämievirus (MLV) mit dem HIV-1 Hüllprotein ein replikationsfähiges Virus entstehen, das das Hüllglykoprotein in seiner nativen Konformation exprimiert. Ein lebendes Virus besitzt eine größere Menge Antigene, die zur Induktion des Immunsystems führen, als das bei einem Fusionsprotein oder einem Vektor der Fall wäre. Außerdem kann durch die Infektion eines Organismus mit einem lebenden abgeschwächten Virus sowohl eine humorale als auch eine zellvermittelte Immunantwort erzeugt werden. Pseudotypisierte MLV/HIV-1 Viren könnten, sofern sie selbst nicht pathogen sind, aus diesem Grund ideale HIV-1 Vakzine sein. Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus könnte weiterhin zusammen mit der transgenen huCD4⁺ Maus ein Modellsystem zur Untersuchung von HIV darstellen. Der Eintritt und die Fusion von HIV-1 in murine huCD4⁺ T-Lymphozyten und dessen Inhibition könnten in der transgenen Maus *in vivo* studiert werden.

Das einfachste MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} basiert auf dem MLV-Genom. Durch Austausch des murinen Hüllproteins durch das HIV-1 Hüllglykoprotein entstand die pseudotypisierte Form des Virus. Das verwendete HIV-1 Hüllglykoprotein enthält das MLV Signalpeptid und ist zytoplasmatisch auf 7 Aminosäuren verkürzt, um einen Einbau des Hüllproteins in Viruspartikel zu gewährleisten (Schnierle *et al.*, 1997). Dem Pseudotypvirus fehlen alle für HIV-1 typischen akzessorischen Gene. Die Abwesenheit des regulatorischen Elements Rev führt jedoch normalerweise zu einem Verlust der mRNA Stabilität oder zu einem unvollständigen Transport der mRNA aus dem Nukleus (Nasioulas *et al.*, 1994). Dessen ungeachtet konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines Introns stromaufwärts des HIV-1 env Gens die Expression des Hüllproteins Rev unabhängig macht (Hammar skjöld *et al.*, 1994). Um denselben Effekt auszunutzen wurden der Spleißakzeptor und der Spleißdonor des MLV intakt gelassen und sollten als Intron fungieren. Somit wurde für das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} ein Rev unabhängiger Transport der mRNA aus dem Nukleus erwartet.

Die HIV-1 Hüllproteinexpression und Synzytienbildung des MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} konnte in transfizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass eine HIV-1 Env-Expression mit der verkürzten Variante des Hüllproteins und dem MLV Signalpeptid generell möglich ist.

Die HIV-1 Env Proteinexpression konnte durch Kotransfektion aller akzessorischer Proteine des HIV-1 gesteigert werden. Ein einzelnes akzessorisches Protein oder eine Kombination von mehreren konnte nach vielfachen Untersuchungen nicht für die Erhöhung der Hüllproteinexpression verantwortlich gemacht werden. Langzeitstudien transfizierter NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen erbrachten keine Zunahme von Synzytien oder Hüllproteinexpression und somit keinen Nachweis über replikationskompetente Pseudotypviren.

Eine Alternative zur Generation replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren mit nur einem Konstrukt stellt die Produktion zweier Verpackungszelllinien dar, die entweder die Gene gag und pol von MLV oder das HIV-1 env Gen verpacken. Nach Transduktion dieser Viruspartikel in eine CD4- und CXCR4-positive Zelle sollten replikationskompetente Pseudotypviren entstehen, die verpackbares MLV gag/pol und HIV env enthalten. Umfangreiche Experimente ermöglichten aber auch hierdurch nicht die Herstellung replikationsfähiger MLV/HIV Pseudotypviren.

5.4 Optimierung der MLV/HIV-1 Pseudotypviren

In einem neuen Ansatz wurde das MLV/HIV-1 Pseudotypviruskonstrukt pUCX/C_{7s} optimiert. Das Pseudotypviruskonstrukt pUCX/C_{7s}WPRE entstand, um das vorgeschaltete Intron vor dem HIV-1 env Gen zu optimieren und eine rev unabhängige Proteinexpression im MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} zu erhalten. Das posttranskriptionelle Element des „woodchuck hepatitis virus“ (WPRE) sollte die Funktion von Rev ersetzen (Popa *et al.*, 2002). Unter Zuhilfenahme des regulatorischen Elements WPRE konnte bereits die Proteinexpression eines Transgenes gesteigert werden (Zufferey *et al.*, 1999). Das aus Hepadna Viren stammende WPRE-Element verwendet zelluläre Transportfaktoren zum Export Intron-enthaltener mRNA aus dem Nukleus (Huang *et al.*, 1999). Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRE entstand durch das Anfügen des WPRE-Elements 3' an das HIV-1 env Gen des Konstruktes pUCX/C_{7s}.

Das zusätzliche Proviruskonstrukt pKAHIV89.6P bediente sich der Erfahrungen, die mit dem synthetischen HIV-1 Hüllprotein 89.6P gemacht wurden: Aufgrund des alternativen Kodongebrauchs des synthetischen Gens erhöhte sich der Guanin/Cytosin-Gehalt und die Proteinexpression wurde verstärkt, außerdem erfolgte ein rev unabhängiger Export einfach gespleißter und ungespleißter mRNA aus dem Nukleus. „Cis aktive inhibitorische Sequenzen“ (INS) liegen oft in kodierenden Bereichen der Gene und können die Proteinexpression negativ beeinflussen, so dass der mRNA-Export aus dem Nukleus rev abhängig wird (Graf *et al.*, 2000). Ein alternativer Kodongebrauch kann INS Sequenzen inaktivieren und die Proteinexpression rev unabhängig gestalten. Die Proteinexpression selbst wird durch den erhöhten Guanin/Cytosin-Gehalt verstärkt. In Verbindung mit den Strukturproteinen Gag und Pol könnte die gesteigerte HIV Env-Expression die Virusreplikation fördern.

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P besitzt ein primäres SHIV-1 env Isolat, das 89.6P benannt wurde. Simian/humanes Immundefizienz Virus (SHIV) entstand durch den Austausch des Hüllglykoproteins und der akzessorischen Gene tat und rev des SIVmac239 durch die entsprechenden Gene des HIV-1. Der Wirtstropismus ist dualotrop, das bedeutet, dass sowohl der CXCR4-Chemokinrezeptor zur Infektion der Zelle verwendet werden kann, als auch der CCR5-Korezeptor. Folglich können T-Lymphozyten und Makrophagen infiziert werden. Die Herstellung des Hüllglykoproteins erfolgte synthetisch, dadurch fehlen sämtliche akzessorische Elemente des HIV-1. Der C-Terminus des HIV-1 Env enthält bei Aminosäure 712 ein Stopp-Kodon und verkürzt den zytoplasmatischen Teil auf 7 Aminosäuren. Die verkürzte Variante des HIV-1 Hüllproteins sollte den Einbau in Viruspartikel gewährleisten. Das HIV Signalpeptid wurde durch das Signalpeptid von CD5 ersetzt.

Die beiden neu synthetisierten MLV/HIV-1 Pseudotypkonstrukte wurden hinsichtlich der Produktion replikationskompetenter Viren untersucht und mit dem bereits vorhandenen Konstrukt pUCX/C_{7s} verglichen. Alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurden in 293 T Zellen produziert und auf ihre HIV-1 env und MLV gag/pol Expression untersucht. Das Konstrukt pKAHIV89.6P zeigte die beste HIV-1 Hüllproteinexpression, da die Menge an gebildeten Protein die höchste bei allen drei Viruskonstrukten war und außerdem die Prozessierung des Hüllproteins stattgefunden hatte (Abbildung 41). Das verkürzte HIV-1 Hüllprotein wird als gp140 bezeichnet und wird während der Prozessierung in die Oberflächenkomponente gp120 und den transmembranen Teil gp20 prozessiert. Im Gegensatz dazu besitzt das vollständige HIV-1 Hüllprotein das gp160 Vorläuferprotein, welches in die Komponenten gp120 und gp41 prozessiert wird.

