

Analyse der Wirksamkeit einer Gentherapie der HIV- Infektion im humanisierten Mausmodell

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 15
der Johann Wolfgang Goethe- Universität
in Frankfurt am Main

von
Alexandra Janine Kimpel
aus Hanau

Frankfurt 2010
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15) der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekanin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Erstgutachterin: Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Dorothee von Laer

Datum der Disputation:

„Für Amanda und Konstantin“

Danksagung

Da ich leider nicht jeden einzelnen hier aufführen kann und auch sicher jemanden vergessen würde, möchte ich mich als erstes bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Frau Prof. Dr. Dorothee von Laer danke ich, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe schreiben zu können, die Vergabe des spannenden Themas und ihren vielseitigen fachlichen Rat.

Bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski- Powitz bedanke ich mich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft zur Übernahme der Betreuung und Begutachtung der vorliegenden Arbeit.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Laer danke ich für die großartige Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft. Bei Nanni Hartmann möchte ich mich für die einzigartige Zusammenarbeit, noch mehr geteilte Dinge, ihre Hilfe bei Experimenten und dafür „fit for life“ gemacht zu werden, bedanken. Besonders Dr. Sebastian Newrzela und Miriam Geist möchte ich für zahllose Diskussionen, den Spaß während der Arbeit und ihre Unterstützung danken. Mein Dank gilt speziell auch Dr. Felix Hermann, Dr. Lisa Egerer, Patricia Schult- Dietrich, Marlies Odie, Andreas Volk, Dr. Anne Hubert und Dr. Jörg Kahle sowohl für viele anregende Diskussionen als auch für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor.

Den Tierpflegern des Georg-Speyer-Hauses (Sabrina Lehmen, Christiane Peter, Sylvia Reiche, Daniela Tamms, Katrin Jäger, Katja Manewski und Claudia Baumann) danke ich für die fürsorglich Pflege und fruchtbare Zucht der Versuchstiere.

Bei Christian Brendel möchte ich mich herzlich für seine Hilfe am konfokalen Mikroskop bedanken.

PD Dr. Annemarie Berger und Marhild Kortenbusch danke ich für die Bestimmung der Viruslast im Serum HIV infizierter Mäuse.

Bei den Hebammen der Geburtsstation des Uniklinikums Frankfurt bedanke ich mich für die Entnahme des Nabelschnurbluts.

Dr. Markus Manz (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona) danke ich für die Bereitstellung von Zuchtpaaren der Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse.

Beim Graduiertenkolleg GRK 1172 bedanke ich mich auf der einen Seite für die Finanzierung meiner Arbeit und auf der anderen Seite für die konstruktiven Anregungen. Silvia Koob danke ich hierbei speziell für ihre Hilfe bei administrativen Dingen.

Desweiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. David Baltimore für die Möglichkeit, einige Zeit in sein Labor zu kommen, bei Dr. Xin Luo und Dr. Alex Balazs für die Einführung in Arbeitstechniken und konstruktive Diskussionen und bei Rana Feidi und Margarida Lei für ihren liebevollen Empfang im Labor bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Georg-Speyer-Hauses für das angenehme Umfeld und die stetige und unkomplizierte Bereitschaft zu helfen.

Bei meiner Familie (insbesondere bei meiner Mutter und meinen Geschwistern Amanda und Konstantin) und bei meinen Freunden bedanke ich mich für ihre Unterstützung während der letzten Jahre.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. HIV und AIDS	3
2.1.1. Aufbau von HIV	4
2.1.2. Replikationszyklus	5
2.1.3. Fusion von HIV mit einer Zielzelle	7
2.1.4. HIV- Therapie	9
2.2. Gentherapie von HIV	10
2.2.1. Vektoren	11
2.2.2. Zielzellen	12
2.2.3. C- Peptide in der Gentherapie von HIV	13
2.3. Tiermodelle in der HIV- Forschung	16
2.3.1. Affenmodelle	16
2.3.2. Mausmodelle	17
2.3.2.1. Entwicklung humanisierter Mausmodelle und Mausstämme	18
2.3.2.2. Transplantation von T- Zellen in immundefiziente Mäuse (T- Zellmausmodell)	20
2.3.2.3. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in im- mundefiziente Mäuse (HIS- Mausmodell)	21
2.3.2.4. BLT Modell	22
2.4. Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	24
3.1. Material	24
3.1.1. Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen	24
3.1.2. Zellen und Anzuchtsmedien	28
3.1.3. Mausstämme	29
3.1.4. Antikörper	29
3.1.5. Peptide und Enzyme	31
3.1.6. Vektoren	32
3.1.7. Verwendete Kits	33
3.1.8. Geräte	33

