

**Optimierung des CD4-spezifischen
Gentransfers in primäre humane T-Zellen
mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Hinblick
auf die Gentherapie des
Immunschwächesyndroms AIDS**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

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

von
Isabel Schmitt
aus Wertheim am Main

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

Dekan:	Prof. Dr. Walter E. Müller
1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Hugo Fasold
2. Gutachter:	Prof. Dr. Klaus Cichutek
Datum der Disputation:	27. Mai 2002

1. EINLEITUNG	1
1.1 Das Humane Immundefizienzvirus	1
1.1.1 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion	1
1.1.2 Der Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus	2
1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1	3
1.1.4 Die Rezeptoren des Humanen Immundefizienzvirus	5
1.1.5 Das Expressionsmuster der HIV-1 Korezeptoren auf hämatopoetischen Zellen	6
1.2 Mögliche Strategien zur Gentherapie der HIV-Infektion	7
1.2.1 Einkettige Antikörperfragmente (scFv) gegen HIV-1 Proteine	8
1.2.2 Ribozyme	9
1.2.3 Interleukin 16	10
1.3 Retrovirale Vektoren für den Gentransfer in hämatopoetische Zellen	11
1.3.1 Aufbau retroviraler Vektorsysteme	12
1.3.2 Retrovirale Pseudotypvektoren	14
1.4 Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Molekularbiologische Methoden	17
2.1.1 Plasmide und Vektoren	17
2.1.1.1 HIV-1 Inhibitorplasmide	17
2.1.1.2 Konstrukte zur Expression der HIV-1 Hüllproteine	17
2.1.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	18
2.1.3 Nukleotidsequenzbestimmung	18
2.1.4 Oligonukleotide	18
2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten	20
2.1.6 Restriktion und Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	20
2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese	20
2.1.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	21
2.1.9 Ligation	21
2.1.10 Herstellung kompetenter Bakterien	21
2.1.11 Transformation	22
2.1.12 Plasmidpräparation	22
2.2 Zellbiologische Methoden	23
2.2.1 Zelllinien und Medien	23
2.2.1.1 Verwendete Suspensionszelllinien	23
2.2.1.2 Verwendete adhärenz Zelllinien	24
2.2.2 Verpackungszelllinien	25
2.2.3 Lagerung von Zellen	25
2.2.3.1 Einfrieren von Zellen	26
2.2.3.2 Auftauen von Zellen	26
2.2.4 Präparation primärer mononukleärer Blutzellen (PBMC)	26

2.2.5	Kultivierung und Stimulation primärer Lymphozyten	27
2.2.6	Transfektion mittels Lipofektamin	27
2.2.7	Ernte von Pseudotypvektoren	28
2.2.8	Transduktion von Zelllinien	28
2.2.9	Vektortitration	29
2.2.10	Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten	29
2.2.11	Transduktion primärer Lymphozyten	30
2.2.12	Herstellung hochtitriger HIV-1 Stocks	30
2.2.13	Titration von HIV-1 Stocks	31
2.2.14	HIV-1 Infektionskinetiken	31
2.2.15	Analytische Durchflusszytometrie	32
2.2.16	Zellsortierung	33
2.2.16.1	Magnetische Zellsortierung (MACS)	33
2.2.16.2	Durchflusszytometrische Zellsortierung (FACS)	34
2.2.17	p24-ELISA	34
2.2.18	<i>In situ</i> Immunperoxidase-Test	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Gentransfer in humane primäre T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren	36
3.1.1	CCR5- und CXCR4-trope HIV-1 Hüllproteine auf [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren	36
3.1.2	Generierung stabiler Verpackungszellen für [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren	38
3.1.3	Die Korezeptorspezifität der [MLV(HIV-1)]-Vektoren	42
3.1.4	Konzentrierung der Pseudotypvektoren zur Generierung höherer Vektortiter	43
3.1.5	Gentransfer in primäre humane CD4-positive PBL mittels [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren	45
3.1.5.1	CD4- und Korezeptor-Expression auf primären T-Lymphozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen	45
3.1.5.2	CD4-Spezifität der Vektoren bei der Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten (PBL)	49
3.1.5.3	Analyse der Korezeptorspezifität von [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren bei der Transduktion primärer Lymphozyten	50
3.1.6	Vergleich der Transduktionseffizienzen von [MLV(HIV-1 _{CXCR4})]-, [MLV(HIV-1 _{CCR5})]- und [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren für humane CD4-positive PBL	53
3.1.7	Optimierung des Gentransfers in primäre humane PBL	56
3.1.7.1	Steigerung der Transduktionsrate durch mehrmalige Transduktion der PBL	56
3.1.7.2	Steigerung der Transduktionsrate durch die Verwendung autologen Plasmas	57
3.1.7.3	Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der Vektormenge	59

3.2	Vergleich verschiedener inhibitorischer Gene für die Genterapie der HIV-1 Infektion	61
3.2.1	Gentransfervektoren zur Inhibition der HIV-1 Replikation	62
3.2.2	Generierung von [MLV(GaLV)]-Vektoren zum Gentransfer der HIV-1 inhibitorischen Gene in T-Zelllinien	63
3.2.3	Herstellung von Inhibitor-exprimierenden T-Zelllinien	65
3.2.4	Vergleich der Inhibitor- und Δ LNFR-Expressionsstärke	65
3.2.5	HIV-1 Infektion der Inhibitor-exprimierenden SupT1-Kulturen	66
3.2.6	Sortierung hochexprimierender SupT1-Inhibitor-kulturen	69
3.2.7	HIV-1 Infektion der sortierten, hochexprimierenden SupT1-Inhibitor-kulturen	71
3.2.8	Mikroskopische Untersuchung der infizierten Zellen	73
4.	DISKUSSION	75
4.1	Gentransfer in humane primäre T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren	75
4.1.1	Entwicklung neuer [MLV(HIV-1 _{CCR5})]- und [MLV(GaLV)]-Verpackungszellen	76
4.1.2	Steigerung des Vektortiters durch Ultrazentrifugation	77
4.1.3	Korezeptor-Tropismus der [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Vergleich zu [MLV(GaLV)]-Vektoren	78
4.1.4	Gentransfer in primäre humane CD4-positive PBL mittels [MLV(HIV-1)] und [MLV(GaLV)]-Vektoren	80
4.1.4.1	Rezeptorexpression auf PBL unter Stimulation	80
4.1.4.2	CD4- und Korezeptorspezifischer Gentransfer in PBL	81
4.1.5	Optimierung der Transduktionsbedingungen zum Gentransfer in humane primäre CD4-positive Lymphozyten mittels [MLV(HIV-1 _{CXCR4})]-Vektoren	84
4.2	Vergleich der Wirkung verschiedener inhibitorischer Gene für die Genterapie der HIV-Infektion	87
5.	ZUSAMMENFASSUNG	93
6.	LITERATURVERZEICHNIS	95
7.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	115
8.	DANKSAGUNG	118
9.	LEBENS LAUF	120

EINLEITUNG

1.1 DAS HUMANE IMMUNDEFIZIENZVIRUS

1.1.1 Klinischer Verlauf der HIV-Infektion

Das humane Immundefizienzvirus (HIV) wurde 1983 als Auslöser der erworbenen Immunschwäche AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrom) entdeckt (Barre-Sinoussi *et al.*, 1983). Die Infektion durch HIV erfolgt über die Blutbahn oder durch sexuellen Kontakt. Auf eine initial hohe Virämie mit grippeähnlichen Symptomen folgt eine Latenzzeit, in der durch eine starke spezifische humorale und zelluläre Immunantwort die Viruslast erniedrigt ist. In dieser Zeit nimmt die Zahl der CD4-positiven Lymphozyten stetig ab. Das Ende der im Schnitt 8-10 jährigen Latenzzeit ist charakterisiert durch einen Abfall der CD4-Zellzahl unter 500 Zellen / ml und einem drastischen Anstieg der Viruslast (Abb. 1.1). Es tritt eine ausgeprägte Immundefizienz auf, die einhergeht mit opportunistischen Infektionen, neurologischen Komplikationen und Neoplasien (Tindall und Cooper, 1991, Fauci und Lane, 1991).

Obwohl in den letzten Jahren durch den kombinierten Einsatz von Reverse Transkriptase- und Protease-Inhibitoren im Rahmen von HAART (Highly Active Anti Retroviral Therapy) Fortschritte in der AIDS-Therapie erzielt wurden, ist eine Heilung bis heute nicht möglich.

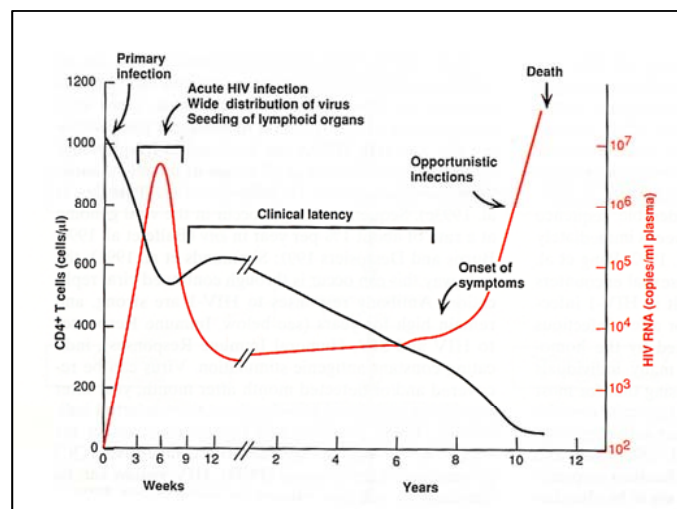


Abb. 1.1 Typischer Verlauf der HIV-1 Infektion in Bezug auf die klinischen Parameter Viruslast und CD4-Zellzahl. Der Verlauf kann im einzelnen von Patient zu Patient je nach momentaner Viruslast von diesem Schema abweichen. Aus: Retroviruses, John Coffin, 1997

1.1.2 Der Aufbau des Humanen Immundefizienzvirus

HIV zählt zur Gruppe der Lentiviren aus der Familie der Retroviren. Das Virus enthält zwei Kopien des RNA-Genoms, auf dem alle viralen Proteine kodiert sind. Nach der reversen Transkription integriert die provirale DNA ins Genom der Wirtszelle (Abb. 1.2).

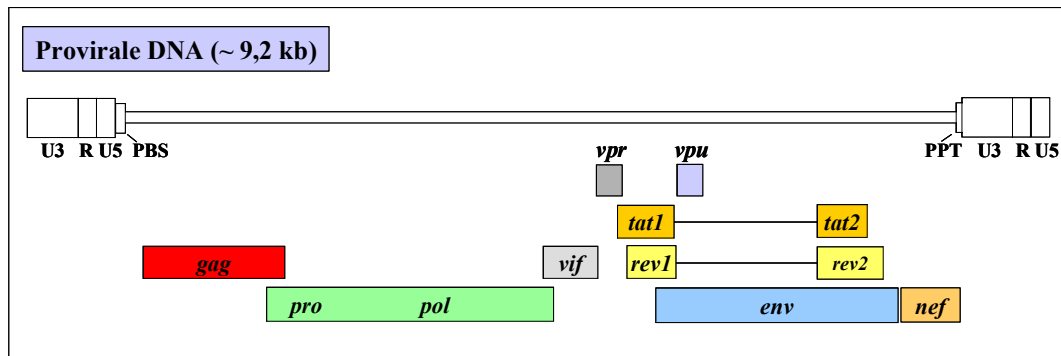


Abb. 1.2: Genomische Struktur des integrierten HIV-1 Provirus. Am 5'- und 3'-Ende des Provirus werden die offenen Leserahmen durch die LTR (Long Terminal Repeat)-Sequenzen eingegrenzt. Diese bestehen aus der U3-, R- und U5-Region, wobei die U3-Region spezifisch für das 3'-Ende der viralen RNA ist, U5 für das 5'-Ende. Die Sequenz R befindet sich an beiden Enden der viralen RNA. Die provirale DNA kodiert die offenen Leserahmen für die internen Strukturproteine (*gag*), die viralen Enzyme (*pro* und *pol*), das Hüllprotein (*env*), die regulatorischen Proteine (*tat*, *rev* und *nef*) und die akzessorischen Proteine (*vif*, *vpr* und *vpu*).

Die viralen Enzyme und Strukturproteine werden als Polyproteine synthetisiert und durch die virale Protease, selbst Teil des Pro-Pol-Polyproteins, in die einzelnen Proteine gespalten. Das Gag-Polyprotein wird erst bei der Partikelreifung in die virusinternen Strukturproteine Matrix (MA), Capsid (CA), Nucleocapsid (NC) und p7 gespalten. Aus dem Pro-Pol-Polyprotein werden die viralen Enzyme Protease (PR), Reverse Transkriptase (RT) und Integrase (IN) abgespalten. Das HIV-1 Hüllprotein (Env) besteht aus einem Oberflächen- (SU, gp120) und einem Transmembran- (TM, gp41) Glykoprotein. Im Gegensatz zu den Polyproteinen Gag und Pro-Pol wird das Env-Polyprotein im Golgi durch zelluläre Proteasen in das SU- und TM-Protein gespalten.

Zusätzlich zu den Proteinen der einfachen Retroviren kodiert das HIV-1 Genom weitere Proteine, die die Infektion und Replikation regulieren. Zu den regulatorischen Proteinen zählen Tat und Rev. Das Tat-Protein (transkriptioneller Transaktivator) ist ein potenter Aktivator der HIV-1 Genexpression. Rev reguliert

den Transport ungespleißter und einfach gespleißter RNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, wo die Strukturproteine und Enzyme des Virus exprimiert und die genomische RNA verpackt werden. Anhand der Rev-Aktivität kann der HIV-Replikationszyklus in eine frühe, regulatorische und eine späte, produktive Phase unterteilt werden.

Die akzessorischen, für die Replikation in Zelllinien nicht notwendigen Proteine Vif (Viral Infectivity Factor), Vpu (Viral Protein U), Vpr (Viral Protein) und Nef (Negative Factor) beeinflussen sowohl virale als auch zelluläre Prozesse und sind somit ebenfalls an der Regulation in unterschiedlichen Stadien des Replikationszyklus beteiligt (Nye und Parkin, 1995).

1.1.3 Der Replikationszyklus von HIV-1

HIV bindet über CD4 und einen Korezeptor an die Zielzelle. Makrophagentrope Viren nutzen neben CD4 den Chemokinrezeptor CCR5 zum Zelleintritt, T-Zelltrope Viren nutzen den Chemokinrezeptor CXCR4. Weiterhin sind die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR8, V28, Bob oder Bonzo als Korezeptor für bestimmte HIV-Isolate bekannt (Berger *et al.*, 1999, Murakami *et al.*, 2000). Nach Anbindung des Virus an die Zielzelle erfolgt eine Konformationsänderung im HIV-1 Hüllprotein, wodurch die Zellfusion erfolgt.

Im Zytoplasma wird aus dem Kapsid der Präintegrationskomplex, bestehend aus dem RNA-Genom, Reverser Transkriptase, Integrase, Matrix-Protein und Vpr, freigesetzt. Innerhalb dieses Komplexes erfolgt die reverse Transkription und die Bildung der doppelsträngigen Provirus-DNA. Der Präintegrationskomplex wandert in den Zellkern, wo die Integrase die Ligation der Provirus-DNA in die genomische DNA der Zelle katalysiert. Je nach Aktivierungs- und Zellzyklussituation der Zelle erfolgt die Expression der viralen Gene. In der frühen Phase werden vor allem die regulatorischen Proteine Tat und Rev gebildet. Liegen ausreichende Mengen dieser regulatorischen Proteine vor, werden durch Rev ungespleißte und einfach gespleißte mRNAs und die genomische RNA ins Zytoplasma transportiert, wo nun die Translation der Strukturproteine sowie der viralen Enzyme erfolgt. Durch eine N-terminale Signalsequenz gelangt das entstehende Env-Protein in das endoplasmatische Retikulum, wo es an spezifischen Aminosäuren glykosyliert wird, die Oligomerisierung der Env-

Proteine stattfindet und diese anschließend über den Golgi-Apparat an die Zellmembran gelangen. Gag- und Gag-Pro-Pol-Polyproteine werden von der ungespleißten mRNA im Zytoplasma translatiert und lagern sich auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an. Über Interaktion des Gag-Polyproteins mit dem Verpackungssignal des Virusgenoms wird die genomische RNA in den sich abschnürenden Viruspartikel inkorporiert (Abb. 1.3). Innerhalb dieses unreifen Viruspartikels erfolgt nach der Abschnürung die weitere Reifung zum infektiösen Viruspartikel, indem die Gag-, Gag-Pro-Pol- und Env-Polyproteine durch die virale Protease in die einzelnen Proteine gespalten werden.

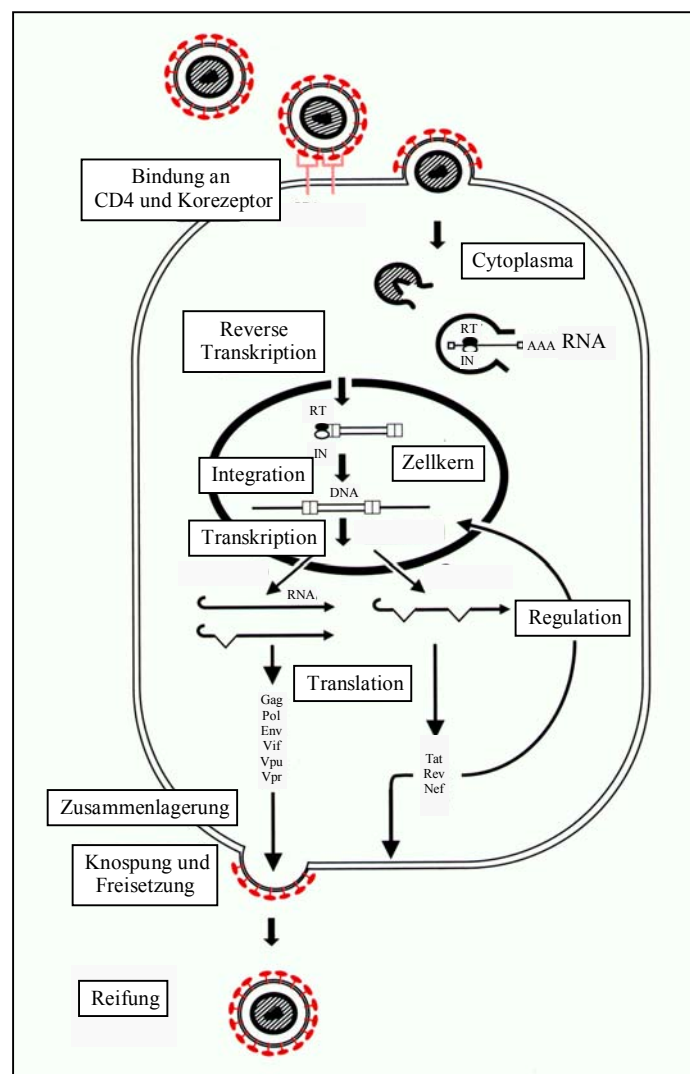


Abb. 1.3: Replikationszyklus von HIV. (modifiziert nach Modrow und Falke, 1997).

1.1.4 Die Rezeptoren des Humanen Immundefizienzvirus

Der primäre Rezeptor für HIV-1 ist das CD4-Molekül (Sweet *et al.*, 1991). CD4 ist ein Oberflächenmarker auf T-Helferzellen und fungiert bei der Antigenerkennung als Korezeptor des T-Zellrezeptors (Janeway, 1992). Daneben wird CD4 in geringerer Dichte auf Monozyten und Makrophagen sowie auf anderen phagozytären Zellen exprimiert. CD4 dient auf diesen Zellen als Korezeptor für MHC-Klasse II Moleküle und besteht in der extrazellulären Domäne aus vier Immunglobulindomänen. Das HIV-1 Oberflächenhüllprotein gp120 bindet an die äusserste Immunglobulindomäne (D1). Die Bindung von gp120 an CD4 alleine reicht jedoch nicht aus, um eine Fusion mit der Zielzelle auszulösen. Die Beobachtung, dass einige, vor allem in frühen Phasen der Infektion gewonnene HIV-1 Isolate neben stimulierten PBMC auch ausdifferenzierte Makrophagen infizieren können, während andere aus späteren Stadien isolierte Viren dagegen befähigt waren, in T-Zelllinien aber nicht in Makrophagen zu replizieren, führte 1996 zur Entdeckung der Korezeptoren von HIV-1 (Deng *et al.*, 1996, Doms *et al.*, 1997, Bieniasz *et al.*, 1998). Als Korezeptor für T-Zelltrope (T-trope) Stämme wurde ein 7-Transmembranprotein identifiziert, das zunächst als Fusin bezeichnet wurde (Feng *et al.*, 1996). Aufgrund seiner Funktion als Chemokinrezeptor wurde es später in CXCR4 umbenannt. Als Korezeptor für makrophagen-trope (M-trope) HIV-1 Isolate wurde der Chemokinrezeptor CCR5 identifiziert (Alkhatib *et al.*, 1996, Deng *et al.*, 1996, Doranz *et al.*, 1996, Dragic *et al.*, 1996). CCR5 dient als Rezeptor für die β -Chemokine Rantes, MIP-1 α und MIP-1 β . 1995 wurden diese als von CD8-positiven T-Zellen sekretierte, HIV-1 inhibitorische Faktoren beschrieben (Cocchi *et al.*, 1995). Menschen, die aufgrund einer homozygoten 32bp Deletion im CCR5-Gen keinen funktionellen Rezeptor bilden, sind durch M-trope HIV-Stämme nicht infizierbar. Die primäre Infektion mit HIV-1 erfolgt in nahezu 100 % der Fälle durch M-trope Viren. Das Auftreten T-troper HIV-Isolate bei etwa 50 % der HIV-Infizierten ist oftmals mit dem Voranschreiten der Krankheit hin zu manifestiertem AIDS assoziiert. Im Vergleich zu makrophagentropen zeigen T-trope Viren eine stärkere Tendenz, Zell-Zell-Fusion und damit die Bildung sogenannter Riesenzellen (Synzytien) zu induzieren. Sie werden daher teilweise

auch als SI (syncytia-inducing) Stämme bezeichnet, während M-trope Stämme als NSI (non-syncytia-inducing) bezeichnet werden.

1.1.5 Das Expressionsmuster der HIV-1 Korezeptoren auf hämatopoetischen Zellen

Die CXCR4- und CCR5-Expression in den unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen wurde von verschiedenen Gruppen untersucht. Während CXCR4 auf allen ausser den erythroiden Zellen exprimiert wird, zeigen nur Monozyten / Makrophagen, Dendritische Zellen und T-Zellen eine nennenswerte CCR5-Expression. Betrachtet man CD4-positive T-Lymphozyten im periphären Blut, so wird CCR5 präferentiell auf CD45RO-positiven Memory-Zellen exprimiert, die hauptsächlich in peripheren Geweben zu finden sind. CD45RA-positive naive, unstimulierte T-Zellen dagegen exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR4. Diese Zellen stellen hauptsächlich das „lymphnode homing subset“ dar. CCR5 wird nicht auf naiven T-Zellen exprimiert, CXCR4 wird auf Memory-Zellen in signifikant niedrigerer Dichte exprimiert als CCR5 (Lee *et al.*, 1999).

Bei Stimulation der T-Zellen werden die Chemokinrezeptoren unterschiedlich reguliert. Die CXCR4-Expression wird durch PHA und IL-2 in 3-6 Tagen hochreguliert und fällt dann wieder leicht ab. CCR5 zeigt einen langsamen aber konstanten Anstieg der Expression bei Kultivierung der Zellen in IL-2 Medium (Bleul *et al.*, 1997). Die Expression der beiden Rezeptoren ist dabei größtenteils reziprok, so dass vermutlich eine unterschiedliche Suszeptibilität einzelner T-Zell-Subsets für M- und T-trope Viren besteht (Bleul *et al.*, 1997, Unutmaz *et al.*, 1997).

1.2 MÖGLICHE STRATEGIEN ZUR GENTHERAPIE DER HIV-INFESTION

Ansätze zur intrazellulären Immunisierung gegen HIV sind an allen wesentlichen Schritten im Replikationszyklus des Virus vom Zelleintritt bis zur Freisetzung neuer Viruspartikel denkbar. Gene für inhibitorische Proteine oder inhibitorisch wirkende RNA-Moleküle werden hierbei in die Zellen eingebracht. Erfolgt der Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen (HSC), so tragen alle aus diesen pluripotenten Zellen hervorgehenden, differenzierten Zellen das Transgen. Ein weiterer Ansatz ist der Gentransfer in primäre CD4-positive T-Zellen, die dem Patienten zuvor entnommen und nach Einbringen des Transgens reinfundiert werden. Im Folgenden werden einige inhibitorische Moleküle näher beschrieben.

Auf der Zelloberfläche exprimierte bzw. sezernierte Proteine wie z. B. das T20-Peptid (Kilby *et al.*, 1998) inhibieren die Fusion des Virus mit der Zellmembran und greifen somit in einem sehr frühen Stadium der Zellinfektion ein. Intrazellulär exprimierte Antikörperfragmente beeinträchtigen nach Anbindung an virale Proteine deren Funktion. Sie wurden gegen verschiedene virale Proteine entwickelt (Duan *et al.*, 1994, Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996, Ho *et al.*, 1998, Marasco *et al.*, 1999). Interessant sind hierbei jedoch vor allem die Antikörperfragmente, die vor der Integration des Provirus in das Wirtszellgenom eingreifen, wie zum Beispiel gegen Integrase und Reverse Transkriptase gerichtete Antikörperfragmente. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle, die sequenzspezifisch RNA spalten. Ein weiterer auf RNA basierender Ansatz ist die Expression von RNA-Decoys, die RNA-Erkennungssequenzen für virale Proteine darstellen und diese durch sequenzspezifische Bindung abfangen. Die intrazelluläre Expression transdominant negativer regulatorischer Proteine, wie zum Beispiel von RevM10 (Bevec *et al.*, 1992, Plavec *et al.*, 1997, Bohyhadi *et al.*, 1997) führten bei Dimerisierung mit den entsprechenden viralen Proteinen zu deren Inaktivierung. Für andere Proteine wie das Interleukin 16 wird ein inhibierender Einfluss auf die virale Transkription beschrieben.

Einige gentherapeutische Ansätze zur Heilung von AIDS, X1- und ADA-SCID befinden sich bereits in klinischen Prüfungen (Culver *et al.*, 1991, Blaese *et al.*,

1995b, Bordignon *et al.*, 1995, Onodera *et al.*, 1998, Wong-Staal *et al.*, 1998, Amado *et al.*, 1999, Bauer *et al.*, 2000, Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000).

1.2.1 Einkettige Antikörperfragmente (scFv) gegen HIV-1 Proteine

Einkettige Antikörperfragmente (single chain Fragments of variable domains, scFv bzw. Intrabodies) bestehen aus der variablen Region der leichten und der schweren Kette eines Antikörpers, wobei beide Domänen mit einem flexiblen Peptidlinker kovalent verbunden sind (Biocca *et al.*, 1990). ScFv stellen das kleinstmögliche Antikörperfragment dar, das die Spezifität und Affinität des parentalen Antikörpers aufweist. Diese scFv können intrazellulär exprimiert werden und in verschiedenen Zellkompartimenten das von ihnen erkannte Protein hochspezifisch binden und dadurch inaktivieren. Einkettige Antikörperfragmente wurden gegen fast alle regulatorischen, katalytischen und strukturellen Proteine des humanen Immundefizienzvirus entwickelt (Marasco *et al.*, 1993, Duan *et al.*, 1994, Mhashilkar *et al.*, 1995, Shaheen *et al.*, 1996, Levy-Mintz *et al.*, 1996, Tewari *et al.*, 1998, Winkler *et al.*, 2000, Bouhamdan *et al.*, 2000). Die inhibitorische Wirkung greift dabei je nach erkanntem Protein an unterschiedlichen Stellen des HIV-Replikationszyklus ein.

Die Arbeitsgruppe von Roger Pomerantz (Thomas Jefferson University, Philadelphia, USA) entwickelte einkettige Antikörperfragmente gegen die HIV-1 Proteine Rev (Duan *et al.*, 1994), Integrase (Levy-Mintz *et al.*, 1996) und Reverse Transkriptase (Shaheen *et al.*, 1996). Hierbei greifen die scFv gegen Integrase und Reverse Transkriptase (RT) vor der Integration des Provirus ins Genom der Zielzelle in den HIV-1 Replikationszyklus ein und stellen dadurch einen sehr interessanten Ansatz zur Immunisierung CD4-positiver T-Zellen im Rahmen einer HIV-Gentherapie dar. Das anti-RT-scFv neutralisiert spezifisch die RT-Aktivität im Präintegrationskomplex und beeinträchtigt dadurch den Prozess der reversen Transkription und somit die Bildung proviraler DNA. In einer T-Zelllinie wurde die HIV-1 Replikation bis zu 22 Tage nach der Infektion um 80 % bis 97 % inhibiert (Shaheen *et al.*, 1996). Das anti-Integrase-scFv ist gegen die C-terminale Domäne der HIV-1 Integrase gerichtet, die an der Dimerisierung und unspezifischen DNA-Bindung beteiligt ist. Die intrazelluläre Expression dieses

scFv inhibierte die HIV-1 Replikation in T-Zelllinien und primären T-Zellen bis zu 24 Tage nach Infektion um 95 -98 % (Levy-Mintz *et al.*, 1996).

1.2.2 Ribozyme

Ribozyme sind kleine RNA-Moleküle mit katalytischer Aktivität. Sie binden über komplementäre Basenpaarung an die Ziel-RNA und spalten diese sequenzspezifisch, in der Regel an einem GUC oder AUC-Triplett. Ribozyme wurden als katalytische Komponenten von Protein/RNA-Komplexen wie der RNase P (Altman *et al.*, 1983), als katalytisch aktive RNA-Bestandteile verschiedener Viren (Wu *et al.*, 1989) und in RNA-Transkripten mitochondrialer DNA verschiedener Spezies gefunden (Saville und Collins, 1991).

Hammerhead-Ribozyme verdanken ihren Namen der charakteristischen Sekundärstruktur. Mit 50 Nukleotiden stellen sie die bisher kleinste bekannte Ribozymverbindung dar. Die Spaltreaktion ist eine Phosphodiester-Umesterung, die die Anwesenheit zweiwertiger Metallkationen benötigt. Hairpin-Ribozyme sind ebenfalls nach ihrer Sekundärstruktur benannt. Die Spaltreaktion dieser Ribozyme ist reversibel, wobei das Gleichgewicht zwischen Spaltung und Ligation von der Salzkonzentration abhängt, die die Stabilität der Ribozym- Sekundärstruktur beeinflusst. Die intrazellulären ionischen Bedingungen begünstigen die Spaltreaktion.

Ribozyme wurden gegen verschiedene Sequenzen des HIV-1 Genoms entwickelt. Wichtige Faktoren sind eine hohe Homologie der Zielsequenz zwischen verschiedenen HIV-1 Isolaten und eine für das Ribozym zugängliche Sekundär- bzw. Tertiärstruktur des entsprechenden RNA-Bereiches. Einige der bisher entwickelten anti-HIV-Ribozyme inhibierten die HIV-1 Replikation nach retroviralem Gentransfer in CD4-positive Zellen um 1-4 Größenordnungen (Ojwang *et al.*, 1992, Yamada *et al.*, 1994, Yu *et al.*, 1995, Klebba, 2000).

Der Vorteil von Ribozymen in der HIV-Gentherapie ist die geringe Größe der Ribozym-kodierenden cDNA und die Tatsache, dass Ribozyme nicht in Protein translatiert werden und somit nicht immunogen sind. In ersten klinischen Studien konnten nach retroviralem Gentransfer Ribozym-kodierender Vektoren in T-Zellen (Carr *et al.*, 1999) und CD34-positiver Blutstammzellen (Zaia *et al.*, 1999)

die Ribozyme 10 bzw. 12 Monate nach Gentransfer im Körper nachgewiesen werden.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Ribozymen handelt es sich um ein Hairpin-Ribozym, das spezifisch das zweite GUC-Triplett in der 5'-LTR von HIV-1 spaltet (Ojwang *et al.*, 1992), und ein Hammerhead-Ribozym, welches die HIV-1 RNA am 13. GUC-Triplett im *pol* Gen spaltet (Klebba, 2000). Nach retroviralem Gentransfer in eine T-Zelllinie, Sortierung auf hoch Ribozym-exprimierende Zellen und anschließender HIV-Infektion dieser Zellen war die HIV-1 Replikation über 7 Wochen um 4 Größenordnungen inhibiert. Des Weiteren konnte für die Ribozym-exprimierenden Zellen ein selektiver Überlebensvorteil festgestellt werden (Klebba *et al.*, 2000).

1.2.3 Interleukin 16

1982 wurde aus dem Überstand CD8-positiver T-Zellen ein Protein isoliert, das wegen seiner chemotaktischen Wirkung auf T-Zellen als „Lymphocyte Chemoattractant Factor“ (LCF) bezeichnet wurde (Center und Cruikshank, 1982). Dieses Zytokin, das später in Interleukin 16 (IL-16) umbenannt wurde, vermittelt migratorische und proliferative Effekte nach Anbindung und Kreuzvernetzung von CD4 als seinem natürlichen Rezeptor. Während die IL-16 mRNA sowohl in CD4-positiven als auch in CD8-positiven T-Zellen vorliegt, wird das Vorläuferprotein pro-IL-16 nur in CD8-positiven Zellen in signifikanten Mengen exprimiert. Die Caspase 3 spaltet in diesen Zellen das 67 kD große pro-IL-16 zwischen Aspartat 253 und Serin 254, wodurch ein 121 Aminosäuren langes C-terminales Fragment, das biologisch aktive Interleukin 16, freigesetzt wird (Zhang *et al.*, 1998).

Neben den immunmodulatorischen und proinflammatorischen Wirkungen wurde 1995 erstmals eine inhibitorische Wirkung des Interleukin 16 auf die Replikation von HIV-1 beschrieben (Baier *et al.*, 1995). Nach Zugabe von rekombinantem humanem (IL-16_{hu}) bzw. simianem IL-16 (IL-16_{agm}) der Afrikanischen Grünen Meerkatze (Agm) zu CD8-depletierten PBMC und anschließender HIV-1 Infektion dieser Kulturen war eine Inhibition der HIV-1-Replikation bei Konzentrationen von 20 µg / ml (IL-16_{hu}) bzw. 10 ng / ml (IL-16_{agm}) zu erkennen. In späteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass auch mittels eukaryotischer

Expressionsvektoren intrazellulär exprimiertes IL-16 einen inhibierenden Einfluss auf die HIV-1 Replikation hat (Zhou *et al.*, 1997). Die Konzentration im Zellkulturüberstand betrug 1-10 ng / ml. Andere Gruppen hingegen konnten diese inhibitorische Wirkung nach Zugabe rekombinanten IL-16 (0,2 bzw. 10 µg / ml) zu CD4-positiven PBMC HIV-1 infizierter Donoren nicht (Gao *et al.*, 1997) bzw. nur bei PBL einiger Donoren (Amiel *et al.*, 1999) nachweisen.

Des Weiteren wird die IL-16-Konzentration im Serum HIV-1 infizierter Patienten als Surrogatmarker für die HIV-1 Therapie diskutiert (Müller, 1999).

1.3 RETROVIRALE VEKTOREN FÜR DEN GENTRANSFER IN HÄMATOPOETISCHE ZELLEN

Für verschiedene erbliche und erworbene Erkrankungen des Immunsystems, die medikamentös schwer zu therapieren sind, stellen gentherapeutische Ansätze eine mögliche Lösung dar. Denkbare klinische Anwendungen sind das Einbringen von Wildtyp-Genen bei erblichen genetischen Erkrankungen wie ADA-SCID (Blaese *et al.*, 1995b, Bordignon *et al.*, 1995, Kohn *et al.*, 1995, Hoogerbrugge *et al.*, 1996, Onodera *et al.*, 1998) oder X1-SCID (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000), die Expression immunmodulatorischer Zytokine in der Krebstherapie (Hwu *et al.*, 1994), Suizid-Gentransfer zur Kontrolle der Graft-versus-Host-Erkrankung (Bonini *et al.*, 1997, Tiberghien 1998, Cahn *et al.*, 1999, Kuhlcke *et al.*, 2000) und die „intrazelluläre Immunisierung“ von Zellen gegen virale Infektionen wie z. B. bei der HIV-1 Infektion (Lee *et al.*, 1994, Leavitt *et al.*, 1994, Woffendin *et al.*, 1996, Klebba *et al.*, 2000, Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996, Bevec *et al.*, 1992, Bonyhadi *et al.*, 1997).