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s}WPRES wies ebenfalls prozessiertes gp120 auf, die gesamte Proteinexpression fiel jedoch schwächer aus im Vergleich zu dem synthetischen HIV-1 Env. Auffallend war das Laufverhalten der Hüllproteine des Konstrukts pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRES im SDS-Page. Das T-trope HIV-1 Env gp120 lag näher an der unprozessierten gp140 Bande, während beim dualotropen HIV-1 Env der Abstand größer war. Die Ursache für das Laufverhalten der Hüllglykoproteine könnte eine unterschiedliche Glykosylierung der T-tropen und dualotropen Hüllproteine sein.

Die Hüllproteinexpression des Konstruktes pUCX/C_{7s} war sehr schwach, prozessiertes gp120 konnte nur in geringen Mengen nachgewiesen werden. Die Produktion der Strukturproteine Gag und Pol von MLV fand für alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren in gleichen Mengen statt.

Nach Produktion der drei verschiedenen MLV/HIV-1 Pseudotypviren in 293 T Zellen, wurden die Viruspartikel mittels Ultrazentrifugation im Zellkulturüberstand nachgewiesen. Die gebildeten Viruspartikel bauten nicht nur prozessiertes gp120 und gp20 in ihre Viruspartikel ein, sondern ebenso das Vorläuferprotein gp140 (Abbildung 41). Der Vergleich mit MLV/HIV-1 pseudotypisierten Vektorpartikeln zeigt dieses Bild nicht. Vektorpartikel tragen nur das prozessierte HIV-1 Hüllglykoprotein gp120 und den transmembranen Teil gp41 in ihrer Hülle (Schnierle *et al.*, 1997). Die Arbeitsgruppe um Iwatani untersuchte HIV-1 Varianten mit verkürzten Hüllproteinen und konnte ebenfalls den Einbau von Vorläuferproteinen in Virionen beobachten (Iwatani *et al.*, 2001). Aus der Literatur ist außerdem bekannt, dass gp140 enthaltene Viruspartikel nicht infektiös sind (Bosch *et al.*, 1990). Durch den zusätzlichen Einbau von unprozessierten gp140 könnte demnach die Infektiösität der Viruspartikel vermindert werden. Der zytoplasmatische Teil des wildtyp gp41

sortiert wahrscheinlich die Proteine bei der Inkorporation des Hüllproteins in HIV Partikel und sorgt für die Aufnahme der prozessierten Form.

Im nächsten Schritt wurde die Infektiösität der Pseudotypviren überprüft. Hierzu wurden MLV/HIV-1 Pseudotypviren von NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen auf weitere Zellen übertragen, so dass mehrere Infektionsrunden auf Hüllproteinexpression hin überprüft werden konnten.

In den infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der ersten Infektionsrunde konnte für alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren Hüllproteinexpression beobachtet werden (Abbildung 42). Der Nachweis belief sich aber auf das HIV-1 Vorläuferprotein gp140. Prozessiertes gp120 wurde nicht detektiert. Die Strukturproteine MLV Gag und Pol konnten gleichfalls in den Zelllysaten infizierter Zellen nachgewiesen werden. Daneben konnten für die mit den Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE infizierten Zellen die Bildung von vielen Synzytien beobachtet werden. Diese war ein Indiz dafür, dass prozessiertes gp120 an der Zellmembran vorhanden war, die gebildeten Mengen aber für eine Detektion im Immunoblot zu gering waren. Das Virus pUCX/C_{7s} führte zu keiner Synzytienbildung in den infizierten Zielzellen. Offenbar lag in den infizierten Zellen ein Defekt bei der Prozessierung des Hüllglykoproteins vor, da hauptsächlich unprozessiertes gp140 in den Zellen existierte.

In den Zelllysaten der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der zweiten Infektionsrunde konnte keine HIV-1 Hüllproteinexpression detektiert werden. Trotzdem konnten für die Viruspartikel pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE die Bildung einiger weniger Synzytien beobachtet werden. Das zeigt, dass aus der ersten Infektionsrunde kaum infektiöse Viruspartikel hervorgingen. Darüber hinaus konnte in keiner weiteren Infektionsrunden Synzytienbildung oder Hüllproteinexpression aufgezeigt werden. Eine Vergrößerung der Synzytien oder die komplette Lyse aller Zellen, was für eine produktive Replikation der Pseudotypviren gesprochen hätte, konnte in keiner Infektionsrunde beobachtet werden.

Folglich verlieren die MLV/HIV-1 Pseudotypviren ihre Infektiösität im Laufe der Zeit und sind nicht replikationskompetent. Die Prozessierung des HIV-1 Env Vorläuferproteins gp140 scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen.

Um zu klären, warum die Infektiösität der MLV/HIV-1 Pseudotypviren abnahm, wurde der Zellkulturüberstand der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen der ersten Infektionsrunde mittels Ultrazentrifugation aufgereinigt.

Eine geringe HIV-1 Hüllproteinaufnahme in die MLV/HIV-1 Pseudotyppartikel pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE konnte bewiesen werden, für pUCX/C_{7s} verlief der Nachweis negativ (Abbildung 44). Die stärkste gp120 Proteinmenge besaßen die dualotropen Pseudotyppartikel pKAHIV89.6P, während pUCX/C_{7s}WPRE nur eine schwache gp120 Menge enthielt. Allerdings zeigten alle Virusüberstände die Anwesenheit von Gag, sogar das

Konstrukt pUCX/C_{7s}, wenn auch schwach, was somit hauptsächlich zur Bildung Env-freier Viruspartikel führte.

Die allgemein geringe Menge des HIV-1 gp120 der beiden Viruspartikel pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE weist auf eine geringe Anzahl infektiöser Viren hin, die aus der ersten Infektionsrunde hervorgehen. Dies erklärt die schlechte Infektion der Zellen in der zweiten Runde. Der Defekt ist wahrscheinlich auf die geringe Menge an funktionellen HIV-1 Hüllprotein in Viruspartikeln zurückzuführen.

Die Quantifizierung der Infektiosität der MLV/HIV-1 Pseudotypviren wurde durch Kotransfektion der Provirus-DNA mit einem verpackbaren GFP-Konstrukt möglich, da replizierende Pseudotypviren das GFP Gen mit übertragen. Durch einfaches Auszählen der grün fluoreszierenden Zellen unter UV-Licht konnten die Titer bestimmt werden.

In der ersten Infektionsrunde lagen die Titer für alle drei MLV/HIV-1 Pseudotypviren nahe den Werten, die mit replikationskompetenten MLV erhalten wurden. Die Titer der Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE reduzierten sich 10 fach in der zweiten Infektionsrunde. Viruspartikel des pUCX/C_{7s} infizierten keine Zellen in der zweiten Runde. In der dritten Infektionsrunde wurden nur noch einzelne GFP-positive Zellen bei den Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE gezählt. Die Werte für wildtyp MLV blieben in allen Runden nahezu konstant.

Die Infektion der NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen war generell möglich, eine Verbreitung der GFP-Fluoreszenz wurde aber nicht beobachtet. Im Gegenteil, die Markierung der Zellen verringerte sich von der ersten bis zur dritten Infektionsrunde rapide. Demnach fand keine produktive Virusreplikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren statt.