INHALTSVERZEICHNIS

3.2. Methoden	34
3.2.1. Molekularbiologische Methoden	34
3.2.1.1. Präparation von Plasmid- DNA	34
3.2.1.2. Restriktionsverdau von DNA	34
3.2.1.3. Agarose- Gelelektrophorese	34
3.2.1.4. Bestimmung der HIV- RNA Kopien im Serum von infizierten Mäusen mittels RT- PCR	35
3.2.2. Proteinbiochemische Methoden	35
3.2.2.1. Lyse von Zellen	35
3.2.2.2. Deglykosylierung von Zellkulturüberständen und Zellysaten	35
3.2.2.3. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	36
3.2.2.4. Elektro- Blotting (Western Blot)	37
3.2.2.5. Immundetektion durch Chemilumineszenz	37
3.2.2.6. p24- ELISA	38
3.2.3. Zellkultur	38
3.2.3.1. Kultivierung von Zellen	38
3.2.3.2. Zellzahlbestimmung	38
3.2.3.3. Produktion von gammaretroviralen oder lentiviralen Vektoren durch transiente Transfektion	39
3.2.3.4. Aufkonzentrieren lentiviraler Überstände	40
3.2.3.5. Titration von gammaretroviralen und lentiviralen Vektoren	40
3.2.3.6. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen Vektoren	41
3.2.3.7. Isolation von humanen CD34 ⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut	41
3.2.3.8. Kultur und Transduktion von humanen CD34 ⁺ Blutstammzellen	42
3.2.3.9. Isolation von humanen CD4 ⁺ T- Zellen aus Blut	42
3.2.3.10. Kultur und Transduktion von humanen CD4 ⁺ T- Zellen	43
3.2.3.11. Beladen von retronektinbeschichteten Zellkulturplatten mit gammaretroviralen Partikeln	44
3.2.3.12. Anzucht von HIV- Stocks	45
3.2.3.13. Titration von HIV- Stocks	45
3.2.3.14. Infektion von Zellen mit HIV	46
3.2.4. Tierexperimente	46
3.2.4.1. Tierhaltungsbedingungen	46
3.2.4.2. Repopulierung von Mäusen mit humanen CD34 ⁺ Blutstammzellen	47
3.2.4.3. Repopulierung von Mäusen mit humanen CD4 ⁺ T- Zellen	47
3.2.4.4. Infektion von humanisierten Mäusen mit HIV	47
3.2.4.5. Entnahme von Blut	48
3.2.4.6. Tötung und Sektion von Tieren	48
3.2.5. FACS	49
3.2.5.1. Färbung von Zellen	49

INHALTSVERZEICHNIS

3.2.5.2.	Färbung von Leukozyten in Blut und Organen von Mäusen und Lyse der Erythrozyten	49
3.2.5.3.	Intrazelluläre Färbung	50
3.2.5.4.	FACS basierter Nachweis für iSAVE Peptide	50
3.2.5.5.	FACS- Messungen	50
3.2.6.	Konfokale Mikroskopie	51
4.	Ergebnisse	52
4.1.	Testung von LV-maC46-GFP <i>in vitro</i>	52
4.1.1.	Selektion von maC46- exprimierenden PM-1 Zellen <i>in vitro</i>	53
4.1.2.	HIV wird auf der Oberfläche von maC46- exprimierenden Zellen gefangen, kann aber nicht in diese eindringen	53
4.1.3.	Selektion von maC46-GFP exprimierenden primären, humanen T-Zellen	55
4.2.	Humanes Immunsystem- Mausmodell	58
4.2.1.	Entwicklung humaner CD4 ⁺ T- Zellen	58
4.2.2.	Repopulierung von HIS- Mäusen mit LV-maC46-GFP transduzierten CD34 ⁺ Zellen	61
4.2.3.	Infektion mit HIV	64
4.2.4.	Einfluss von IL-7 auf die Repopulierung von HIS- Mäusen mit humanen Lymphozyten	67
4.3.	T- Zellmausmodell	68
4.3.1.	Test der antiviralen Wirksamkeit von maC46 im T- Zellmausmodell	69
4.3.1.1.	Infektion mit HIV _{D117/II} vor Transplantation	69
4.3.1.2.	Infektion mit HIV _{D117/II} nach Transplantation	73
4.3.1.3.	Infektion mit HIV _{NL43} nach Transplantation	73
4.3.2.	Test der Expression von iSAVE im T- Zellmausmodell	76
4.3.2.1.	Expression von iSAVE durch einen gammaretroviralen Vektor	76
4.3.2.2.	Expression von iSAVE durch einen lentiviralen Vektor	79
5.	Diskussion	81
5.1.	LV-maC46-GFP <i>in vitro</i>	82
5.1.1.	Selektion von maC46- exprimierenden Zellen <i>in vitro</i>	82
5.1.2.	HIV wird auf der Oberfläche von maC46- exprimierenden Zellen gefangen, kann aber nicht in diese eindringen	83
5.2.	Humanisierte Mausmodelle	84
5.2.1.	Testung von LV-maC46-GFP im HIS (humanes Immunsystem)-Mausmodell	84
5.2.2.	Testung von LV-maC46-GFP im T- Zellmausmodell	89
5.2.3.	Limitationen der beiden verwendeten Mausmodelle und Vergleich mit der klinischen Studie	91
5.3.	iSAVE Peptid als Weiterentwicklung des maC46 Peptids	92
5.4.	Ausblick	93