Der Gentransfer kann in die pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) erfolgen, wodurch theoretisch alle daraus hervorgehenden Zellen der lymphoiden, myeloiden und erythroiden Linien das Transgen tragen (Asahara *et al.*, 2000). Die klinische Anwendung des Stammzellgentransfers wird bisher durch die schwierige Isolation der CD34-positiven Stammzellen, die eine sehr kleine Population im peripheren Blut darstellen (Sutherland *et al.*, 1994), und deren Transduktion und Expansion unter Beibehaltung der Repopulierungseigenschaften erschwert (Beck-Engeser *et al.*, 1991, Bender *et al.*, 1992, Peters *et al.*, 1996).

Eine weitere Möglichkeit besteht im Gentransfer in die ausdifferenzierten Zellen des hämatopoetischen Systems, die von der jeweiligen Krankheit betroffen sind. T-Lymphozyten sind neben den hämatopoetischen Stammzellen bevorzugte Zielzellen für die Genterapie von AIDS, SCID und zur Kontrolle der allogenen Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Im Gegensatz zu HSC sind T-Lymphozyten leicht aus dem Patienten zu isolieren, *ex vivo* zu transduzieren und zu expandieren (Culver *et al.*, 1991, Mavilio *et al.*, 1994, Bunnell *et al.*, 1997). Die Lebensspanne dieser Zellen reicht *in vivo* von einigen Wochen bis zu mehreren Jahren (Culver *et al.*, 1991, Mavilio *et al.*, 1994). Im Hinblick auf eine intrazelluläre Immunisierung gegen HIV ist ein Gentransfer in die CD4-positive Subpopulation der T-Lymphozyten erforderlich (Nabel *et al.*, 1994, Gladow *et al.*, 2000, Klebba *et al.*, 2000). *Ex vivo* Gentransferexperimente an Rhesus Affen (*Macaca mulatta*) zeigten, dass bei mehrfachen Infusionen einer ausreichend großen Zahl autologer transfervektorpositiver CD4-Lymphozyten bis zu 21 Wochen nach Reinfusion transduzierte CD4-positive PBL nachgewiesen werden konnten (Bunnell *et al.*, 1997). Die Zahl infundierter CD4-positiver Lymphozyten war mit $1-6 \times 10^8$ in etwa gleich der Zahl endogener CD4-positiver Lymphozyten. In klinischen Studien am Menschen zum Transfer genetisch modifizierter CD4-positiver Lymphozyten wurden pro Infusion 10^8 bis 10^{11} autologe Zellen reinfundiert, wobei der Anteil transfervektorpositiver Zellen bei 10-35 % lag (Morgan *et al.*, 1996, Cooper *et al.*, 1999).

1.3.1 Aufbau retroviraler Vektorsysteme

Als virale Vektoren werden infektiöse, aber nicht replikationskompetente Viruspartikel, die Fremdgene übertragen können, bezeichnet. Das Genom eines retroviralen Vektors enthält die 5'- und 3'-flankierenden LTR-Strukturen und die Verpackungssequenz (Ψ), die für die viralen Proteine kodierenden Sequenzen werden durch therapeutische Gene und/oder Markergene ersetzt. Retrovirale Vektoren haben eine Klonierungskapazität von 8-9 kb für heterologe Sequenzen. Die Herstellung der Vektoren erfolgt durch sogenannte Verpackungszellen, wobei die viralen Enzyme und Strukturproteine in *trans* zur Verfügung gestellt werden (Abb. 1.4). Die Expressionskonstrukte für *gag/pol* und *env* tragen kein Verpackungssignal und werden somit nicht Bestandteil des Vektorgenoms. Liegt

in der Verpackungszelle ein Ψ -positiver Transfervektor vor, werden infektiöse Vektorpartikel in den Zellkulturüberstand abgegeben. Retrovirale Vektoren erlauben die stabile Integration des Vektorgenoms ins Genom der Zielzelle und eine lang anhaltende Transgenexpression.

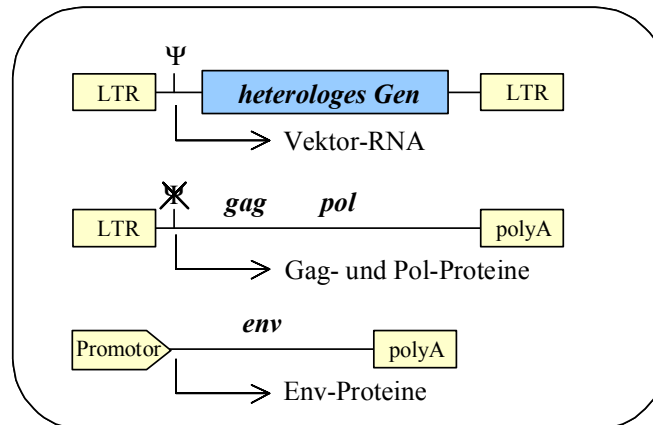


Abb. 1.4: Aufbau einer Verpackungszelle für retrovirale Vektoren. Die viralen Proteine Gag/Pol und Env werden auf verschiedenen Konstrukten kodiert, um das Rekombinationsrisiko und somit das Risiko zur Entstehung replikationskompetenter Viren zu minimieren. Nur das Ψ -positive Vektorgenom wird in die Vektoren verpackt und nach Infektion in die Zielzellen übertragen. LTR: Long Terminal Repeat, Ψ : Verpackungssignal.

Die am besten charakterisierten und in klinischen Studien oftmals eingesetzten retroviralen Vektoren sind vom murinen Leukämievirus (MLV) abgeleitet. Da amphotropes MLV und davon abgeleitete Vektoren zum Zelleintritt den auf humanen Zellen ubiquitär exprimierten Phosphattransporter Ram-1 als Rezeptor nutzen, können sie fast alle humanen Zelltypen transduzieren (Kavanaugh *et al.*, 1994, Eiden *et al.*, 1996, Kozak *et al.*, 1995).

Ein Nachteil onkoretroviraler Vektoren ist, dass die Integration des Vektorgenoms ins Genom der Zielzelle die Auflösung der Kernmembran erfordert und somit Mitose-abhängig ist (Springett *et al.*, 1989, Miller *et al.*, 1990). Lentivirale Vektoren ermöglichen die Transduktion ruhender Zellen, da der Präintegrationskomplex von Lentiviren die Kernmembran passieren kann (Naldini *et al.*, 1996, Blömer *et al.*, 1997). Allerdings bestehen gegen lentivirale Vektoren u.a. aufgrund der Notwendigkeit potentiell zytotoxischer akzessorischer viraler Proteine bisher noch Sicherheitsbedenken.

1.3.2 Retrovirale Pseudotypvektoren

Unter Pseudotypisierung versteht man die Inkorporation heterologer Hüllproteine in Viruspartikel. Ersetzt man das homologe Hüllprotein durch das Env-Protein eines anderen Virus, so erhalten die daraus entstehenden Vektoren den Tropismus des Virus, von dem das heterologe Hüllprotein stammt. Je nach Ursprung des Env-Proteins kann dabei der Tropismus des ursprünglichen Vektors erweitert oder eingeschränkt werden. Diese Pseudotypisierung kann neben der Tropismusänderung auch zur Steigerung der Transduktionseffizienz der generierten Vektoren oder zu einer erhöhten Vektorstabilität führen. Pseudotypisiert man MLV-Vektoren mit dem Hüllprotein des Gibbon Ape Leukemia Virus (GaLV), so zeigen diese [MLV(GaLV)]-Vektoren eine höhere Transduktionseffizienz für hämatopoetische Zellen, da der GaLV-Rezeptor (Glr-1, auch Pit-1 genannt) auf diesen Zellen 8 bis 19-fach stärker exprimiert ist als Ram-1 (Bunnell *et al.*, 1995, Lam *et al.*, 1996). [MLV(GaLV)] Pseudotypvektoren finden aus diesem Grund zum Gentransfer in T-Zellen breite Anwendung. Die Pseudotypisierung mit dem G-Protein des Vesikulären Stomatitisvirus (VSV) resultiert in stabileren Vektoren, die besser aufkonzentriert werden können (Burns *et al.*, 1993, Sharma *et al.*, 1996, Gallardo *et al.*, 1997). Das Hüllprotein des MLV 10A1 kann sowohl den amphi MLV Rezeptor Ram-1 als auch den GaLV-Rezeptor Pit-1 zum Zelleintritt nutzen (Miller *et al.*, 1991, Uckert *et al.*, 2000). Das Hüllprotein des feline RD114-Retrovirus ist resistent gegen humanes Komplement und vermittelt den Zelleintritt über den Rezeptor hATB (Rasko *et al.*, 1999). Während die oben aufgeführten Pseudotypvektoren nahezu alle humanen Zelltypen transduzieren können, wurde mit der Pseudotypisierung von MLV mit dem Hüllprotein des humanen Immundefizienzvirus (HIV-1) die Generierung von Pseudotypvektoren mit eingeschränktem Tropismus für CD4-positive Zellen beschrieben (Schnierle und Stitz *et al.*, 1997, Abb. 1.5).

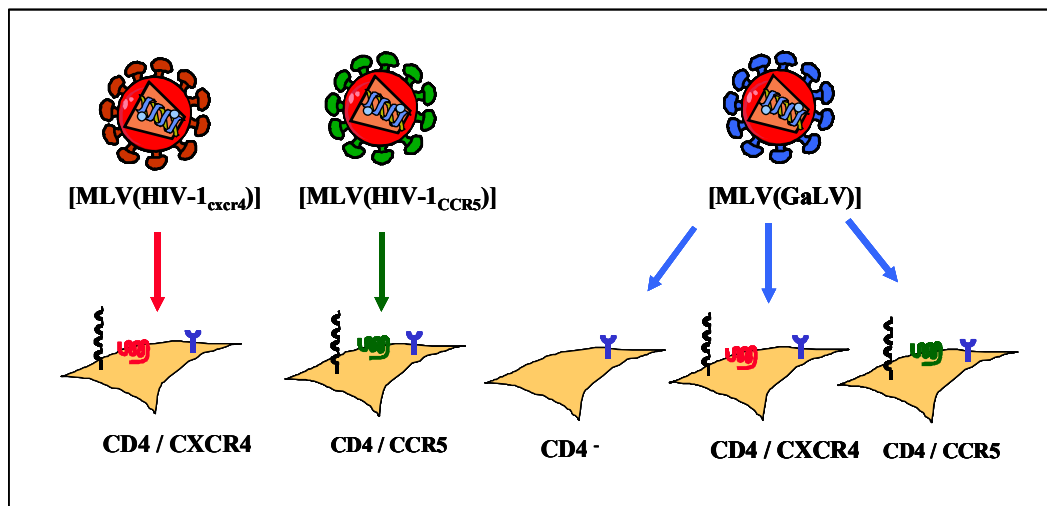


Abb. 1.5: Zelltypspezifische vs. unspezifischer Transduktion. Schematische Darstellung der CD4/Korezeptor-spezifischen Transduktion durch [MLV(HIV-1)]-Vektoren und der unspezifischen Transduktion durch [MLV(GaLV)]-Vektoren über den ubiquitär exprimierte GaLV-Rezeptor.

Zellspezifische Vektoren sind eine Grundvoraussetzung für gentherapeutische Ansätze *in vivo*, bei denen die Vektoren intravenös appliziert werden. [MLV(HIV-1)]-Vektoren transduzieren spezifisch CD4-positive Zellen, wodurch sie für eine *in-vivo* Gentherapie von ADA-SCID oder AIDS geeignet scheinen. Diese CD4- und damit Zelltyp-spezifische Transduktion könnte auch Vorteile für *ex-vivo* Gentherapie-Ansätze bieten.

1.4 ZIEL DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Systems zum spezifischen und hocheffizienten Gentransfer in primäre CD4-positive Lymphozyten für eine mögliche Gentherapie der HIV-Infektion.

Zunächst sollte die Spezifität und Effizienz von CD4/CXCR4- und CD4/CCR5-tropen [MLV(HIV-1)]-Vektoren bei der Transduktion primärer CD4-positiver T-Zellen des Menschen mit den in der Gentherapie häufig verwendeten [MLV(GaLV)]-Vektoren verglichen werden. Berücksichtigt werden sollte hierbei ebenfalls die Transduktionseffizienz in die CXCR4- und CCR5-positiven Subpopulationen primärer CD4-Lymphozyten. Um ausreichende Vektormengen produzieren zu können, sollten hierzu stabile Verpackungszellen hergestellt werden. Da für eine klinische Anwendung z. B. zur *ex-vivo* Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS bis zu 10^{11} genetisch modifizierte Zellen reinfundiert werden müssen, ist neben der Produktion großer Vektormengen ein hocheffizienter Gentransfer in die Zielzellen dringend erforderlich. Daher sollte ein Protokoll zur Transduktion primärer CD4-positiver T-Lymphozyten entwickelt werden, das eine maximale Transduktionseffizienz ermöglicht.

Therapeutische Gene, die die HIV-1 Replikation effizient unterdrücken, sind eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie der HIV-Infektion. Einige der von verschiedenen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen bisher beschriebenen anti-HIV-Gene wurden in unterschiedlichen Systemen, d.h. nach Infektion unterschiedlicher T-Zelllinien mit unterschiedlichen Virusisolaten, untersucht und waren in diesen Systemen wirksam. Ein direkter Vergleich der Inhibitoren war dabei jedoch nicht möglich. In dieser Arbeit sollten daher erstmals verschiedene bekannte anti-HIV-Gene in einem einheitlichen System *in vitro* auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Inhibition der HIV-Replikation untersucht werden, um das Potential der einzelnen Inhibitoren vergleichend beurteilen zu können.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.1.1 Plasmide und Vektoren

2.1.1.1 HIV-1 Inhibitorplasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten verpackbaren retroviralen Expressionskonstrukte wurden ausgehend von dem Plasmid pMgSLdelS, das von Manuel Grez (Georg-Speyer-Haus, Frankfurt) zur Verfügung gestellt wurde, kloniert. Das Plasmid pMgSLdelS kodiert für einen bicistronischen retroviralen Transfervektor mit der 5'-LTR des Mouse stem cell virus (MSCV) und der 3'-LTR des Spleen focus forming virus (SFFV). Dieser Vektor ist für die Genexpression in lymphohämatopoetischen Zellen optimiert. Er enthält ferner das Ampicillinresistenzgen (*amp^r*) und ein Replikationssignal zur Amplifikation in *E. coli*. Die *phox*-cDNA, die für eine Untereinheit der NADPH Oxidase kodiert, liegt 5' vom offenen Leserahmen des C-terminal trunkierten, schwach-affinen Rezeptors für den humanen Nervenwachstumsfaktor (Δ LNNGFR, „low affinity nerve growth factor receptor“). Zur Klonierung der jeweiligen Inhibitorplasmide wurde das *phox*-Gen durch die cDNA der jeweiligen potentiellen HIV-1 Inhibitoren (Interleukin-16, einkettige Antikörperfragmente gegen HIV-1 Integrase und RT) ersetzt. Die resultierenden Konstrukte wurden entsprechend pMg-IL-16 / α -IN-scFv / α -RT-scFv Δ LNNGFR benannt.

2.1.1.2 Konstrukte zur Expression der HIV-1 Hüllproteine

Das HIV-1 *env*-Expressionskonstrukt pTr712 kodiert die an Aminosäure 712 trunkierte Variante des CD4/CXCR4-tropen HIV-1_{BH10}-Hüllproteins (Abb. 3.1.1). Das Plasmid wurde von Frau Dr. Valerie Bosch (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt und von Wilk *et al.* (1992) ausführlich beschrieben. Durch Austausch der V3-Loop Region und angrenzender Bereiche der HIV-1_{BH10}-*env* cDNA im pTr712 gegen die entsprechende Region des CCR5-tropen HIV-1 Primärisolats MBK (Cichutek *et al.*, 1992) wurde das Plasmid pTr712 MBK

erhalten, welches für ein trunkiertes, CD4/CCR5-tropes HIV-1 Hüllprotein kodiert. Das Plasmid wurde von P. Müller zur Verfügung gestellt (Müller, 1999).

2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine Standard-PCR (100 µl Ansatz) enthielt: 1 x PCR-Puffer (10 mM Tris / HCl, pH 8,8; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,01 % Gelatine), je 1-2 µM (+) Primer und (-) Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten *Taq*-Polymerase und ca. 100 ng Plasmid-DNA mit der zu amplifizierenden Nukleotidsequenz. Die Zyklusbedingungen wurden wie folgt gewählt, wobei sich die Annealingtemperatur und Synthesedauer nach den verwendeten Primern und der Länge des zu amplifizierenden Nukleotidfragments richtete: 94 °C, 2 min (Denaturierung); 30 Schleifen: 94 °C, 1 min (Denaturierung), ±60 °C, 1 min (Annealing), 72 °C ± 1,5 min (DNA-Synthese); 72 °C, 10 min; 4 °C (Lagerung bis zur Weiterverarbeitung).

2.1.3 Nukleotidsequenzbestimmung

Alle Sequenzierungen erfolgten mit der Thermostabilen-Sequenase (Amersham, Freiburg) und dem automatischen DNA-Sequenzer Modell 373 A (Applied Biosystems, Weiterstadt). Die automatischen Sequenzierungen und Auswertungen wurde von Herrn Dipl. Ing. Martin Selbert (PEI, Langen) durchgeführt.

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ARK Scientific (Darmstadt) bezogen und auf eine Standardkonzentration von 10 µM eingestellt. Zur Durchführung rekombinanter PCR wurden folgende Oligonukleotidprimer verwendet, bei denen die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease *EcoRI* unterstrichen ist:

Amplifikation der Vollängen-IL-16 cDNA:

MGECORI+2: 5'-CCG GAA TTC ATG CCC GAC CTC AAC TCC TCC
ACT GAC TCT GCA-3'

MGECORI-2: 5'-CCG GAA TTC CTA GGA GTC TCC AGC AGC TGT
GGT TTC CTT-3'

Amplifikation der cDNA des IL-16 Caspase-Fragments:

M-123-IL-16+: 5'-CGG AAT TCA TGT CTG CAG CCT CAG CCT CTG C-3'

Amplifikation der anti-RTscFv-cDNA:

a RT ECO+P: 5'-CCG GAA TTC ATG GAC ATT ATA ATG ACT CAG
TCT CCA GCC-3'

a RT ECO-: 5'-CCG GAA TTC CTA TGA GGA GAC GGT AC TGA
GGT TCC TTG-3'

Amplifikation der anti-Integrase-scFv-cDNA:

a IN33 ECO+: 5'-CCG GAA TTC ATG GAC ATC CAG ATG ACA CAG
TCT CCA TCC-3'

a IN33 ECO-: 5'-CCG GAA TTC TCG AGG ATC CTT ATG AGG AGA
CGG TGA GGC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung der inhibitorischen Gene im Mg Δ LNGFR-Vektor:

MG SEQ(+): 5'-GCC TCG ATC CTC CCT TTA TCC AGC-3'

MG SEQ(-)2: 5'-TCA GGT CCA CAG AGG AAA ACT CCT-3'

INTIL16(+)Seq: 5'-GCC TGG AAC ATC ATC AAG GCA CTG-3'

INTIL16(-)Seq: 5'-CTC CAG TGT CAC CGT GCA GAC TGT-3'

a IN33 (+) Seq 2: 5'-CTG TGG ACG TTC GGT GGA GGC ACC-3'

a IN33(-) Seq: 5'-CAG ATC TGC CGA GCT CTG AGC CAC-3'

2.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

10 µl des PCR-Ansatzes wurden nach der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, um die spezifische Amplifikation des gewünschten DNA-Fragmentes zu überprüfen. Sofern keine unspezifischen Banden aufgetreten waren, wurde das PCR-Fragment unter Verwendung des „QIAQuick PCR Purification Kits“ (QIAGEN, Hilden) direkt aus dem PCR-Ansatz aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.6 Restriktion und Dephosphorilierung von Plasmid-DNA

Zur Restriktion von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB, Schwalbach) nach Angaben des Herstellers verwendet. Mittels der alkalischen Phosphatase (Calf intestinal alkaline phosphatase, CIP, NEB) konnte die nach Restriktion mit nur einer Endonuklease bestehende Möglichkeit einer Religation von Plasmid-DNA reduziert werden. Die CIP entfernt die für eine Ligation notwendigen 5'-Phosphatgruppen der DNA. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese. Für DNA-Fragmente von 0,3 bis 3 kb wurden 1 %-ige Agarosegele verwendet. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Probenpuffer (15 % Glycerin, 0,1 % Xylenblau, 0,075 % Bromphenolblau, 10 mM EDTA) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 70-120 Volt aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) verwendet. Die aufgetrennte DNA konnte anschließend auf einem UV-Transilluminator (302 nm) detektiert werden. Als DNA-Größenstandards wurden *HaeIII* restringierte ϕ X-174-RF DNA bzw. *HindIII* restringierte Lambda-DNA (NEB, Schwalbach) verwendet.

2.1.8 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen erfolgte mit dem QIAEX II™ Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wird hierbei durch unspezifische Bindung an Silikapartikel in Gegenwart chaotroper Salze aufgereinigt. Die Elution erfolgte in H₂O_{dest.}

2.1.9 Ligation

Die Ligation von PCR-Amplifikaten in Plasmid-DNA nach der Restriktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 15 µl. Die zu inserierenden Fragmente wurden je nach Fragmentgröße in einem Verhältnis von 2:1 - 4:1 mit dem restringierten Empfängerplasmid gemischt und mit 100 Einheiten T4-DNA-Ligase (GIBCO BRL, Eggenstein), dem entsprechenden Ligasepuffer (GIBCO BRL, Eggenstein) in Anwesenheit von ATP für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot des Ligationsansatzes wurde direkt zur Transformation kompetenter Bakterien eingesetzt.

2.1.10 Herstellung kompetenter Bakterien

Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die *E. coli* Stämme DH5α und Top10F' (GIBCO BRL, Eggenstein) mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Hierzu wurden pro Bakterienstamm 100 ml LB-Medium mit 1 ml Übernachtskultur (37 °C) angeimpft und die Bakterienkultur bei 37 °C im Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD₅₅₀) von 0,55 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 Minuten auf Eis gekühlt, mit 6.000 rpm bei 4 °C (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) pelletiert und in 40 ml TFB1 (30 mM KOAc, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und sterilfiltriert) resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis und einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C mit 6.000 rpm wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt und sterilfiltriert) aufgenommen, á 100 µl Aliquots in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.1.11 Transformation

Zur Transformation wurden 100 µl kompetenter Bakterien auf Eis langsam aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien mit 0,5 ml SOC-Medium (GIBCO BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37 °C für eine Stunde im Bakterieneschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert, in der im Gefäß verbleibenden Lösung resuspendiert und auf Ampicillin-Agarplatten (50 µg / ml Ampicillin) ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.12 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien erfolgte mittels der Plasmid-Aufreinigungs-Kits der Firma Qiagen (Hilden). Zur Gewinnung kleinerer Mengen DNA aus 15 ml Übernachtskulturen wurde hierzu der QIAprep-8-Kit verwendet. Die Präparation größerer Mengen DNA erfolgte aus 200 ml Übernachtskulturen mittels Anionenaustauschersäulen (tip-20, QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.2 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 Zelllinien und Medien

Suspensionszelllinien wurden in RPMI 1640 Medium (nach GIBCO BRL, Eggenstein), supplementiert mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS, Biochrom KG, Berlin), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg / ml Nystatin, 100 Einheiten / ml Penicillin, 50 mg / ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator (Cytoperm, Heraeus, Hanau) bei 37 °C und 7 % CO₂ gehalten. Sie wurden zweimal pro Woche 1:10 mit frischem Medium versetzt.

2.2.1.1 Verwendete Suspensionszelllinien

Molt 4/8	humane T-Zelllinie (akut lymphoblastische Leukämie), NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: #175
Jurkat	humane T-Zelllinie, NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: #177
SupT1	humane T-Zelllinie (Non-Hodgkin-Lymphom), NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: #100
PM1	Klon von Hut78-Zellen (humanes, kutanes T-Zell-Lymphom), NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: # 3038
A3.01 CCR5	humane T-Zelllinie, stabil transfiziert mit einem humanen CCR5-Expressionskonstrukt
C8166	humane Nabelschnurblut-Lymphozyten-Linie, die ein defektes HTLV-1 Genom enthalten, NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: #404

2.2.1.2 Verwendete adhärenzte Zelllinien

GHOST	humane Osteosarkomzelllinie (HOS-abgeleitet), stabil transduziert mit dem retroviralem Vektor MV7neo-T4, stabil cotransfiziert mit einem HIV-2 LTR-getriebenen hGFP-Konstrukt, hyg ^r , GHOST parental: CD4-positiv, NIH-AIDS Research and Reference Reagent-Programm: # 3679, mit retroviralem Expressionskonstrukt für HIV-Korezeptoren stabil transduziert: GHOST CXCR4: # 3685, GHOST Hi-5 (CCR5): # 3944
TE671	humane Rhabdomyosarkomzelllinie, Stratton <i>et al.</i> , 1989
TECeB15 EGFP	abgeleitet von TE671, enthält stabil ein MLV- <i>gag/pol</i> -Expressionskonstrukt und den Transfervektor MgEGFP Δ LNGFR (Stefanie Steidl, Paul Ehrlich Institut)
PG13	NIH 3T3 (kontaktinhibierte embryonale Mäuse-Fibroblasten), stabil transfiziert mit MoMLV- <i>gag/pol</i> - und GaLV- <i>env</i> -Expressionskonstrukt, Miller <i>et al.</i> (1991)
293T	humane Nierenepithelzelllinie
Phoenix gp	293T-Zellen stabil transfiziert mit MLV- <i>gag/pol</i> -Expressionskonstrukt, Pear <i>et al.</i> (1993)

Adhärenzte Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagles Medium („low glucose“ DMEM von GIBCO BRL, Eggenstein) mit 10 % FKS (Biochrom, Berlin), 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg / ml Nystatin, 100 Einheiten / ml Penicillin, 50 mg / ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) in einem Zellinkubator bei 37 °C und 7 % CO₂ gehalten. Zur Zellpassage wurden die Zellen mit PBS / 5 mM EDTA aus den Kulturgefäßen gelöst und mit frischem Medium versetzt. Medium für die GHOST Zellen wurde mit 100 µg / ml Hygromycin (GIBCO BRL, Eggenstein), 500 µg / ml G418 (Serva, Heidelberg) und sofern sie ein Korezeptor-Expressionsplasmid enthalten zusätzlich mit 1 µg / ml Puromycin (ICN Biomedicals, Eschwege) supplementiert.

2.2.2 Verpackungszelllinien

Stabile Verpackungszelllinien für [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren wurden basierend auf der Transfervektor-negativen, aber MLV *gag/pol*- und GaLV-*env*-positiven Zelllinie PG13 (Miller *et al.*, 1991) etabliert. Um eine direkte Integration des Transfervektor ins Genom der Verpackungslinie zu erreichen, wurden die PG13-Zellen mit [MLV(MLV10A1)]-Vektoren transduziert, die den entsprechenden Transfervektor als Vektorgenom tragen. Diese [MLV(MLV 10A1)]-Vektoren wurden transient in Phoenix *gp* Zellen erzeugt, die mit den Transfervektor-kodierenden Plasmiden (pMg Δ LNGFR) transfiziert worden waren. 3-5 Tage nach Transduktion der PG-13 Zellen wurden diese mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) zu 95-98 %-iger Reinheit angereichert.

Zur Generierung stabiler [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Verpackungszelllinien wurden die bereits Transfervektor-positiven TECeB15 MgEGFP Δ LNGFR (Stefanie Steidl, PEI, Langen) mit dem entsprechenden Expressionsplasmid für das trunkierte, CD4 / CCR5-trope HIV-1 *env* (pL128 MBK) transfiziert und anschließend selektioniert. Das zur Selektion verwendete Medium entsprach dem zur Kultivierung adhärenter Zellen beschriebenen Medium, das zusätzlich mit den Antibiotika G418 (800 μ g / ml, Serva, Heidelberg) zur Selektion *neo*⁺ Zellen (HIV-1 *env*-Konstrukt) und Blasticidin (5 μ g / ml, ICN Biomedicals, Eschwege) zur Selektion *bsr*⁺ Zellen (in TECeB15 vorhandenes MLV *gag/pol*-Konstrukt) supplementiert wurde. Die Selektion stabil transfizierter Zellen begann zwei Tage nach der Transfektion. Sobald sich Zellkolonien von Einzelzellklonen gebildet hatten, wurden diese mit einer Eppendorfpipette von der Kulturschale abgelöst, resuspendiert und in 24-Lochplatten (Nunc, Wiesbaden) expandiert. Durch Titration der Überstände auf GHOST CCR5-Zellen wurden die erhaltenen Verpackungszellklone auf ihren Vektortiter hin untersucht.

2.2.3 Lagerung von Zellen

Zur Lagerung von Zellen wurden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3.1 Einfrieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden mit PBS 5 mM EDTA vom Kulturgefäßboden abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Suspensionszellen und adhärenente Zellen wurden anschließend abzentrifugiert (1.300 rpm, 4 °C, 10 min, Heraeus-Minifuge, Hanau) und $1,5 \times 10^6$ Zellen in 800 µl eisgekühltem Medium 1 (DMEM bzw. RPMI, 20 % FKS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 2 ml Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. 800 µl eisgekühltes Medium 2 (DMEM bzw. RPMI, 20 % FKS, 20 % DMSO, Merck, Darmstadt) wurde langsam zugetropft und die Zellen dann für zwei Stunden auf –20 °C langsam eingefroren. Nach zwei Stunden wurden die Zellen über Nacht auf –80 °C überführt und konnten anschließend in flüssigem Stickstoff dauerhaft gelagert werden.

2.2.3.2 Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang von Zellen sollte nach Möglichkeit schnell erfolgen. Dafür wurden die Einfrierröhrchen mit den Zellen in ein 37 °C Wasserbad überführt. Die Zellsuspension wurde sofort nach Auftauen in 20 ml erwärmtes Medium überführt und die Zellen für 10 Minuten bei 1.300 rpm (Minifuge T, Heraeus, Hanau) pelletiert. Anschließend wurden die Zellen resuspendiert und in Kultur genommen. Am nächsten Tag folgte ein weiterer Mediumwechsel. Eventuell notwendige Selektionsmarker wurden erst an diesem Tag zugesetzt.

2.2.4 Präparation primärer mononukleärer Blutzellen (PBMC)

Zur Gewinnung primärer, peripherer Blutlymphozyten (PBL) wurden zunächst die mononukleären Zellen (PBMC) aus frischem Vollblut gesunder Spender isoliert. Bei dem Blut handelte es sich um Citrat- oder EDTA-Blut.

15 ml vorgewärmtes Ficoll Histopaque (Sigma, Deisenhofen) wurden in einem 50 ml Röhrchen (BD Falcon, Heidelberg) vorsichtig mit 15-30 ml Blut überschichtet und anschließend für 30 min zentrifugiert (1.000 rpm, RT, ohne Bremse, Minifuge T, Heraeus, Hanau). Hierbei sedimentieren die roten Blutkörperchen und Granulozyten an den Boden, über dem Ficoll befinden sich

die Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen („Lymphozytenring“) und über diesen das Plasma. Dieses wurde, sofern es für die weitere Kultivierung der Zellen benötigt wurde, abgenommen und für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert. Der Lymphozytenring wurde abgenommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die PBMC wurden zweimal mit je 35 ml PBS gewaschen, um restliches Ficoll Histopaque zu entfernen. Daraufhin erfolgte die Lyse restlicher Erythrozyten durch 15-minütige Inkubation der Zellen in PBS 0,86 % NH₄Cl bei 37 °C. In zwei Waschschrritten wurde das Ammoniumchlorid entfernt und die Zellen wurden in einer Dichte von 1 x 10⁶ / ml in Medium aufgenommen.

2.2.5 Kultivierung und Stimulation primärer Lymphozyten

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden nach der Aufreinigung aus Vollblut oder Lymphozytenkonzentrat („buffy coat“) in X-Vivo 10 Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien), das mit 20 % FKS bzw. 10 % FKS und 10 % autologem Plasma, 2 mM Glutamin (Biochrom, Berlin) und Antibiotika (0,1 mg / ml Nystatin, 100 Einheiten / ml Penicillin, 50 mg / ml Streptomycin, Biochrom KG, Berlin) und 200 Einheiten Interleukin 2 (IL-2, Chiron, Marburg) supplementiert war, kultiviert. Zur Stimulation der Zellproliferation wurde den PBMC sofern nicht anders beschrieben für 24 h PHA (5 µg / ml, Calbiochem, San Diego, USA) zugesetzt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in Medium ohne PHA resuspendiert. Unter diesen Stimulationsbedingungen sterben Monozyten und Makrophagen ab, so daß man eine 95-98 % reine Lymphozytenpopulation erhält, was durch flowcytometrische Analyse auf den T-Zell-Marker CD3 bestätigt wurde.

2.2.6 Transfektion mittels Lipofektamin

Das Einbringen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Zur stabilen und transienten Transfektion wurde die DNA mit Lipidvesikeln komplexiert, welche anschließend in das Zytoplasma aufgenommen werden (Lipofektion). Hierzu wurde das Transfektionsreagenz LipofektaminTM in Kombination mit dem PLUSTM-Reagenz (GIBCO BRL, Eggenstein) verwendet. Am Vortag der Transfektion wurden die Zellen in einer Dichte von 5 x 10⁵ pro

Vertiefung einer 6-Lochplatte ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurden 3 µg Plasmid-DNA mit 6 µl PLUSTM in 100 µl OptiMEM (GIBCO BRL, Eggenstein) für 15 Minuten bei RT vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 µl OptiMEM mit 5 µl LipofektaminTM folgte wiederum eine 15 minütige Inkubation. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Der Transfektionsansatz wurde in 800 µl OptiMEM aufgenommen und zu den Zellen gegeben. Die Inkubation mit dem DNA-Liposomengemisch betrug vier Stunden bei 37 °C im Zellinkubator. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurde frisches Medium zugegeben. Die Expression der übertragenen Gene wurde 48 h nach Transfektion getestet.

2.2.7 Ernte von Pseudotypvektoren

Zur Generierung von Pseudotypvektoren wurden auf 80 % konfluente Kulturen von Verpackungszellen in 182 cm² Zellkulturflaschen je 12 ml Medium ohne Selektionsmarker gegeben. Nach acht bis zehn Stunden wurde das Medium abgenommen und durch einen 0,45 µm Filter von verbleibenden Zellen befreit. Nativer Überstand wurde, sofern er nicht direkt zur Transduktion eingesetzt wurde, á 1 ml aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Um höhere Vektortiter zu erzielen, wurden in einigen Versuchen die Verpackungszellen vor der Vektorernte in Medium mit 10 mM Natriumbutyrate (Olsen *et al.*, 1995) kultiviert und die Vektorpartikel aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation pelletiert. Hierzu wurde der filtrierte Überstand bei 35.000 rpm und 4 °C für 1,5 h in einem SW28-Rotor (Beckmann, München) abzentrifugiert. Zum Vektorpellet wurden anschließend in 150 µl X-Vivo-Medium (BioWhittaker, Verviers, Belgien) gegeben und das Pellet unter vorsichtigem Schwenken für 45 min bei 4 °C resuspendiert. Danach wurde der Vektorstock aliquotiert und bei –80 °C gelagert. Von nativen und pelletierten Vektoraliquots wurde je ein Aliquot wieder aufgetaut, um den Vektortiter zu bestimmen.

2.2.8 Transduktion von Zelllinien

Für die Transduktion von adhärennten Zelllinien wurden am Vortag $2,5 \times 10^5$ Zellen in einer 6-Loch Platte (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Erfolgte die Transduktion mit frischen Vektorüberständen, so wurden zunächst die

Zelltrümmer durch Filtration (45 µm Mikrofilter, Sartorius, Göttingen) vom Überstand abgetrennt. Das Kulturmedium der zu transduzierenden Zellen wurde entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit vektorhaltigem Überstand inkubiert. Zur Transduktion von Suspensionszellen wurden 1×10^5 Zellen abzentrifugiert, im Überstand bzw. der entsprechenden Verdünnung in einem Volumen von 1 ml resuspendiert und in 12-Loch Platten ausgesät. Bei der Transduktion von Suspensionszelllinien wurden zum Transduktionsansatz zusätzlich 4 µg / ml Protaminsulfat zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 4-5 Stunden bei 37 °C erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.9 Vektortitration

Für die Titrationsvektorerhaltiger Überstände wurden Verdünnungsreihen (500 µl, 50 µl und 5 µl bei nativen Überständen, 10 µl, 1 µl, 0,1 µl bei UZ-pelletierten Überständen) angelegt, die dann zur Transduktion der entsprechenden Zelllinie eingesetzt wurden. [MLV(GaLV)]-Überstände wurden auf GHOST parental oder PM1, [MLV[HIV-1_{CXCR4}]]-Vektoren auf GHOST CXCR4 oder A3.01 CCR5 und [MLV[HIV-1_{CCR5}]]-Vektoren auf GHOST CCR5 oder A3.01 CCR5-Zellen titriert.