Rekombinationsereignisse der MLV/HIV-1 pseudotypisierten Viren mit persistierendem, replikationskompetenten MLV in den Zielzellen konnte mittels PCR ausgeschlossen werden. Zudem hätten Rekombinationen zu einer Verbreitung von GFP in den Zielzellen geführt, da verpackbarer Marker in allen Fällen kotransfiziert wurde.

Um die Ursache zu erforschen, die eine produktive Virusreplikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren verhindern, wurde eine Northern Blot Analyse der infizierten NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zellen durchgeführt. Zur Detektion der mRNA der T-tropen und dualotropen HIV env mRNA wurden verschiedene Sonden verwendet. Als positiv Kontrolle diente das replikationskompetente MLV, dessen env mRNA mit einer MLV env Sonde nachgewiesen wurde. Beginnend mit der Detektion der MLV env Sonde konnte bereits nach 2 Stunden Exposition eine enorme Menge MLV-mRNA radioaktiv detektiert werden (Abbildung 45). Dies war auf die Tatsache zurückzuführen, dass sich das Virus schnell in Mausfibroblastenzellen vermehren konnte. Da MLV zu der Familie der einfachen Retroviren

gehört, konnten zwei Spleißprodukte in infizierten Zellen nachgewiesen werden: eine größere Menge ungespleißter, genomischer mRNA, die für die Strukturproteine kodiert und in Nachkommenviren verpackt wird, sowie etwa 10 fach weniger einfach gespleißte env mRNA, die für das Hüllprotein kodiert.

Das dualotrope MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P wies alle Charakteristika eines MLV auf: Das ungespleißte Transkript entsprach ca. der 10 fachen Menge an einfach gespleißter env mRNA. Wenn auch die pKAHIV89.6P mRNA-Menge geringer war als die des MLV, so präsentierte der Pseudotypvirus die beste mRNA-Expression der drei Proviren. Zusätzliche Spleißprodukte oder ein Defekt auf mRNA-Ebene konnten somit als Ursache für das Scheitern der Virusvermehrung für den Provirus pKAHIV89.6P ausgeschlossen werden.

Das MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} präsentierte nur sehr geringe mRNA-Mengen. Ferner bestand ein Missverhältnis zwischen genomischer und env mRNA, da größere Mengen HIV-1 env mRNA vorhanden waren im Vergleich zur genomischen mRNA. Anhand des Northern Blots konnte gezeigt werden, dass die geringe mRNA-Menge aufgrund eines Spleißdefekts, der zum Missverhältnis von ungespleißter und einfach gespleißter mRNA führte, die Replikationsunfähigkeit des Retrovirus pUCX/C_{7s} verursachen könnte. Zu geringe Mengen genomischer mRNA könnten dazu führen, dass kaum genomische mRNA zur Verfügung stand, um in Nachkommenviren verpackt zu werden, was die gleichen Titer in der ersten Infektion erklärt, da GFP verpackt wurde.

Das mRNA-Missverhältnis des Pseudotypvirus pUCX/C_{7s} konnte durch die Anwesenheit des WPRE-Elements im Provirus pUCX/C_{7s}WPRE umgekehrt werden. Zusätzlich erhöhte sich die Menge an genomischer mRNA im Vergleich zu pUCX/C_{7s}, die provirale mRNA-Menge erreichte jedoch nicht das Ausmaß des dualotropen MLV/HIV-1 Pseudotypvirus pKAHIV89.6P und hier kann kein mRNA-Defekt für das Einbüßen der Infektiosität des Virus pUCX/C_{7s}WPRE verantwortlich gemacht werden.

Die Northern Blot Analyse erklärt den Verlust der Virusreplikation für das Konstrukt pUCX/C_{7s}. Das Einfügen eines Introns konnte die Funktion des regulatorischen Proteins Rev nicht ersetzen, da aufgrund des Fehlens dieses Proteins eine größere Anzahl gespleißter mRNA in der Zelle vorlag. Das WPRE-Element war in der Lage diesen Defekt zu kompensieren.

Alle anderen Proviren zeigten ideale mRNA-Verhältnisse, die eine Voraussetzung für die Virusreplikation darstellen. Der Fehler, der die Replikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE verhindert, ist entweder bei der zu beobachtenden Aufnahme des Hüllglykoproteins oder beim Reifen der Viruspartikel zu suchen. Die Funktion

von Rev konnte bei den optimierten Pseudotypviren entweder durch Hinzufügen des WPRE-Elements oder durch Verwendung des synthetischen Hüllproteins 89.6 ersetzt werden.

In einem weiteren Experiment sollte festgestellt werden, ob der Verlust der Virusinfektiosität in Zusammenhang mit einem Defekt der Hüllproteininkorporation oder der Kapsidpartikelreifung stand, da die Northern Blot Analyse einwandfreie mRNA-Produkte der MLV/HIV-1 Pseudotypviren pKAHIV89.6P und pUCX/C_{7s}WPRE nachweisen konnte.

Eine zusätzliche MLV-Hüllproteinexpression in den NIH 3T3 CD4/CXCR4 Zielzellen der ersten Infektionsrunde sollte einen vorhandenen Defekt des Hüllproteins durch neu gebildete MLV-Kapsidpartikel ausgleichen, so dass die Infektion der zweiten Runde verbessert werden konnte. In der Tat erhöhte sich die Infektionseffizienz der zweiten Runde aller MLV/HIV-1 Pseudotypviren. Folglich wurden die MLV Gag und Pol Strukturproteine aller MLV/HIV-1 pseudotypisierten Viren zu vollständigen Kapsidpartikeln zusammen gebaut. Dies gab einen weiteren Hinweis darauf, dass die Bildung infektiöser MLV/HIV-1 Pseudotypviren durch einen Defekt des HIV-1 Hüllproteins verursacht wurde.

5.5 Interpretation der Ergebnisse

Eine Erklärung für die fehlende Virusreplikation könnte laut veröffentlichten Studien die Benutzung von Mauszellen sein. Da das HI-Virus nicht in der Lage ist sich in murinen Zellen zu vermehren, gibt es derzeit kein Kleintiermodell für HIV-1. Hierfür kommen verschiedene Gründe in Betracht, beispielsweise ein Fehler beim Zusammenbau der HI-Viruspartikel in murinen Zellen.

Die in diesen Experimenten am häufigsten verwendeten Mausfibroblastenzellen NIH 3T3 CD4/CXCR4 gehören zu den für HIV-1 nicht-permissiven Zellen. Das HI-Virus ist zur Replikation in diesen Zellen nicht befähigt, wenn gleich verschiedene Prozesse der Virusreplikation wie Reverse Transkription, Integration und Translation stattfinden können. Die Produktion von ungespleißter mRNA ist allerdings reduziert und der Viruszusammenbau ist erheblich gestört (Mariana *et al.*, 2000). Eine Ursache für die Blockierung des Viruszusammenbaus stellt die schlechte Prozessierung der Gag Proteine dar, die dazu führt, dass kaum HIV-1 Matrixprotein zur Zellmembran gelangt (Bieniasz *et al.*, 2000). Viruspartikel können nicht freigesetzt werden. Der Austausch des HIV-1 Matrixproteins gegen das des MLV führte zu einem effizienteren Zusammenbau von MHIV chimären Viruspartikel in murinen Zellen unter Verwendung eines verkürzten HIV-1 Env. Replikationskompetente pseudotypisierte MHI-Viren wurden nicht produziert, vermutlich spielen weitere zelluläre Faktoren, die mit dem Matrixprotein interagieren eine Rolle (Chen *et al.*, 2001; Reed *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit konstruierten MLV/HIV-1 Pseudotypviren sollten aber keine Probleme mit der Prozessierung der Gag Strukturproteine haben, da letztere murinen Ursprungs waren und wie der Rescue-Versuch zeigte, in Mauszellen ohne Schwierigkeiten produziert wurden.