INHALTSVERZEICHNIS

Literaturverzeichnis	95
Abkürzungsverzeichnis	113
A. Plasmidkarten	116
B. Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge	121
B.1. Wissenschaftliche Veröffentlichungen	121
B.2. Vorträge	121
C. Lebenslauf	122

Abbildungsverzeichnis

2.1. Schematischer Aufbau eines HIV- Partikels	4
2.2. Replikationszyklus von HIV	6
2.3. Fusion von HIV mit einer Zielzelle	8
2.4. Schematischer Aufbau von M87o	14
2.5. Schematischer Aufbau von iSAVE	16
4.1. Selektion von maC46-GFP exprimierenden PM-1 Zellen	54
4.2. Lokalisation von p24 in p24/ GFP doppelpositiven Zellen	55
4.3. Bindung von HIV pseudotypisierten Viren an maC46 exprimierende T- Zellen	56
4.4. Selektionsvorteil von maC46-GFP in primären humanen T- Zellen	57
4.5. HIS- Maus 8 Wochen nach Transplantation	59
4.6. HIS- Maus 6 Monate nach Transplantation	60
4.7. Thymi von HIS- Mäusen	61
4.8. CD34 Präparate nach Transduktion mit LV-maC46-GFP	62
4.9. Expression von human CD45, human CD4 und maC46-GFP im Blut von HIS- Mäusen	63
4.10. Expression von human CD45 und human CD4 im Blut von HIS- Mäusen vor HIV Infektion	65
4.11. Expression von human CD45 und human CD4 im Blut einer HIS- Maus nach HIV Infektion	66
4.12. Expression von human CD45 und human CD4 im Blut von HIS- Mäusen mit und ohne Fc-IL-7 Behandlung	68
4.13. Expression von CD4 und CD8 vor und nach CD8- Depletion in humanen PBMC	70
4.14. Transplantat für T- Zellmausmodell	70
4.15. Selektionsvorteil von maC46-GFP <i>in vivo</i>	72
4.16. Selektionsvorteil von maC46-GFP <i>in vivo</i>	74
4.17. Selektionsvorteil von maC46-GFP <i>in vivo</i>	75
4.18. Expression von iSAVE in humanen T- Zellen <i>in vivo</i>	77
4.19. FACS basierter Nachweis zur Quantifizierung von iSAVE Peptiden im Mausserum	78
4.20. Expression von iSAVE im Serum einer mit RV-iSAVE transduzierten T- Zellen transplantierten Maus	79
4.21. LV-iSAVE transduzierte humane T- Zellen	80

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

4.22. Expression von iSAVE im Serum einer mit LV-iSAVE transduzierten T-
Zellen transplantierten Maus 80

1. Zusammenfassung

Durch die Behandlung HIV- positiver Patienten mit einer Kombinationstherapie verschiedener antiviraler Substanzen (HAART = hochaktive antiretrovirale Therapie) kann die Virusreplikation über einen längeren Zeitraum unterdrückt werden. Allerdings hat diese Therapie Limitationen. Die Medikamente verursachen hohe Therapiekosten, haben zum Teil starke Nebenwirkungen und es entstehen mit der Zeit resistente Viren. Eine Alternative besteht in der somatischen Gentherapie der HIV- Infektion. Bei diesen Ansätzen werden Zellen der Patienten genetisch modifiziert, so dass sie ein antivirales Genprodukt exprimieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein membrangebundenes, antivirales C46 Peptid (maC46) sowohl *in vitro* in Zelllinien und primären humanen T- Zellen als auch *in vivo* in zwei humanisierten Mausmodellen getestet. Das C46 Peptid entstammt der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz des HIV Hüllproteins gp41. C- Peptide wie C46 oder auch T20, welches bereits für die HAART Therapie zugelassen ist, binden während der Fusion des Virus mit der Zielzelle an gp41 und inhibieren so die Fusion. Werden T- Zelllinien oder primäre humane T- Zellen mit einem gammaretroviralen Vektor, der maC46 codiert, transduziert, können sie sehr effizient vor einer Infektion mit HIV geschützt werden [30]. Dieser Vektor wurde bereits in einer klinischen Studie mit T- Zellen von 10 HIV- positiven Patienten getestet [142]. Dabei konnte allerdings kein antiviraler Effekt der Gentherapie beobachtet werden.