2.2.10 Herstellung Retronektin-beschichteter Zellkulturplatten

Retronektin ist ein rekombinantes Fragment aus humanem Fibronektin. Es enthält spezifische Bindungsstellen sowohl für retrovirale Vektoren, als auch für hämatopoetische Zellen (Hanenberg *et al.*, 1996). Kollokalisierung von Vektoren und Zellen auf Retronektin-beschichteten Platten führt zu einer Erhöhung der Transduktionseffizienz.

Zur Transduktion primärer T-Zellen wurden 24- bzw. 48- Lochplatten (BD Falcon, Heidelberg), die nicht zellkulturbehandelt waren, mit Retronektin beschichtet. Dazu wurden 250 bzw. 150 µl Retronektinlösung (0,1 µg / ml) je Vertiefung der 24- bzw. 48 - Lochplatte gegeben und für eine Stunde offen unter UV-Licht inkubiert. Nach einer weiteren halben Stunde unter UV-Licht mit geschlossenem Deckel der jeweiligen Platte wurde die Retronektinlösung abgenommen und 250 µl einer 2 %-igen BSA-Lösung zur Blockierung

unspezifischer Bindungsstellen in die Vertiefungen gegeben. Nach einer halben Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten zweimal mit HBSS-Puffer (Sigma, Deisenhofen) gewaschen und zur Lagerung bei 4 °C mit 500 µl bzw. 1 ml PBS überschichtet. Die Retronektin-beschichteten Platten können bei 4 °C mehrere Monate gelagert werden.

2.2.11 Transduktion primärer Lymphozyten

Die zur Transduktion primärer Lymphozyten eingesetzten Retronektin-beschichteten Platten wurden zunächst mit vektorhaltigem Überstand für eine halbe Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und 5×10^5 Zellen (24-Loch Platte) bzw. 5×10^4 Zellen (48-Loch Platte) in 500 µl X-Vivo Medium mit 20 % FKS bzw. FKS/Serum-Gemisch, 200 Units / ml IL-2, 4 µg / ml Protaminsulfat (Sigma, Deisenhofen), 2 mM Glutamin und Antibiotika auf die Platten gegeben. 500 µl frischer Vektorüberstand, gegebenenfalls verdünnt, wurde auf die Zellen gegeben und die Platten wurden anschließend für 90 min bei 32 °C und 1.000 rpm (Varifuge 3.0R, Heraeus, Hanau) zentrifugiert und weitere 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Halbmediumwechsel gegen entsprechendes Medium ohne Protaminsulfat. In einigen Fällen wurde der Transduktionsvorgang an ein oder zwei darauffolgenden Tagen wiederholt. Die flowzytometrische Analyse der transduzierten Zellen erfolgte drei Tage nach der letzten Transduktion.

2.2.12 Herstellung hochtitriger HIV-1 Stocks

Um die einzelnen Inhibitoren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Inhibition der HIV-1 Replikation zu vergleichen, wurden Inhibitor-positive T-Zellen mit den HIV-1 Stämmen NL4-3 (Adachi *et al.*, 1986) und IIIB (Popovic *et al.*, 1984) infiziert. Neue HIV-1_{NL4-3} Virusstocks wurden durch Infektion von Molt4.8-Zellen mit bestehenden Virusstocks generiert. Sieben Tage nach der Infektion waren in der Kultur Synzytien erkennbar. Der virushaltige Überstand der Zellen wurde geerntet und auf C8166-Zellen titriert. Der Virustiter betrug $3,6 \times 10^4$ i.E. / ml. Zur Generierung größerer Mengen des HIV-1_{IIIB} wurden A3.01 CCR5-Zellen mit vorhandenen HIV-1_{IIIB}-Virusstocks infiziert (m.o.i. ≈ 1). Nach vier Tagen waren

erste Synzytien erkennbar, nach sieben Tagen wurde der virushaltige Überstand geerntet und ebenfalls auf C8166-Zellen titriert. Der HIV-1_{IIIB}-Titer betrug $2,05 \times 10^4$ i.E. / ml.

2.2.13 Titration von HIV-1 Stocks

Zur Bestimmung des Virustiters wurde eine Endpunkttitration auf C8166-Zellen durchgeführt. Der HIV-1 Überstand wurde in 8 Replikaten und 12 Verdünnungsstufen titriert. Hierzu wurden in einer 96-Loch Platte (U-Form, Nunc, Wiesbaden) 2×10^3 C8166-Zellen pro Loch in 150 μ l Medium ausgesät und mit 50 μ l der Virusverdünnungen für eine Woche inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Mehrkanalpipette resuspendiert und auf Poly-L-Lysin (Sigma, Deisenhofen) beschichtete Platten überführt. Nach einstündiger Inkubation im Zellinkubator bei 37 °C hafteten die Zellen am Boden der Kulturschale. Sie konnten nun in einen Immunperoxidase-Test (IPA, 2.3.4.) untersucht werden. Hierbei wurde ein Pool von Seren verschiedener HIV-1 Infizierter Patienten (freundlicherweise von Dr. Werner, PEI, zur Verfügung gestellt) zur Detektion HIV-1-positiver Zellen eingesetzt. Der Virustiter errechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{TCID}_{50} / \text{ml} = \frac{\text{D}_s \left[\frac{n^{\text{inf}}}{R} + 0,5 \right] * \text{D}_1 * 1.000}{\text{D}_s * V}$$

TCID₅₀: „Tissue culture infectious dose 50 %“, **D_s**: Verdünnungsstufe, **n^{inf}**: Anzahl infizierter Vertiefungen, **R**: Replikate, **D₁**: erster Verdünnungsschritt, **V**: Volumen je Vertiefung in μ l.

2.2.14 HIV-1 Infektionskinetiken

SupT1-Zellen wurden in Infektionskinetiken mit den HIV-1 Virusstämmen NL4-3 und IIIB eingesetzt. Der Titer der HI-Virusstocks war zuvor durch Titration auf C8166-Zellen bestimmt worden (s. 2.2.12 Virustitration). Die Infektionskinetiken wurden in Triplikaten durchgeführt. $1,6 \times 10^6$ Zellen wurden abzentrifugiert, einmal mit frischem Medium gewaschen und in einem Volumen

von 500 µl verdünntem Virusstock für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Multiplizität der Infektion (m.o.i., Virusmenge pro Zelle) betrug 10^{-2} . Nach drei Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert und dreimal mit frischem Medium gewaschen. Anschließend wurde der Ansatz in drei Replikate aufgeteilt. Die Bestimmung der p24-Konzentration im Überstand der Kulturen erfolgte sofern nicht anders beschrieben alle 3 Tage.

2.2.15 Analytische Durchflußzytometrie

Anhand der analytischen Durchflußzytometrie wurden in der vorliegenden Arbeit transfizierte und transduzierte Zellen die Expression der Markergene *egfp* und *Δlngfr* sowie primäre Lymphozyten und T-Zelllinien auf die Expression von CD-Markern und Cytokinrezeptoren analysiert. Die Durchflußzytometrie liefert hierbei sowohl eine qualitative wie auch quantitative Aussage zur Expression des jeweiligen Proteins.

Das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) kann direkt als Fluoreszenz 1 gemessen werden, alle Oberflächenmarker wurden mittels fluoreszenzfarbstoff-konjugierter Antikörper nachgewiesen. Adhärente Zellen wurden hierzu mit PBS 5 mM EDTA abgelöst und in Medium resuspendiert. Die resuspendierten Zellen und Suspensionszellen wurden dann einmal mit Waschpuffer (PBS, 1 % BSA, Applichem, Darmstadt, 0,1 % NaN_3 , Merck, Darmstadt) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 30-50 µl Waschpuffer resuspendiert und die Antikörper wurden zugegeben. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach zwei Waschschritten wurden die Zellen in 500 µl Fixierlösung (PBS 1 % Paraformaldehyd, Sigma, Deisenhofen) aufgenommen, sofern es sich um eine Färbung mit Farbstoff-konjugiertem Antikörper handelte. Bei einer Färbung mit Zweitantikörper folgte der zweite Färbeschritt und nach zwei weiteren Waschschritten wurde das Zellpellet ebenfalls in Fixierlösung aufgenommen. Die Proben wurden innerhalb einer Woche nach Färbung analysiert. Hierbei wurden bei Zelllinien mindestens 7.000, bei Primärzellen mindestens 10.000 Zellen eingemessen. Die Analyse erfolgte an einem FACScan von Beckton Dickinson (Heidelberg) mit der Lysis II Software oder an einem DAKO Galaxy (DAKO Diagnostika, Hamburg) mittels FloMax Software.

Zur Analyse der Oberflächenrezeptoren auf primären Lymphozyten und T-Zelllinien dienten folgende Antikörper: α CD3 (Klon UCHT1, IgG1), α CD4 (Klon MT310, IgG1) und α CD8 (Klon DK25, IgG1) direktkonjugiert mit FITC, PE oder PE-Cy5 (DAKO Diagnostika, Hamburg), α CD25 (Klon ACT-1, IgG1) und α CD69 (Klon FN50, IgG1) direktkonjugiert mit FITC oder PE (DAKO Diagnostika, Hamburg), α CCR5 (Klon 2D7, IgG2a, κ) und α CXCR4 (Klon 12G5, IgG2a, κ), PE-konjugiert (BD Pharmingen, Heidelberg). Die entsprechenden Isotypkontrollen wurden jeweils vom gleichen Hersteller bezogen. Für die Färbungen wurden für 5×10^5 Zellen 5 μ l der DAKO Diagnostika-Antikörper und 10 μ l der BD-Pharmingen-Antikörper eingesetzt.

Zur Färbung des Δ LNGFR wurde anfangs als Erstantikörper α huNGFR (Klon MAB5264, IgG1, Chemicon, Hofheim) und als Zweitantikörper α Mouse IgG1-PE (Sigma, Deisenhofen) verwendet, später wurde der Erstantikörper von der Firma Chemikon FITC-markiert und konnte so für Direktfärbungen verwendet werden.

2.2.16 Zellsortierung

2.2.16.1 Magnetische Zellsortierung (MACS)

Die magnetische Zellsortierung diente der Anreicherung Transfervektor-positiver Verpackungszellen und T-Zelllinien nach der Transduktion mit [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren. Verwendet wurde das Mini- und Midi-MACS-System der Firma Miltenyi-Biotec (Bergisch-Gladbach) nach den Angaben des Herstellers. Zellen, die zu 5 - 50 % das Transgen exprimierten, konnten durch ein oder zwei magnetische Zellsortierungen auf eine Reinheit von bis zu 98 % angereichert werden. Die zu sortierenden Zellen (5×10^6 für die MSTM-Säulen und 1×10^8 Zellen für die LS-Säulen) wurden abzentrifugiert und einmal in Waschpuffer (PBS, 2 % BSA, Serva, Heidelberg, 2 mM EDTA, pH 7,2, sterilfiltriert) gewaschen. Das Zellpellet wurde dann in 50 - 100 μ l Waschpuffer resuspendiert und mit 10 μ l α huNGFR (50 μ g / ml) je 5×10^6 Zellen für 30 min bei 4 °C gefärbt. Nach zwei Waschschrritten bei 4 °C wurde das Pellet wiederum in 50-100 μ l Waschpuffer resuspendiert und Rat-anti-mouse-IgG1-Beads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) für 30 min bei 4 °C zugegeben (10 μ l pro 5×10^6 Zellen). Die an den Sekundärantikörper gekoppelten Beads sind magnetisch,

wodurch Antigen-positive Zellen an den Säulen im Magnetfeld haften. Nach einem Waschschrift bei RT wurden die Zellen auf die jeweiligen Säulen (MS bzw. LS-Säulen, Miltenyi-Biotech, Bergisch-Gladbach) gegeben und zweimal mit 2 bzw. 5 ml Waschpuffer gewaschen. Für die Elution wurde die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die Zellen in 2 bzw. 5 ml Waschpuffer eluiert. Nach Abzentrifugieren (1.300 rpm, 10 min, RT, Minifuge T, Heraeus, Hanau) wurden die Zellen in Kultur genommen und nach zwei bis drei Tagen im Flow-Cytometer auf ihre Reinheit hin untersucht. Gegebenenfalls wurde eine zweite MACS-Anreicherung angeschlossen.

2.2.16.2 Durchflußzytometrische Zellsortierung (FACS)

Während die magnetische Zellsortierung nur zwischen Marker-positiven und Marker-negativen Zellen diskriminieren kann, ist es anhand der durchflußzytometrischen Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorting, FACS) möglich, Zellen auch im Hinblick auf die Expressionsstärke eines Markers zu sortieren bzw. intrazellulär fluoreszierende Zellen zu sortieren. Der Aufwand ist jedoch ungleich höher als bei der magnetischen Zellsortierung.

Die fluoreszenzaktivierte Zellsortierung wurde in dieser Arbeit verwendet, um Transfervektor-positive Zellen im Hinblick auf die Expressionsstärke von Δ LNGFR als Maß der Transgenexpression zu sortieren. Stark Δ LNGFR-exprimierende Zellen wurden aus nahezu 100 %-positiven Zellen heraussortiert. Die Färbung der Zellen erfolgte analog der Δ LNGFR-Färbung im Kapitel 2.2.15 mit dem Unterschied, dass 1×10^7 Zellen gefärbt wurden und die Zellen mit MACS-Waschpuffer gewaschen und zur Sortierung ohne Fixierung in diesem Puffer aufgenommen wurden. Die Sortierung wurde an einem MoFloTM High-Speed-Sorter (Cytomation, Freiburg) von Ann Atzberger am EMBL in Heidelberg durchgeführt.

2.2.17 p24-ELISA

In den HIV-1 Infektionskinetiken wurde die Virusmenge anhand der p24-Konzentration im Überstand der infizierten Zellkultur mit dem kommerziellen p24-IEMA (Beckmann Coulter, Krefeld) bestimmt. Die Überstände der

Infektionskinetiken wurden in Verdünnungsstufen von 1:4 bis 1 : 400.000 in RPMI verdünnt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Als Standard wurde das im Kit enthaltene p24 Antigen in 1:2 Schritten verdünnt und in folgenden Konzentrationen in Duplikaten verwendet: 7,8 / 15,6 / 31,2 / 62,5 / 125 ng / ml). Das Waschen der Mikrotiterplatten erfolgte mit dem ImmunoWash 1575 (BioRad, München), der Test wurde an einem ELISA-Reader der Firma SLT (SLT-Spectra, SLT, Crailsheim) bei 405 nm gemessen.

2.2.18 *In situ* Immunperoxidase-Test

Der IPA wurde eingesetzt, um die Expression viraler Proteine in transfizierten bzw. infizierten Zellen nachzuweisen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit kaltem Methanol (-20 °C) 30 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und Blockierungspuffer (PBS, 2 % BSA) zugegeben, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einstündiger Inkubation bei RT folgte die Zugabe des entsprechenden Antiserums. Zum Nachweis des HIV-1 Hüllproteins in Verpackungszellen diente das HIV-1 Antiserum 456 (1:1000 verdünnt in Blockierungspuffer), für den IPAP der HIV-Titrations wurde ein gepooltes anti HIV-1 Serum 1:800 verdünnt eingesetzt (beide Seren wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Norley, PEI). Nach einer Stunde wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von Meerrettichperoxydase-konjugiertem Protein G (BIO-RAD, München, 1:1000 in Blockierungspuffer) folgte die Detektion der Fc-Teile der spezifischen Immunglobuline. Die Inkubationsdauer betrug eine Stunde. Nach zwei Waschschritten folgte die Zugabe der Substratlösung (4 mg 3-Amino-9-Ethylcarbazol in 1 ml Dimethylformamid gelöst, 19 ml 20 mM NaOAc-Puffer, pH 5 und 30 µl H₂O₂). Nach ca. 15 Minuten war eine deutliche Rotfärbung bei Antigenpositiven Zellen zu erkennen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Gentransfer in humane primäre T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren

3.1.1 CCR5- und CXCR4-trope HIV-1 Hüllproteine auf [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren

Pseudotypisiert man MLV-Vektorkapside mit dem Hüllprotein des humanen Immundefizienzvirus (HIV), so vermitteln die resultierenden [MLV(HIV-1)]-Vektoren den Gentransfer spezifisch in CD4-positive Zellen. Um die Inkorporation des HIV-1 Hüllproteins in MLV-Kapside zu ermöglichen, war eine C-terminale Trunkierung des Hüllproteins erforderlich (Schnierle und Stitz *et al.*, 1997, s. Abb. 3.1.1).

Die Korezeptorspezifität von HIV-1 wird vor allem durch die V3-Region im Hüllprotein determiniert. Das HIV-1 Hüllprotein auf den bestehenden [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren wurde von dem CD4/CXCR4-tropen HIV-Stamm HIV-1_{BH10} abgeleitet (Schnierle und Stitz *et al.*, 1997). Die Vektoren werden daher im Folgenden mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})] bezeichnet. Um auch für CD4/CCR5-positive Zellen spezifische Vektoren zu generieren, wurde im HIV-1_{BH10} Env-Expressions-konstrukt pTr712 die V3-Region mit angrenzenden Bereichen gegen die entsprechende Region des CD4/CCR5-tropen HIV-1 Primärisolats MBK (Cichutek *et al.*, 1992) ausgetauscht (s. 2.1.1.2., Peter Müller, 1999).

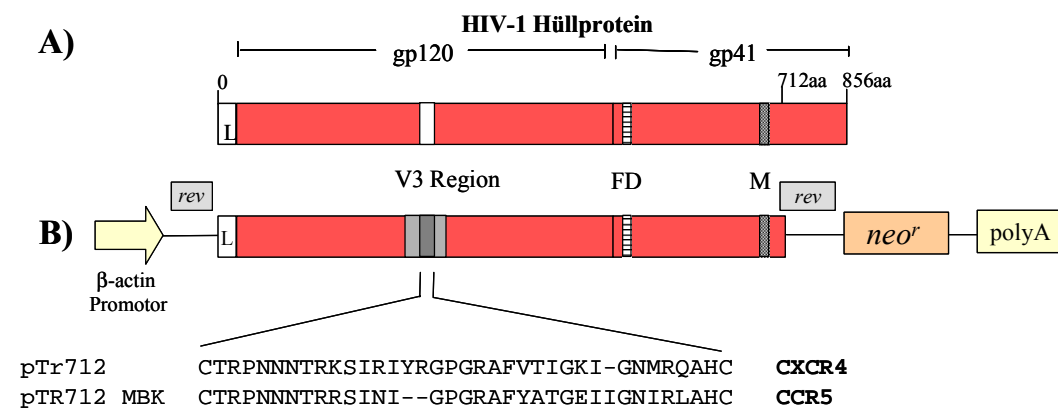
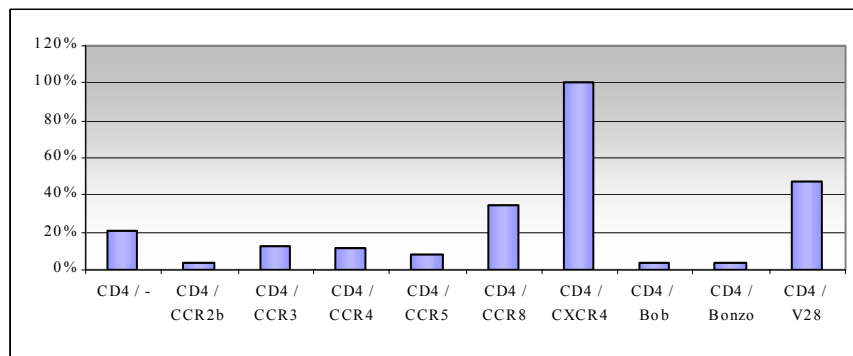


Abb. 3.1.1: Schematische Darstellung des HIV-1 Hüllproteins (A) und der davon abgeleiteten Expressionskonstrukte pTr712 und pTr712 MBK (B), sowie der jeweiligen Aminosäuresequenz der V3-Region. *neo^r*: Neomycin-Resistenzgen, FD: Fusionsdomäne, M: membrandurchspannende Domäne. Die Expressionskonstrukte kodieren ein C-terminal trunkiertes Hüllprotein und das Rev-Protein. Die C-terminale Trunkierung des HIV-1 Env erlaubt dessen Inkorporation in MLV-Partikel. pTr712: Expressionsplasmid für das C-terminal trunkierte CD4/CXC4-trope HIV-Env, pTr712 MBK: Expressionsplasmid für das CD4/CCR5-trope HIV-1 Env.

Abbildung 3.1.1 zeigt schematisch den Aufbau des HIV-1 Hüllproteins (A) und die davon abgeleiteten Expressionskonstrukte pTr712 und pTr712 MBK (B), die für C-terminal trunkierte Hüllproteine kodieren. Die jeweilige Aminosäuresequenz der V3-Regionen, die die Korezeptorspezifität der Hüllproteine determinieren, ist angegeben.

Um den Tropismus der [MLV(HIV-1_{CXC4})]-Vektoren für CD4/CXC4-positive Zellen und der [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren für CD4/CCR5-positive Zellen zu bestätigen, sind bereits entsprechende *lacZ*-kodierende Pseudotypvektoren zur Transduktion von GHOST-Zellen eingesetzt worden, die neben CD4 jeweils einen der Korezeptoren CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CCR8, CXC4, Bob, Bonzo und V28 exprimieren.

A) [MLV(HIV-1_{CXCR4})]



B) [MLV(HIV-1_{CCR5})]

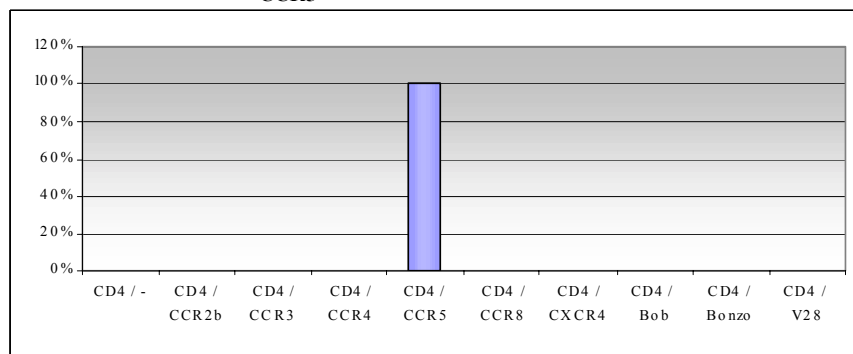


Abb. 3.1.2: Tropismus der *lacZ*-kodierenden [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren. Angegeben ist die relative Effizienz für [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- (A) und [MLV(HIV-1_{CCR5})]- (B) Pseudotypvektoren zur Transduktion der einzelnen GHOST-Zelllinien. Der maximale Titer wurde 100 % gesetzt. Stefanie Steidl, Paul Ehrlich Institut.

Benutzt man HIV-1_{BH10} Env, kodiert durch Tr712, zur Pseudotypisierung von MLV-Vektoren, so zeigten die resultierenden [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren eine Spezifität für CD4/CXCR4-positive Zellen. Eine schwache Hintergrund-Expression von CXCR4 auf GHOST-Zellen (Edinger *et al.*, 1997) bedingte, dass alle verwendeten Zelllinien in geringen Maß von den [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren transduziert wurden. Die [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren zeigten die erwartete Spezifität für CD4/CCR5-positive Zellen (Abb.3.1.2, Stefanie Steidl, Paul-Ehrlich Institut).

3.1.2 Generierung stabiler Verpackungszellen für [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren

Die in 3.1.1 beschriebenen [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren tragen *lacZ* als Reportergen im Vektor genom. Um die Transduktion primärer Zellen mittels der [MLV(HIV-1)]-Vektoren genau zu charakterisieren und zu optimieren, wurden

Vektoren generiert, die die cDNA des „Enhanced Green Fluorescent Protein“ (EGFP) anstelle von *lacZ* im Vektorgenom tragen. Dadurch konnten die transduzierten Zellen mit durchflußzytometrischen Methoden parallel auf die Transgen-, CD4- und Korezeptorexpression analysiert werden. Als verpackbares retrovirales Expressionskonstrukt diente der MgEGFP- Δ LNNGFR Vektor.

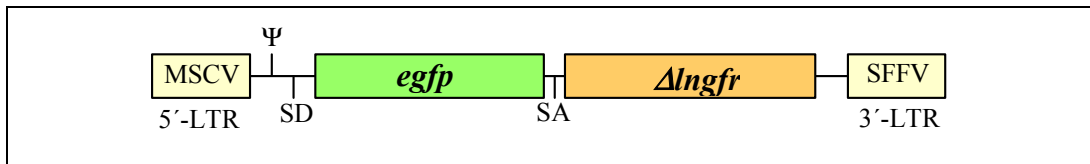


Abb. 3.1.3: Schematische Darstellung des MgEGFP Δ LNNGFR Transfervektors. SD: Spleiss-Donor, SA: Spleiss-Akzeptor, Ψ : Verpackungssignal, MSCV: Murines Stammzellvirus, SFFV: Spleen Focus Forming Virus.

Es handelt sich dabei um einen bicistronischen Vektor, der neben EGFP als zweites Reportergen den Oberflächenmarker Δ LNNGFR (C-terminal trunkierter, niedrig-affiner Nervenwachstumsfaktor Rezeptor/low-affinity nerve growth factor receptor) kodiert (Abb. 3.1.3). Von der ungespleißten mRNA wird EGFP gebildet, von der einfach gespleißten mRNA wird Δ LNNGFR abgelesen. Die 3'-LTR des Spleen Focus Forming Virus (SFFV) dient nach Integration des Transfervektors in die genomische DNA der transduzierten Zelle als Promotor. Für zukünftige gentherapeutische Anwendungen kann der *egfp*-Leserahmen durch therapeutische Gene ersetzt werden (s. Kapitel 3.2.1).

Um die Herstellung größerer Mengen [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren zu ermöglichen, wurden stabile Verpackungszelllinien durch Einzelzellklonierung etabliert. Hierzu wurde die *env*-negative, MLV*gag/pol*- und MgEGFP Δ LNNGFR Transfervektor-positive Zelllinie TECeB15 EGFP mit 3 μ g des HIV-1 Env-Expressionsplasmids pTr712 MBK, das ein Neomycin-Resistenzgen kodiert, mittels Lipofektion transfiziert. Durch anschließende G418-Selektion wurden Zellklone etabliert, die nach Expansion in 24-Lochplatten auf die Env-Expression untersucht wurden. Im Immunperoxidase-Assay zeigten die einzelnen Klone eine unterschiedliche Zahl HIV-1 Env-positiver Zellen sowie eine unterschiedlich starke Expression des HIV-1 Hüllproteins auf den positiven Zellen (Abb. 3.1.4).

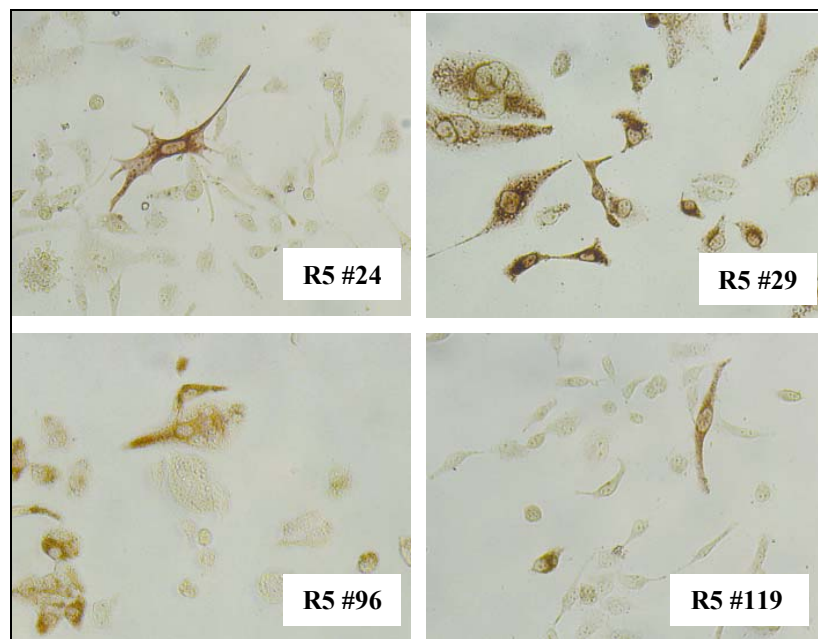


Abb. 3.1.4: Nachweis der Expression des HIV-1 Hüllproteins in den [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Verpackungszellklonen durch Immunperoxidase-Färbung. Dargestellt ist die Anfärbung von vier Klonen mit einem HIV-1⁺ Serum (#456).

Danach wurden die Klone auf die Bildung infektiöser Vektorpartikel hin untersucht. Hierzu wurde der Überstand der einzelnen Klone auf GHOST CCR5-Zellen titriert. Zwei Tage nach der Transduktion wurde die Δ LNGFR-Expression im FACS untersucht. Von 150 getesteten Klonen bildeten 5 % detektierbare Vektormengen. Der Vektortiter lag zwischen 1×10^4 und 2×10^5 i.E. / ml. Der Verpackungszellklon R5#96 produzierte mit 2×10^5 i.E. / ml den höchsten Titer. Das Maß der Expression des trunkierten HIV-1 Hüllproteins korrelierte nicht mit der Menge produzierter Pseudotypvektoren, z.B. wies der Klon R5 #29 eine stärkere Env-Expression auf, produzierte aber weniger infektiöse Vektorpartikel ($1,3 \times 10^4$ i. E. / ml) als Klon R5 #96.

Ein Verpackungszellklon für [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren (Klon X4#53) wurde analog durch Transfektion von TECeB15 EGFP Zellen mit pTr712 und anschließender Einzelzellklonierung hergestellt (Stefanie Steidl, Paul Ehrlich Institut). Der [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Verpackungszellklon #53 produzierte Pseudotypvektoren mit einem Titer von 5×10^5 i.E. / ml nach Titration auf GHOST CXCR4-Zellen.

Um die [MLV(HIV-1)]-Vektoren mit den häufig zur Transduktion primärer Blutlymphozyten verwendeten [MLV(GaLV)]-Vektoren zu vergleichen, wurde eine stabile Verpackungszelllinie für [MLV(GaLV)]-Vektoren etabliert, die ebenfalls den MgEGFP Δ LNNGFR-Transfervektor enthält (Abb. 3.1.5). Hierzu wurde die Zelllinie PG13 verwendet, die bereits Expressionskonstrukte für MLVgag/pol und GaLVenv enthält (Miller *et al.*, 1991). Da sich PG13-Zellen nicht effizient transfizieren ließen, wurden die Zellen mit transient generierten [MLV(MLV10A1)]-Vektoren transduziert. Dies hatte zudem den Vorteil, dass in den transduzierten PG13-Zellen der Transfervektor direkt im Genom integriert vorlag.

Durch Transfektion des MgEGFP Δ LNNGFR-Transfervektors und eines Expressionsvektors für das MLV10A1-Hüllprotein (pALF 10A1) in die MLVgag/pol-positive Zelllinie Phoenix-gp wurden zunächst transient [MLV(MLV10A1)]-Pseudotypvektoren generiert, die den Transfervektor MgEGFR Δ LNNGFR als Vektorgenom tragen. Die [MLV(MLV10A1)]-Pseudotypvektoren wurden zwei Tage nach der Transfektion geerntet und zur Transduktion der PG13-Zellen eingesetzt, um den Transfervektor MgEGFP Δ LNNGFR stabil in die Zellen einzubringen. Transfervektorpositive PG13-Zellen wurden zwei Tage nach der Transduktion mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) auf eine Reinheit von 95-98 % Δ LNNGFR-exprimierender Zellen angereichert. Hierzu wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen den humanen NGFR angefärbt und anschließend mit einem magnet-konjugierten anti-Maus-IgG1-Zweitantikörper markiert. Diese PG13 EGFP-Mischkultur produzierte Vektorpartikel mit einer Konzentration von $6,5 \times 10^6$ i.E. / ml Zellkulturüberstand.

Die Abbildung 3.1.5 zeigt eine schematische Darstellung der etablierten Verpackungszellen für [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren.

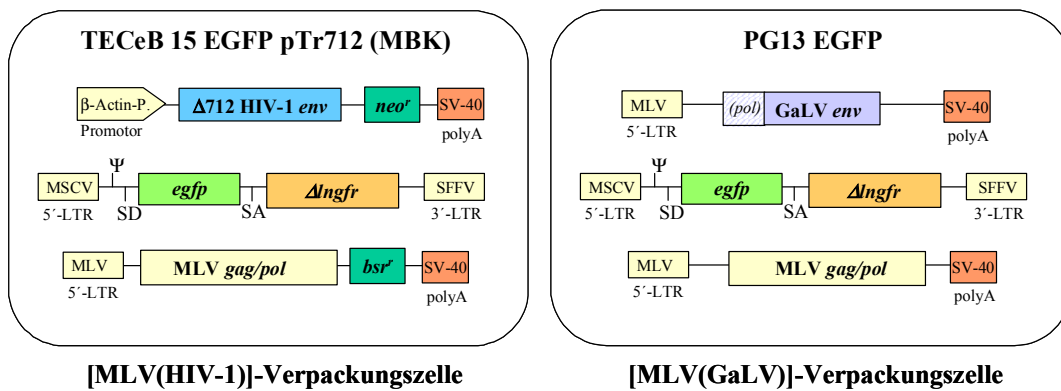


Abb. 3.1.5: Schematische Darstellung der Verpackungszelllinien für [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren. Die [MLV(HIV-1)]-Verpackungszelllinien TECeB15 EGFP pTr712 bzw. pTr712 MBK basieren auf der humanen Rhabdomyosarkomlinie TE671. Als HIV-1 Env-Expressionskonstrukt enthalten [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Verpackungszellen das Konstrukt pTr712, Verpackungszellen für [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren enthalten das Plasmid pTr712 MBK (Abb. 3.1.1 B). Die Verpackungszelllinie für [MLV(GaLV)]-Vektoren, PG13 EGFP, ist von der murinen embryonalen Fibroblastenlinie NIH 3T3 abgeleitet. *neo^r*: Neomycin-Resistenzgen, *bsr^r*: Blasticidin-Resistenzgen, SD: Spleiss-Donor, SA: Spleiss-Akzeptor, Ψ: Verpackungssignal.

3.1.3 Die Korezeptorspezifität der [MLV(HIV-1)]-Vektoren

Nachdem die Korezeptorspezifität für *lacZ*-übertragende [MLV(HIV-1)]-Vektoren schon gezeigt worden war (Abb. 3.1.2), sollte sie für die *egfp*-übertragenden [MLV(HIV-1)]-Vektoren bestätigt und diese mit den [MLV(GaLV)]-Vektoren verglichen werden. Hierzu wurden die drei verschiedenen Pseudotypvektoren auf GHOST Parental (CD4-positiv), GHOST CXCR4 (CD4/CXCR4-positiv) und GHOST CCR5 (CD4/CCR5-positiv) Zellen titriert. Zwei Tage nach der Transduktion erfolgte die Auswertung durch Färbung der GHOST-Zellen auf den Oberflächenmarker ΔLNGFR und die anschließende FACS-Analyse der Zellen (Abb. 3.1.6).

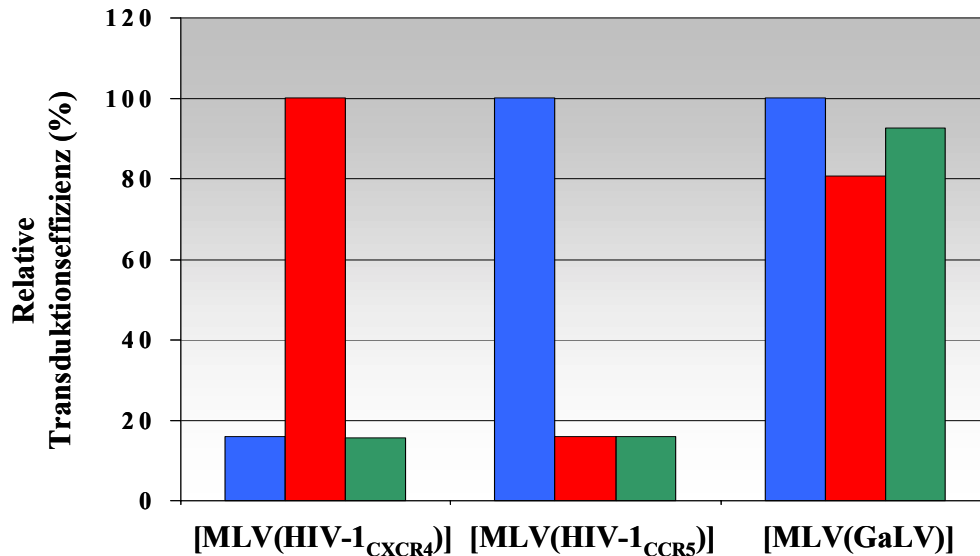


Abb. 3.1.6: Die Korezeptorspezifität von [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Vergleich zu [MLV(GaLV)]-Vektoren. Angegeben ist die relative Transduktionseffizienz in Prozent Δ LNDR-positiver GHOST-Zellen bezogen auf den Wert der jeweils höchsten Transduktionseffizienz eines Pseudotypvektors, der 100 % gesetzt wurde. Relative Transduktionsraten auf GHOST Parental (grün), GHOST CXCR4 (rot) und GHOST CCR5 (blau).