Dennoch, die Vermehrung von HIV-1 in transgenen huCD4⁺ und huCXCR4⁺ Mäusen konnte nicht beobachtet werden, obgleich die Infektion dieser Zellen erfolgte (Chen *et al.*, 2001). Dies deutete darauf hin, dass spezielle murine Faktoren bei der Unterdrückung der Virusreplikation eine Rolle spielten. Ein solcher Faktor ist Cyclin T₁, er ist verantwortlich für die Aktivität von Tat als Transkriptionsaktivator. Die murine Variante des Cyclin T₁ kann Tat und TAR (trans-activation response, Sekundärstruktur auf allen viralen mRNAs) nicht binden, folglich kann keine LTR getriebene Transkription stattfinden. Die Transfektion von humanen Cyclin T₁ kompensiert die Tat Funktion. In den Experimenten dieser Arbeit scheint das aber nicht die Ursache für den Verlust der Virusinfektiosität der MLV/HIV-1 Pseudotypviren zu sein, da nicht das HIV LTR benutzt wurde und dasselbe Bild in Jurkat Zellen und in Hela CD4 Zellen beobachtet wurde, die humanen Ursprungs sind. Ein Defekt, der auf der Benutzung von murinen Zellen selbst beruhte, konnte somit ausgeschlossen werden.

Einen Hinweis für die Abnahme der Infektiosität der MLV/HIV-1 Pseudotypviren gibt die CD4-Expression der infizierten Zellen. 293 T Zellen, die mit der proviralen DNA der MLV/HIV-1 Pseudotypviren transfiziert wurden, zeigten unprozessiertes gp140 als auch prozessiertes gp120 Hüllprotein. In infizierten CD4- und CXCR4-positiven NIH 3T3 Zellen konnte dagegen nur das Vorläuferprotein gp140 detektiert werden. Das könnte ein Indiz dafür sein, dass die Expression des CD4-Rezeptors mit der Hüllproteinprozessierung interferiert.

HIV hat verschiedene Mechanismen zur Reduktion der CD4-Expression entwickelt, an denen die akzessorischen Proteine Nef, Vpu und Vpr beteiligt sind. Nef bewirkt die Internalisierung des CD4-Rezeptors in Clathrin-coated-pits und einen Abbau in Lysosomen (Klester *et al.*, 1991). Das akzessorische Protein Vpu verhindert die intrazelluläre Komplexbildung des neusynthetisierten Hüllglykoproteins mit dem CD4-Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum und ermöglicht so die Prozessierung des HIV Env. Das Vpr Protein ist ebenfalls an der Reduktion des CD4-Rezeptors beteiligt, genaue Mechanismen sind nicht bekannt (Conti *et al.*, 2000).

Diese Mechanismen zeigen, dass diese akzessorischen Elemente durchaus wichtig für die HIV-1 Virusreplikation sind. Alle MLV/HIV-1 pseudotypisierten Viren besitzen keine akzessorischen Gene, deren Aufnahme in das Virusgenom könnte möglicherweise zu einer vollständigen Env-Prozessierung führen.

Einen anderen Anhaltspunkt für die Replikationsunfähigkeit der MLV/HIV-1 Pseudotypviren liefert das verkürzte HIV-1 Hüllglykoprotein selbst. Veröffentlichungen haben gezeigt, dass das verkürzte HIV-1 Hüllglykoprotein im HI-Virus Zelltyp-abhängig in Virionen inkorporiert wird. Eine zytoplasmatisch auf 7 Aminosäuren verkürzte Variante des HIV-1 Env im Kontext des HI-Virus replizierte in permissiven MT-4 Zellen fast genauso gut wie Wildtypvirus (Wilk *et al.*, 1992). Die Replikation in nicht-permissiven T-Lymphozyten war jedoch nicht möglich (Freed *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 2000). Diskutiert wird eine Interaktion des HIV-1 Matrixproteins mit dem langen zytoplasmatischen C-Terminus des gp41, die für die Inkorporation des Hüllglykoproteins wichtig ist. Die zytoplasmatische Domäne des gp41 spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Virusinfektiosität und dem Einbau des Hüllglykoproteins in Viruspartikel. Die Hintergründe für eine HIV-1 Vermehrung der verkürzten HIV-1 Env Variante in MT-4 Zellen konnten bisher nicht geklärt werden. Derzeit sind keine Mechanismen bekannt, die für den Defekt der Inkorporation des HIV-1 Hüllglykoproteins in Viruspartikel verantwortlich zu machen sind.

In einem anderen Fall wurde wie bereits erwähnt das HIV-1 Matrixprotein des HI-Virus gegen das von MLV ersetzt, um einem Defekt im Zusammenbau der Virionen in murinen Zellen entgegen zu wirken (Reed *et al.*, 2002). Bei Verwendung des verkürzten HIV-1 Env war das chimäre Virus zu einem kompletten Zusammenbau befähigt, besaß aber keine Infektiosität in

humanen und murinen Zellen. Eine Virusvermehrung in MT-4 Zellen konnte allerdings nach einer Anpassungsphase stattfinden. Dasselbe könnte auf die MLV/HIV-1 Pseudotypviren dieser Arbeit zutreffen somit wären Infektionsstudien an MT-4 Zellen erfolgversprechend. Durch die akzessorischen Gene des veröffentlichten chimären Virus wurde die CD4-Expression auf der Oberfläche der Zielzellen sicherlich reduziert. Die Hilfsgene ermöglichten aber keine Replikation des Virus in murinen Zellen. Die Reduktion des CD4-Rezeptors allein kann daher nicht für die Virusvermehrung ausschlaggebend sein, andere zelluläre Faktoren oder die Anpassungen des Virus scheinen notwendig zu sein.

Das lange zytoplasmatische Ende des transmembranen Hüllproteins gp41 besitzt aber auch andere Domänen, die einen Einfluss auf die Virusinfektiösität des HIV besitzen und deshalb nicht außer Acht gelassen werden dürfen.

HIV-1 besitzt zwei palmylierte Cysteinreste in der zytoplasmatischen Domäne gp41, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung infektiöser Viren spielen (Rousso *et al.*, 2000). Die Palmylierung der zytoplasmatischen Domäne ist verantwortlich für den Transport des Hüllglykoproteins zu speziellen Lipidbereichen der Zellmembran. Dieser Transportmechanismus erfordert die Palmylierung des Env und scheint für die Inkorporation des Env während des Zusammenbaus und für die Infektiösität des Virus essentiell zu sein. Diese Palmylierungsstellen sind in den MLV/HIV-1 Pseudotypviren nicht enthalten, da alle verkürzte HIV-1 Hüllglykoprotein Varianten aufweisen. Durch Einfügen der Palmylierungsstellen könnte die Infektiösität der pseudotypisierten Viren eventuell erhöht werden.

5.6 Ausblick

Mit der Verwendung des WPRE-Elements und des synthetischen Env konnten MLV/HIV-1 Pseudotypviren generiert werden, die Rev-unabhängig die Bildung viraler Partikel ermöglichten. Replikationskompetente Viren konnten nicht erzeugt werden, obwohl korrekte mRNA-Spleißprodukte in infizierten Zellen vorhanden waren. Die Ursache hierfür ist ein Defekt in infizierten Zellen, der dafür sorgt, dass HIV-1 Hüllprotein nicht in Viruspartikel inkorporiert wurde.

Die Replikation der MLV/HIV-1 Pseudotypviren bedarf wahrscheinlich Veränderungen des zytoplasmatischen Bereichs des gp41 Proteins und der Reduktion des CD4-Rezeptors auf der Oberfläche infizierter Zellen.

Zusätzlich sollte eine Vermehrung der MLV/HIV-1 Pseudotypviren in MT-4 Zellen überprüft werden, da HIV-1 Varianten mit verkürzten Hüllproteinen und MLV Matrixprotein zur Vermehrung in diesen Zellen fähig waren.

Replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren könnten als Quelle für oligomeres HIV-1 Hüllglykoprotein dienen und in Vakzinierungsstudien eingesetzt werden. Zusammen mit transgenen CD4⁺ Mäusen könnte mit pseudotypisierten Viren ein Maustiermodell etabliert werden, das genaue Untersuchungen der HIV-Infektion CD4-exprimierender Zellen, sowie Studien mit Inhibitoren des Viruseintritts erlauben. Ein Kleintiermodell für HIV würde eine Vielzahl von Experimenten zulassen, die in diesem Umfang in Affen nicht möglich wären.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung eines Impfstoffes gegen das humane Immundefizienz Virus (HIV-1) erfordert die Aktivierung einer humoralen und zellvermittelten Immunantwort. Diese kann durch lebende attenuierte Viren oder DNA Impfstoffe am besten induziert werden. Im Mittelpunkt der Impfstoffentwicklung steht das HIV-1 Hüllglykoprotein (Env), da es den initialen Kontakt mit der CD4-positiven Zielzelle herstellt. Die hohe Mutationsrate des HIV-1 führt zu Veränderungen des Hüllproteins und erzwingt die Ableitung konservierter Bereiche der nativen, oligomeren Konformation des Proteins.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden CD4-gp120 Fusionsproteine hergestellt, die Konformationsänderungen des Hüllglykoproteins nachahmen sollten, wie sie beim Eintritt von HIV in die Wirtszelle entstehen. Eine inhibitorische Wirkung dieser Proteine bei der Infektion von CD4-exprimierenden Zellen, sowie die Bildung neutralisierender Antikörper in immunisierten transgenen CD4⁺ Mäusen konnten nicht nachgewiesen werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Entstehung und Charakterisierung replikationskompetenter Viren zur Expression des oligomeren HIV-1 Hüllglykoproteins. Hierfür wurden murine Leukämie Viren (MLV) mit einer verkürzten Variante des HIV-1 Hüllglykoproteins pseudotypisiert. Sämtliche akzessorischen Gene des HIV-1 waren nicht enthalten. Die regulatorische Funktion des akzessorischen Proteins Rev wurde entweder durch die Verwendung eines Introns, durch das posttranskriptionelle Element des „woodchuck hepatitis virus“ (WPRE) oder durch Benutzung eines kodonveränderten Hüllproteins ersetzt. Folglich wurden drei unterschiedliche MLV/HIV-1 Pseudotypviren konstruiert.

Alle MLV/HIV-1 Pseudotypviren konnten nach Transfektion in 293 T Zellen synthetisiert werden und waren in der Lage CD4- und CXCR4-positive Zielzellen zu infizieren. Die Effizienz der zweiten Infektion war für die Proviren mit WPRE Element und synthetischen Hüllprotein reduziert, obwohl die mRNA-Synthese korrekt erfolgte und die Funktion des akzessorischen Elements Rev erfolgreich ersetzt werden konnte. Das Intron enthaltende MLV/HIV-1 pseudotypisierte Virus zeigte kaum mRNA-Produktion, folglich konnte keine zweite Infektion stattfinden. Replikationskompetente MLV/HIV-1 Pseudotypviren konnten mit keinem Konstrukt erzeugt werden, da Viruspartikel, die aus infizierten Zellen freigesetzt wurden, kaum Hüllprotein enthielten. Verschiedene Faktoren könnten hierbei eine Rolle spielen, unter anderem das zytoplasmatisch auf 7 Aminosäuren verkürzte HIV-1 Hüllglykoprotein selbst, was nur in MT-4 Zellen eine HIV-Replikation erlaubt. Folglich sind für die Herstellung replikationskompetenter MLV/HIV-1 Pseudotypviren Veränderungen am C-Terminus des Hüllglykoproteins unausweichlich.

7 Literatur

- Amara, R. R., Villinger, F., Altman, J. D., Lydy, S. L., O'Neil, S. P., Staprans, S. I., Montefiori, D. C., Xu, Y., Herndon, J. G. *et al.* (2001).
Control of a mucosal challenge and prevention of AIDS by a multiprotein DNA/MVA vaccine. *Science* **292**:69-74.
- Baba, T. W., Liska, V., Hofmann-Lehmann, R., Vlasak, J., Xu, W., Ayehunie, S., Cavacini, L. A., Posner, M. R., Katinger, H., Stiegler, G., Bernacky, B. J., Rizvi, T. A., Schmidt, R., Hill, L. R., Keeling, M. E., Lu, Y., Wright, J. E., Chou, T. C., and Ruprecht, R. M. (2000). Human neutralizing monoclonal antibodies of the IgG1 subtype protect against mucosal simian-human immunodeficiency virus infection. *Nature Medicine* **6**:200-206.
- Bachmann, B. (1990).
Linkage map of *Escherichia coli* K12. *Microbiol. Rev.* **54**:130-197.
- Barbosa, P., Charneau, P., Dumey, N., and Clavel, F. (1994).
Kinetic analysis of HIV-1 early replicative steps in a coculture system. *Aids Research Human Retroviruses* **10**:53-59.
- Bieniasz, P. D., and Cullen, B. R. (2000).
Multiple blocks to human immunodeficiency virus type 1 replication in rodent cells. *Journal of virology* **74**:9868-9877.
- Binley, J. M., Sanders, R. W., Clas, B., Schuelke, N., Master, A., Guo, Y., Kajumo, F., Anselma, D. J., Maddon, P. J., Olson, W. C., and Moore, J. P. (2000).
A recombinant human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein complex stabilized by an intermolecular disulfide bond between gp120 and gp41 subunits is an antigenic mimic of the trimeric Virion-associated structure. *Journal of Virology* **74**:627-643.
- Bosch, V. and Pawlita, M. (1990).
Mutational analysis of the human immunodeficiency virus type 1 env gene product proteolytic cleavage site. *Journal of Virology* **64**:2337-2344.

- Bukrinsky M. I., Sharova, N., Dempsey, M. P., Stanwick, T. L., and Bukrinskaya, A. G. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:6580-6584.
- Chen, B., Rousso, I., Shim, S., and Kim, P. S. (2001). Efficient assembly of an HIV-1/MLV gag-chimeric virus in murine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:15239-15244.
- 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.
- Chowers, M.Y., Spina, C. A., Kwoh, T. J., Fitch, N. J., Richman, D. D., and Guatelli, J. C. (1994). Optimal infectivity *in vitro* of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene. *Journal of Virology* **68**:2906-2914.
- Closs, E. I., Lyons, C. R., Kelly, C., and Cunningham, J. M. (1993). Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J. Biol. Chem.* **268**:20796-20800.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E. (1997). Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Cohen, E. A., Dehni, G., Sodroski, J. G., and Haseltine, W. A. (1990). Human immunodeficiency virus vpr product is virion-associated regulatory protein. *Journal of Virology* **64**:3097-3099.
- Connor, R. I., Kuan, Chen K., Choe, S., and Landau, N. (1995). Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type 1 in mononuclear phagocytes. *Virology* **206**:935-944.