Die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- Pseudotypvektoren zeigten bei Titration auf GHOST-Zellen eine hohe Spezifität für GHOST CXCR4-Zellen, die Transduktionseffizienz auf GHOST Parental- und GHOST CCR5-Zellen war signifikant niedriger. Dagegen transduzierten die [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren spezifisch GHOST CCR5-Zellen. Im Vergleich zu den *lacZ*-kodierenden Vektoren (Abb. 3.1.2) zeigten die *egfp*-kodierenden [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren einen höheren Hintergrund auf den GHOST-Parental und GHOST CXCR4. Im Gegensatz zu den beiden [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren transduzierten die [MLV(GaLV)]-Vektoren alle drei GHOST Zelltypen unabhängig von der Korezeptorexpression mit etwa der gleichen Effizienz.

3.1.4 Konzentrierung der Pseudotypvektoren zur Generierung höherer Vektortiter

Um die Vektorkonzentration zu erhöhen wurde versucht, die Zellkulturüberstände der Verpackungszellen mittels Ultrazentrifugation aufzukonzentrieren. Zunächst wurden die Verpackungszellen über Nacht in Medium mit 10 mM Natriumbutyrate kultiviert. Für amphotrope Vektoren ist eine Erhöhung des Vektortiters nach Natriumbutyratezugabe beschrieben (Olsen und Sechelski, 1995). Am nächsten

Morgen wurden die Vektoren in der Ultrazentrifuge pelletiert und in einem geringen Volumen X-Vivo Medium ohne Zusätze resuspendiert (s. 2.2.7). Die Vektorstocks wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, ein Aliquot wurde zur Titration auf A3.01 CCR5 T-Zellen eingesetzt.

Zelllinie	Vektor	Nativer Titer [i.E. / ml]	Titer nach UZ [i.E. / ml]	Ausbeute
TECeB15 EGFP pTr712 Klon #53	[MLV(HIV-1 _{CXCR4})]	$7,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7$	12,6 %
TECeB15 EGFP pTr712 MBK Klon #96	[MLV(HIV-1 _{CCR5})]	$6,3 \times 10^5$	$2,2 \times 10^7$	16,9 %
PG13 EGFP	[MLV(GaLV)]	$6,5 \times 10^5$	$3,3 \times 10^6$	2,5 %

Tab. 3.1.1: Vektortiter nach Anreicherung durch Ultrazentrifugation. Aus 35 ml nativem Zellkulturüberstand wurden die Pseudotypvektoren pelletiert und in 150 μl X-Vivo resuspendiert (230-fache Ankonzentrierung). Die Ausbeute der tatsächlich wiedergefundenen infektiösen Vektorpartikel ist angegeben.

Für [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren gelang es, Überstände mit einem nativen Titer von $6-7 \times 10^5$ i.E. / ml bei einer Volumenreduktion um den Faktor 230 auf einen Titer von bis zu 2×10^7 i.E. / ml zu konzentrieren (Tabelle 3.1.1). Die Wiedergewinnungsrate lag bei 12,6 % für [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren bzw. 16,9 % für [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren. Dagegen ließen sich [MLV(GaLV)]-Vektoren durch Ultrazentrifugation nur geringfügig anreichern. Der Vektortiter stieg von $6,5 \times 10^5$ nur auf $3,3 \times 10^6$ i. E. / ml bei einer Volumenreduktion um Faktor 230. Nur 2,5 % der pelletierten Vektoren konnten dabei wiedergewonnen werden bzw. vermittelten nach der Ultrazentrifugation noch Infektiösität.

3.1.5 Gentransfer in primäre humane CD4-positive PBL mittels [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren

3.1.5.1 CD4- und Korezeptor-Expression auf primären T-Lymphozyten unter verschiedenen Stimulationsbedingungen

Bevor die der Effizienz von [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren zur Transduktion CD4-positiver primärer Blutlymphozyten (PBL) bestimmt wurde, wurde zunächst der Anteil CD4- bzw. CD8-positiver T-Zellen (Abb. 3.1.8) und das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 auf den CD4-positiven Zellen (Abb. 3.1.9) gemessen, um den Prozentsatz potentieller Zielzellen für die [MLV(HIV-1)]-Vektoren zu ermitteln.

Für einen *ex-vivo* Gentransfer in CD4-positive Zellen ist es zudem wünschenswert, dass der Phenotyp der Zellen bezogen auf das Expressionsmuster der Korezeptoren möglichst der Situation im Vollblut entspricht, damit nach der Transduktion keine stark veränderte Zellpopulation reinfundiert wird. Daher wurde das CD4/CD8-Verhältnis und das Expressionsmuster der Korezeptoren auf den CD4-Zellen bei zwei üblichen Stimulationsprotokollen mit den Werten im Vollblut verglichen.

Aus Citratblut von drei Spendern wurde mit monoklonalen Antikörpern eine Färbung auf CD4, CD8 und die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 durchgeführt. Die Lymphozytenpopulation wurde über eine CD3-Färbung identifiziert. Parallel wurden aus dem verbleibenden Blut primäre mononukleäre Blutzellen (PBMC) durch Ficollgradientenzentrifugation (s. 2.2.4.) aufgereinigt und nach zwei verschiedenen Protokollen stimuliert. In einem Ansatz wurden die Zellen für 72 Stunden mit IL-2 und PHA stimuliert, in einem zweiten Ansatz wurde das IL-2 / PHA-Medium nach 24 Stunden durch Medium mit IL-2 ohne PHA ersetzt und die Zellen anschließend für zwei weitere Tage kultiviert. Nach 72 h bestand die Zellpopulation in beiden Fällen zu 80-95 % aus T-Zellen, was durch Färbung des T-Zell-Markers CD3 bestätigt wurde (nicht gezeigt).

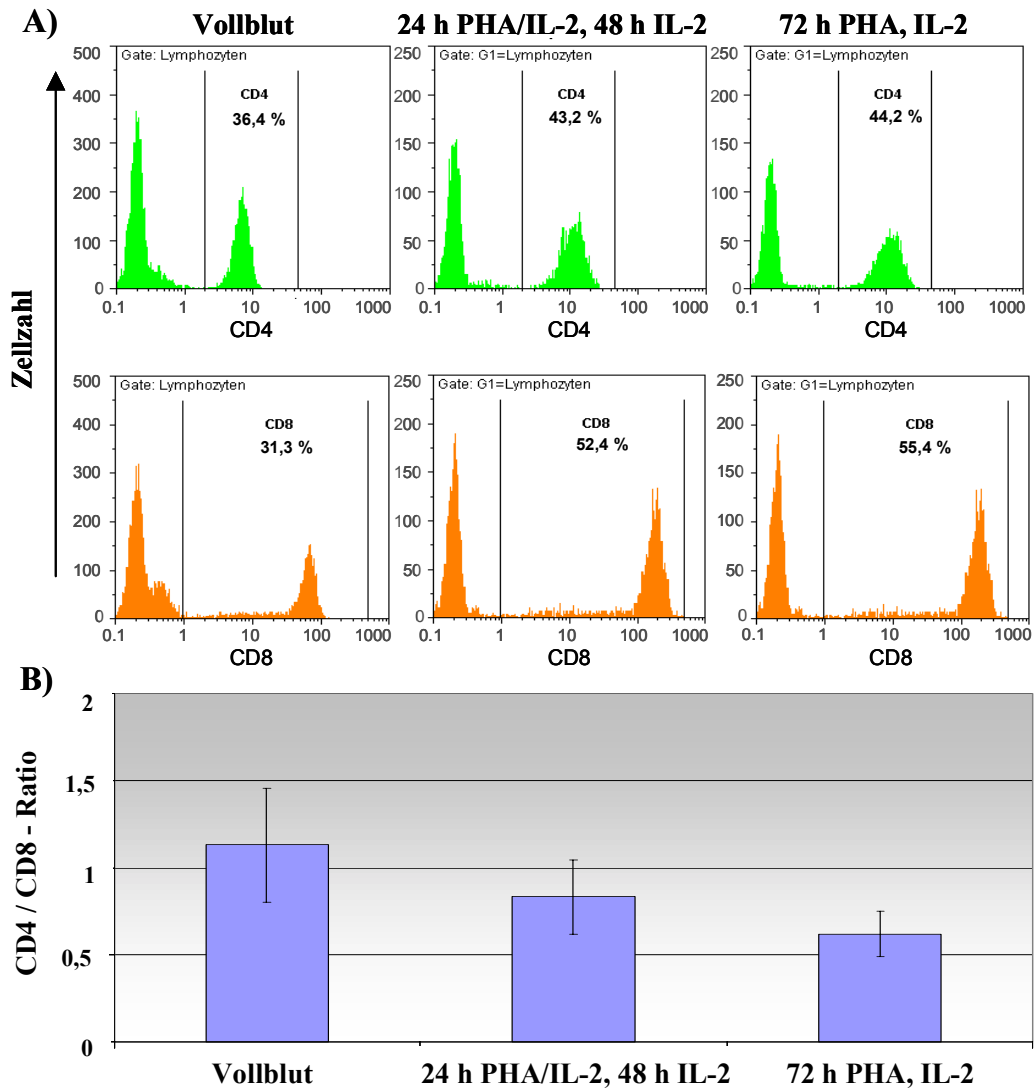


Abb. 3.1.7 CD4- und CD8-Expression auf primären Blutlymphozyten im Vollblut und nach Stimulation der Lymphozyten mit PHA/IL-2. (A) Das CD4/CD8-Verhältnis wurde durch FACS-Analyse im Vollblut und nach unterschiedlich langer Stimulation mit PHA in IL-2 Medium bestimmt. Exemplarisch sind die FACS-Daten eines Donors gezeigt. (B) Angegeben ist der Quotient aus dem Prozentsatz der CD4- und CD8-positiven T-Zellen. Aus PBL von drei Donoren ist der Mittelwert dargestellt.

Betrachtet man die CD4- und CD8-Expression auf primären Lymphozyten im Vollblut, so bestand diese Population je nach Donor zu 35-60 % aus CD4-positiven/CD8-negativen und zu 30-55 % aus CD8-positiven/CD4-negativen T-Zellen (Abb. 3.1.7 B). Dabei war zu erkennen, dass nach dreitägiger Stimulation das CD4/CD8-Verhältnis in den für 72 h mit IL-2 und PHA stimulierten Kulturen niedriger war als in den 24 h PHA/IL-2 und 48 h IL-2 stimulierten Kulturen. Somit steigt bei der Stimulierung der Prozentsatz CD8-positiver T-Zellen an, der Anteil CD4-positiver T-Zellen nimmt entsprechend ab.

Neben dem CD4-Expressionsmuster nach Stimulation wurde auch die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 nach unterschiedlich langer Stimulation mit PHA in IL-2 Medium mit den entsprechenden Werten im peripheren Blut verglichen (Abb. 3.1.8).

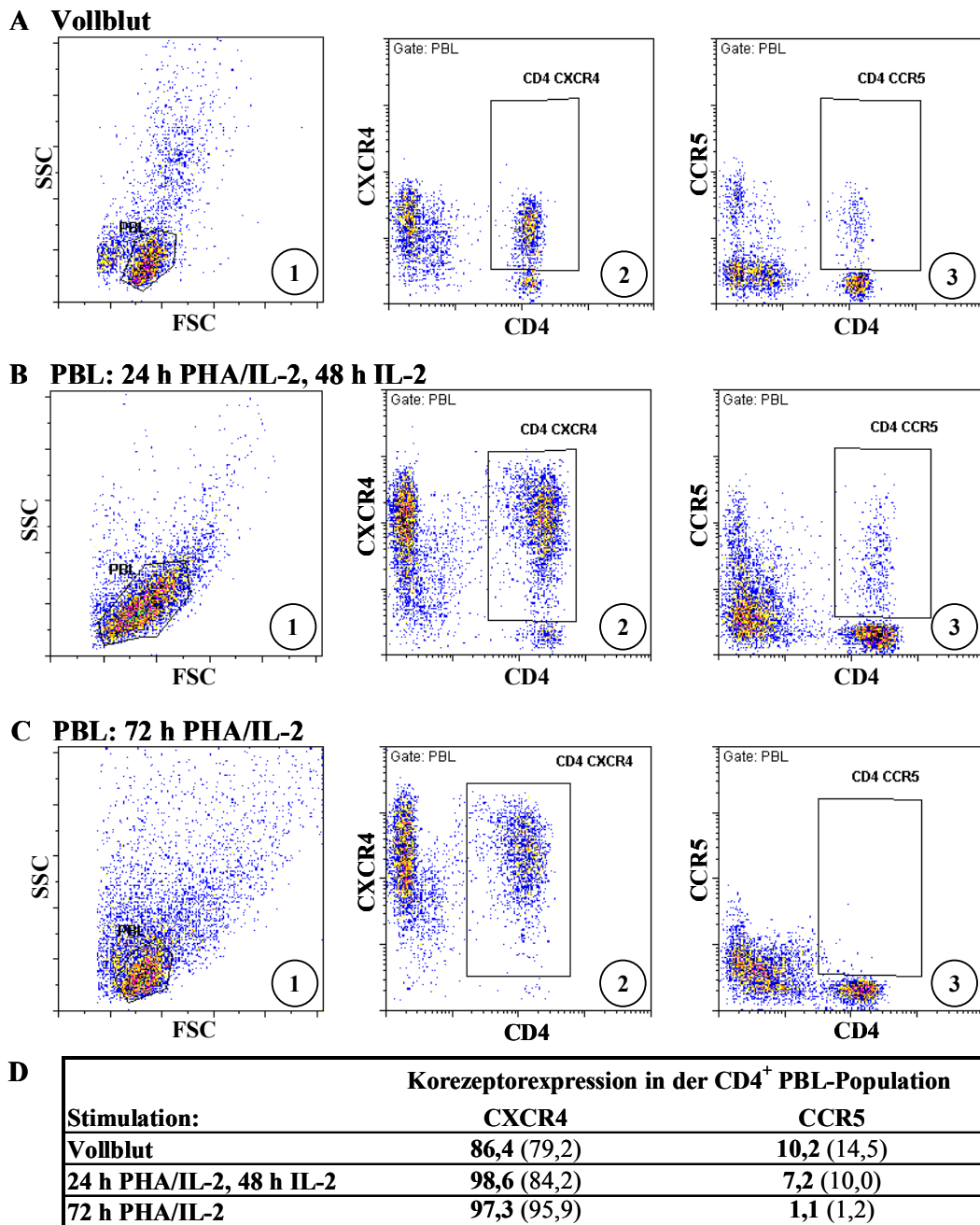


Abb. 3.1.8: Expression von CXCR4 und CCR5 auf Zellen im peripheren Blut und nach unterschiedlicher Stimulation mit PHA / IL-2. Exemplarische Darstellung der Färbungen von PBL eines Donors. (A) Färbungen aus Vollblut, (B) nach 24 h PHA/IL-2 Stimulation und anschließender Kultivierung für 48 h in IL-2 Medium ohne PHA, (C) nach 72 h PHA-Stimulation. (D) Prozentsatz korezeptorpositiver Zellen in der CD4-positiven Population. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Donoren und in Klammern die entsprechenden Werte des in A-C gezeigten Donors.

Der Prozentsatz CXCR4-positiver CD4-positiver T-Zellen im Vollblut der verschiedenen Spender lag im Mittel bei 86 % (Abb. 3.1.8, D), nach dreitägiger Stimulation stieg der Anteil in der Regel auf 97 % der CD4-positiver T-Zellen. Der Anstieg in der Fluoreszenzintensität der CXCR4-Färbung (Abb. 3.1.8, A2, B2, C2, Verschiebung der Population in Richtung der y-Achse) deutete zudem auf eine höhere Korezeptordichte auf den stimulierten Zellen im Vergleich zum Vollblut hin. Der Chemokinrezeptor CCR5 wurde im Vollblut auf 2-15 % der CD4-positiven T-Zellen exprimiert. Bei 72 stündiger PHA/IL-2 Stimulation fiel der Prozentsatz unter 3 % ab, im Mittel lag er bei nur ca. 1 %. Wurde die Stimulation mit PHA und IL-2 auf 24 Stunden verkürzt und die Zellen anschließend für weitere 48 Stunden in IL-2 Medium kultiviert, so waren 2-10 % der CD4-positiven Lymphozyten CCR5-positiv (Abb. 3.1.8, A3, B3 und C3).

Die Stimulation der Lymphozyten mit PHA und IL-2 für 24 h mit anschließender 48-stündiger Kultivierung in IL-2 Medium erwies sich in zweierlei Hinsicht als günstiger als die 72-stündige Stimulation mit PHA und IL-2. Zum Einen nahm der Anteil CD4-positiver Lymphozyten bei dieser Stimulationsmethode weniger stark ab, so dass das CD4/CD8-Verhältnis in den stimulierten Lymphozyten der im peripheren Blut besser entsprach. Zum Anderen war nach 72-stündiger Stimulation mit PHA und IL-2 der Korezeptor CCR5 kaum noch auf CD4-positiven T-Zellen nachweisbar. Wurden die Zellen nach 24 Stunden in PHA-freies IL-2 Medium überführt, sank die Zahl CCR5-positiver CD4-T-Zellen weniger stark ab. Der Anteil CXCR4/CD4-positiver T-Zellen war bei beiden Stimulationsmethoden vergleichbar. Für die nachfolgenden Versuche zur Transduktion mit [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren wurden die Zellen daher für 24 h mit PHA/IL-2 und anschließend für weitere 48 Stunden mit IL-2 stimuliert.

3.1.5.2 CD4-Spezifität der Vektoren bei der Transduktion humaner peripherer Blutlymphozyten (PBL)

Die CD4-Spezifität der [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Vergleich mit den [MLV(GaLV)]-Vektoren wurde bei der Transduktion primärer T-Zellen untersucht. Die Transduktion der stimulierten primären T-Zellen dreier Donoren erfolgte auf Retronektin-beschichteten 48-Loch-Platten. 5×10^4 PBL wurden je Vertiefung ausgesät. Der vektorhaltige Überstand wurde auf eine Konzentration von 1×10^4 i.E. / ml eingestellt. Jeweils 500 μ l Vektorüberstand (5×10^3 i.E.) mit IL-2 und Protaminsulfat wurden in die Vertiefungen der 48-Loch-Platte zur Zellsuspension gegeben. Dies entsprach einer m.o.i. („multiplicity of infection“) von 0,1. Fünf Tage nach der Transduktion wurde die EGFP- und CD4-Expression der Zellen im FACS untersucht.

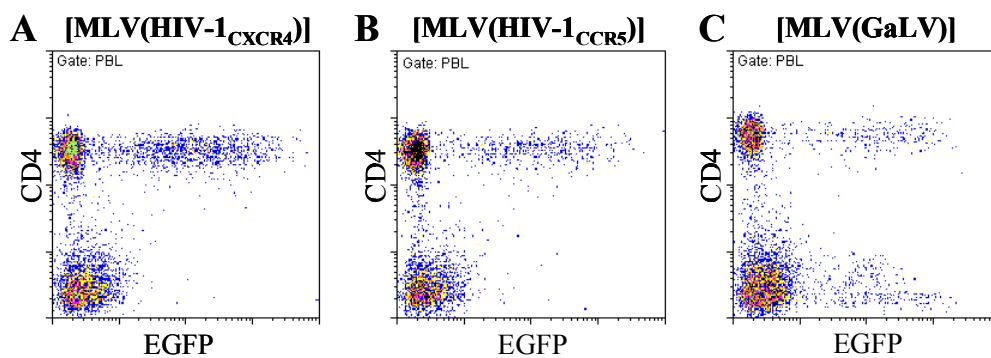


Abb. 3.1.9: CD4-Spezifität der Transduktion primärer Lymphozyten durch [MLV(HIV-1)] Pseudotypvektoren am Beispiel eines Donors. Darstellung der EGFP- und CD4-Expression in PBL nach Transduktion mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- (A), [MLV(HIV-1_{CCR5})]- (B) und [MLV(GaLV)]-Vektoren (C).

Sowohl die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- als auch die [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Pseudotypvektoren transduzierten in stimulierten peripheren Blutlymphozyten spezifisch CD4-positive Zellen, während die [MLV(GaLV)]-Vektoren sowohl CD4-positive, als auch CD4-negative PBL transduzierten. In Abbildung 3.1.9 sind exemplarisch die FACS-Daten eines Donors dargestellt, die Transduktionsdaten der zwei weiteren Donoren zeigten ebenfalls eine strikt CD4-spezifische Transduktion durch beide [MLV(HIV-1)]-Vektoren und eine bezogen auf die CD4-Population unspezifische Transduktion durch die [MLV(GaLV)]-Vektoren.

Die Effizienz der drei Pseudotypvektoren für den Gentransfer in CD4-positive primäre T-Zellen wurde im Kapitel 3.1.6 untersucht.

3.1.5.3 Analyse der Korezeptorspezifität von [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren bei der Transduktion primärer Lymphozyten

Durch Färbung der Zellen auf CD4 und CXCR4 bzw. CD4 und CCR5 konnte die EGFP-Expression in den transduzierten Zellen für die einzelnen Korezeptor-exprimierenden CD4-Populationen untersucht werden.

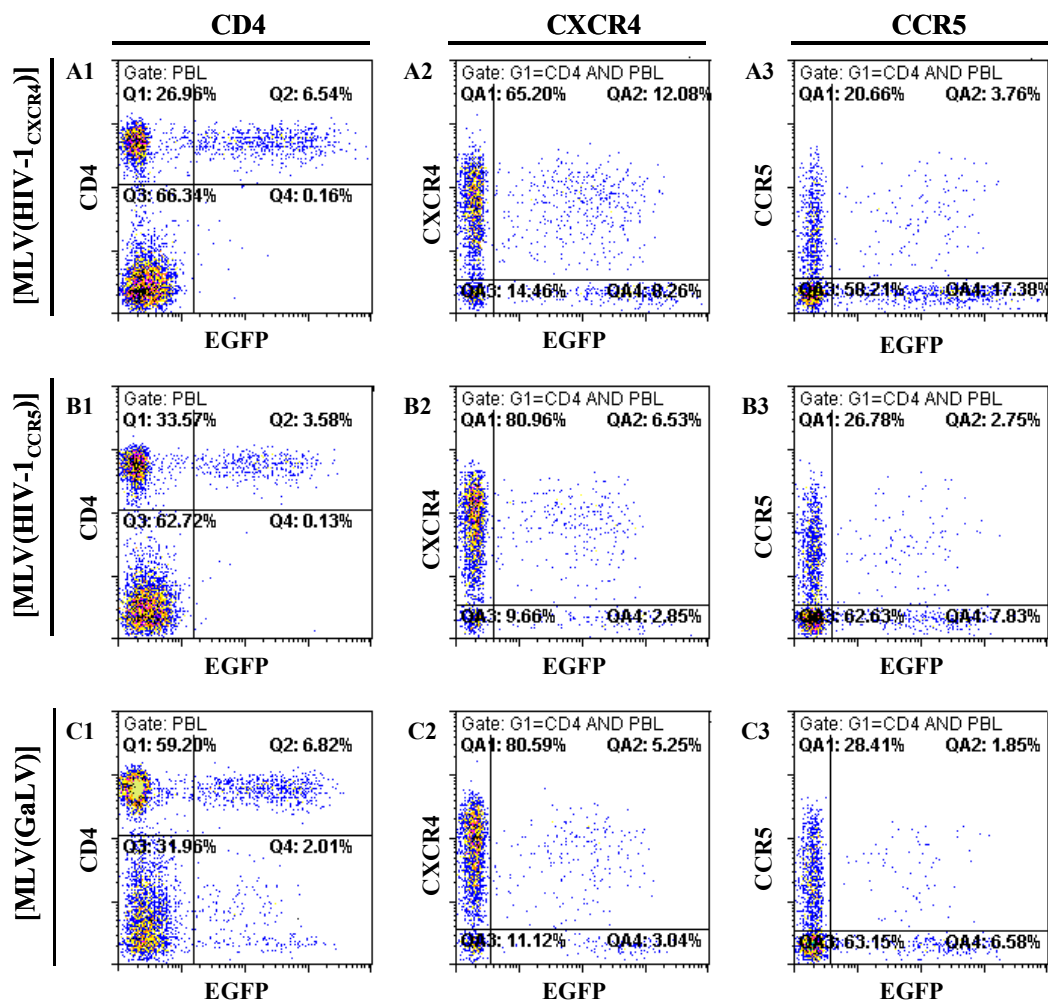


Abb. 3.1.10: Verteilung der EGFP-positiven transduzierten PBL in den CD4-, CD4/CXCR4- und CD4/CCR5-positiven PBL-Populationen. A-C: Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Messungen eines Donors. A: nach Transduktion mit [MLV(HIV-1)_{CXCR4}]-Vektoren, B: nach Transduktion mit [MLV(HIV-1)_{CCR5}]-Vektoren, C: nach Transduktion mit [MLV(GaLV)]-Vektoren. Die Daten in der zweiten und dritten Spalte zeigen Verteilung der Korezeptor- und EGFP-Expression in der CD4-positiven Population. In Tab. 3.1.2 sind die Daten der Korezeptorexpression auf den transduzierten Zellen aller drei untersuchten Donoren aufgeführt.

Die Transduktion durch [MLV(HIV-1)]-Vektoren (Abb. 3.1.10 A1 und B1) war im Gegensatz zu den [MLV(GaLV)]-Vektoren (C1) wie erwartet strikt CD4-abhängig. Hingegen waren die mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren transduzierten CD4-positiven PBL fünf Tage nach der Transduktion nicht alle CXCR4-positiv (Abb. 3.1.10, A2) und die mit [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren transduzierten PBL nur zu einem geringen Prozentsatz CCR5-positiv (Abb. 3.1.10, B3). In Tabelle 3.1.2 sind die Daten der einzelnen drei Donoren aufgeführt. Angegeben ist der Anteil der transduzierten CD4-Zellen, der im FACS positiv bzw. negativ für den jeweiligen Korezeptor CXCR4 oder CCR5 war.

Vektor	Donor	CXCR4 - positiv	CXCR4 - negativ	CCR5 - positiv	CCR5 - negativ
(Prozentsatz in den transduzierten CD4-positiven Zellen)					
[MLV(HIV-1 _{CXCR4})]	Donor 1	64,54	34,46	13,91	86,09
	Donor 2	73,38	26,62	22,72	77,28
	Donor 3	76,63	23,37	17,46	82,54
	Mittelwert	71,85	28,15	18,03	81,97
[MLV(HIV-1 _{CCR5})]	Donor 1	70,24	29,76	10,60	89,40
	Donor 2	79,56	20,44	32,83	67,17
	Donor 3	75,31	24,69	19,92	80,08
	Mittelwert	75,04	24,96	21,12	78,88
[MLV(GaLV)]	Donor 1	56,41	43,59	7,88	92,12
	Donor 2	61,21	38,79	21,99	78,01
	Donor 3	55,31	44,69	12,37	87,63
	Mittelwert	57,64	42,36	14,08	85,92

Tab. 3.1.2: Korezeptorexpression auf den transduzierten CD4-Zellen. Angegeben ist der Anteil der Zellen in der Population der transduzierten (EGFP-positiven) CD4-Zellen, der die Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 exprimiert bzw. nicht exprimiert (5 Tage nach der Transduktion).

Während die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren die verschiedenen GHOST-Zelllinien korezeptorspezifisch transduzierten (Abb. 3.1.6), zeigten die transduzierten PBL fünf Tage nach der Transduktion nicht die Korezeptorexpression, die der Spezifität der [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren entsprochen hätte. Möglicherweise ist diese Beobachtung durch eine Veränderung der Korezeptorexpression nach der Transduktion zu erklären: Da die Expression der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 stark reguliert und nicht wie die CD4-Expression konstitutiv ist, könnte sich deren Expressionsmuster bei der Kultivierung vor, während und nach der Transduktion verändert haben. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurde am Tag der Transduktion und fünf Tage nach

der Transduktion die CD4-, CXCR4- und CCR5-Expression auf den PBL bestimmt und miteinander verglichen (Tab. 3.1.3). Der Prozentsatz korezeptorpositiver CD4-Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion entsprach tatsächlich nicht dem Prozentsatz zum Zeitpunkt der FACS-Färbung und Auswertung fünf Tage nach der Transduktion.

Population	Donor	Transduk- tionstag	Fünf Tage nach der Transduktion durch die Vektoren:		
			[MLV(HIV-1 _{CXCR4})]	[MLV(HIV-1 _{CCR5})]	[MLV(GaLV)]
CXCR4- positive CD4-Zellen	Donor 1	93,40	73,27	76,73	81,83
	Donor 2	88,56	78,47	88,04	86,70
	Donor 3	78,98	83,31	83,20	87,20
	Mittelwert	86,98	78,35	82,66	85,24
CCR5- positive CD4-Zellen	Donor 1	7,26	19,25	14,72	15,45
	Donor 2	9,91	24,76	29,76	30,67
	Donor 3	9,52	23,50	23,93	27,82
	Mittelwert	9,72	24,13	22,80	24,65

Tab. 3.1.3: Expression der Korezeptoren auf CD4-positiven T-Zellen. Angegeben ist der Prozentsatz der CXCR4- bzw. CCR5-exprimierenden CD4-positiven T-Zellen zum Zeitpunkt der Transduktion und fünf Tage nach der Transduktion mit den drei Pseudotypvektoren.

Der Prozentsatz CXCR4-positiver CD4-Zellen veränderte sich bei den drei Donoren unterschiedlich. Bei Donor 1 sank er nach der Transduktion bei allen drei Pseudotypen ab, bei Donor 2 nur nennenswert nach Transduktion mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren. Dagegen lag der Prozentsatz CXCR4-positiver CD4-Zellen bei Donor 3 fünf Tage nach der Transduktion mit allen drei Pseudotypvektoren um bis zu 9 % höher als am Tag der Transduktion. Es ist somit keine einheitliche Tendenz der CXCR4-Expression nach Transduktion mit bestimmten Vektoren erkennbar. Unter Umständen ist die Regulation der CXCR4-Expression während der Kultivierung donorabhängig.

Für die CCR5-Expression auf den CD4-positiven Lymphozyten nach der Transduktion zeigte sich bei allen drei Donoren eine einheitliche Tendenz. Der Prozentsatz CCR5-positiver CD4-Zellen nahm nach Transduktion mit allen drei Pseudotypvektoren zu (um 7 % bis 20 %). Es ist zu vermuten, dass die CCR5-Expression auf den CD4-positiven T-Zellen im Verlauf der Kultivierung zwischen Transduktion und Auswertung unabhängig vom eingesetzten Vektor reguliert wird.

Aufgrund dieser Veränderungen in der Korezeptorexpression nach der Transduktion konnte die Korezeptorspezifität der Vektoren für primäre T-Zellen nicht bestimmt werden.

3.1.6 Vergleich der Transduktionseffizienzen von [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-, [MLV(HIV-1_{CCR5})]- und [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren für humane CD4-positive PBL

[MLV(HIV-1)]-Vektoren wurden im Hinblick auf die Effizienz der Transduktion CD4-positiver primärer T-Zellen sowohl untereinander, als auch mit den bisher häufig in klinischen Studien verwendeten [MLV(GaLV)]-Vektoren verglichen.

Von drei Donoren wurden PBMC isoliert, für 24 h mit PHA/IL-2 stimuliert und anschließend in IL-2 Medium kultiviert. Nach drei Tagen wurden je 5×10^4 PBL mit einer m.o.i. von 0,1 transduziert. Die Auswertung der Transduktionseffizienz in Gesamt-PBL und CD4-positiven T-Zellen erfolgte fünf Tage nach der Transduktion am Durchflusszytometer (Abb. 3.1.11).

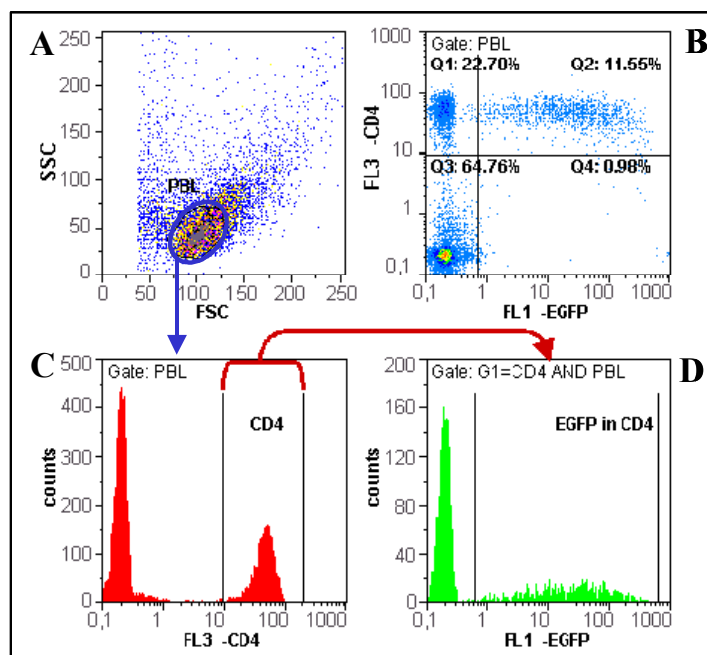


Abb. 3.1.11: Auswertung der PBL-Transduktion am Durchflusszytometer. Als Beispiel ist die Auswertung nach Transduktion mittels [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren dargestellt. A: zunächst wurde das PBL-Gate festgelegt. B: nach Transduktion mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren exprimierten in der PBL-Population nur CD4-positive Zellen EGFP. C: innerhalb der PBL-Population wurde ein Gate um die CD4-positiven Zellen gesetzt. D: Der Prozentsatz transduzierter, EGFP-positiver CD4-Zellen wurde durch Kombination des PBL- und CD4-Gates bestimmt (A und C).

Die Transduktionsrate der CD4-positiven Population wurde durch CD4-Färbung der Zellen bestimmt. Der Prozentsatz EGFP-positiver, ungefärbter Zellen ergab den Prozentsatz transduzierter Gesamt-PBL.

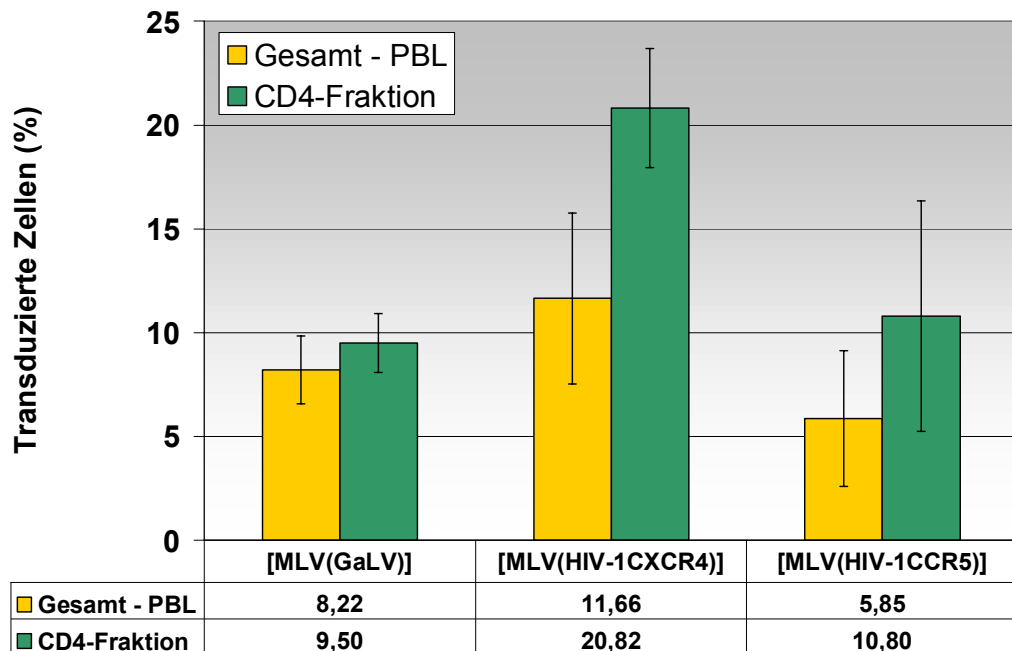


Abb. 3.1.12: Transduktionseffizienz der Vektoren für Gesamt-PBL und der CD4-positiven Population. Aufgetragen ist der Mittelwert von drei Donoren bei einer m.o.i. von 0,1.