- Connor, R. I., Korber, B. T. M., Graham, B. S., Hahn, B. H., Ho, D. D., Walker, B. D., Neumann, A. U. et al. (1998).
Immunological and virological analyses of persons infected by human immunodeficiency virus type 1 while participating in trials of recombinant gp120 subunit vaccines. *Journal of Virology* **72**:1552-1576.
- Conti, L., Varano, B., Gauzzi, M. C., Matarrese, P., Frederico, M., Malori, W., Belardelli, F., and Gessani, S. (2000).
Impairment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry into jurkat T cells by constitutive expression of the HIV-1 vpr protein: role of CD4 down-modulation. *Journal of Virology* **74**:10207-10211.
- Crawford, J. M. et al. (1999).
Characterization of primary isolate-like variants of simian-human immunodeficiency virus. *Journal of Virology* **73**:10199-10207.
- Daniel, M. D., Kirchhoff, F., Czajak, S. C., Sehgal, P. K., and Desrosiers, R. C. (1992).
Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* **258**:1938-1941.
- De Vico, A. L., and Gallo, R. C. (1999).
HIV coreceptors and chemokines as therapeutic targets against HIV/AIDS. *AIDS Reviews* **1**:4-14.
- Deng, C., Bedford, M., Li, C., Xu, X., Yang, X., Dunmore, J., and Leder, P. (1997).
Fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) is essential for normal neural tube and limb development. *Developmental Biology* **185**:42-54.
- Dejardin, J., Bompard-Marechal, G., Audit, M., Hope, T. J., Sitbon, M., and Mougel, M. (2000).
A novel subgenomic murine leukaemia virus RNA transcript results from alternative splicing. *Journal of Virology* **74**:3709-3714.
- Doyle, A. , Morris C. B., and Armitage, W. J. (1988).
Cryopreservation of animal cells. *Advanced Biotechnological Processes* **7**:1-17

Dudda, J. (1998).

Konstruktion eines replikationskompetenten HIV-1/MLV Pseudotypvirus.
Diplomarbeit der Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.

Earl, P., Sugiura, W., Montefiori, D., Broder, C., Lee, S., Wild, C., Lifson, J., and Moss, B. (2001). Immunogenicity and protective efficacy of oligomeric human immunodeficiency virus type 1 gp140.
Journal of Virology, **75**:645-653.

Erlwein, O., and Schnierle, B. (2002).

Chimeric ecotropic MLV envelope proteins that carry EGF receptor specific ligands and the *Pseudomonas* exotoxin A translocation domain to target gene transfer to human cancer cells.
Virology, in press.

Freed, E. O., and Martin, M. A. (1996).

Domains of the human immunodeficiency virus type 1 matrix and gp41 cytoplasmic tail required for envelope incorporation into virions.
Journal of Virology **70**:341-351.

Fouts, T., Godfrey, K., Bobb, K., Montefiori, D., Hanson, C., Kalyanaraman, V., and De Vico, D. (2002).

Crosslinked HIV-1 envelope-CD4 receptor complexes elicit broadly cross-reactive neutralizing antibodies in rhesus macaques.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:11842-11847.

Gallo, S. A., Puri, A., and Blumenthal, R. (2001).

HIV-1 gp41 six-helix-bundle formation occurs rapidly after the engagement of gp120 by CXCR4 in the HIV-1 env-mediated fusion process.
Biochemistry **40**:12231-12236.

Gaschen, B., Taylor, J., Yusim, K., Foley, B., Gao, F., Lang, D., Novitsky, V., Haynes, B., Hahn, B. H., Bhattacharya, T., and Korber, B. (2002).

Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection.
Science **296**:2354-2360.

- Gottlieb, M. S., Schroff, R., Schanker, H. M., Weisman, J. D., Fan, P. T., Worlf, R. A., and Saxon, A. (1981).
Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men. *New England Journal of Medicine* **305**:1425-1431.
- Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Wolf, H., and Wagner, R. (2000).
Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression.
Journal of Virology **74**:10822-10826.
- Green, S., Issemana, I., Sheer, E. (1988)
A versatile *in vivo* and *in vitro* eukaryotic expression vector for protein engineering.
Nucleic Acids Research **16**, Number 1.
- Hammarskjöld, M., Li, H., Rekosh, D., and Prasad, S. (1994).
Human Immunodeficiency Virus env expression becomes rev-independent if the env region is not defined as an Intron.
Journal of Virology **68**:951-958.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A., Barbosa, P., Trocha, A., Johnson, R. P., Elbeik, T., Feinberg, M. B., Buchbinder, S. P., and Walker, B. D. (1996).
Cytotoxic T lymphocytes in asymptomatic long-term nonprogressing HIV-1 infection. Breadth and specificity of the response and relation to *in vivo* viral quasispecies in a person with prolonged infection and low viral load.
Journal of Immunology **156**:2616-2623.
- Ho, I. C. and Glimcher, L. H. (2002).
Transcription: tantalizing times for T cells.
Cell **109**:109-120.
- Höhne, M., Thaler, S., Dudda, J., Groner, B., and Schnierle, B. (1999).
Truncation of the human immunodeficiency virus-type-2 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of murine leukemia virus retroviral vector particles.
Virology **261**:70-78.

Hobbs, S., Jitrapakdee, S., Wallace, J. C. (1998).

Development of a bicistronic vector driven by the human polypeptide chain elongation factor 1 α promoter for creation of stable mammalian cell lines that express very high levels of recombinant proteins.

Biochemical and biophysical research communications **252**:368-372.

Huang Y., Wilmer, K. M., and Carmichael, G. G. (1999).

Intronless mRNA transport elements may affect multiple steps of pre-mRNA processing. *EMBO Journal* **18**:1642-1652.

Jones, K., and Peterlin, B. (1994).

Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter.

Annu. Rev. Biochem. **63**:717-743.

Jones, KA. (1997).

Taking a new TAK on Tat transactivation. *Genes Dev.* **11**:2593-2599.

Karczewski, M. K., and Strebel, K. (1996).

Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *Journal of Virology* **70**:494-507.

Killeen, N., Sawada, S., and Littman, D. R. (1993).

Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO Journal* **12**:1547-1553.

Klatzmann, D., Champagne, E., Chamaret, S., Gruest, J., Guetard, D., Hercend, T.,

Gluckman, J. C., and Montagnier, L. (1984).

T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LVA.

Nature **312**:767-768.

Klestler, H. W. D., Ringler, D. J., Mori, K., Panicali, D. L., Sehgal, P. K., Daniel, M. D., and Desrosiers, R. C. (1991).

Importance of the nef gene for maintenance of high virus loads and for development of AIDS. *Cell* **65**:651-662.

Knight, DM, Flomerfelt, FA, and Ghrayeb, J. (1987).

Expression of the art/trs proteins of HIV and study of its role in viral envelope synthesis. *Science* **236**:837-840.

Kwong, P. D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R. W., Sodroski, J., and Hendrickson, W. A.

(1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature* **393**:648-659.

LaCasse, R. A., Follis, K. E., Trahey, M., Scarborough, J. D., Littman, D. R., and

Nunberg, J. H. (1999).

Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV.

Science **283**:357-362.

Landau, N. R., Warton, M., and Littman, D. R. (1988).

The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin like domain of CD4.

Nature **334**:159-162.

Laspia, M. F., Rice, A. P., and Mathews, M. B. (1989).

HIV-1 tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation.

Cell, **59**: 283-292.

Letvin, N. L. (1998).

Progress in the development of an HIV-1 vaccine.

Science **280**:1875-1880.

Lodish, H., Baltimore, D., Brek, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., and Darnell, J. (1995).

Molecular cell biology, Scientific American Books.

Lorès, P., Boucher, V., Mackay, C., Pla, M., Von Boehmer, H., Jami, J., Barré-Sinoussi, F., and Weill, J. C. (1992).

Expression of human CD4 in transgenic mice does not confer sensitivity to human immunodeficiency virus infection. *AIDS Research Human Retroviruses* **8**:2063-2071.

Luciw, P. A., Cheng-Meyer, C., and Levy, J. A. (1987).

- Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region downregulates virus replication.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**:1434-1438.
- Malim, MH., Cullen, BR. (1993).
Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* **13**:6180-89.
- Malim, MH., Hauber, J., Le, S-Y, Maizel, JV., and Cullen, BR. (1989).
The HIV-1 rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* **338**:254-257.
- Mammano, F., Kondo, E., Sodroski, J., Bukovsky, A., and Göttlinger, H. G. (1995).
Rescue of human immunodeficiency virus type 1 matrix protein mutants by envelope glycoprotein with short cytoplasmic domains.
Journal of Virology **69**:3824-3830.
- Mammano, F., Salvatori, F., Indraccolo, S., De Rossi, A., Chieco-Bianchi, L., and Göttlinger, H. (1997). Truncation of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein allows efficient pseudotyping of moloney murine leukaemia virus particles and gene transfer into CD4⁺ cells.
Journal of Virology **71**:3341-3345.
- Mann, DA, Mikaelian, I, Zimmel, RW, Green, SM, and Lowe, AD (1994).
Cooperative Rev binding to stem I of the Rev-responsive element modulates human immunodeficiency virus type 1 late gene expression. *J. Mol. Biol.* **241**:193-207.
- Marianai, R., Rutter, G., Harris, M. E., Hope, T., Kräusslich, H.-G., and Landau, N. (2000).
A block to human immunodeficiency virus type 1 assembly in murine cells.
Journal of Virology **74**:3859-3870.
- Mascola, J. R., Stiegler, G., VanCott, T. C., Katinger, H., Carpenter, C. B., Hanson, C. E., Beary, H., Hayes, D., Frankel, S. S., Brix, D. L., and Lewis, M. G. (2000).
Protection of macaques against vaginal transmission of a pathogenic HIV-1/SIV chimeric virus by passive infusion of neutralizing antibodies.
Nature Medicine **6**:207-210.

McMichael, and Hanke, T. (2002).

The quest for an AIDS vaccine: is the CD8⁺ T-cell approach feasible?
Nature Reviews Immunology **2**:283-291.

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.
Journal of Cell Biology **151**:413-423.

Miller, Rosman *et al.* (1989).

Improved retroviral vectors for gene transfer and expression.
Biotechniques **1**:980-990.

Miller, M. D., Farnet, C. M., and Bushman, F. D. (1997).

Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of
organization and composition. *Journal of Virology* **71**:5382-5390.

Modrow, S. und Falke, D. (1997).

Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag.

Morgenstern *et al.*, (1990).

Advanced mammalian gene transfer: high titer retroviral vectors with multiple drug
selection markers and a complementary helperfree packaging cell.
Nucleic Acid Research **18**:3587-3596.

Murakami, T. and Freed, E. O. (2000).

The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-
1 envelope glycoprotein incorporation into virions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:343-348.

Nasioulas, G., Zolotukhin, A., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C., Pavlakis, G., and
Felber, B. (1994).

Elements distinct from human immunodeficiency virus type 1 splice sites are
responsible for the rev dependence of env mRNA.
Journal of Virology **68**:2986-2993.

Nelson, J., and Krawetz, S., (1992).

Purification of cloned and genomic DNA by guanidin thiocyanate/isobutyl alcohol fractionation. *Annual. Biochemistry* **207**:197-201.

Nolan G. P., and Shatzman, A. R. (1998).

Expression vectors and delivery systems.
Current Opinion in Biotechnology **9**:447-450.

Ogg, G.S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., Segal, J. P.,

Cao, Y., Rowland-Jones, S. L., Cerundolo, V., Hurley, A., Markowitz, M., Ho, D. D.,
Nixon, D. F., and McMichael, A. J. (1998).

Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic and plasma load of viral RNA.
Science **279**:2103-2106.

Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., and Baltimore, D. (1993).

Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**:8392-8396.

Poignard, P., Klasse, P. J., and Sattentau, Q. J. (1996).

Antibody neutralization of HIV-1. *Immunology Today* **17**:239-246.

Poignard, P., Ollmann Saphire, E., Parren, P., and Burton, D. (2001).

Gp120: biologic aspects of structural features. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:253-274.

Pollard, V., and Malim, M. (1998).

The HIV-1 rev protein. *Annu. Rev. Microbiol.* **52**:491-532.

Popa, I., Harris, M. E., Donello, J. E., and Hope, T. J. (2002).

CRM1-dependent function of a cis-acting RNA export element.
Molecular and Cellular Biology **22**:2057-2067.

Price, J., Turneer, D., and Cepko, C. (1987).

Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:156-160.

Purcell, D., and Martin, M. (1993).

Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity.

Journal of Virology **67**:6365-6378.

Redfield, R. R., Wright, D. C., James, W. D., Jones, T. S., Brown, C., Bruke, D. S. (1997).

Disseminated Vaccinia in a military recruit with human immunodeficiency (HIV) disease.

New England Journal of Medicine **316**:673.

Reed, M., Mariani, R., Sheppard, L., Pekrun, K., Landau, N. R., and Soong, N.-W. (2002).

Chimeric human immunodeficiency virus type 1 containing murine leukaemia virus matrix assembles in murine cells. *Journal of Virology* **76**:436-443.

Reitter, J. N., Means, R. E., and Desrosiers, R. C. (1998).

A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nature Medicine* **4**:679-684.

Richman, D. D., Rowland-Jones, S., Pinheiro, S., and Kaul, R. (2001).

HIV chemotherapy. *Nature* **410**:995-1001.

Rizzuto, C. D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P. D., Hendrickson, W. A.,
And Sodroski, J. (1998).

A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science* **280**:1949-1953.

Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G., and Brown P. O. (1993).

Integration of murine leukaemia virus DNA depends on mitosis.

EMBO Journal **12**:2099-2108.

Rossio, L. J., Esser, M. T., Suryanarayana, K., Schneider, D. K., Bess, J. W., Vasquez, G.

M., Wiltout, T. A., Chertova, E., Grimes, M. K., Sattentau, Q., Arthur, L. O.,
Henderson, L. E., and Lifson, J. D. (1998).

Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of Virion surface proteins.

Journal of Virology **72**:7992-8001.

Rouso, I., Mixon, M. B., Chen, B. K., and Kim, P. S. (2000).

Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:13523-13525.

Sanders, R. W., Vesanen, M. S., Schülke, N., Master, A., Schiffner, L., Kalyanaraman, R., Paluch, M., Berkhout, B., Maddon, P. J., Olson, W. C., Lu, M., and Moore, J. P. (2002). Stabilization of the soluble, cleaved, trimeric form of the envelope glycoprotein complex of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **76**:8875-8889.

Sattenau, Q. J., and Moore, J. P. (1995).

Human immunodeficiency virus type 1 neutralisation is determined by epitope exposure on the gp120 oligomer. *J. Exp. Med.* **182** (1):185-196.

Schnierle, B. S., Stitz, J., Bosch, V., Nocken, F., Merget-Millitzer, H., Engelstadter, M., Kurth, R., Groner, B., and Cichutek, K. (1997).

Pseudotyping of murine leukemia virus with the envelope glycoproteins of HIV generates a retroviral vector with specificity of infection for CD4-expressing cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:8640-8645.

Schwartz, S., Felber, B. K., Benko, D. M., Fenyo, E.-M., Pavlakis, G.-N. (1990).