Die [MLV(GaLV)] Vektoren zeigten mit 8,2 % bzw. 9,5 % eine etwa gleich hohe Transduktionseffizienz in Gesamt-PBL und der CD4-positiven Population. [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Pseudotypvektoren zeigten im Mittel eine Transduktionseffizienz von etwa 12 % auf Gesamt-PBL. Die große Standardabweichung bei der Transduktionseffizienz von [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren in Gesamt-PBL ist durch den unterschiedlichen prozentualen Anteil CD4-positiver PBL der einzelnen Donoren bedingt. In der CD4-positiven Population erreichten [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren eine Transduktionsrate von 20 %, sie war somit verglichen mit den [MLV(GaLV)]-Vektoren um mehr als Faktor 2 höher. Die [MLV(HIV-1_{CCR5})] Pseudotypvektoren erreichten bezogen auf Gesamt-PBL entsprechend dem geringen prozentualen Anteil an CD4-/CCR5-positiven Zellen mit etwa 6 % die niedrigste Transduktionseffizienz, in der CD4-positiven Population erreichten sie im Mittel eine Transduktionsrate von 11 %. Die hohe Standardabweichung ist bei den [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren durch den stark

unterschiedlichen Prozentsatz CD4-/CCR5-positiver Zellen bei den einzelnen Donoren zu erklären.

Zusammenfassend zeigten die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren die höchste Gentransfereffizienz für CD4-positive T-Zellen. Sie liegt bei einer m.o.i. von 0,1 mit 20,8 % deutlich über der Effizienz der [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren (10,8 %) und der [MLV(GaLV)]-Vektoren (9,5 %). Während der Gentransfer durch CXCR4- und CCR5-trope [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren strikt CD4-abhängig ist, konnte die Korezeptorspezifität der Vektoren auf PBL nicht bestimmt werden, da sich das Expressionsmuster der Korezeptoren auf den CD4-Zellen während der Kultivierung veränderte.

3.1.7 Optimierung des Gentransfers in primäre humane PBL

Für klinische Anwendungen ist eine hohe Gentransferrate, verbunden mit einer möglichst kurzen Kultivierung der Zellen außerhalb des Körpers wünschenswert. Im Folgenden sollte daher der Gentransfer anhand der für den CD4-spezifischen Gentransfer effizientesten [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren weiter optimiert werden.

Die für die folgenden Versuche verwendeten vektorhaltigen Überstände wurden auf GHOST-Zellen titriert, wodurch die m.o.i. Angaben mit denen der Transduktion in Kapitel 3.1.4 nicht direkt vergleichbar sind, da die Verpackungszellüberstände dort auf A3.01 CCR5 T-Zellen titriert worden waren. Paralleltitrationen von [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren auf A3.01 CCR5 und GHOST CXCR4 ergaben einen um etwa Faktor 2 höheren Titer auf A3.01 CCR5 als auf GHOST CXCR4-Zellen.

3.1.7.1 Steigerung der Transduktionsrate durch mehrmalige Transduktion der PBL

Bestehende Transduktionsprotokolle für die klinische Anwendung von [MLV(GaLV)]-Vektoren beinhalten meist wiederholte Transduktionen, um einen höheren Prozentsatz an Zellen zu transduzieren. Daher sollte der Effekt multipler Transduktionen durch [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren untersucht werden. Primäre Lymphozyten von vier Donoren wurden für drei Tage stimuliert und in drei Ansätze aufgeteilt, die mit einer m.o.i. von eins ein-, zwei- oder dreimal an aufeinanderfolgenden Tagen transduziert wurden. Nach jeder Transduktion erfolgte ein Halbmediumwechsel. Fünf Tage nach der letzten Transduktion wurde die EGFP- und Rezeptorexpression im FACS untersucht. Abb. 3.1.13 zeigt die Transduktionsraten für die CD4-positiven PBL.

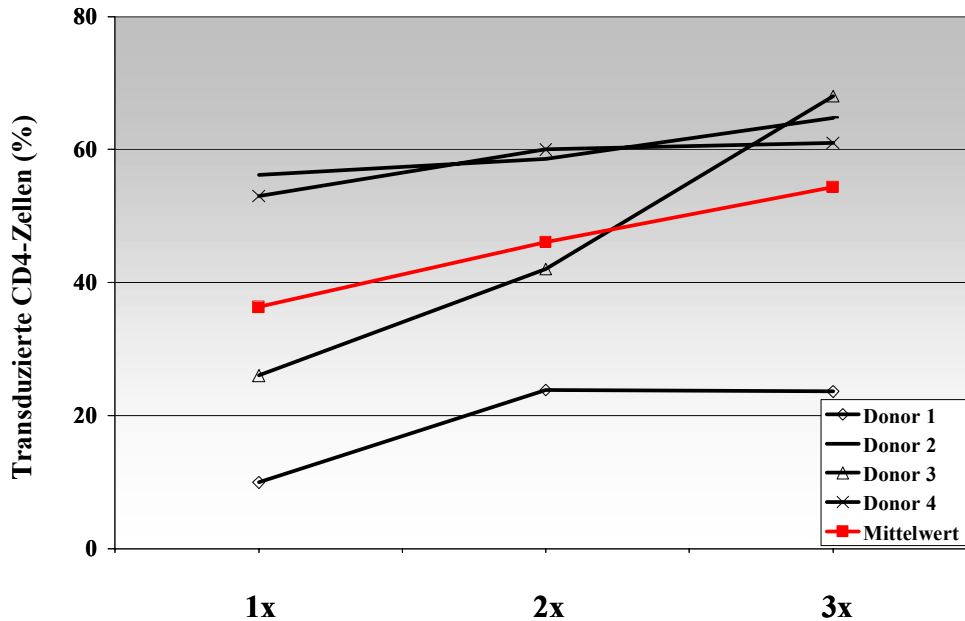


Abb. 3.1.13: Gentransferraten in CD4⁺ PBL bei wiederholter Transduktion der PBL mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren. Prozentsatz der EGFP-exprimierenden CD4-positiven Zellen bei einer, zwei oder drei aufeinanderfolgenden Transduktionen der PBL von vier verschiedenen Donoren (m.o.i. = 1).

Die Steigerung der Gentransfer-Effizienz durch wiederholte Transduktionen war stark donorabhängig. Bei den Donoren Donor 1 und 3 und stieg sie um bis zu 16 % mit der zweiten Transduktion, die dritte Transduktion bedingte nur bei den PBL von Donor 3 einen weiteren Anstieg der Gentransferrate. Bei den Donoren 2 und 4 betrug der Anstieg der Transduktionsrate nur etwa 2 % je weiterer Transduktion. Allgemein war die Steigerung bei den Donoren größer, bei denen die Transduktionsrate bei der ersten Transduktion niedriger lag.

3.1.7.2 Steigerung der Transduktionseffizienz durch die Verwendung autologen Plasmas

Bei der klinischen Anwendung retroviraler Vektoren ist die Verwendung fötalen Kälberserums (FKS) aufgrund der Übertragungsrisiken xenotroper Erreger nicht möglich. Daher sollte untersucht werden, wie sich die Verwendung von autologem Plasma während der Kultivierung und Transduktion der Zellen auf die Gentransfereffizienz auswirkt. PBL aus Lymphozytenkonzentrat (Buffy Coat) von drei verschiedenen Donoren wurden isoliert und in drei Ansätze aufgeteilt. Zum Einen wurden die Zellen wie in den vorigen Versuchen in X-Vivo Medium mit 20 % FKS stimuliert und mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(GaLV)]-Vektoren

transduziert. Im zweiten Ansatz wurden die Zellen in X-Vivo Medium mit 10 % autologem Plasma und 10 % FKS, und in einem dritten Ansatz in Medium mit 20 % autologem Plasma kultiviert und transduziert. Zur Transduktion von 5×10^5 Zellen wurden 5×10^5 Vektorpartikel (m.o.i. = 1), eingesetzt, die Zellen wurden dreimal transduziert und nach fünf Tagen im FACS analysiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.1.14 zusammengefasst.

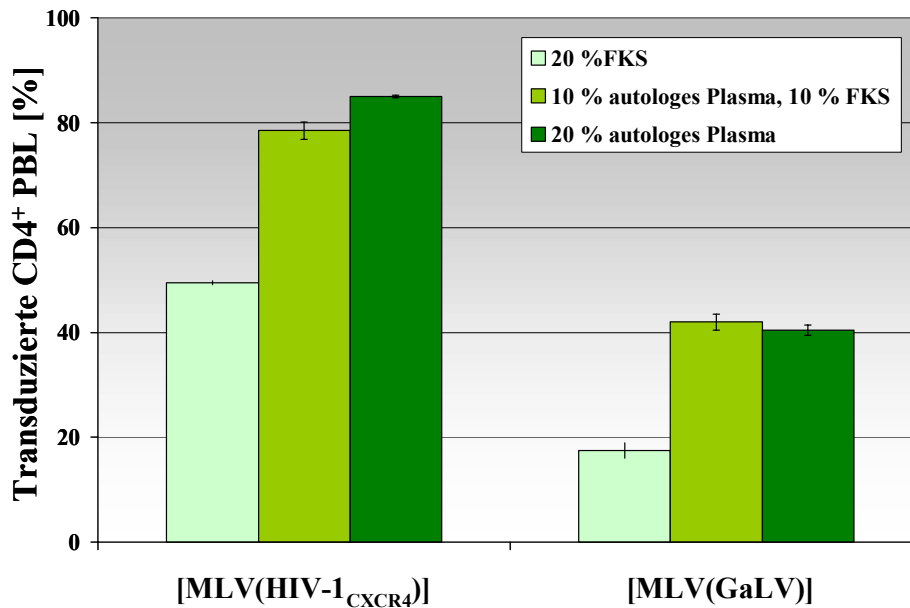


Abb. 3.1.14: Transduktionseffizienz CD4⁺ PBL bei Kultivierung der Zellen mit verschiedenen Konzentrationen autologen Plasmas. Angegeben ist die Transduktionseffizienz in CD4-positiven PBL.

Die Verwendung autologen Plasmas steigerte die Transduktionseffizienz bei [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(GaLV)]- Vektoren signifikant. In beiden Fällen war ein Anstieg der Transduktionsrate um 20-30 % bei Verwendung von 10 % autologen Plasmas im Vergleich zu 20 % FKS zu beobachten. Bei Verwendung von 20 % autologen Plasmas stieg die Transduktionseffizienz der [MLV(HIV-1_{CXCR4})] Vektoren um weitere 6,5 %.

Da für die weiteren Versuche nur geringe Mengen autologen Plasmas zur Verfügung standen und bereits bei der Verwendung von 10 % autologem Plasma und 10 % FKS eine hohe Effizienz erreicht wurde, wurden die primären Zellen in den folgenden Versuchen unter diesen Bedingungen kultiviert und transduziert. Bei einer klinischen Anwendung der Vektoren wäre es jedoch erforderlich, die Zellen ohne FKS in Medium mit autologem Plasma zu kultivieren.

3.1.7.3 Abhängigkeit der Transduktionseffizienz von der Vektormenge

Für eine klinische Anwendung sind lange Kultivierungszeiten und wiederholte Manipulationen der Zellen *ex vivo* zu vermeiden. Daher sollte untersucht werden, ob durch Erhöhung der Vektormenge Transduktionseffizienzen zu erreichen sind, die wiederholte Transduktionen überflüssig machen.

5×10^5 PBL von drei Donoren wurden nach dreitägiger Stimulation mit einer m.o.i. von 1, 5, 10 und 15 auf Vektor-vorbeschichteten Retronektinplatten transduziert. Fünf Tage nach der Transduktion wurden die Zellen auf die Transgenexpression in den CD4-positiven PBL untersucht. Die Auswertung der FACS-Ergebnisse ist in Abb. 3.1.15 dargestellt.

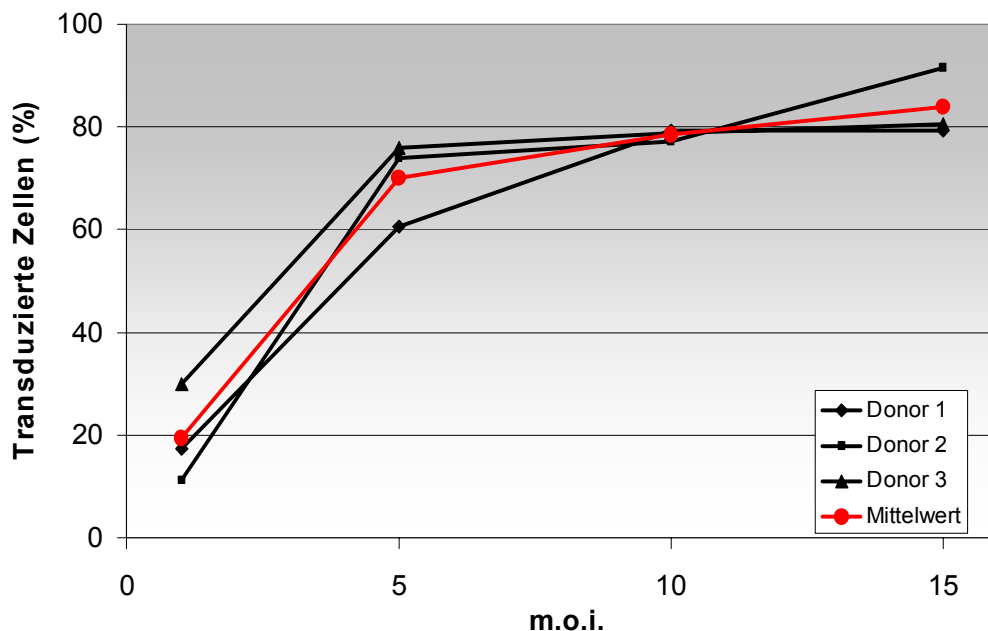


Abb. 3.1.15: Transduktionsraten in CD4⁺ PBL nach Transduktion mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren bei Verwendung unterschiedlicher m.o.i. PBL von drei Donoren wurden einmalig mit einer m.o.i. von 1, 5, 10 bzw. 15 transduziert.

Wurde eine m.o.i. von 5 eingesetzt, so konnte die Transduktionsrate im Vergleich zu einer m.o.i. von 1 im Schnitt von 20 % auf 70 % erhöht werden. Bei weiterer Erhöhung der Vektormenge auf 10 bzw. 15 Vektorpartikel pro Zelle stieg die Transduktionseffizienz je nach Donor auf 80 % bis 91 %. Die Schwankungen zwischen den einzelnen Donoren waren relativ gering.

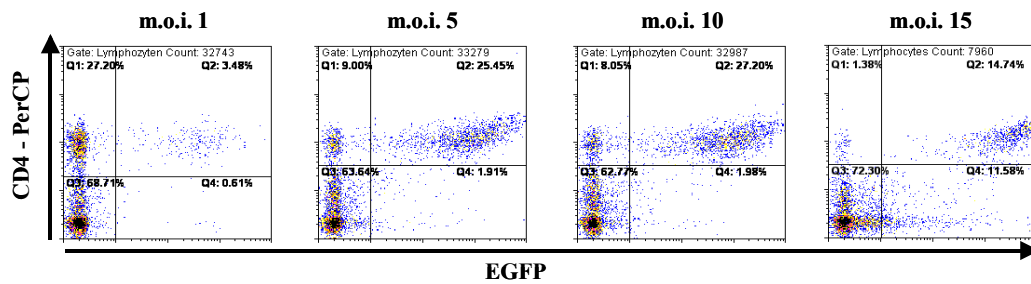


Abb. 3.1.16: Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Population bei steigender Vektormenge. CD4 / EGFP-Aufragung der transduzierten Zellen von Donor 3. Die Fluoreszenzintensität der EGFP-positiven Population steigt nach Transduktion mit einer m.o.i. von 15 signifikant an.

Betrachtet man die FACS-Analyse der einzelnen Donoren (z.B. für Donor 3 in Abb. 3.1.16), so war bei einer m.o.i. von 15 ein starker Anstieg der Fluoreszenzintensität EGFP-positiver Zellen als Verschiebung der EGFP-positiven Zellfraktion (Q2) nach rechts zu erkennen. Dies deutet auf Mehrfachtransduktionen der einzelnen Zellen hin.

Für eine *ex-vivo* Gentherapie ist es wünschenswert, die Zellen nur für einen möglichst kurzen Zeitraum außerhalb des Körpers zu kultivieren. Durch die Steigerung der Vektormenge (m.o.i. von 10) wurde mit 80 % eine höhere Transduktionsrate erreicht als durch mehrfache Transduktionen. Somit konnte die *ex vivo* Kultivierungsdauer der Zellen verkürzt und gleichzeitig die Gentransfereffizienz gesteigert werden. Auch die Verwendung von autologem Plasma anstelle von fötalem Kälberserum hatte einen positiven Effekt auf die Transduktionseffizienz. Zusammenfassend erscheint ein Transduktionsprotokoll mit einer m.o.i. von 10 bei einmaliger Transduktion in Medium mit 20 % autologem Serum am geeignetsten.

3.2 VERGLEICH VERSCHIEDENER INHIBITORISCHER GENE FÜR DIE GENTHERAPIE DER HIV-1 INFEKTION

In verschiedenen gentherapeutischen Ansätzen werden mittels retroviraler Vektoren therapeutische Gene, die eine Resistenz gegen HIV-1 vermitteln sollen, in die Zielzellen des Virus eingebracht. Fünf inhibitorische Gene, die von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, sollten erstmals in einem einheitlichen System in ihrem Einfluss auf die HIV-1 Replikation verglichen werden. Sie haben unterschiedliche Angriffspunkte im Replikationszyklus des Virus (Tab. 3.2.1).

Inhibitorisches Gen	Abkürzung	Wirkprinzip	Literatur
Interleukin 16	IL-16	Inhibition der HIV-1 Transkription	Baier <i>et al.</i> , 1995 Cruikshank <i>et al.</i> , 2000
anti-Integrase scFv	α -IN-scFv	Intrazelluläre Bindung an die C-terminale Domäne der HIV-1 Integrase und dadurch Inhibition der Enzymfunktion	Levy-Mintz <i>et al.</i> , 1996
anti-RT scFv	α -RT-scFv	Intrazelluläre Bindung an die Reverse Transkriptase von HIV-1 und dadurch Inhibition der Enzymfunktion	Shaheen <i>et al.</i> , 1996
Hairpin (HP)-Ribozym gegen die 5'-LTR von HIV-1	HP-LTR-2	Spaltung der HIV-1 RNA am zweiten GUC-Triplett der 5'-LTR	Ojwang <i>et al.</i> , 1992
Hammerhead (HH)-Ribozym gegen <i>pol</i> -Gen	HH-POL-13	Spaltung der HIV-1 RNA am 13. GUC-Triplett im <i>pol</i> -Leserahmen (Integrase-Gen)	Klebba, 2000
-	LCo	Negativkontrolle, MgSLdelS $\Delta EcoRI$	

Tab. 3.2.1: Auflistung der untersuchten HIV-1-inhibitorische Gene und des Kontrollvektors.

Interleukin 16 reduziert nach Bindung an seinen Rezeptor CD4 die Promotoraktivität der HIV-1 LTR, vermutlich über die Induktion eines Repressors des HIV-1-Core-Enhancers (Cruikshank *et al.*, 2000). Intrazellulär exprimierte, einkettige Antikörperfragmente gegen Integrase (IN) bzw. Reverse Transkriptase (RT) von HIV-1 binden die entsprechenden Proteine im Zytoplasma und beeinträchtigen dadurch deren Funktion (Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996). Das Hairpin-Ribozym HP-LTR-2 spaltet spezifisch am zweiten GUC-Tiplet der HIV-1 LTR. Bei HH-POL-13 handelt es sich um ein Hammerhead-

Ribozym, das die HIV-1 RNA spezifisch am 13. GUC-Triplett im *pol*-Leserahmen spaltet.

Die verschiedenen inhibitorischen Gene lagen in unterschiedlichen Transfervektoren vor und wurden daher zunächst in den gleichen Transfervektor kloniert, um sie in einem einheitlichen System auf ihre Wirksamkeit zur Inhibition der HIV-1 Replikation vergleichen zu können.

3.2.1 Gentransfervektoren zur Inhibition der HIV-1 Replikation

Zum Vergleich der oben aufgeführten anti-HIV-Gene wurden diese in den retroviralen Expressionsvektor MgSLdelS kloniert, um sie anschließend nach retroviralem Gentransfer in geeigneten T-Zellen auf ihre Fähigkeit zur Hemmung der HIV-1 Replikation zu untersuchen. Die cDNAs für das α -IN- und α -RT-scFv sowie die Caspase-prozessierte, biologisch aktive Form des Interleukin-16 wurden über *EcoRI* in MgSLdelS kloniert (Abb. 3.2.1). Die cDNAs für die Ribozyme HP-LTR-2 und HH-POL-13 lagen bereits in diesem Expressionsvektor vor (Christian Klebba, J. W. Goethe-Universität, Frankfurt).

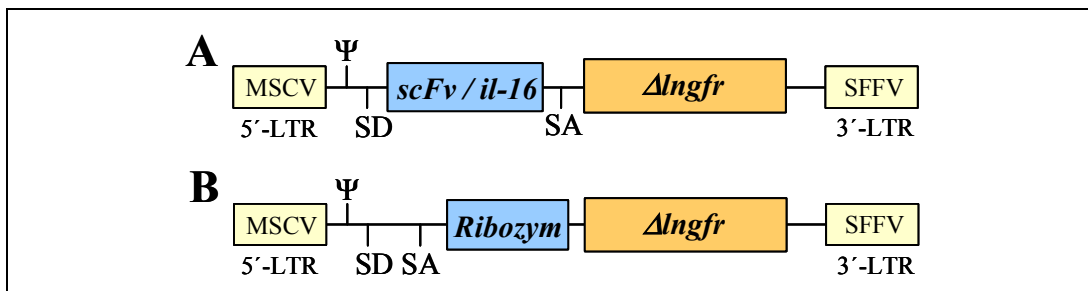


Abb. 3.2.1: Retrovirale Expressionsvektoren für die verschiedenen HIV-1 Inhibitoren. (A) Expressionsvektoren für die scFv gegen HIV-1 Integrase (IN) bzw. Reverse Transkriptase (RT) und das Interleukin 16. Die Proteine werden von der ungespleissten RNA translatiert. (B) Expressionsvektor für die anti-HIV-Ribozyme, die von der gespleissten RNA gebildet werden.

Die IL-16 cDNA wurde aus dem retroviralen Expressionsvektor MSCV IL-16 neo (Frank Nocken, Paul-Ehrlich Institut) amplifiziert. Da Interleukin 16 nur in CD8-positiven Lymphozyten intrazellulär durch die Caspase 3 gespalten und dadurch in die aktive Form überführt wird, wurde für den Gentransfer in CD4-positive T-

Zellen ein Expressionsvektor kloniert, der bereits für die prozessierte Form des Proteins kodiert. Die cDNA der scFv gegen die HIV-1 IN bzw. RT wurde aus den Vektoren pSLX CMV anti-IN33 bzw. pSLX CMV anti-RT sFv3 (Roger Pomerantz, Thomas Jefferson University, Philadelphia) amplifiziert. Über die Oligonukleotide wurden jeweils 5' und 3' *EcoRI* Schnittstellen eingefügt, um die amplifizierten cDNAs über *EcoRI* in den *EcoRI*-geschnittenen MgSLdels zu klonieren (Abb. 3.2.1 A).

3.2.2 Generierung von [MLV(GaLV)]-Vektoren zum Gentransfer der HIV-1 inhibitorischen Gene in T-Zelllinien

Das Potential der einzelnen Inhibitoren zur Hemmung der HIV-1 Replikation sollte nach Gentransfer in T-Zellen und anschließender HIV-Infektion dieser Zellen verglichen werden. Für den Gentransfer der HIV-Inhibitoren in T-Zellen wurden [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren mit den entsprechenden Inhibitor-kodierenden Transfervektoren generiert. Die Herstellung stabiler Verpackungszelllinien für [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren (Abb. 3.2.2) war in diesem Fall einfacher als die Herstellung von [MLV(HIV-1)]-Verpackungszelllinien, da eine Transfervektor-negative, GaLV-*env*- und MLV-*gag/pol*-positive Zelllinie PG13 vorhanden war, eine entsprechende Transfervektor-negative Verpackungszelllinie für [MLV(HIV-1)]-Vektoren jedoch nicht vorlag.

Da die Transfektion von PG13-Zellen mit den Transfervektor-Plasmiden relativ ineffizient war, wurden [MLV(VSV)]-Vektoren generiert, welche die Expressionsvektoren für IL-16, α -IN-scFv und α -RT-scFv (Tab. 3.2.1) übertragen. Hierzu wurde die MLV-*gag/pol*-positive Zelllinie Phoenix-*gp* mit Plasmid pMD-G, das für das VSV-G-Protein kodiert, und den jeweiligen Inhibitor-Expressionsvektoren transfiziert. Die so generierten [MLV(VSV)]-Vektoren wurden zur Transduktion von PG13-Zellen eingesetzt, wodurch 50-70 % Transfervektor-positive PG13-Verpackungszellkulturen entstanden, die durch die Transduktion anstelle der Transfektion den Transfervektor direkt ins Genom integriert hatten. Durch magnetische Zellsortierung wurden diese Mischkulturen über den Oberflächenmarker Δ LNGFR auf eine Reinheit von 95-98 % Markergen-exprimierender Zellen angereichert. Der Vektortiter dieser

[MLV(GaLV)]-Verpackungszelllinien wurde auf GHOST-Zellen bestimmt und lag zwischen 5×10^5 und 1×10^6 i.E. / ml.

Für die Ribozyme HP-LTR-2 und HH-POL-13 wurden von Stefan Klein (Universitätsklinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt) Verpackungszellen für [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren zur Verfügung gestellt, die bereits den jeweiligen von MgSLdelS abgeleiteten Expressionsvektor enthielten und ebenfalls von der Zelllinie PG13 abgeleitet sind.

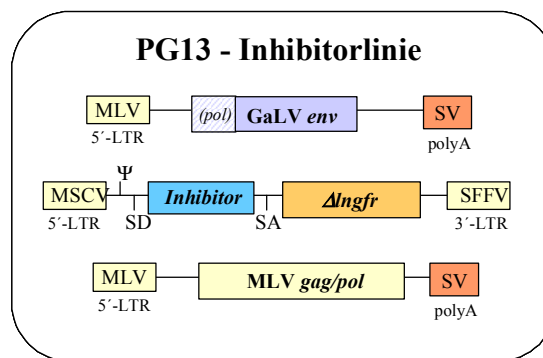


Abb. 3.2.2: Schematische Darstellung der [MLV(GaLV)]-Verpackungszellen, welche die einzelnen HIV-1 Inhibitoren auf dem Transfervektor kodieren. Angegeben ist der Transfervektor für IL-16, α -IN-scFv bzw. α -RT-scFv (vgl. Abb. 3.2.1)

3.2.3 Herstellung von Inhibitor-exprimierenden T-Zelllinien

Die vektorhaltigen Zellkulturüberstände der einzelnen Verpackungszellen wurden zur Etablierung Inhibitor-positiver T-Zelllinien verwendet. Als Modellsystem wurde die für CXCR4-trope HIV-1 Stämme susceptible T-Zelllinie SupT1 verwendet. Mit dieser Zelllinie wurden auch die publizierten Inhibitionsstudien der α -IN- und α -RT-scFv publiziert (Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996). Um die einzelnen potentiellen Inhibitoren miteinander zu vergleichen, wurden SupT1-Zellen mittels anti-HIV-Gen übertragender [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren transduziert und zwei Tage später durch Färbung des Oberflächenmarkers Δ LNCFR und anschließende magnetische Zellsortierung auf eine Reinheit von 95-98 % transduzierte Zellen angereichert.

3.2.4 Vergleich der Inhibitor- und Δ LNGFR-Expressionsstärke

Für den Expressionsvektor des HP-LTR-2 Ribozyms (Mg HP-LTR-2 Δ LNGFR, Abb. 3.2.1 B) ist gezeigt worden, dass die Expressionsstärke des Markers Δ LNGFR auf der Zelloberfläche mit der intrazellulären Ribozymmenge korreliert (Klebba *et al.*, 2000). In diesem Vektor werden sowohl das Ribozym als auch der Oberflächenmarker Δ LNGFR von der gespleissten mRNA exprimiert. Zellen mit hoher Δ LNGFR- und Ribozymexpression zeigten in HIV-1 Infektionsversuchen eine stärkere Inhibition der Virusreplikation.

In den Expressionsvektoren für die α -IN-scFv, α -RT-scFv und das IL-16 wird der Inhibitor von der ungespleissten mRNA translatiert, Δ LNGFR von der einfach gespleissten mRNA (Abb. 3.2.1 A). Es sollte untersucht werden, ob auch für die IL-16- und scFv-Konstrukte eine Korrelation zwischen Transgen- und Δ LNGFR-Expression vorliegt. Der im ersten Teil der Arbeit verwendete EGFP-Expressionsvektor Mg EGFP Δ LNGFR ist analog zu den Inhibitoronstrukten aufgebaut; die *egfp*-cDNA wurde *EcoRI* / *EcoRI* in MgSLdelS kloniert. Da sich EGFP leicht im FACS nachweisen läßt, wurde anhand dieses analog zu den Inhibitoronstrukten aufgebauten Vektors untersucht, ob eine Korrelation der Expressionsstärke von Transgen und dem Oberflächenmarker Δ LNGFR vorliegt. Die T-Zelllinie A3.01 CCR5 wurde mit [MLV(GaLV)]-Vektoren transduziert, die den Expressionsvektor MgEGFP Δ LNGFR übertragen. Die transduzierten Zellen wurden im FACS parallel auf die Δ LNGFR- und die EGFP-Expression hin untersucht (Abb. 3.2.3).

Die Abbildung 3.2.3 zeigt die FACS-Analyse der MgEGFP Δ LNGFR-positiven A3.01 CCR5-Zellen auf EGFP und Δ LNGFR (B). Abb. 3.2.3 A zeigt die Negativkontrolle ohne Δ LNGFR-Färbung.

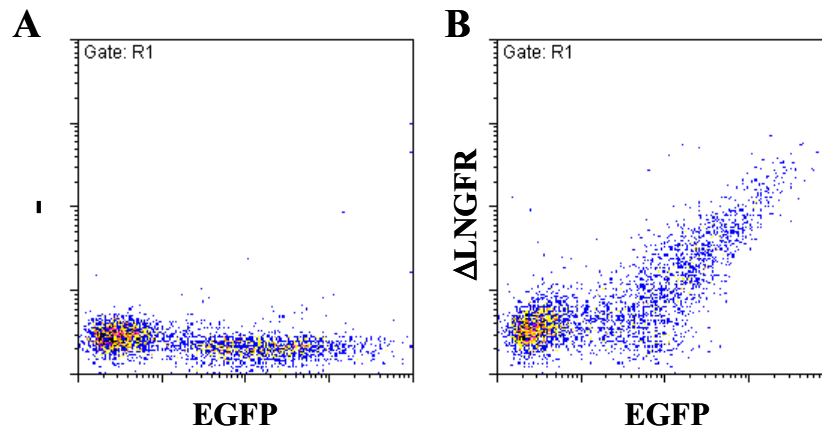


Abb. 3.2.3: Korrelation der Expressionsstärke beider Markergene im MgEGFP Δ LNGFR. Der Dot-Plot zeigt A3.01 CCR5 T-Zellen, die den MgEGFP Δ LNGFR-Transfervektor tragen. Die Zellen wurden ungefärbt (A) bzw. mit einem unkonjugierten anti-NGFR-Erstantikörper und einem PE-konjugierten Zweitantikörper auf den Oberflächenmarker Δ LNGFR gefärbt (B).

Die Daten zeigten eine lineare Korrelation zwischen der Expressionsstärke des Transgens und der Expressionsstärke des Oberflächenmarkers Δ LNGFR. Je mehr Δ LNGFR auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar war (Abb. 3.2.3 B, y-Achse), desto stärker war auch die EGFP-Fluoreszenzintensität (x-Achse). Dabei war für EGFP im FACS eine niedrigere Detektionsgrenze im Vergleich zu Δ LNGFR zu beobachten (Rechtsverschiebung der positiven Population in Abb. 3.2.3 B). Nach diesem Ergebnis konnte davon ausgegangen werden, dass die SupT1 Inhibitor-kulturen, die Δ LNGFR von den MgSLdelS-abgeleiteten Transfervektoren exprimieren, auch das Transgen und damit den Inhibitor exprimieren.

3.2.5 HIV-1 Infektion der Inhibitor-exprimierenden SupT1-Kulturen

Um die Inhibitor-positiven SupT1-Zellen auf eine Resistenz gegenüber HIV-1 zu untersuchen, wurden Infektionsversuche durchgeführt. Je $1,5 \times 10^6$ Zellen der Linien SupT1, SupT1-LCo und der einzelnen SupT1-Inhibitorlinien (Auflistung der Inhibitoren s. Tab. 3.2.1) wurden mit einer m.o.i von 0,01 mit HIV-1_{NL4-3} infiziert. Die Zellen wurden für drei Stunden mit dem Virusüberstand inkubiert und anschließend dreimal mit frischem RPMI-Medium gewaschen. Der Ansatz wurde auf drei Replikate verteilt.

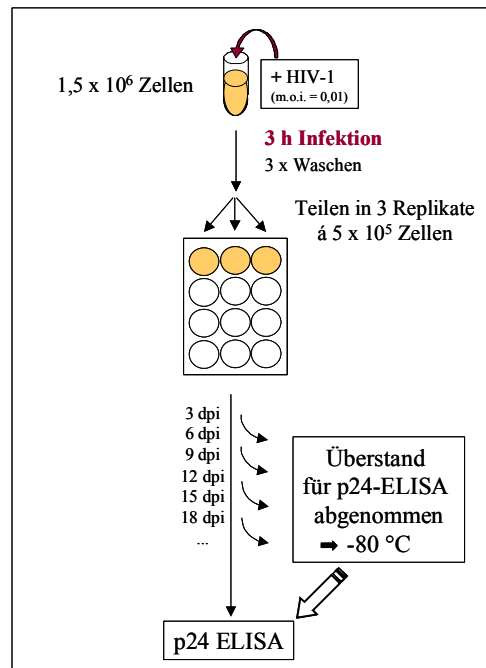


Abb. 3.2.4: Versuchsablauf zur Messung der HIV-Inhibition in den Inhibitorpositiven SupT1-Kulturen. Die Infektion der verschiedenen Inhibitor-Kulturen erfolgte in je einem Ansatz, der anschließend in drei Replikate aufgeteilt wurde. Alle drei Tage wurden Proben für eine Konzentrationsbestimmung des HIV-1 Kapsidproteins p24 abgenommen.

Alle drei Tage erfolgte ein Halbmediumwechsel, wobei der abgenommene Überstand zur späteren Konzentrationsbestimmung des HIV-1 Kapsidproteins p24 bei -80°C eingefroren wurde (Abb. 3.2.4). Über 17 bzw. 18 Tage wurde die p24-Konzentration im Überstand gemessen. Aus drei Replikaten jeder Inhibitor-Kultur wurde der Mittelwert errechnet und graphisch dargestellt (Abb. 3.2.5). Die Konzentration des HIV-1 Kapsidproteins p24 ist als Marker für die HIV-1 Replikation anerkannt. Ausserdem wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf die Bildung von Synzytien als Indiz für eine Virusreplikation untersucht (Kap. 3.2.8).

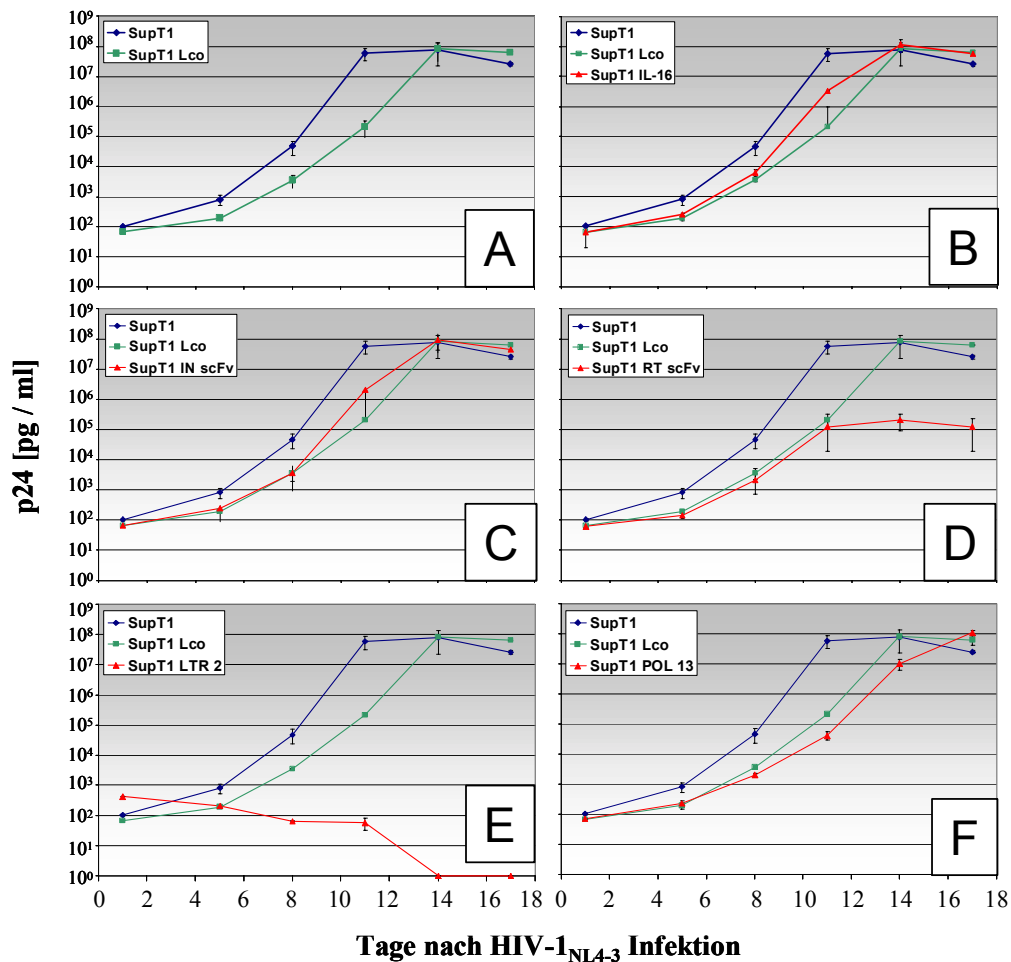


Abb. 3.2.5: Verlauf der p24-Konzentration im Überstand der HIV-1_{NL4-3} infizierten SupT1 Kulturen. Dargestellt ist der Mittelwert der p24-Konzentration aus drei Replikaten. Blau: SupT1 Zellen ohne Expressionsvektor, grün: SupT1 Zellen mit Kontrollvektor ohne Inhibitor (LCo), rot: einzelne SupT1-Inhibitor-kulturen: A: LCo, B: IL-16, C: α -IN-scFv, D: α -RT-scFv, E: HP-LTR-2, F: HH-POL-13.

Bei den SupT1-Linien, die einen Inhibitor-kodierenden Expressionsvektor enthielten, war eine unterschiedlich starke Verzögerung der HIV-1 Replikation im Vergleich zu den Kontrolllinien SupT1 und SupT1-LCo zu erkennen (Abb. 3.2.5). Während in den IL-16- und α -IN-scFv-exprimierenden SupT1-Kulturen die p24-Konzentration vergleichbar mit der p24-Konzentration in den SupT1 LCo-Kulturen anstieg, lag die maximal erreichte p24-Konzentration im Überstand der α -RT-scFv exprimierenden SupT1-Zellen um mehr als zwei Größenordnungen niedriger (Abb. 3.2.5). Bei den SupT1 HH-POL-13 Kulturen war eine geringe Verzögerung der Replikation um maximal einen Tag zu erkennen, die p24-Werte stiegen jedoch an Tag 15 auf den Wert der Kontrollzellen an (Abb. 3.2.5, F). Im Gegensatz dazu lag die p24-Konzentration im Überstand der SupT1 HP-LTR-2

Zellen während des gesamten Verlaufs der Infektionskinetik deutlich unter dem Wert der Kontrollzellen und sank an Tag 14 nach Infektion auf null ab (Abb. 3.2.5, E). Im Mikroskop war jedoch zu erkennen, dass die SupT1 LTR 2-Zellen abgestorben waren.

Nur drei Inhibitorlinien zeigten somit eine stärkere Inhibition als die Kontrolllinie SupT1-LCo. Es gelang jedoch mit keinem der Inhibitoren, eine komplette Hemmung der HIV-1 Replikation bei Erhalt der Zellviabilität zu erzielen.

3.2.6 Sortierung hochexprimierender SupT1-Inhibitor-kulturen

Um zu untersuchen, ob die Expression des Transfervektors in den T-Zellen zu niedrig war, um eine Inhibition der HIV-1 Replikation zu gewährleisten, wurden die einzelnen SupT1-Kulturen auf den Oberflächenmarker Δ LNGFR gefärbt und im FACS auf die Expressionsstärke untersucht.

Es war zu erkennen, dass die Expressionsstärke des Markers auf den einzelnen Inhibitorlinien sehr stark schwankten (Abb. 3.2.6)

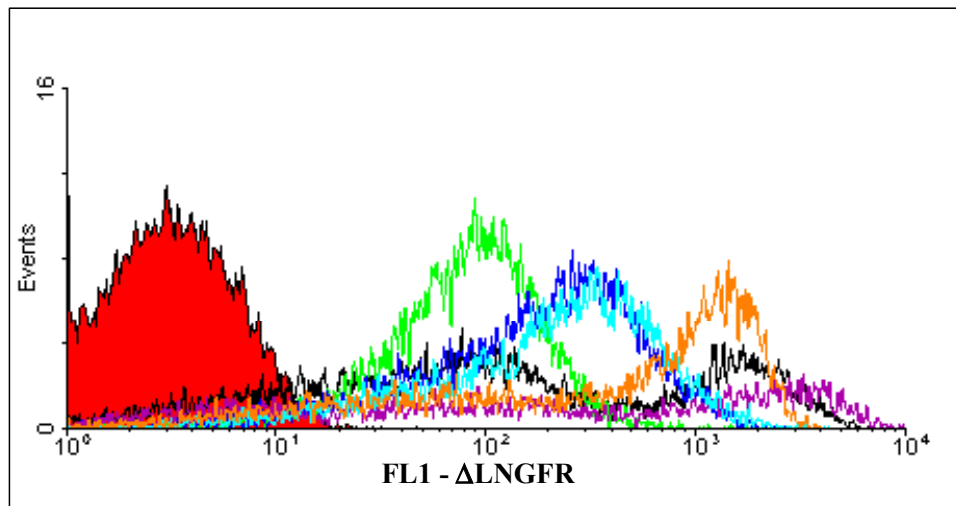


Abb. 3.2.6: Δ LNGFR-Expression der SupT1-Inhibitor-kulturen. In rot ist die Negativkontrolle dargestellt (SupT1 ohne Inhibitor). Grün: SupT1 IL-16, blau: SupT1 α -IN-scFv, türkis: SupT1 α -RT-scFv, lila: SupT1 HP-LTR-2, orange: SupT1 HH-POL-13, schwarz: SupT1 LCo.

Die stärkste Expression zeigten die Ribozym-exprimierenden Zellen und die Zellen mit dem Leerkontrollvektor. Diese Expressionsvektoren kodieren zwischen

Spleissdonor und -akzeptor kein Protein (Abb. 3.2.1.B). Die Δ LNGFR-Expression der anderen Inhibitor-positiven SupT1-Kulturen war signifikant niedriger.

Da eine höhere Expression der Inhibitoren zu einer besseren Inhibition der HIV-1 Replikation führen könnte und eine höhere Δ LNGFR-Expression mit der Expressionsstärke des zwischen Spleissdonor und -akzeptor kodierten Transgens zu korrelieren schien (Abb. 3.2.3), wurden die SupT1-Kulturen auf stark Δ LNGFR-exprimierende Zellen sortiert. Die Sortierung erfolgte nach Färbung auf Δ LNGFR an einem MoFlo-High Speed Sorter und wurde von Fr. Atzberger (EMBL, Heidelberg) durchgeführt. Drei Tage nach der Sortierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Δ LNGFR-Expression hin untersucht und mit den Transgen-positiven Zellen vor der Sortierung verglichen (Abb. 3.2.7).

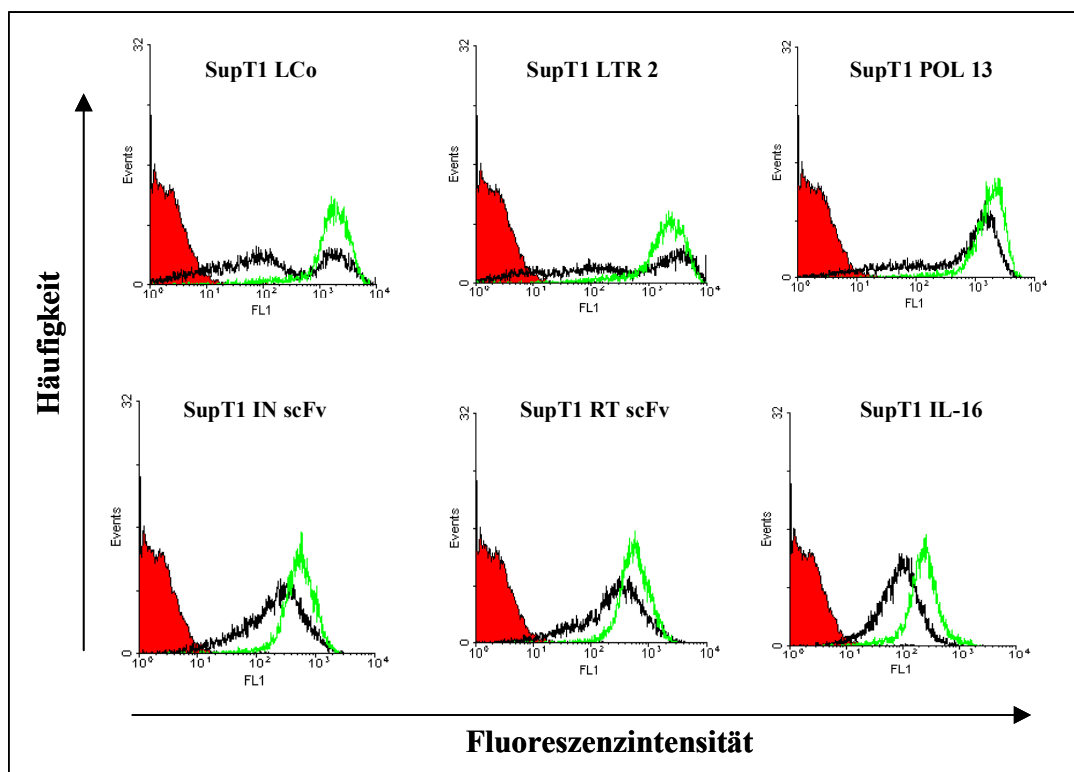


Abb. 3.2.7: Δ LNGFR-Expression in den SupT1 Inhibitor-kulturen vor und nach der Sortierung. Rot: SupT1-Zellen ohne Transfervektor, schwarz: SupT1-Inhibitor-kulturen vor der Sortierung, grün: nach der Sortierung. Die Verschiebung des Peaks zu höheren Fluoreszenzintensitäten auf der x-Achse zeigt eine stärkere Δ LNGFR-Expression.

Die Fluoreszenzintensität war bei allen Zellen nach der Sortierung (Abb. 3.2.7, grüner Peak) höher als vor der Sortierung (schwarzer Peak). Die Ribozym-exprimierenden und Kontrollvektor-positiven Zellen zeigten weiterhin die stärkste

Δ LNGFR-Expression. Die Δ LNGFR-Expressionsstärke der α -IN- und α -RT-scFv und des IL-16 exprimierenden SupT1-Zellen liegen in einem vergleichbaren Bereich (Mittlere Fluoreszenzintensität von 10^2 - 10^3).

3.2.7 HIV-1 Infektion der sortierten, hochexprimierenden SupT1-Inhibitor-kulturen

Um zu untersuchen, ob die auf hohe Δ LNGFR-Expression sortierten SupT1-Kulturen eine stärkere Inhibition der HIV-1 Replikation ermöglichen, wurde eine Infektionskinetik analog der der unsortierten Kulturen durchgeführt. Neben dem bisher verwendeten Virusstamm NL4-3 wurden die Zellen in einem getrennten Ansatz mit einem weiteren HIV-1 Isolat, HIV-1_{IIIIB}, infiziert.

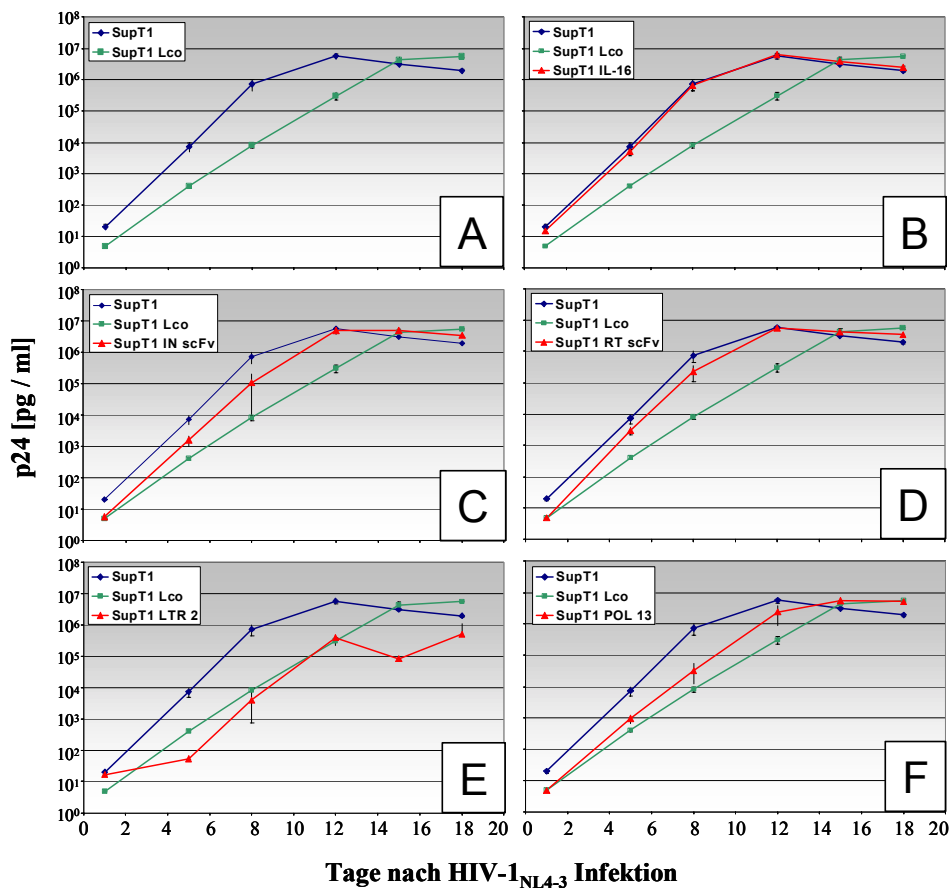


Abb. 3.2.8: Verlauf der p24-Konzentration in den sortierten, HIV-1_{NL4-3} infizierten SupT1-Inhibitor-kulturen. Dargestellt ist der Mittelwert der p24-Konzentration aus drei Replikaten in den Inhibitor-positiven (rot) im Vergleich zu den Kontrolllinien SupT1 (blau) und SupT1 LCo (grün). A: LCo, B: IL-16, C: α -IN-scFv, D: α -RT-scFv, E: HP-LTR-2, F: HH-POL-13.

Keine der Inhibitor-positiven SupT1-Kulturen zeigte im Vergleich zu den SupT1-Zellen ohne Transfervektor und der SupT1 LCo Kultur eine Inhibition der HIV-Replikation (Abb. 3.2.8). Lediglich in der SupT1 HP-LTR-2 Kultur lag das Maximum der p24-Konzentration etwa eine Größenordnung unter den Werten der Kontrollen. Am Tag 18 nach Infektion wurden jedoch wieder ähnliche p24-Werte wie in den Kontrollen erreicht. Die SupT1 HP-LTR-2 Zellen proliferierten in diesem Experiment zwar langsamer als die anderen Kulturen, im Vergleich zum ersten Infektionsversuch starben sie jedoch nicht ab.

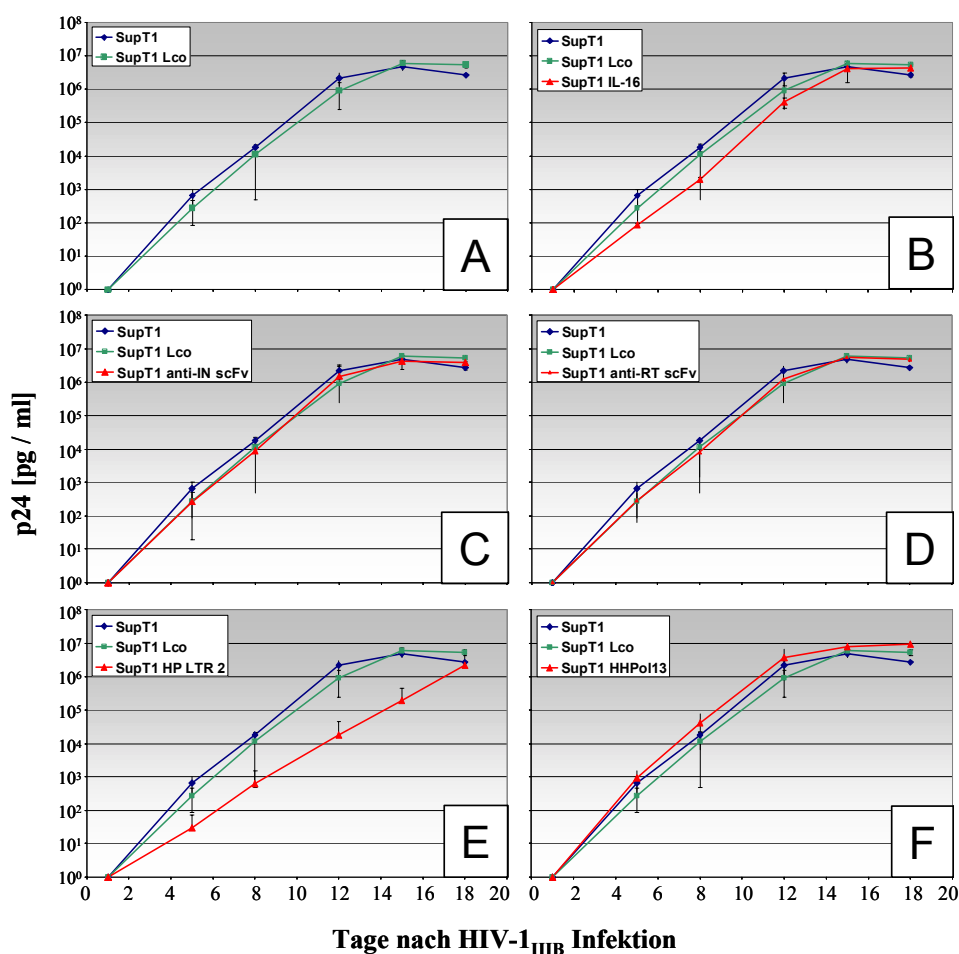


Abb. 3.2.9: Verlauf der p24-Konzentration in sortierten, HIV-1_{III B} infizierten SupT1-Inhibitorkulturen. Die Werte der einzelnen transfervektor-positiven Kulturen (rot) und der untransduzierten SupT1 Kulturen (blau) sind Mittelwerte aus drei Replikaten. A: LCo, B: IL-16, C: α -IN-scFv, D: α -RT-scFv, E: HP-LTR-2, F: HH-POL-13.

Bei der Infektion der Inhibitorkulturen mit dem HIV-1 Isolat III B ist nur bei den HP-LTR-2 Ribozym-exprimierenden SupT1-Zellen eine Verzögerung der Replikation erkennbar (Abb. 3.2.9 E). Bis 15 Tage nach der Infektion war nur in

einem der drei Replikate p24-Protein im ELISA nachweisbar. Nach drei weiteren Tagen stieg auch in diesen Replikaten die p24-Konzentration an. Im dritten Replikat war die p24-Konzentration im Mittel achtfach niedriger als in den Kontrollen.

3.2.8 Mikroskopische Untersuchung der infizierten Zellen

Die Betrachtung der infizierten Zellen unter dem Mikroskop (Abb. 3.2.10) zeigte, dass die Zahl der Synzytien in den einzelnen Kulturen sehr unterschiedlich war, obwohl die p24-Werte im Überstand aller Kulturen mit Ausnahme der SupT1 HP-LTR-2 Zellen ähnlich hoch waren (Abb. 3.2.9).

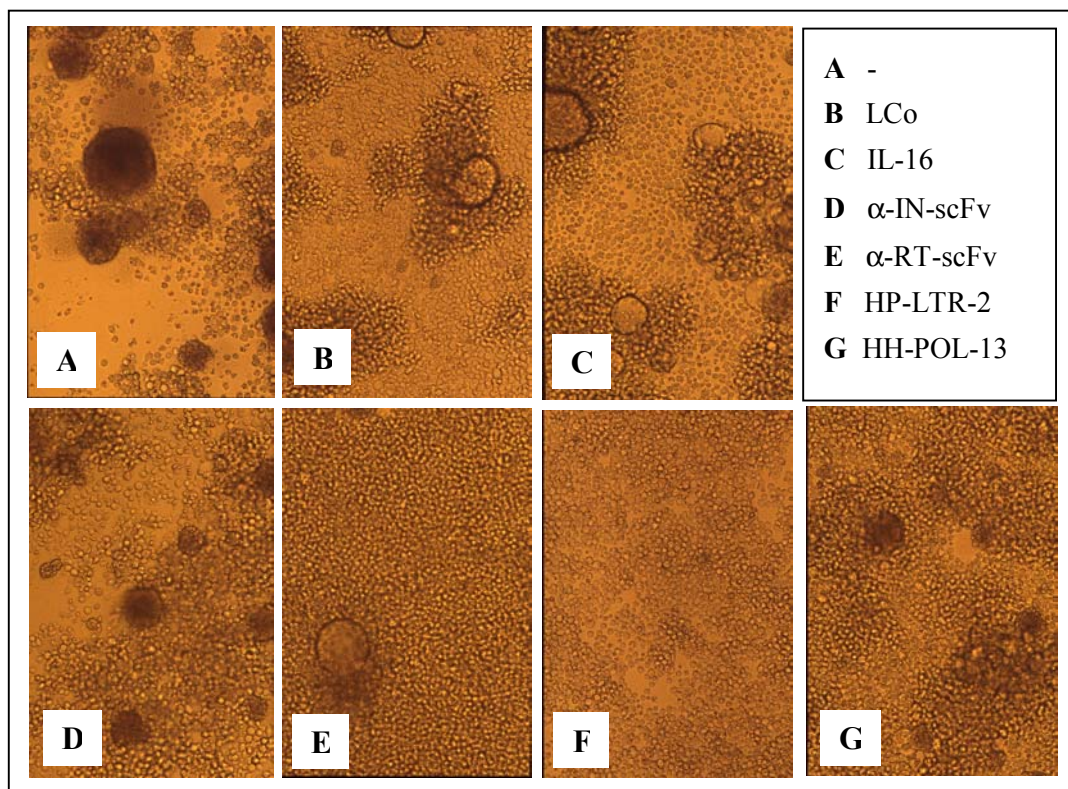


Abb. 3.2.10: Infizierte SupT1 Inhibitor-kulturen 12 Tage nach Infektion.

Die Fotos zeigen infizierte Zellen der HIV-1_{III_B}-Infektionskinetik sortierter SupT1-Inhibitor-kulturen in 10-facher Vergrößerung.

Bei den SupT1-Zellen ohne Expressionsvektor (A) sind zu diesem Zeitpunkt fast alle Zellen abgestorben. In den SupT1-LCo, -IL-16 und -α-IN-scFv Kulturen war die Zahl der Synzytien relativ groß, es waren jedoch im Gegensatz zu den SupT1-Zellen ohne Expressionsvektor mehr viable Zellen vorhanden. In der SupT1-αRT-

scFv Kultur war die Synzytienzahl niedriger als in den Kulturen, die den LCo-Vektor, IL-16 und das α -IN-scFv exprimierten. In der SupT1 Kultur, die das HH-POL-13 Ribozym exprimierte, war die Synzytienzahl geringer, zudem waren die vorhandenen Synzytien kleiner. Die geringsten zytopathischen Effekte waren in der HP-LTR-2 Kultur zu beobachten. In zwei von drei Replikaten waren kaum Synzytien zu sehen, eines dieser Replikate ist in Abb. 3.2.10 dargestellt. In diesen Kulturen waren auch die p24-Konzentrationen niedriger als in den Kontroll- bzw. anderen Inhibitorkulturen. Zwölf Tage nach der Infektion lag der Mittelwert der p24-Konzentration um zwei Größenordnungen niedriger als in den SupT1-Zellen ohne Expressionsvektor (Abb. 3.2.9). Die HP-LTR-2 exprimierenden Zellen zeigten zudem eine verlangsamte Proliferation im Vergleich zu allen anderen untersuchten Kulturen.

Zusammenfassend zeigte keiner der untersuchten Inhibitoren eine komplette Hemmung der HIV-1 Replikation. Die mit den Antikörperfragmenten gegen Integrase und Reverse Transkriptase publizierte Hemmung um 3-4 Größenordnungen, bezogen auf die p24-Konzentration im Überstand, konnte nicht reproduziert werden. Den grössten Effekt zeigte das Hairpin-Ribozym gegen die 5' LTR (HP-LTR-2), wobei die Zellen, die dieses Ribozym exprimierten, in der Infektionskinetik eine verlangsamte Zellproliferation zeigten und in einem Ansatz abstarben. Die Sortierung der Kulturen auf hoch vektorexprimierende Zellen bewirkte keine stärkere Inhibition der HIV-Replikation.

4 DISKUSSION

4.1 GENTRANSFER IN HUMANE PRIMÄRE T-ZELLEN MITTELS [MLV(HIV)]-VEKTOREN

Eine notwendige Voraussetzung für viele gentherapeutische Ansätze CD4-zellassoziierter Erkrankungen wie z. B. AIDS ist der effiziente Gentransfer in die CD4-positive Population peripherer Lymphozyten. Bei einer unspezifischen Transduktion aller Lymphozytenpopulationen, z. B. bei Verwendung herkömmlicher [MLV(aMLV)]- oder [MLV(GaLV)]-Vektoren, ist eine Aufreinigung der CD4-positiven Zellen vor bzw. nach der Transduktion erforderlich. MLV-Vektoren, die mit dem HIV-1 Hüllprotein pseudotypisiert sind, und daher als [MLV(HIV-1)]-Vektoren bezeichnet werden, transduzieren spezifisch CD4-exprimierende Zellen (Schnierle und Stitz *et al.*, 1997). Hierbei kann die Aufreinigung der CD4-Lymphozyten entfallen, weil nur die CD4-positiven Zellen eines Zellgemisches transduziert werden. Dies hat den weiteren Vorteil, dass z.B. für eine Gentherapie der HIV-1 Infektion während der *ex-vivo* Kultivierung die CD8-positiven Lymphozyten, die über die Ausschüttung von Cytokinen eine hemmende Wirkung auf die Virusreplikation haben, anwesend sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der spezifische Gentransfer mit CD4/CCR5- und CD4/CXCR4-tropen [MLV(HIV-1)]-Vektoren in CD4-positive Zellen genauer charakterisiert und optimiert werden, um die Grundlage für *ex-vivo* Anwendungen solcher Vektoren zu verbessern.

Neben einem effizienten Gentransfer in die Zielzellen des Virus sind therapeutische Gene erforderlich, welche die Replikation des Virus effizient unterdrücken. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher verschiedene potentielle HIV-1-Inhibitorgene bezüglich der Hemmung der HIV-1-Replikation in der Zellkultur verglichen werden, um die effizientesten Inhibitorgene zu identifizieren.

4.1.1 Entwicklung neuer [MLV(HIV-1_{CCR5})]- und [MLV(GaLV)]-Verpackungszellen

Um die Spezifität der [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren für CD4/CXCR4- und CD4/CCR5-positive T-Zellen untersuchen zu können, wurden Vektoren etabliert, die das für das Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) kodierende Transgen übertragen. Dies ermöglichte später die gleichzeitige Analyse der transduzierten primären Lymphozyten hinsichtlich der Bildung ihrer zelltypspezifischen Oberflächenmarker und der Expression des Transgens.

Eine stabile [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Verpackungszelllinie wurde durch Transfektion der *env*-negativen, Transfervektor- und MLV*gag/pol*-positiven Zelllinie TECeB15 EGFP mit dem HIV-Env-Expressionskonstrukt Tr712 MBK generiert. In diesem von HIV-1_{BH10} abgeleiteten Konstrukt ist die für die V3-Region kodierende Sequenz gegen die entsprechende Region des CCR5-tropen HIV-1_{MBK} ausgetauscht (Müller, 1999). Um eine stabile, hochtitrige Verpackungszelllinie zu etablieren, war eine Einzelzellklonierung notwendig. Die Expression des Hüllproteins in den einzelnen Zellklonen korrelierte unerwarteterweise nicht mit dem erzielten Vektortiter, vielmehr produzierte der Verpackungszellklon (R5#96), der eine eher schwache HIV-Env Expression zeigte, den höchsten Titer von 2×10^5 i.E. / ml. Eine Erklärung für dieses Phänomen könnte die von Hill *et al.* (1993) beschriebene zytotoxische Wirkung von HIV-1 gp120 auf Neuronen *in vitro* sein, da die hier verwendete Zelllinie TECeB15 von einem humanen Rhabdomyosarkom, einem Tumor des Rückenmarks, abgeleitet ist. Optimierte Verpackungszellen könnten daher in Zukunft möglicherweise auf der Basis anderer humaner Zelllinien nicht-neuronalen Ursprungs hergestellt werden.

Für die Herstellung einer [MLV(GaLV)]-Verpackungszelllinie wurden PG13-Zellen verwendet. Diese enthielten bereits ein psi-negatives GaLV-*env* und ein psi-negatives MLV-*gag/pol* Expressionskonstrukt, so dass durch Transduktion mit transient hergestellten [MLV(MLV10A1)]-Vektoren, die den psi-positiven MgEGFP Δ LNGFR-Transfervektor übertrugen, Verpackungszellen generiert werden konnten, bei welchen der Transfervektor stabil chromosomal integriert vorlag. Durch Heraussortierung Δ LNGFR-positiver Zellen konnten anschließend

transfervektorpositive Zellen in der Kultur angereichert werden, wodurch ein Vektortiter von $6,5 \times 10^6$ i.E./ml erzielt wurde. Der im Vergleich zu den [MLV(HIV-1)]-Verpackungszellen um etwa eine Größenordnung höhere native Titer kann durch die unterschiedlichen Hüllproteine und die Verwendung unterschiedlicher Ausgangszelllinien bedingt sein.

4.1.2 Steigerung des Vektortiters durch Ultrazentrifugation

Durch Zugabe von Natriumbutyrat, einem allgemeinen Transkriptionsaktivator (Boosalis *et al.*, 2001), der u.a. auch eine Stabilisierung der Vollängen-Vektor-RNA bewirkt (Olsen und Sechelski, 1995), zu den Verpackungszellen vor der Vektorernte und nach anschließender Konzentrierung der Pseudotypvektoren aus dem Zellkulturüberstand mittels Ultrazentrifugation konnten die [MLV(HIV-1)]-Vektortiter weiter gesteigert werden. Für CXCR4- und CCR5-trope Pseudotypvektoren konnten bei 230-facher Volumenreduktion Titer bis zu 2×10^7 i. E. / ml erzielt werden. Die Vektorausbeute, gemessen am erhaltenen Titer, lag jedoch nur bei etwa 15 %. Ein Grund für die geringe Vektorausbeute könnte der physikalische Stress sein, der während der Ultrazentrifugation auf die Vektorpartikel einwirkt, und zur Zerstörung der Infektiosität eines Teils der Vektorpartikel führen kann (Powell *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den [MLV(HIV-1)]-Pseudotypvektoren konnten jedoch [MLV(SIVagm)]-Vektoren, die mit trunkierten Hüllproteinen des simianen Immundefizienzvirus der Afrikanischen Grünen Meerkatze (SIVagm) pseudotypisiert wurden, nach Ultrazentrifugation Vektortiter bis zu 10^8 i.E./ml mit einer Wiedergewinnungsrate von ca. 40 % erzielt werden (Steidl, 2001). Der [MLV(GaLV)]-Vektortiter konnte durch Ultrazentrifugation nicht wesentlich gesteigert werden. Ein Grund für diese Beobachtung könnte eine geringe Stabilität bzw. höhere Sensitivität gegen physikalischen Stress von GaLV-Pseudotypvektoren im Vergleich zu [MLV(HIV-1)]- und [MLV(SIVagm)]-Vektorpartikeln sein.

Zur Produktion ausreichender Vektormengen für eine klinische Anwendung ist die Entwicklung noch effizienterer Konzentrationsmethoden notwendig. Bei *ex vivo* Gentherapieversuchen an Rhesus-Affen (*Macaca mulatta*) wurde eine Anzahl endogen vorhandener CD4-positiver T-Zellen (etwa 10^8) an transduzierten

Zellen reinfundiert (Bunnell *et al.*, 1997). Eine weitere Erhöhung des Vektortiters könnte durch verbesserte Kulturbedingungen der Verpackungszellen während der Vektorernte, z.B. in verbesserten Zellkulturmedien oder bei niedrigerer Temperaturen und eine dadurch erhöhte Stabilität der Vektoren erzielt werden (McTaggart *et al.*, 2000).

4.1.3 Korezeptor-Tropismus der [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Vergleich zu [MLV(GaLV)]-Vektoren

Durch Titration der [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren auf GHOST-Zellen, die entweder nur CD4 oder CD4 und einen der Korezeptoren CXCR4 oder CCR5 exprimieren, konnte die Korezeptorspezifität der [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren bestätigt werden. Hierbei zeigten die für EGFP kodierenden [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren einen höheren unspezifischen Titer auf den GHOST CCR5- bzw. GHOST CXCR4-Zellen, verglichen mit den entsprechenden für β -Gal kodierenden Vektoren (Abb. 3.1.2 und 3.1.6). Die geringe Hintergrund-Transduktion von GHOST CCR5-Zellen durch [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren kann durch die CXCR4-Hintergrundexpression der GHOST-Zellen, die weniger als 10 % der CXCR4-Expression der GHOST CXCR4-Zellen entspricht, erklärt werden (Edinger *et al.*, 1997, Polzer *et al.*, 2001). Während jedoch β -Gal-kodierende [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren keinen Hintergrund auf GHOST CXCR4-Zellen zeigten, war dies bei den EGFP-kodierenden Vektoren der Fall. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass GHOST-Zellen ein HIV-1 Tat-induzierbares GFP-Expressionskonstrukt enthalten. Auch ohne das Vorhandensein von Tat zeigten diese Zellen eine erhöhte Eigenfluoreszenz, die durch eine geringe basale GFP-Expression erklärbar sein könnte. Diese Eigenfluoreszenz machte eine Analyse der transduzierten Zellen auf EGFP unmöglich, beeinträchtigte jedoch auch die durchflusszytometrische Analyse der Zellen bezüglich der Expression des Oberflächenmarkers Δ LNGFR. Grund hierfür ist die Überlappung des EGFP-Spektrums mit dem Spektrum der Farbstoffe, die an die Antikörper zur Δ LNGFR-Detektion konjugiert sind. Im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Analyse hat die Hintergrundfluoreszenz in den GHOST Zellen auf die Detektion von β -Gal im X-Gal-Test keinen Einfluß.

Daher wurden zur Titration der Vektorstocks für die Versuche zur Optimierung der PBMC-Transduktion statt der GHOST-Zellen die CXCR4- und CCR5-positive T-Zelllinie A3.01 CCR5 verwendet, die kein GFP-Expressionskonstrukt enthält.