Cloning and functional analysis of multiply spliced mRNA species of human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Virology* **64**:2519-2529.

Seagal, J., Spectorman, E., Gershoni, J. M., and Denisova, G. F. (2001).

Use of human CD4 transgenic mice for studying immunogenicity of HIV-1 envelope protein gp120. *Transgenic Research* **10**:113-120.

Seguin, B., Staffa, A., and Cochrane, A. (1998).

Control of human immunodeficiency virus type 1 RNA metabolism: role of splice sites and intron sequences in unspliced viral RNA subcellular distribution.
Journal of Virology **72**:9503-9513.

Schülke, N., Vesanen, M. S., Sanders, R. W., Zhu, P., Lu, M., Anselma, D. J., Villa, A. R., Parren, P., Binley, J. M., Roux, K. H., Maddon, P. J., Moore, J. P., and Olson, W. C. (2002). Oligomeric and conformational properties of a proteolytically mature, disulfid-stabilized human immunodeficiency virus type 1 gp140 envelope protein.
Journal of Virology **76**:7760-7776.

Sova, P., and Volsky, D. J. (1993).

Efficiency of viral DNA synthesis during infection of permissive and nonpermissive cells with vif-negative human immunodeficiency virus type 1.

Journal of Virology **67**:6322-6326.

Sparacio, S., Zeilfelder, U., Pfeiffer, T., Henzler, T., and Bosch, V. (2000).

Membrane fusion between retroviral particles: hostrange extension and vaccine prospects. *Virology* **271**:248-252.

Starlich, B. R., Hahn, B. H., Shaw, G. M., McNeely, P. D., Modrow, S., Wolf, H., Parks, E. S., Parks, W. P., Josephs, S. F., and Gallo, R. C. (1986).

Identification and characterisation of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* **45**:637-648.

Stewart, S. A., Poon, B., Jowett, J. B., and Chen, I. S. (1997).

Human immunodeficiency virus type 1 vpr induces apoptosis following cell-cycle arrest. *Journal of Virology* **71**:5579-5592.

Stott, E. J. (1991).

Anti-cell antibody in macaques. *Nature* **353**:393.

Strebel, K., Daugherty, D., Clouse, K., Cohen, D., Folks, T., and Martin, M. A. (1987).

The HIV "A" (sor) gene product is essential for virus infectivity.

Nature **328**, 728-730.

Subbramanian, R. A., Dessous-Elbaz, A., Lodge, R., Forget, J., Yao, X. J., *et al.*, (1998).

Human immunodeficiency virus type 1 Vpr is a positive regulator of viral transcription and infectivity in primary human macrophages.

Journal of Experimental Medicine **187**: 1103-1111.

Thaler, S., and Schnierle, B. (2001).

A packaging cell line generating CD4-specific retroviral vectors for efficient gene transfer into primary human T-helper lymphocytes.

Molecular Therapy **4**:273-279.

Thaler, S. (2002).

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

Dissertation Universität Frankfurt, Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften.

Wang, J., Meijers, R., Xiong, Y., Liu, J., Sakihama, T., Zhang, R., Joachimiak, A., and Reinherz, E. (2001).

Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MHC molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:10799-10804.

Wang, L., Mukherjee, S., Jia, F., Narayana, O., and Zhao, L.J. (1995).

Interaction of virion protein Vpr of human immunodeficiency virus type 1 with cellular transcription factor Sp1 and Trans-activation of viral long terminal repeat.

J. Bio. Chem. **270**:25564-25569.

Whatmore, A. M. , Cook, N., Hall, G. A., Sharpe, S., Rud, E. W., and Cranage, M. P. (1995).

Repair and evolution of nef in vivo modulates simian immunodeficiency virus virulence. *Journal of Virology* **69**:5117- 5123.

Wilk , T., Pfeiffer, T., and Bosch, V. (1992).

Retained in vitro infectivity and cytopathogenicity of HIV-1 despite truncation of the c-terminal tail of the env gene product.

Virology **189**:167-177.

Wilk et al., (1996).

Glycoprotein incorporation and HIV-1 infectivity despite exchange of the gp160 membrane-spanning domain.

Virology **218**:269-274.

Willey, R. L., Maldarelli, F., Martin, M. A., and Strebel, K. (1992).

Human immunodeficiency virus type 1 vpu protein induces rapid degradation of CD4.

Journal of Virology **66**:7193-7200.

Wong-Staal, F. (1990).

Human immunodeficiency viruses and their replication.

In *Fields virology*, B. N., and Knipe, D. M. , Raven Press, New York, NY.

- Wyatt, R., Moore, J.P., Accola, M., Desjardin, E., Robinson, J., and Sodroski, J. (1995).
Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding.
Journal of Virology **69**:5723-5733.
- Wyatt, R., Desjardin, E., Olshevsky, U., Nixon, C., Binley, J., Olshevsky, V., and Sodroski, J. (1997).
Analysis of the interaction of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein with the gp41 transmembrane glycoprotein.
Journal of Virology **71**:9722-9731.
- Wyatt, R., and Sodroski, J. (1998).
The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens.
Science **280**:1884-1888.
- Wyatt, R., Kwong, P. D., Desjardins, E., Sweet, R. W., Robinson, J., Hendrickson, W. A., and Sodroski, J. D. (1998).
The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein.
Nature **393**:705-711.
- Yang, X., Farzan, M., Wyatt, R., and Sodroski, J. (2000).
Characterization of stable, soluble trimers containing complete ectodomains of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins.
Journal of Virology **74**:5716-5725.
- Zufferey, R., Donello, J., Trono, D., and Hope, T. (1999).
Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors.
Journal of Virology, **73**:2886-2892.

Posterpräsentationen

Jahrestagung 2000 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Wien;

Pseudotype formation of HIV envelope glycoprotein variants with murine leukaemia virus (MLV) capsids.

Reidel, U., Dudda, J., and Schnierle, B.

Jahrestagung 2001 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Dresden;

Production of a replication competent MLV/HIV-1 pseudotype virus.

Reidel, U., and Schnierle, B.

Jahrestagung 2001 der Deutschen Gesellschaft für Virologie, Erlangen;

Production of a replication competent MLV/HIV-1 pseudotype virus.

Reidel, U., and Schnierle, B.

Veröffentlichungen

Nack, U., and Schnierle, B. (2003).

Replacement of the murine leukemia virus (MLV) envelope gene by a truncated HIV envelope gene in MLV generates a virus with impaired replication capacity.

Zur Veröffentlichung eingereicht.

Eidesstattliche Erklärung

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

Frankfurt am Main, _____

Ursula Nack

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Ursula Nack, geb. Reidel
Geburtsdatum: 25.09.1972
Geburtsort: Schäßburg/Rumänien
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1979 – 1983 Josef-Heckler-Schule, Grundschule in Bensheim
1983 – 1992 Liebfrauenschule, Gymnasium in Bensheim

Hochschulstudium

1992 – 1999 Studium der Biologie
an der Technischen Universität Darmstadt
1998/1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie bei
Herrn Prof. Dr. Friedl
1999 Abschluss: Diplom-Ingenieurin (Biologie)
seit 1999 Doktorarbeit im Georg-Speyer-Haus bei
Frau PD. Dr. Schnierle, Frankfurt am Main

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in Frankfurt am Main, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Groner durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Schnierle für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Vergabe des interessanten Themas sowie die praktischen Ratschläge und fachliche Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Starzinsky-Powitz danke ich für das dieser Arbeit entgegengebrachte Interesse und für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Darüber hinaus danke ich den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für die stets gewährte Hilfsbereitschaft, ihre Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima während der Anfertigung dieser Arbeit.