4.1.4 Gentransfer in primäre humane CD4-positive PBL mittels [MLV(HIV)] und [MLV(GaLV)] Vektoren

4.1.4.1 Rezeptorexpression auf PBL unter Stimulation

Um die optimalen Bedingungen zur PBL-Transduktion mittels [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren zu definieren, wurde das Expressionsmuster von CD4, CXCR4 und CCR5 bei unterschiedlich langer Stimulation mit PHA untersucht. Ziel war es, die Zellen so zu stimulieren, dass die CD4- und Korezeptorexpression auf den stimulierten Zellen möglichst genau dem Expressionsmuster im Vollblut entsprach. Die Ergebnisse zeigten, dass dies bei 24-stündiger Stimulation mit PHA/IL-2-Medium und anschließender 48-stündiger Kultivierung in IL-2-haltigem Medium in Abwesenheit von PHA gegeben war. Während bei einer 72-stündigen Stimulation mit PHA und IL-2 eine starke Abnahme des CD4/CD8-Verhältnisses und ein fast vollständiger Verlust der CCR5-Expression auf den CD4-positiven Lymphozyten zu beobachten war, sank das CD4/CD8-Verhältnis bei nur 24-stündiger PHA/IL-2 Stimulation mit anschließender Kultivierung in IL-2 Medium weniger stark ab. Auch die CCR5-Expression auf den CD4-positiven Lymphozyten blieb unter diesen Bedingungen relativ konstant. Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4 veränderte sich im Vergleich zur Situation im Vollblut bei nur 24-stündiger PHA-Stimulation weniger stark als bei 72-stündiger Stimulation.

Das Absinken der CD4/CD8-Ratio kann dadurch erklärt werden, dass CD8-positive Lymphozyten bei PHA-Stimulation früher zu proliferieren beginnen als CD4-positive Lymphozyten und sich dadurch das Verhältnis zu Gunsten der CD8-positiven Lymphozyten verschiebt (Movassagh *et al.*, 2000). Eine kürzere Dauer der PHA/IL-2 Stimulation könnte diesen Effekt geringer ausfallen lassen, was die Beobachtung bei nur 24-stündiger PHA/IL-2 Stimulation erklären könnte.

Für den Chemokinrezeptor CCR5 ist beschrieben, dass die Expression auf primären Lymphozyten in Anwesenheit von IL-2 zunimmt, ein Effekt, dem PHA entgegenwirkt (Bleul *et al.*, 1997, Weißmann *et al.*, 2000). Dieser Effekt kann der Grund für die Beobachtungen bei unterschiedlich langer PHA-Stimulation sein. Im Gegensatz zu CCR5 steigt die CXCR4-Expression sowohl in IL-2 Medium als auch in IL-2 Medium mit PHA. Das Ansteigen der CXCR4-Expression bei IL-2 bzw. PHA-Exposition primärer Lymphozyten ist ebenfalls bereits in der Literatur beschrieben worden (Bleul *et al.*, 1997).

4.1.4.2 CD4- und Korezeptor-spezifischer Gentransfer in PBL

Durch Transduktion primärer T-Zellen mit den drei verschiedenen Pseudotypvektoren und anschließender CD4-Färbung der transduzierten Zellen konnte gezeigt werden, dass [MLV(HIV-1_{CXCR4})]- und [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren spezifisch die CD4-positive Fraktion primärer Lymphozyten transduzierten, während die [MLV(GaLV)]-Vektoren sowohl CD4-positive als auch CD4-negative Zellen transduzierten (Abb. 3.1.9). Bei einer ausreichend hohen Gentransfereffizienz der [MLV(HIV-1)]-Vektoren haben diese somit gegenüber [MLV(GaLV)]-Vektoren den Vorteil, dass eine Aufreinigung der CD4-positiven Lymphozyten vor oder nach der Transduktion nicht erforderlich ist. Insbesondere für die Gentherapie der HIV-Infektion wäre es wünschenswert, die CD4-positiven Lymphozyten infizierter Patienten in Gegenwart der CD8-positiven Lymphozyten zu kultivieren, da diese durch zytolytische Aktivität und sezernierte Faktoren wie z.B. β -Chemokine die HIV-Replikation hemmen können (Buseyne *et al.*, 1996, Yang *et al.*, 1997, Garzino-Demo *et al.*, 1998, Geiben-Lynn *et al.*, 2001, Chun *et al.*, 2001, Cocchi *et al.*, 2001).

[MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren transduzierten die CD4-positive Population primärer Lymphozyten am effizientesten. Während bei mit GaLV-Env pseudotypisierten MLV-Vektoren die Transduktionseffizienz mit einer m.o.i. von 0,1 und einmaliger Transduktion bei 9,5 % der CD4-positiven Population lag, war die Transduktion der CD4-positiven Population durch [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren bei gleicher Vektormenge mit 21 % um mehr als den Faktor 2 höher. CD4-negative Zellen wurden nicht transduziert. Die geringere Zahl an Zielzellen

für die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren (38,1-54,9 % CD4-positive Zellen) als für [MLV(GaLV)]-Vektoren (alle PBL) kann eine Erklärung für die höhere Transduktionseffizienz dieser Pseudotypvektoren sein.

In unterschiedlichen Ansätzen zur Vektorgewinnung und Transduktion wurden mit [MLV(GaLV)]-Vektoren höhere Transduktionsraten von 25-95 % in CD3-positiven PBMC erzielt (Bunnell *et al.*, 1995, Fehse *et al.*, 1998, Ayuk *et al.*, 1999, Dardalhon *et al.*, 1999, Movassagh *et al.*, 2000, Lamana *et al.*, 2001), allerdings unter Verwendung von 10- bis 500-fach höheren Vektormengen als in dieser Arbeit. Vielfach wurden dabei auch mehrere aufeinanderfolgende Transduktionen durchgeführt.

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengefaßten Daten zeigen, dass beim Vergleich von [MLV(GaLV)]- Vektoren mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren letztere nicht nur eine spezifische, sondern auch eine effektivere Transduktion der CD4-positiven Zielpopulation im Zellgemisch von Gesamt-PBL ermöglichen. Gegenüber den [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren zeigten die [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren mit 10,8 % transduzierten CD4-positiven PBL eine geringere Effizienz. Der wesentlich niedrigere Prozentsatz CD4/CCR5-positiver Zellen (4,2-5,2 %) im Vergleich zu CD4/CXCR4-positiven Zellen (38,1-54,9 %) in menschlichen PBL bedingt offensichtlich die niedrige Transduktionseffizienz der [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren in Gesamt-PBL und der CD4-positiven Population. Daher scheinen [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren geeigneter für eine hocheffiziente Transduktion der CD4-positiven Lymphozyten.

Des Weiteren wurde beobachtet, dass die mit [MLV(HIV-1)]-Vektoren transduzierten PBL zwar alle CD4-positiv waren (Abb. 3.1.9), dass die transduzierte Zellpopulation aber nicht einheitlich den Korezeptor exprimierte, für den der zur Transduktion eingesetzte Pseudotypvektor spezifisch war (Abb. 3.1.10). Während CD4 konstitutiv exprimiert wird (Petrie *et al.*, 1990), kann die Expression der Chemokinrezeptoren mit der Zeit, insbesondere unter Stimulation bzw. nach Exposition mit HIV-1 Hüllproteinen schwanken.

CCR5 wird vorwiegend auf Memory-T-Zellen exprimiert, während die CXCR4-Expression auf naiven, unstimulierten T-Zellen signifikant höher ist als auf

Memory-T-Zellen. (Bleul *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1999). Die Tatsache, dass mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren transduzierte Zellen CCR5-positiv sind, könnte daher durch die vorhandene, wenn auch geringe CXCR4-Expression auf den CCR5-positiven Memory-T-Zellen zu erklären sein. Dies könnte ebenfalls erklären, warum ein Grossteil der mit [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren transduzierten Zellen CXCR4-positiv war.

Bei Stimulation primärer Lymphozyten mit PHA und IL-2 verändert sich jedoch das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren (Bleul *et al.*, 1997). Für die Stimulation mit monoklonalen CD3- und CD28-Antikörpern konnte eine phenotypische Veränderung naiver T-Zellen gezeigt werden (Riley *et al.*, 1998).

Eine weitere Ursache der veränderten Korezeptorexpression könnte eine Internalisierung der Korezeptoren nach der Infektion durch die Vektorpartikel sein. Nach der Infektion einer Zelle durch HIV kommt es vielfach zur Internalisierung der Korezeptoren (Amadori *et al.*, 1992, Cefai *et al.*, 1992, Karsten *et al.*, 1996, Ugolini *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1998, Chenine *et al.*, 2000). Dies könnte auch nach Transduktion mit Vektoren der Fall sein, die mit Hüllproteinen des HIV-1 pseudotypisiert sind.

Durch die Veränderung der Korezeptorexpression auf den transduzierten Zellen konnte die Korezeptorspezifität der [MLV(HIV-1)]-Vektoren bei primären T-Zellen nicht gezeigt werden. Die Transduktion der GHOST-Zellen mit den zwei [MLV(HIV-1)]-Vektoren zeigte jedoch eine spezifische Transduktion der Zellen, die den jeweiligen Korezeptor exprimierten (Abb. 3.1.6). Daher ist anzunehmen, dass eine spezifische Transduktion auch bei primären T-Zellen erfolgt, diese durch eine Veränderung des Expressionsmusters der Korezeptoren nach der Transduktion jedoch nicht im FACS ausgewertet werden kann.

Die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren zeigten neben der CD4-Spezifität die höchste Gentransfereffizienz in CD4-positiven Zellen. Die transduzierte Zellpopulation bestand sowohl aus CXCR4- als auch aus CCR5-positiven CD4-positiven T-Zellen, so dass bei einer klinischen *ex-vivo* Anwendung sowohl CD4/CXCR4- als auch CD4/CCR5-positiv Lymphozyten reinfundiert würden. Die Weiterent-

wicklung der [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren scheint aufgrund der geringen Transduktionsrate in CD4-positiven Zellen, bedingt durch die niedrige Zahl CCR5-positiver CD4-Lymphozyten und aufgrund der Tatsache, dass sich das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf den transduzierten Zellen sich nicht von dem der mit [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren transduzierten Zellen unterscheidet, für die hoch-effiziente Transduktion primärer T-Lymphozyten nicht sinnvoll. Daher wurden für die Versuche zur Optimierung des Gentransfers nur die [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-, nicht die [MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren verwendet. Für die Pseudotypisierung lentiviraler Vektoren, die auch die nicht-proliferierenden CD4/CCR5-positiven Monozyten und Makrophagen transduzieren können, könnten CD4/CCR5-trope Pseudotypvektoren von Vorteil sein, da diese Zellen für CXCR4-trope Viren wenig suszeptibel sind (Di Marzio *et al.*, 1998).

4.1.5. Optimierung der Transduktionsbedingungen zum Gentransfer in humane primäre CD4-positive Lymphozyten mittels [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren

Für [MLV(MLV)]-Vektoren wurde beschrieben, dass durch Mehrfachtransduktionen die Gentransfereffizienz um 3-9 % je weiterer Transduktion zunimmt (Pollok *et al.*, 1998). Auch für [MLV(GaLV)]-Vektoren sind Protokolle mit mehreren aufeinanderfolgenden Transduktionen beschrieben, um eine höhere Gentransfereffizienz zu erzielen (Leavitt *et al.*, 1996, Morgan *et al.*, 1996, Onodera *et al.*, 1998, Pollok *et al.*, 1998, Li *et al.*, 1998, Movassagh *et al.* 2000, Uckert *et al.*, 2000). Auch bei [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren konnte in dieser Arbeit durch wiederholte Transduktionen eine Steigerung der Gentransferrate um 7 bis 45 % erzielt werden. Der Effekt war jedoch stark donorabhängig. Wurde schon mit der ersten Transduktion ein relativ hoher Prozentsatz der Zellen transduziert, so war die Effizienzsteigerung nach der dritten Transduktion relativ niedrig. War hingegen die Transduktionsrate nach der ersten Transduktion geringer, so war die Steigerung mit der dritten Transduktion vergleichsweise hoch. Auch hier waren die Schwankungen der erzielten Ergebnisse zwischen den Zellen unterschiedlicher Donoren sehr stark. Ein Grund für die unterschiedlichen Steigerungsraten könnte die Internalisierung von CD4 oder CXCR4 nach Anbindung von HIV-1 gp120 sein. Für die HIV-1 Infektion von Zellen ist vielfach eine Internalisierung von CD4 und CXCR4 nach Bindung von gp120

beschrieben (Amadori *et al.*, 1992, Cefai *et al.*, 1992, Karsten *et al.*, 1996, Ugolini *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass alle mit [MLV(HIV-1)]-Vektoren transduzierten Zellen im FACS CD4-positiv waren (Abb. 3.1.9 und 3.1.10), spricht eher für eine Internalisierung des Korezeptors, was auch eine Erklärung für das Korezeptor-Expressionsmuster fünf Tage nach der Transduktion sein könnte (Abb. 3.1.10).

Ein weiter Grund für die großen Schwankungen könnte eine unterschiedliche Kinetik in der Stimulation der Zellen der einzelnen Donoren sein. Wären am Tag der ersten Transduktion die Zellen eines Donors stärker stimuliert, könnte die Transduktionsrate höher sein, während bei anderen Donoren die Zellen erst am zweiten Tag der Transduktion optimal stimuliert wären und daher ein großer Anstieg der Transduktionsrate bei einer zweiten Transduktion erfolgen würde.

Mehrfache Transduktionen verlängern die *ex-vivo* Kulturdauer der Zellen vor der Reinfusion und erhöhen damit Risiken wie Kontaminationen, Immunreaktionen gegen Mediumbestandteile und Veränderungen des T-Zell-Repertoires (Bunnell *et al.*, 1997, Movassagh *et al.*, 2000). Somit wäre ein Umgehen mehrfacher Transduktionen durch einmalige, hocheffiziente Transduktion der Zellen von großem Vorteil.

Für die Verwendung von autologem menschlichen Serum bei der Transduktion primärer T-Zellen mit [MLV(GaLV)]-Vektoren wurde eine Erhöhung der Gentransfereffizienz um den Faktor zwei beschrieben (Ayuk *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von 10 % autologem Plasma und 10 % FKS für [MLV(GaLV)]-Vektoren ebenfalls zu einer Verdoppelung der Gentransfereffizienz führte, für [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren betrug die Steigerung 30 %. Die Schwankung bei der Verwendung von Zellen verschiedener Donoren war hierbei sehr gering. Wurden statt 10 % FKS und 10 % autologem Plasma 20 % autologes Plasma verwendet, so stieg die Gentransferrate für [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren um weitere 6,5 %, nicht jedoch bei [MLV(GaLV)]-Vektoren. Der Grund für den positiven Effekt autologen Plasmas auf die Transduktionsrate ist bisher nicht bekannt, es könnte aber einen Einfluss sowohl auf die Virus-Zell-Interaktion als auch auf die Vektorstabilität haben

(Uckert, persönliche Mitteilung). Für die klinische Anwendung von [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren wäre die Verwendung von 20 % autologen Plasmas anzustreben, da eine *ex-vivo* Kultivierung der Zellen in Medium mit fötalem Kälberserum (FKS) Übertragungsrisiken xenogener Erreger birgt. Aufgrund der begrenzten Menge autologen Plasmas, das zur Verfügung stand, wurden für die weiteren Optimierungsversuche nur 10 % autologes Plasma und 10 % FKS verwendet.

Es wurde untersucht, ob durch eine Steigerung der Vektormenge bei nur einmaliger Transduktion die gleichen Transduktionsraten wie bei dreimaliger Transduktion mit einer m.o.i. von 1 erreicht werden können. Die Versuche zeigten, dass bei einer m.o.i. von 5 im Vergleich zu einer m.o.i. von 1 bei einfacher Transduktion die Gentransfereffizienz für humane PBL bereits im Durchschnitt um mehr als das Dreifache ansteigt. Bei weiterer Steigerung der Vektormenge (m.o.i. = 10 bzw. 15) war der Anstieg der Transduktionsrate geringer, maximal wurden mit einer m.o.i. von 15 bei einem Donor 91 % der CD4-positiven Zellen transduziert.

Die Analyse der mit hoher m.o.i. transduzierten Zellen im FACS deutete darauf hin, dass die Steigerung der Vektormenge über eine m.o.i. von 10 zu Mehrfachintegrationen des Transfervektors führt. Da Mehrfachintegrationen ein erhöhtes Risiko der Insertionsmutagenese in den transduzierten Zellen bergen (Vanin *et al.*, 1994), scheint die Verwendung einer m.o.i. von 5-10 optimal, um mit einmaliger Transduktion einen möglichst hohen Prozentsatz CD4-positiver Zellen zu transduzieren und das Risiko für Mehrfachintegrationen zu reduzieren.

Nach Optimierung der Transduktionsmethode unter Berücksichtigung aller optimierten Faktoren konnten mit den [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren bis zu 80 % der CD4-positiven T-Zellen mit einer m.o.i. von 5-10 und einmaliger Transduktion in Anwesenheit autologen Plasmas transduziert werden. Ähnlich hohe Transduktionsraten konnten bisher nur bei mehrfacher Transduktion und zum Teil mit wesentlich höherer m.o.i. erzielt werden (Ayuk *et al.*, 1999, Pollok *et al.*, 1998, Movassagh *et al.*, 2000). Die Verwendung höherer [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektormengen erlaubt die Transduktion von bis zu 91 % der CD4-

positiven Zellen, birgt aber das Risiko von Mehrfachtransduktionen und damit von Insertionsmutagenesen.

4.2 VERGLEICH DER WIRKUNG VERSCHIEDENER INHIBITORISCHER GENE FÜR DIE GENTHERAPIE DER HIV-INFEKTION

Das primäre Ziel der Entwicklung von [MLV(HIV-1)]-Vektoren ist der Gentransfer in CD4-positive Lymphozyten zur intrazellulären Immunisierung gegen HIV. Parallel zur Optimierung des [MLV(HIV-1)]-vermittelten Gentransfers in primäre CD4-positive Lymphozyten wurden daher verschiedene bekannte HIV-inhibitorische Gene auf ihre Wirksamkeit hinsichtlich der Hemmung der Virusreplikation getestet. Bisher gibt es keine Arbeiten, in denen die von verschiedenen Gruppen entwickelten inhibitorischen Gene unter gleichen Bedingungen, d.h. im gleichen Expressionsvektor, im gleichen Zellsystem und nach Infektion mit dem gleichen Virusstamm bei ebenfalls gleicher Virusmenge, getestet wurden. Dadurch war ein direkter Vergleich der inhibitorischen Wirksamkeit bisher nicht möglich.

Für den Vergleich wurden die potentiellen Inhibitoren IL-16 (Baier *et al.*, 1995, Zhou *et al.*, 1997), einkettige Antikörperfragmente gegen Integrase (α -IN-scFv, Levy-Mintz *et al.*, 1996) und Reverse Transkriptase (α -RT-scFv, Shaheen *et al.*, 1996) und zwei Ribozyme, die die virale RNA in der 5'-LTR (HP-LTR-2, Ojwang *et al.*, 1992) bzw. im *pol*-Leserahmen (HH-POL-13, Klebba, 2000) spalten, ausgewählt.

Zur intrazellulären Expression der Inhibitoren in T-Zellen wurde der für die Genexpression in hämatopoetischen Zellen optimierte Expressionsvektor MgSLdelS verwendet. Er kodiert als Markergen die trunkierte Form des humanen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors (Δ LNGFR). Dieser Oberflächenmarker eignet sich für eine spätere therapeutische Anwendung, da es ein humaner Rezeptor ist und er daher keine Immunreaktion hervorruft. Er ist im FACS leicht nachzuweisen und wird nativ nur auf neuronalen Zellen exprimiert. Die HIV-inhibitorische Wirkung der verschiedenen Gene wurde nach retroviralem Gentransfer in die T-Zelllinie SupT1 untersucht. SupT1-Zellen waren bereits für die ersten HIV-Inhibitionsversuche der scFv gegen HIV-1 Integrase (IN) und

Reverse Transkriptase (RT) verwendet worden (Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996), in denen eine deutliche Inhibition der Replikation zu beobachten war. Auch in vielen weiteren Arbeiten zur Bewertung der inhibitorischen Wirkung von anti-HIV-Genen wurde die Zelllinie SupT1 als Indikatorzelllinie verwendet (Morgan *et al.*, 1994, Ragheb *et al.*, 1995, Mhashilkar *et al.*, 1999, Adelson *et al.*, 1999, Krebs *et al.*, 1999), weshalb sie zunächst auch in dieser Arbeit für die Inhibitionskinetiken ausgewählt wurde. Zur Transduktion der SupT1-Zellen mit den Expressionsvektoren der Inhibitorgene wurden [MLV(GaLV)]-Vektoren eingesetzt. Nach magnetischer Zellsortierung auf den Oberflächenmarker Δ LNGFR wurden SupT1-Linien erhalten, die zu 95-98 % den jeweiligen Transfervektor exprimierten. Diese Kulturen wurden in die HIV-Inhibitionsversuche eingesetzt.

Ein Problem beim Vergleich verschiedener HIV-Inhibitoren bestand bisher darin, dass ihr Potential zur Hemmung der HIV-1 Replikation mit unterschiedlichen HIV-Isolaten getestet wurde. Um die Inhibitor-exprimierenden SupT1-Zellen auf eine Inhibition der HIV-Replikation hin zu vergleichen, wurden alle Linien mit den HIV-1 Stämmen NL4-3 bzw. IIIB infiziert. Das α -IN-scFv ist gegen die Integrase von HIV-1_{NL4-3} (Bizub-Bender, 1994, Levy-Mintz, 1996), das α -RT-scFv gegen die RT von HIV-1_{IIIB} generiert worden (Intracel Inc., Cambridge, Massachusetts, Shaheen *et al.*, 1996). Die Daten zur HIV-Inhibition der scFv gegen Integrase und Reverse Transkriptase basieren auf Infektionen von SupT1-Zellen mit HIV-1_{NL4-3} und HIV-1_{R7-HXB2} (Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996). Die vorhandenen HIV-Inhibitionsdaten der Ribozyme wurden durch Infektion von Ribozym-positiven Zellen mit HIV-1_{IIIB} gewonnen (Klebba, 2000).

Die Infektion erfolgte zunächst mit HIV-1_{NL4-3}. Im Vergleich zu den SupT1-Zellen ohne Transfervektor zeigten die Zellen mit dem Kontrollvektor LCo, der kein inhibitorisches Gen enthält, einen verzögerten Anstieg der p24-Konzentration, die ein Korrelat der Menge von HI-Virionen darstellt. Eventuell hat die Expression des Vektors einen schwach inhibitorischen Einfluß auf die HIV-Replikation. Nur in zwei Inhibitor-Kulturen lag die maximal erreichte p24-Konzentration als Maß der Virusreplikation über den gesamten Zeitraum von 17 Tagen nach der Infektion signifikant niedriger als in den Kontrollen: in den

SupT-1 Kulturen, die das α -RT-scFv exprimierten, und in den für das HP-LTR-2-positiven Kulturen. In Letzteren war nach 11 Tagen keine Replikation mehr nachweisbar. Im Mikroskop zeigte sich jedoch, dass die Zellen abgestorben waren und daher keine Virusreplikation stattfinden konnte. Da in den uninfizierten SupT1 HP-LTR-2 Kulturen kein Unterschied in der Zellviabilität im Vergleich mit den anderen SupT1-Kulturen festgestellt werden konnte (nicht gezeigt), scheint das Ribozym selbst keinen toxischen Effekt auf die Zellen zu haben. Auch in den Arbeiten von Klebba *et al.* (2000) und Ojwang *et al.* (1992) wurde keine zelltoxische Wirkung des HP-LTR-2-Ribozyms beschrieben. Der Grund für das Absterben der Zellen ist demnach unklar.

Die das HH-POL-13 Ribozym-exprimierenden SupT1-Kulturen zeigten eine um 3-4 Tage verzögerte HIV-1 Replikation. Für das HH-POL-13 Ribozym wurde eine Inhibition der HIV-Replikation um 4 Größenordnungen über 42 Tage bei einer Infektion von Hut78-Zellen mit HIV-1_{IIIb} (m.o.i. = 0,01) beschrieben (Klebba, 2000). Im Vergleich zu dem hier durchgeführten Experiment wurde also sowohl ein anderer Virusstamm als auch eine andere Zelllinie verwendet, was möglicherweise Gründe für eine schwächere Inhibition der Replikation sein könnten. Der retrovirale Expressionsvektor war in beiden Versuchsansätzen identisch.

Die IL-16 und α -IN-scFv-positiven Kulturen zeigten keine Replikations-Inhibition. Im Vergleich zu den publizierten Daten zum α -IN-scFv von Levy-Mintz *et al.* (1996) und dem α -RT-scFv von Shaheen *et al.* (1996) wurde nur ein anderer Transfervektor eingesetzt, Zelllinie und Virusstamm waren identisch. Nach Abschluss der Arbeiten wurde jedoch eine Korrektur dieser Veröffentlichungen zu den α -IN- und α -RT-scFv (Levy-Mintz *et al.*, 1996, Shaheen *et al.*, 1996) publiziert. Diese besagt, dass sich die Autoren in der m.o.i., mit der die HIV-1 Inhibitionsstudien durchgeführt worden waren, verrechnet hatten (J. Virol. 2001, 75: 1092-1093). Die m.o.i. lag in den publizierten Versuchen um Faktor 2000 für das α -IN-scFv bzw. Faktor 300 für das α -RT-scFv niedriger als zunächst angegeben. Wahrscheinlich ist daher die in dieser Arbeit eingesetzte, höhere m.o.i. der Grund für die nicht bzw. nur sehr schwach vorhandene Inhibition der HIV-Replikation der beiden scFv. Fraglich ist, ob eine Inhibition der Virusrepli-

kation bei einer extrem niedrigen m.o.i. von 4×10^{-5} und 2×10^{-5} relevant ist. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass die Virusmengen *in vivo* ähnlich gering sind und ein inhibitorischer Effekt mit den scFv gegen IN und RT erzielt werden könnte.

Für Interleukin-16-exprimierende SupT1-Zellen konnte keine Inhibition der HIV-Replikation beobachtet werden. Gründe können eine zu niedrige IL-16 Expression sein oder mangelnde inhibitorische Wirkung des Interleukins. Die HIV-inhibitorische Wirkung von IL-16 ist nach wie vor umstritten. Nach Zugabe von rekombinantem IL-16 zu T-Zellen wurde eine Inhibition von HIV-1 beobachtet (Baier *et al.*, 1995). Auch von retroviralen Vektoren in Jurkat T-Zelllinien exprimiertes IL-16 vermittelte eine Inhibition der HIV-Replikation (Zhou *et al.*, 1997). Andere Gruppen konnten diese inhibitorische Wirkung in anderen Zellsystemen jedoch nicht beobachten (Gao *et al.* 1997, Amiel *et al.*, 1999).

Klebba *et al.* (2000a) publizierten, dass das Maß der HIV-1 Inhibition von der Expressionsstärke des Transfervektors und damit des Inhibitors abhängig ist. Hochexpressierende Zellen vermittelten eine längeranhaltende Inhibition als Mischkulturen mit im Schnitt niedrigerer Expression des Vektors. Die Inhibitorexpression korrelierte dabei direkt mit der Expression des Oberflächenmarkers Δ LNGFR. Anhand des MgEGFP Δ LNGFR-Vektors wurde untersucht, ob auch die Expression eines 5'-kodierte Proteins im bicistronischen Vektor für die Inhibitoren IL-16, α -IN-scFv und α -RT-scFv mit der Δ LNGFR-Expression korreliert. Da in Zellen mit höherer Δ LNGFR-Expression auch die EGFP-Expression stärker war, kann davon ausgegangen werden, dass diese positive Korrelation auch für andere Inhibitoren gilt, deren cDNA auf dem Expressionsvektor 5' vom Markergen lokalisiert ist.

Die verschiedenen SupT1 Inhibitorkulturen zeigten eine sehr unterschiedliche Δ LNGFR-Expressionsstärke. Auf den Ribozym-exprimierenden Kulturen wurde der Marker am stärksten exprimiert. Dies kann dadurch begründet sein, dass bei diesen Vektoren kein Splicing notwendig ist, um den Δ LNGFR zu exprimieren (Abb. 3.2.1).

Um zu untersuchen, ob SupT1-Kulturen, die eine höhere Vektorexpression zeigen, auch eine bessere Inhibition der HIV-Replikation vermitteln, wurden die Kulturen auf hochexprimierende Zellen sortiert. Im Schnitt zeigten die Ribozym-exprimierenden Zellen und die Kultur, die den Kontrollvektor exprimiert, zwar auch nach der Sortierung eine stärkere Δ LNGFR-Expression als die sortierten scFv- und IL-16 exprimierenden Kulturen. Allerdings war auch in diesen die Δ LNGFR-Expression nach der Sortierung im Vergleich zu vorher signifikant erhöht. Die so sortierten SupT1-Kulturen wurden in eine weitere Infektionskinetik mit HIV-1_{NL4-3} eingesetzt. Die einzige SupT-1 Kultur, in der im Vergleich zu den Kontrollen eine Inhibition der Replikation zu erkennen war, war die HP-LTR-2-positive SupT1-Linie. Der p24-Wert lag im Maximum etwa eine Größenordnung unter dem Kontrollwert. Es zeigte sich jedoch wieder, dass diese Zellen abgestorben waren. Die wenig signifikante Inhibition des α -RT-scFv aus dem ersten Experiment war nicht reproduzierbar. Die anfänglich beobachtete schwache Inhibition könnte versuchsbedingte Schwankungen widerspiegeln.

In einem dritten Infektionsversuch wurden alle sortierten Kulturen mit HIV-1_{III B} infiziert um zu untersuchen, ob die für die Ribozyme HH-POL-13 und HP-LTR-2 publizierte, langanhaltende HIV-1 Inhibition spezifisch für das verwendete Virusisolat HIV-1_{III B} ist (Klebba *et al.*, 2000, Klebba, 2000). Auch in diesem Experiment zeigten nur die HP-LTR-2-positiven SupT1-Kulturen im Mittel eine Verzögerung der HIV-Replikation, in zwei von drei Replikaten war bis 15 Tage nach Infektion kein p24-Protein detektierbar. Die Zellen zeigten jedoch im Vergleich zu den anderen Kulturen eine verlangsamte Proliferation. Eine Inhibition der HIV-Replikation über 49 Tage um 4 Größenordnungen (Klebba *et al.*, 2000) konnte nicht reproduziert werden. Für das Polymerase-Ribozym (HH-POL-13) wurde bei Infektion mit einer m.o.i. von 0,01 eine Inhibition der HIV-1_{III B}-Replikation über 56 Tage um 4 Größenordnungen gezeigt (Klebba, 2000). Auch diese Inhibition konnte nicht reproduziert werden. Jedoch wurden für die veröffentlichten Inhibitionsstudien mit HP-LTR-2 und HH-POL-13 PM1-Zellen mit dem Ribozym-exprimierenden Vektor transduziert und infiziert. In dieser Arbeit wurden SupT1-Zellen verwendet. PM1-Zellen ermöglichen wahrscheinlich eine höhere Transgenexpression nach retroviralem Gentransfer im Vergleich zu SupT1-Zellen (von Laer, persönliche Mitteilung). Dies könnte eine Erklärung für

die mangelnde Reproduzierbarkeit der HIV-Inhibition durch die Ribozyme sein. Eine weitere Möglichkeit ist eine unterschiedliche Permissivität von PM1 und SupT1-Zellen für HIV.

Für klinische Anwendungen solcher HIV-inhibitorischer Gene wäre eine langanhaltende und hohe Expression in primären T-Zellen notwendig. Daher erscheint die Weiterentwicklung der retroviralen Expressionsvektoren für eine hohe und langanhaltende Expression in primären T-Zellen sinnvoll.

Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass der jeweils verwendete Expressionsvektor für den HIV-Inhibitor, der verwendete Zelltyp, in dem das inhibitorische Gen exprimiert wird, sowie der verwendete Virusstamm und die Virusmenge bei der Infektion einen großen Einfluss auf das Maß der inhibitorischen Wirksamkeit einzelner Inhibitoren haben können. Um eine objektive Aussage über die Wirksamkeit verschiedener HIV-inhibitorischer Gene zu treffen, reicht es nicht aus, die Inhibitionsversuche mit nur einem Zelltyp und einem Virusisolat durchzuführen. Vielmehr sollte die Hemmung der HIV-Replikation durch einen Inhibitor möglichst unabhängig vom verwendeten Zelltyp und Virusisolat sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Für verschiedene gentherapeutische Ansätze zur Behandlung der HIV-Infektion oder anderer erworbener oder angeborener Krankheiten wie z. B. der angeborenen Immunschwäche SCID ist ein hocheffizienter Gentransfer in CD4-positive T-Lymphozyten erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurden daher geeignete retrovirale Pseudotypvektoren weiterentwickelt. Unter Einsatz von Markergenen wurden Methoden der Transduktion primärer humaner Lymphozyten optimiert. Schließlich wurden verschiedene potentielle therapeutische anti-HIV-Gene durch retroviralen Gentransfer in humane T-Zelllinien übertragen und hinsichtlich der Hemmung der *in-vitro* Replikation verschiedener HIV-Stämme verglichen.

Zunächst wurden stabile Verpackungszelllinien zur Herstellung von [MLV(HIV-1)]- und [MLV(GaLV)]-Pseudotypvektoren entwickelt, die ein für die Analyse der Transduktionseffizienz geeignetes Markergen übertragen. [MLV(HIV-1)]-Vektoren konnten mit Titern bis zu 2×10^5 i.E. / ml hergestellt werden.

Die Optimierung der Kultivierung primärer humaner T-Lymphozyten vor dem *ex-vivo* Gentransfer ergab, dass eine 24-stündige PHA/IL-2 Stimulation mit anschließender 48-stündiger Kultivierung in IL-2 Medium optimal für die Transduktion primärer CD4-positiver T-Lymphozyten unter weitgehender Erhaltung des Expressionsmusters der Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 ist. Bei längerer Stimulation mit PHA und IL-2 verändert sich sowohl das CD4/CD8-Verhältnis als auch die CCR5-Expression gegenüber nativem Blut signifikant.

Die Analyse der Expression des übertragenen Markergens und anderen Oberflächenmarkern der Zellen nach der Transduktion zeigte eine strikte Abhängigkeit der Transduktion der [MLV(HIV-1)]-Vektoren vom HIV-Rezeptor CD4, während herkömmliche [MLV(GaLV)]-Vektoren sowohl CD4-positive als auch CD4-negative Zellen transduzierten. Die Effizienz von [MLV(HIV-1)_{CXCR4}]-Vektoren für CD4-positive Zellen war signifikant höher als die der [MLV(GaLV)]-Vektoren, während die Transduktionseffizienz der

[MLV(HIV-1_{CCR5})]-Vektoren aufgrund der geringen Anzahl CCR5-positiver CD4-T-Zellen am niedrigsten war. Zwei Tage nach der Transduktion wurde eine reduzierte Korezeptorexpression in den Zellen nachgewiesen. Gründe hierfür könnten die Internalisierung der Korezeptoren nach der Transduktion oder eine durch die Kultivierung der Zellen bedingte Änderung der Expression sein.

Nach weiterer Optimierung des retroviralen Gentransferprotokolls, u.a. durch Verwendung autologen Plasmas, konnten schließlich bei einmaliger Transduktion mit einer m.o.i. von 5 mit den [MLV(HIV-1_{CXCR4})]-Vektoren Transduktionsraten von bis zu 80 % erreicht werden.

Zum Vergleich der Wirkung potentieller anti-HIV-Gene, die mit den neuen Vektoren in der Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS eingesetzt werden könnten, wurden fünf verschiedene HIV-Inhibitoren (zwei intrazellulär exprimierte Antikörperfragmente (scFv) gegen HIV-1 Integrase und Reverse Transkriptase, zwei Ribozyme, die die HIV-1 RNA in der 5'-LTR oder im Pol-Leserahmen spezifisch spalten, sowie Interleukin-16) in den gleichen Transfervektor kloniert und durch retroviralen Gentransfer in die T-Zelllinie SupT1 übertragen. In Infektionsversuchen mit zwei unterschiedlichen HIV-1 Stämmen vermittelte jedoch keiner der potentiellen Inhibitoren eine signifikante Resistenz gegenüber HIV-1. Erst nach Sortierung der Kulturen auf starke Expression der übertragenen Gene konnte in den sortierten Zellen eine geringe Hemmwirkung des 5'-LTR-spezifischen Ribozyms auf die *in-vitro* Replikation des Stammes HIV-1_{IIIB}, nicht jedoch auf die des Stammes HIV-1_{NL4-3} gezeigt werden. Die Signifikanz dieser Beobachtung muß über den Vergleich der Hemmwirkung weiterer Inhibitorgene geklärt werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

A

ADACHI, A., GENDELMAN, H. E., KOENIG, S., FOLKS, T., WILLEY, R., RABSON, A., MARTIN, M. A. (1986). Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone. *J. Virol.* 59: 284-291

ADELSON, M. E., MARTINAND-MARI, C., IACONO, K. T., MUTO, N. F., SUHADOLNIK, R. J. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1) replication in SupT1 cells transduced with an HIV-1 LTR-driven PKR cDNA construct. *Eur. J. Biochem.* 264: 806-815

AMADO, R. G., MITSUYASU, R. T., SYMONDS, G., ROSENBLATT, J. D., ZACK, J., SUN, L. Q., MILLER, M., ELY, J., GERLACH, W. (1999). A phase I trial of autologous CD34+ hematopoietic progenitor cells transduced with an anti-HIV ribozyme. *Hum. Gene Ther.* 10: 2255-2270

AMADORI, A., DE SILVESTRO, G., ZAMARCHI, R., VERONESE, M. L., MAZZA, M. R., SCHIAVO, G., PANOZZO, M., DE ROSSI, A., OMETTO, L., MOUS, J. (1992). CD4 epitope masking by gp120/anti-gp120 antibody complexes. A potential mechanism for CD4+ cell function down-regulation in AIDS patients. *J. Immunol.* 148: 2709-2716

AMIEL, C., DARCISSAC, EL, TRUONG, M. J., DEWULF, J., LOYENS, M., MOUTON, Y., CAPRON, A., BAHR, G. M. (1999). Interleukin-16 (IL-16) inhibits human immunodeficiency virus replication in cells from infected subjects, and serum IL-16 levels drop with disease progression. *J. Infect. Dis.* 79: 83-91

ASAHARA, T., KALKA, C., ISNER, J. M. (2000). Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther.* 7: 451-457

B

BARRE-SINOUSI, F., CHERMANN, J. C., REY, F., NUGEYRE, M. T., CHAMARET, S., GRUEST, J., DAUGUET, C., AXLER-BLIN, C., VEZINET-BRUN, F., ROUZIOUX, C., ROZENBAUM, W., MONTAGNIER, L. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871

BAUER, G., SELANDER, D., ENGEL, B., CARBONARO, D., CSIK, S., RAWLINGS, S., CHURCH, J., KOHN, D. B. (2000). Gene therapy for pediatric AIDS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 918: 318-329

BECK-ENGESER, G., STOCKING, C., JUST, U., ALBRITTON, L., DEXTER, M., SPOONCER, E., OSTERTAG, W. (1991). Retroviral vectors related to the myeloproliferative sarcoma virus allow efficient expression in hematopoietic stem and precursor cell lines, but retroviral infection is reduced in more primitive cells. *Hum. Gene Ther.* 2: 61-70

BENDER, J., TO, L. B., WILLIAMS, S., SCHWARTZBERG, L. (1992). Defining a therapeutic dose of peripheral blood stem cells. *J. Hematother.* 1: 329-334

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

BEVEC, D., DOBROVNIK, M., HAUBER, J., BOHNLEIN, E. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9870-9874

BIENIASZ, P. D., CULLEN, B. R. (1998). Chemokine receptors and human immunodeficiency virus infection. *Front. Biosci.* 3: 44-58

BIOCCA, S., NEUBERGER, M. S., CATTANEO, A. (1990). Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells. *EMBO* 9: 101-108

BIZUB-BENDER, D., KULKOSKY, J., SKALKA, A. M. (1994). Monoclonal antibodies against HIV type 1 integrase: clues to molecular structure. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1105-1115

BLAESE, R. M. (1995). Steps toward gene therapy: 2. cancer and AIDS. *Hosp. Pract. (off ed.)* 30: 37-45

BLAESE, R. M., CULVER, K. W., MILLER, D., CARTER, C. S., FLEISHER, T., CLERICI, M., SHEARER, G., CHANG, L., CHIANG, Y., TOLSTOSHEV, P., GREENBLATT, J. J., ROSENBERG, S. A., KLEIN, H., BERGER, M., MULLEN, C. A., RAMSEY, W. J., MUUL, L., MORGAN, R. A., ANDERSON, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA⁻ SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270: 475-480

BLEUL, C. C., WU, L., HOXIE, J. A., SPRINGER, T. A., MACKAY, C. R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1925-1939

BLOMER, U., NALDINI, L., KAFRI, T., TRONO, D., VERMA, I. M., GAGE, F. H. (1997). Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol.* 71: 6641-6649

BONINI, C., FERRARI, G., VERZELETTI, S., SERVIDA, P., ZAPPONE, EL, RUGGIREI, L., PONZONI, M., ROSSIGNI, S., MAVILIO, F., TRAVERSARI, C., BORDIGNON, C. (1997). HSV-tk gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus host leukemia. *Science* 276:1719-1723

BONYHADI, M. L., MOSS, K., VOYTOVICH, A., AUTEN, J., KALFOGLOU, C., PLAVEC, I., FORESTELL, S., SU, L., BOHNLEIN, E., KANESHIMA, H. (1997). RevM10-expressing T cells derived in vivo from transduced human hematopoietic stem-progenitor cells inhibit human immunodeficiency virus replication. *J. Virol.* 71: 4707-4716.

BORDIGNON, C., NOTARANGELO, L. D., NOBILI, N., FERRARI, G., CASTRATI, G., PANINA, P., MAZZOLARI, E., MAGGIONI, D., ROSSI, CL, SERVIDA, P., UGAZIO, A. G., MAVILIO, F. (1995). Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA⁻ immunodeficient patients. *Science* 270: 470-474

BOUHAMDAN, M., KULKOSKY, J., DUAN, L. X., POMERANTZ, R. J. (2000). Inhibition of HIV-1 replication and infectivity by expression of a fusion protein, VPR-anti-Integrase single-chain variable fragment (sFv): intravirion molecular therapies. *J. Hum. Virol.* 3: 6-15

BOUR, S., GELEZIUNAS, R., WAINBERG, M. A. (1995). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) CD4 receptor and its central role in promotion of HIV-1 infection. *Microbiol. Rev.* 59: 63-93

BUNNELL B. A., METZGER, M., BYRNE, E., MORGAN, R. A. DONAHUE, R. E. (1997). Efficient in vivo marking of primary CD4⁺ T lymphocytes in nonhuman primates using a gibbon ape leukemia virus-derived retroviral vector. *Blood* 89: 1287-1995

BUSEYNE, F., FEVRIER, M., GARCIA, S., GOUGEON, M. L., RIVIERE, Y. (1996). Dual function of a human immunodeficiency virus (HIV)-specific cytotoxic T-lymphocyte clone: inhibition of HIV replication by non-cytolytic mechanisms and lysis of HIV-infected CD4⁺ cells. *Virology* 225: 248-253

C

CAHN, J. Y., DECONINCK, E., TIBERGHIE, P., BRION, A., RACADOT, E., DESCHASEAUX, M., ANGININ, R., VOILLAT, L., VUILLIER, J., FONTAN, J., MOREL, P., CORDONNIER, J. M., COMPAROT, S., WORONOFF-LEMSI, M. C., HERVE, P. (1999). Low dose T-cell lymphocyte infusion combined with marrow T-cell depletion as prophylaxis of acute graft vs host disease for HLA identical sibling bone marrow transplantation. *Hematol. Cell. Ther.* 41: 31-37

CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, G., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J.-L., BOUSSO, P., LE DEIST, F., FISCHER, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672

CEFAI, D., FERRER, M., SERPENTE, N., IDZIOREK, T., DAUTRY-VARSAT, A., DEBRE, P., BISMUTH, G. (1992). Internalization of HIV glycoprotein gp120 is associated with down-modulation of membrane CD4 and p56lck together with impairment of T cell activation. *J Immunol* 149: 285-94

CHENINE, A. L., SATTENTAU, Q., MOULARD, M. (2000). Selective HIV-1-induced downmodulation of CD4 and coreceptors. *Arch. Virol.* 145: 455-471

CHUN, T. W., JUSTEMENT, J. S., MOIR, S., HALLAHAN, C. W., EHLER, L. A., LIU, S., MCLAUGHLIN, M., DYBUL, M., MICAN, J. M., FAUCI, A. S. (2001). Suppression of HIV replication in the resting CD4⁺ T cell reservoir by autologous CD8⁺ T cells: implications for the development of therapeutic strategies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 253-258

CICHUTEK K., MERGET, H., NORLEY, S., LINDE, R., KREUZ, W. GAHR, M., KURTH, R. (1992). Development of quasispecies of human immunodeficiency virus type 1 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7365-7369

COCCHI, F., DEVICO, A. L., GARZINO-DEMO, A., ARYA, S. K., GALLO R. C., LUSSO, P. (1995). Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science* 270: 1811-1815

CUCCHIAINI, M., CAGNON, L., GIORDANENGO, V., DOGLIO, A., LEFEBVRE, J. C. (1995). Induction by human immunodeficiency viruses types 1 and 2 of degradation of CD4 but not of a CD4 mutant unable to bind viral envelope glycoproteins. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 8: 427-436

CULVER, K., CORNETTA, K., MORGAN, R., MORECKI, S., AEBERSOLD, P., KASID, A., LOTZE, M., ROSENBERG, S. A., ANDERSON, W. F., BLAESE, R. M. (1991). Lymphocytes as cellular vehicles for gene therapy in mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3155-3159

D

DOMS, R. W., PEIPER, S. C. (1997). Unwelcomed guests with master keys : how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology* 235: 179-190

DUAN, L., ZHU, M., OZAKI, IL, ZHANG, H., WEI, D. L., POMERANTZ, R. J. (1997). Intracellular inhibition of HIV-1 replication using a dual protein- and RNA-based strategy. *Gene Ther.* 4: 533-543

DUAN, L., BAGASRA, O., LAUGHLIN, M. A., OAKES, J. W., POMERANTZ, R. J. (1994). Comparison of trans-dominant inhibitory mutant human potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-rev single chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5075-5079

E

EDINGER, A. L., MANKOWSKI, J. L., DORANZ, B. J., MARGULIES, B. J., LEE, B., RUCKER, J., SHARRON, M., HOFFMAN, T. L., BERSON, J. F., ZINK, M. C., HIRSCH, V. M., CLEMENTS, J. E., DOMS, R. W. (1997). CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14742-14747

EIDEN, M. V., FARREL, K. B., WILSON, C. A. (1996). Substitution of a single amino acid residue is sufficient to allow the human amphotropic murine leukemia virus receptor to also function as gibbon ape leukemia virus receptor. *J. Virol.* 70: 1080-1085

F

FAUCI, A. S. UND LANE, H. C. (1991). The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). In: *Harrison's principles of internal medicine*, McGraw-Hill, New York, 12. Edition: 1402-1410

G

GARZINO-DEMO, A., DEVICO, A. L., COCCHI, F., GALLO, R. C. (1998). Beta-chemokines and protection from HIV type 1 disease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 177-184

GEIBEN-LYNN, R., KURSAR, M., BROWN, N. V., KERR, E. L., LUSTER, A. D., WALKER, B. D. (2001). Noncytolytic inhibition of X4 virus by bulk CD8(+) cells from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected persons and HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes is not mediated by beta-chemokines. *J. Virol.* 75: 8306-8316

GLADOW, M., BECKER, C., BLANKENSTEIN, T., UCKERT, W. (2000). MLV-10A1 retrovirus pseudotype efficiently transduces primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Gene Med.* 2: 409-415

H

HANAHAN, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557-580

HO, W. Z., LAI, J. P., BOUHAMDAN, M., DUAN, L., POMERANTZ, R. J., STARR, S. E. (1998). Inhibition of HIV type 1 replication in chronically infected monocytes and lymphocytes by retrovirus mediated gene-transfer of anti-Rev single-chain variable fragments. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 1573-1580

HOOGERBRUGGE, P. M., VAN BEUSECHEM, V. W., FISCHER, A., DEBREE, M., LE DEIST, F., PERIGNON, J. L., MORGAN, G., GASPAR, B., FAIRBANKS, L. D., SKEOCH, C. H., MOSELEY, A., HARVEY, M., LEVINSKY, R. J., VALERIO, D. (1996). Bone marrow gene transfer in three patients with adenosine deaminase deficiency. *Gene Ther.* 3: 179-183

HWU P. AND ROSENBERG S. A. (1994). The genetic modification of T cells for cancer therapy: an overview of laboratory and clinical trials. *Cancer Detect. Prevent.* 18: 43-50

J

JANEWAY, C. A. (1992). The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 645-674

K

KARSTEN, V., GORDON, S., KIRN, A., HERBEIN, G. (1996). HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor-alpha. *Immunology* 88: 55-60

KAVANAUGH, M. P., MILLER, D. G., ZHANG, W., LAW, W., KOZAK, S. L., KABAT, D., MILLER, D. A. (1994). Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7071-7075

KELER, T., LI, H., CLOYD, M. W., VITALE, L. A., DEO, Y. M. (1996). Development of T-cell lines expressing functional HIV-1 envelope glycoproteins for evaluation of immune responses in HIV-infected individuals. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 13:117-26

KILBY, J. M., HOPKINS, S., VENETTA, T. M., DI MASSIMO, B., CLOUD, G. A., LEE, J. Y., ALLDREDGE, L., HUNTER, E., LAMBERT, D., BOLOGNESI, D., MATTHEWS, T., JOHNSON, M. R., NOWAK, M. A., SHAW, G. M., SAAG, M. S. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* 4: 1302-1307

KLASSE, P. J., ROSENKILDE, M. M., SIGNORET, N., PELCHEN-MATTHEWS, A., SCHWARTZ, T. W., MARSH, M. (1999). CD4-Chemokine Receptor Hybrids in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J. Virol.* 73: 7453-7466

KLEBBA, C. (2000). Entwicklung und Charakterisierung von retroviral exprimierten anti-HIV Ribozymen. *Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*

KLEBBA, C., OTTMANN, O. G., SCHERR, M., PAPE, M., ENGELS, J. W., GREZ, M., HOELZER, D., KLEIN, S. A. (2000). Retrovirally expressed anti-HIV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4⁺ cells in vitro. *Gene Ther.* 7: 408-416

KOHN, D. B., HERSHFIELD, M. S., CARBONARO, D., SHIGEOKA, A., BROOKS, J., SMOGORZEWSKA, E. M., BARSKY, L. W., CHAN, R., BUROTTO, F., ANNETT, G., NOLTA, J. A., CROOKS, G., KAPOOR, N., ELDER, M., WARA, D., BOWEN, T., MADSEN, E., SNYDER, F. F., BASTIAN, J., MUUL, L., BLAESE, R. M., WEINBERG, K., PARKMAN, R. (1998). T lymphocytes with a normal ADA gene accumulate after transplantation of transduced autologous umbilical cord blood CD34⁺ cells in ADA-deficient SCID neonates. *Nat. Med.* 4: 775-780

KOHN, D. B., WEINBERG, K. I., NOLTA, J. A., HEISS, L. N., LENARSKY, C., CROOKS, G. M., HANLEY, M. E., ANNETT, G., BROOKS, J. S., EL-KHOUREIY, A. (1995). Engraftment of gene-modified umbilical cord blood cells in neonates with adenosine deaminase deficiency. *Nat Med.* 1: 1017-1023

KOZAK, S. L., SIESS, D. C., KAVANAUGH, M. P., MILLER, A. D., KABAT, D. (1995). The envelope glycoprotein of an amphotropic murine retrovirus binds specifically to the cellular receptor / phosphate transporter of susceptible species. *J. Virol.* 69: 3433-3440

KREBS, F. C., MILLER, S. R., MALAMUD, D., HOWETT, M. K., WIGDAHL, B. (1999). Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by nonoxynol-9, C31G, or an alkyl sulfate, sodium dodecyl sulfate. *Antiviral Res.* 43: 157-173

KUHLCKE, K., AYUK, F. A., LI, Z., LINDEMANN, C., SCHILZ, A., SCHADE, U. M., FAUSER, A. A., ZANDER, A. R., ECKERT, H. G., FEHSE, B. (2000). Retroviral transduction of T lymphocytes for suicide gene therapy in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 25: 96-98

L

LEAVITT M. C., YU, M. WONG-STAAAL, F., LOONEY, D. J. (1996). Ex vivo transduction and expansion of CD4⁺ lymphocytes from HIV+ donors: prelude to a ribozyme gene therapy trial. *Gene Ther.* 3: 599-606

LEAVITT, M. C., YU, M., YAMADA, O., KRAUS, G., LOONEY, D., POESCHLA, E., WONG-STAAAL, F. (1994). Transfer of an anti-HIV-1 ribozyme gene into primary human lymphocytes. *Hum Gene Ther.* 5: 1115-1120

LEE, S. W., GALLARDO, H. F., GILBOA, E., SMITH, D. (1994). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 in human T cells by a potent Rev response element decoy consisting of the 13-nucleotide minimal Rev-binding domain. *J. Virol.* 68: 8254-8264

LEVY, J. A. (1993). HIV pathogenesis and long-term survival. *AIDS* 7: 1401-1410

LEVY-MINTZ, P., DUAN, L., ZHANG, H., HU, B., DORNADULA, G., ZHU, M., KULKOSKY, J., BIZUB-BENDER, D., SKALKKA, A.M., POMERANTZ, R.J. (1996). Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase. *J. Virol.* 70: 8821-8832

LI, Z.-X., SCHADE, Z. M., FEHSE, B., STOCKSCHLÄDER, M., UHDE, A., KOCH, S. GOLLER, B., RÜGER, R., FEHSE, N., ZANDER A. R. (1998). High-efficiency retroviral vector-mediated gene transfer into human lymphocytes. *Gene Therapy of Cancer, Plenum Press, New York*, 375-378

M

MACKAY, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* 5: 423-427

MARASCO, W. A., HASELTINE, W. A., CHEN, S. Y. (1993). Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893

MARASCO, W. A., LAVECCHIO, J., WINKLER, A. (1999). Human anti-HIV tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1 infection and AIDS. *J. Immunol.* 231: 223-238

DI MARZIO, P., TSE, J., LANDAU, N. R. (1998). Chemokine receptor regulation and HIV type 1 tropism in monocyte-macrophages. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 14: 129-138

MAVILIO, F., FERRARI, G., ROSSIGNI, S., NOBILI, N., BOVINI, C., CASTRATI, G., TRAVERSARI, C., BORDINGON, C. (1994). Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* 83: 1988-1997

MCTAGGART, S., AL-RUBEAI, M. (2000). Effects of culture parameters on the production of retroviral vectors by a human packaging cell line. *Biotechnol. Prog.* 16: 859-865

MHASHILKAR, A. M., BAGLEY, J., CHEN, S. Y., SZILVAY, A. M., HELLAND, D. G., MARASCO, W. A. (1995). Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies. *EMBO J.* 14: 1542-1551

MHASHILKAR, A. M., LAVECCHIO, J., EBERHARDT, B., PORTER-BROOKS, J., BOISOT, S., DOVE, J. H., PUMPHREY, C., LI, X., WEIßMAHR, R. N., RING, D. B., RAMSTEDT, U., MARASCO, W. A. (1999). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro in acutely and persistently infected human CD4+ mononuclear cells expressing murine and humanized anti-human immunodeficiency virus type 1 Tat single-chain variable fragment intrabodies. *Hum. Gene Ther.* 10: 1453-1467

MILLER, A. D., GARCIA, J. V., VON SUHR, N., LYNCH, C. M., WILSON, C., EIDEN, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J. Virol.* 65: 2220-2224.

MILLER, D. G., ADAM, M. A., MILLER, A. D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. *Mol. Cell. Biol.* 10: 4239-4242

MORGAN R. A., WALKER, R. (1996). Gene therapy for AIDS using retroviral mediated gene transfer to deliver HIV-1 antisense TAR and transdominant Rev protein genes to syngeneic lymphocytes in HIV-1 infected identical twins. *Hum. Gen. Ther.* 7: 1281-1306

MORGAN, R. A., BALER-BITTERLICH, G., RAGHEB, J. A., WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C., ANDERSON, W. F. (1994). Further evaluation of soluble CD4 as an anti-HIV type 1 gene therapy: demonstration of protection of primary human peripheral blood lymphocytes from infection by HIV type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10: 1507-1515

MOVASSAGH M., BOYER, O., BURLAND, M.-D., LECLERCQ, V., KLATZMANN, D., LEMOINE, F. M. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95 % transduction efficiency without further in vitro selection. *Hum. Gen. Ther.* 11: 1189-1200

MÜLLER, PETER (1999). Antiretrovirale Therapie begleitende Surrogatmarker und [MLV(HIV-1)]-vermittelter Gentransfer. *Doktorarbeit, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*

MULLIS, H. B. AND FALOONA, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155: 335-360

MULLIS, K. B., FALOONA, G., SCHARF, S., SAIKI, R. K., HORN, G. T., EHRLICH, H. A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273

MURAKAMI, T., UND YAMAMOTO, N. (2000). Roles of chemokines and chemokine receptors in HIV-1 infection. *Int. J. Hematol.* 72: 412-417

N

NABEL, G. J., FOX, B. S., POST, L., THOMPSON, C. B., WOFFENDIN, C. (1994). A molecular genetic intervention for AIDS - effects of a transdominant negative form of Rev. *Hum. Gene Ther.* 5: 79-92

NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F. H., VERMA, I. M., TRONO, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272: 263-267.

NYE, K. E. UND PARKIN, J. M. (1995). HIV und AIDS, die molekularbiologischen Grundlagen. *Spektrum-Verlag*

O

OJWANG, J. O., HAMPEL, A., LOONEY, D. J., WONG-STAAAL, F. (1992). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 expression by a hairpin ribozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10802-10806

OLSEN, C. J. AND SECHELSKI, J. (1995) Use of sodium butyrate to enhance production of retroviral vectors expressing CFTR cDNA. *Hum. Gen. Ther.* 6: 1195-1202

ONODERA, M., ARIGA, R., KAWAMURA, N., KOBAYASHI, I., OHTSU, M., YAMADA, M., TAME, A., FURUTA, H., OKANO, M., MATSUMOTO, S., KOTANI, H., MGGARRITY, G. J., BLAESE, R. M., SAKIYAMA, Y. (1998). Successful peripheral T-lymphocyte directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91: 30-36

P

PEAR, W. S., NOLAN, G. P., SCOTT, M. L., BALTIMORE, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90: 8392-8396

PETERS, S. O., KITTLER, E. L. W., RAMSHAW, H. S., QUESENBERRY, P. J. (1996). Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11 and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood* 87: 30-37

PETRIE, H. T., HUGO, P., SCOLLAY, R., SHORTMAN, K. (1990). Lineage Relationships and Developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. *J. Exp. Med.* 172: 1583-1588

PHAM, L., YE, H., COSSET, F. L., RUSSELL, S. J., PENG, K. W. (2001). Concentration of viral vectors by co-precipitation with calcium phosphate. *J. Gene Med.* 3: 188-194

POLLOK, K. E., HANENBERG, H., NOBLITT, T. W., SCHOEDER, W. L., KATO, I., EMANUEL, D., WILLIAMS, D. A. (1998). High-Efficiency gene transfer into normal and adenosine deaminase-deficient T lymphocytes is mediated by transduction on recombinant fibronectin fragments. *J. Virol.* 72: 4882-4892

POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M. G., READ, E., GALLO, R. C. (1984). Detection, Isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and Pre-AIDS. *Science* 224: 497-500

POWELL, S. K., KALOSS, M. A., PINKSTAFF, A., MCKEE, R., BURIMSKI, I., PENSIERO, M., OTTO, E., STEMMER, W. P. C., SOONG, N.-W. (2000). Breeding of retroviruses by DNA shuffling for improved stability and processing yields. *Nat. Biotech.* 18: 1279-1282

Q

QUINN, E. R., LUM, L. G., TREVOR, K. T. (1998). T cell activation modulates retrovirus-mediated gene expression. *Hum. Gene Ther.* 9: 1457-1467

R

RAGHEB, J. A., BRESSLER, P., DAUCHER, M., CHIANG, L., CHUAH, M. K., VANDENDRIESSCHE, T., MORGAN, R. A. (1995). Analysis of trans-dominant mutants of the HIV type 1 Rev protein for their ability to inhibit Rev function, HIV type 1 replication, and their use as anti-HIV gene therapeutics. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 11: 1343-1353

RASKO, J. E., BATTINI, J. L., GOTTSCHALK, R. J., MAZO, I., MILLER, A. D. (1999). The RD114/simian type D retrovirus receptor is a neutral amino acid transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 2129-2134

RILEY, J. L., Levine, B. L., Craighead, N., Francomano, T., Kim, D., Carroll, R. G., June, C. H. (1998). Naïve and memory CD4 T-cells differ in their susceptibilities to human immunodeficiency virus type 1 infection following CD28 costimulation: implications for transmission and pathogenesis. *J. Virol.* 72: 8273-8280

S

SAIKI, R. K., SCHARF, S. J., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., EHRLICH, H. A. AND ARNHEIM, N. (1985). Enzymatic amplification of β -Globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354

SAVILLE, B. J. UND COLLINS, R. A. (1991). RNA-mediated ligation of self-cleavage products of a neurospora mitochondrial plasmid transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1222-1225

SCHNIERLE, B. S., STITZ, J., BOSCH, V., NOCKEN, F., MERGET-MILLITZER, H., ENGELSTÄDTER, M., KURTH, R., 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

SHAHEEN, F., CUAN, L., ZHU, M., BAGASRA, O., POMERANTZ, R.J. (1996). Targeting Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase by intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle. *J. Virol.* 70: 3392-3400

SPRINGETT, G. M., MOEN, R. C., ANDERSON, S., BLAESE, R. M., ANDERSON, W. F. (1989). Infection efficiency of T lymphocytes with amphotropic retroviral vectors is cell cycle dependent. *J. Virol.* 63: 3865-3869

STEIDL, S. (2001). Entwicklung und Charakterisierung sicherer CD4-spezifischer retroviraler Vektoren des Typs [MLV(SIVagm)] für die Gentherapie des Immunschwächesyndroms AIDS. *Doktorarbeit*

STRATTON, M. R., DARLING, J., PILKINGTON, G. J., LANTOS, P. L., REEVES, B. R., COOPER, C. S. (1989). Characterization of the human cell line TE671. *Carcinogenesis* 10: 889-905

SUTHERLAND, D., KEATING, A., NAYAR, R., ANANIA, S., STEWART, A. (1994). Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral blood by flow cytometry. *Exp. Hematol.* 22: 1003

T

TAHARA-HANAOKA S, USHIJIMA Y, TARUI H, WADA M, HARA T, IMANISHI S, YAMAGUCHI T, HATTORI T, NAKAUCHI H, KOITO A. (2000). Differential level in co-down-modulation of CD4 and CXCR4 primed by HIV-1 gp120 in response to phorbol ester, PMA, among HIV-1 isolates. *Microbiol. Immunol.* 44: 489-498

TEWARI, D., GOLDSTEIN, S. L., NOTKINS, A. L., ZHOU, P. (1998). cDNA encoding a single-chain antibody to HIV p17 with cytoplasmic or nuclear retention signals inhibits HIV-1 replication. *J. Immunol.* 161: 2642-2647

TIBERGHIE P. (1998). "Suicide" gene for the control of graft-versus-host disease. *Curr. Opin. Hematol.* 5: 478-482

TINDALL, B. UND COOPER, D. A. (1991). Primary HIV infection: Host responses and intervention strategies. *AIDS* 5: 1-14

U

UGOLINI, S., MOULARD, M., MONDOR, I., BAROIS, N., DEMANDOLX, D., HOXIE, J., BRELOT, A., ALIZON, M., DAVOUST, J., SATTENTAU, Q. J. (1997). HIV-1 gp120 induces an association between CD4 and the chemokine receptor CXCR4. *J. Immunol.* 159: 3000-3008

UNUTMAZ, D., LITTMAN, D. R. (1997). Expression pattern of HIV-1 coreceptors on T cells: implications for viral transmission and lymphocyte homing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1615-1618

V

VANIN, E. F., KALOSS, M., BROSCIUS, C., NIENHUIS, A. W. (1994). Characterization of replication-competent retroviruses from nonhuman primates with virus-induced T-cell lymphomas and observations regarding the mechanism of oncogenesis. : *J. Virol.* 68: 4241-50

W

WANG J. M., UEDA, H., ZACK HOWARD O. M., GRIMM, M. C., CHERTOV, O., GONG, X., GONG, W., RESAU, J. H., BRODER, C. C., EVANS, G., ARTHUR, L. O., RUSCETTI, F. W., OPPENHEIM, J. J. (1998). HIV-1 Envelope gp120 Inhibits the Monocyte Response to Chemokines Through CD4 Signal-Dependent Chemokine Receptor Down-Regulation. *J. Immunol.* 161: 4309-4317

WILK, T., PFEIFFER, T., 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

WINKLER, K., KRAMER, A., KUTTNER, G., SEIFERT, M., SCHOLZ, C., WESSNER, H., SCHNEIDER-MERGENER, J., HOHNE, W. (2000). Changing the antigen binding specificity by single point mutations of an anti-p24 (HIV-1) antibody. *J. Immunol.* 165: 4505-4515

WOFFENDIN, C., RANGA, U., YANG, Z.-Y., XU, L., NABEL, G. (1996). Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2889-2894

WONG-STAAAL, F., POESCHLA, E. M., LOONEY, D. J. (1998). A controlled, Phase 1 clinical trial to evaluate the safety and effects in HIV-1 infected humans of autologous lymphocytes transduced with a ribozyme that cleaves HIV-1 RNA. *Hum. Gene Ther.* 9: 2407-2425

WU, H. N., LIN, Y. J., LIN, F. P., MAKINO, S., CHANG, M. F., LAI, M. M. (1989). Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1831-1835

Y

YAMADA, O., YU, M., YEE, J. K., KRAUS, G., LOONEY, D., WONG-STAAAL, F. (1994). Intracellular immunization of human T-Cells with a hairpin ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Gene Ther.* 1: 38-45

YANG, O. O., KALAMS, S. A., TROCHA, A., CAO, H., LUSTER, A., JOHNSON, R. P. (1997). Suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication by CD8⁺ cells: evidence for HLA class 1-restricted triggering of cytolytic and noncytolytic mechanisms. *J. Virol.* 71: 3120-3128.

YU, M., LEAVITT, M. C., MARUYAMA, M., YAMADA, O., YOUNG, D., HO, A. D., WONG-STAAAL, F. (1995). Intracellular immunization of human fetal cord blood stem/progenitor cells with a ribozyme against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 699-703

Z

ZHOU, P., GOLDSTEIN, S., DEVADAS, K., TEWARI, D., NOTKINS, A. L. (1997). Human CD4⁺ cells transfected with IL-16 cDNA are resistant to HIV-1 infection: inhibition of mRNA expression. *Nat. Med.* 3: 659-664

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADA	Adenosin deaminase
agm	Afrikanische Grüne Meerkatze
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
aMLV	Amphotropes MLV
ATB	Neutraler Aminosäuretransporter, Rezeptor für RD114
β -Gal	beta-Galactosidase
Bob	“Brother of Bonzo”, Chemokinrezeptor
Bonzo	Chemokinrezeptor der CC-Familie
BSA	Bovines Serumalbumin
CA	Capsid-Protein
CCR	Chemokinrezeptor
CIP	Calf intestine phosphatase
CXCR	Chemokinrezeptor der CXC-Familie
DMEM	Dulbecco’s modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Env	Hüllprotein
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FITC	5’-Fluoroisothiozyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FL	Fluoreszenz
gag	virales Strukturgen
GaLV	Gibbon ape Leukemiavirus
Glr-1	GaLV-Rezeptor-1, auch als Pit-1 bezeichnet, membranständiger Phosphat-Transporter
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HAART	Highly Active Anti-Retroviral Therapy
HH-POL-13	Hammerhead Ribozym POL 13
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HP-LTR-2	Hairpin Ribozym LTR 2
HSC	Hämatopoetische Stammzelle(n)
hu	human
IL	Interleukin
IN	Integrase
kD	kilo Dalton

Δ LNFR	Trunkierte Form des schwach-affinen Nervenwachstumsfaktor-Rezeptors
LTR	Long Terminal Repeat
MA	Matrix-Protein
MACS	Magnetische Zellsortierung
MHC	Major Histocompatibility Complex
MLV	Murines Leukämievirus
m.o.i.	Multiplizität der Infektion
MSCV	Murines Stammzellvirus
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NC	Nucleocapsid-Protein
Nef	Negative factor
NSI	non-syncytia inducing
PBL	Primäre Blutlymphozyten
PBMC	Primäre mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PHA	Phytohemagglutinin
Pit-1	Membranständiger Phosphat-Transporter, GaLV-Rezeptor, auch als Glvr-1 bezeichnet
PPT	Poly-Purintrakt
PR	Protease
Ψ	Verpackungssignal
Ram-1	Membranständiger Phosphattransporter, auch als Pit-2 bezeichnet, Rezeptor für amphotropes MLV
RD114	Felines Endogenes Retrovirus
Rev	Regulatorisches Protein von HIV, reguliert das Splicing und den RNA-Transport
RevM10	Transdominant-negative Variante des Rev-Proteins
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Kulturmedium aus dem "Roswell Park Memorial Institute"
R-Region	Repetitive Sequenz an 5'- und 3'-Ende der viralen RNA
RT	Reverse Transkriptase
SA	Splice-Akzeptor
scFv	einkettiges Antikörperfragment
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SD	Splice-Donor
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SI	syncytia inducing

SU	externes Hüllprotein
T20	Synthetisches Peptid analog zu den Aminosäuren 637 bis 666 aus HIV-1 gp41, HIV-1-inhibitorisches Peptid
Tat	Transkriptioneller Transaktivator
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dosis 50 %
TM	Transmembran-Protein
U3	Teil der LTR, spezifisch für das 3'-Ende der viralen RNA
U5	Teil der LTR, spezifisch für das 5'-Ende der viralen RNA
V28	G-Protein gekoppelter 7-Transmembranrezeptor, Korezeptor für bestimmte HIV-Isolate
Vif	Viral infectivity factor
Vpr	Viral Protein
Vpu	Viral Protein U
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus

8 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Klaus Cichutek danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die wissenschaftliche Anleitung und die wertvollen Diskussionen während der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Kurth und Herrn Dr. J. Löwer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Paul-Ehrlich-Institut.

Für die freundliche und fachübergreifende Betreuung dieser Arbeit danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Hugo Fasold vom Institut für Biochemie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Matthias Schweizer und Dr. Jörn Stitz für die Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Stefan Klein und Dr. Christian Klebba danke ich für die Bereitstellung der anti-HIV Ribozyme und Herrn Prof. Dr. Roger J. Pomerantz für die Bereitstellung der scFv gegen HIV-Integrase und Reverse Transkriptase.

Ich danke Dr. Steven Norley und seiner Abteilung, insbesondere Frau Julia Seidl für die tatkräftige Unterstützung bei den HIV-Titrationen und ihre Diskussionsbereitschaft.

Für die fachliche und persönliche Diskussionsbereitschaft, die freundliche Unterstützung im Laboralltag sowie das angenehme Arbeitsklima möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen 6/01, 6/1 und 6/2 bedanken. Ganz besonderer Dank gilt Renate Wenig und Stefanie Steidl für ihre Diskussionsbereitschaft, Hilfsbereitschaft und vor allem Freundschaft.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums und der Anfertigung dieser Arbeit. Sowie Christoph Merten und allen meinen Freunden für ihre Hilfe und ihre Geduld während der letzten drei Jahre. Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Isabel Katharina Schmitt
Geburtsdatum: 13. Dezember 1972
Geburtsort: Wertheim am Main
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Ausbildungsdaten:

1979 – 1983 Grundschule in Heusenstamm / Rembrücken
1983 – 1985 Adolf-Reichwein Schule in Heusenstamm
1985 – 1992 Adolf-Reichwein-Gymnasium in Heusenstamm mit Abschluß
der allgemeinen Hochschulreife
1992 – 1994 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-
Universität, Frankfurt am Main, Vordiplom in Biologie
1994 – 1997 Diplomstudium der Biochemie an der Johann Wolfgang
Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie
Nebenfächer: Pharmakologie, Mikrobiologie
Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Funktion
ausgewählter Promotorregionen von *Paracoccus*
denitrificans“
02. Dezember 1997 Diplom in Biochemie
1998 – 2002 Promotionsstudium im Fachbereich Biochemie an der Johann
Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
Anfertigung der Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
über das Thema:
„Optimierung des CD4-spezifischen Gentransfers in primäre
humane T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren im
Hinblick auf die Gentherapie des Immunschwächesyndroms

AIDS“.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre mich hiermit an Eides Statt, dass ich die vorgelegte Dissertation über die „Optimierung des CD4-spezifischen Gentransfers in primäre humane T-Zellen mittels [MLV(HIV-1)]-Vektoren im Hinblick auf die Genterapie des Immunschwächesyndroms AIDS“ selbständig angefertigt, insbesondere, dass aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Darmstadt, den 24.01.2002

Isabel Schmitt