Hier wurde nun ein lentiviraler Vektor für maC46 (LV-maC46-GFP) verwendet. Lentivirale Vektoren transduzieren im Gegensatz zu gammaretroviralen auch ruhende Zellen, was ein kürzeres *ex vivo* Aktivierungs- und Transduktionsprotokoll ermöglicht. Außerdem ist für lentivirale Vektoren das Risiko der Transformation der Zelle niedriger als für gammaretrovirale. Für eine mögliche klinische Anwendung sollte es daher tolerierbar sein, für lentivirale Vektoren eine höhere MOI zu verwenden als für gammaretrovirale. Eine höhere Transduktionseffizienz sollte auf der anderen Seite auch eine effektive und langanhaltende Transgenexpression ermöglichen.

1. Zusammenfassung

Zunächst wurde gezeigt, dass sowohl die T- Zelllinie PM-1 als auch primäre humane T- Zellen nach Transduktion mit LV-maC46-GFP vor einer Infektion mit HIV geschützt waren und während der Infektion einer gemischten Kultur einen Selektionsvorteil gegenüber nicht- transduzierten Zellen hatten. Dabei konnte auch durch konfokale Mikroskopie gezeigt werden, dass das Virus die maC46- exprimierenden Zellen nicht infizieren konnte, sondern lediglich auf der Zelloberfläche gebunden wurde.

Im Weiteren wurden zwei humanisierte Mausmodelle etabliert, um LV-maC46-GFP *in vivo* zu testen. Im humanen Immunsystem Mausmodell (HIS- Mausmodell) wurden immundefiziente Mäuse mit humanen Blutstammzellen repopuliert. In den Tieren kam es zu einer *de novo* Bildung von humanen, reifen T- Lymphozyten durch Thymopoese. Dabei wurden im Blut der Tiere humane, maC46- exprimierende CD4⁺ T- Zellen detektiert. Nach Infektion der Tiere mit HIV wurden diese T- Zellen depletiert. Es kam allerdings nicht zu einer Anreicherung oder einem selektiven Überleben der genmodifizierten T- Zellen. Eine Erklärung dafür könnte eine gestörte T- Zellhomeostase in den Tieren sein. Das zweite humanisierte Mausmodell (T- Zellmausmodell) verwendete immundefiziente Mäuse, die mit transduzierten humanen T- Zellen repopuliert wurden. Die Infektion mit HIV erfolgte entweder *in vitro* vor Transplantation der Zellen oder *in vivo* nach Repopulierung der Tiere. In beiden Fällen konnte ein selektives Überleben maC46- exprimierender CD4⁺ T- Zellen nach HIV- Infektion beobachtet werden.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Weiterentwicklung von maC46, eine sekretierte Variante des C46- Peptids (iSAVE), im T- Zellmausmodell getestet. Ein sekretierter Fusionsinhibitor stellt insofern eine Weiterentwicklung des membrangebundenen dar, als nicht nur die genmodifizierten Zellen, sondern zusätzlich auch nicht- modifizierte Nachbarzellen vor einer Infektion mit HIV geschützt werden könnten. Dadurch erhöht sich auch das Spektrum an möglichen Produzentenzellen für den Fusionsinhibitor.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden humane T- Zellen entweder mit einem gammaretroviralen (RV-iSAVE) oder einem lentiviralen Vektor (LV-iSAVE) transduziert und die Expression des iSAVE- Peptids wurde im Serum der Tiere gemessen. In beiden Ansätzen konnte iSAVE Peptid im Serum der Tiere detektiert werden. In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob dieses *in vivo* sekretierte iSAVE Peptid antiviral aktiv ist und die humanisierten Mäuse vor einer Infektion mit HIV schützen kann.

2. Einleitung

2.1. HIV und AIDS

Die Krankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome = erworbene Immunschwäche- Krankheit) wurde erstmals 1981 beschrieben [49] [92]. In New York und Kalifornien war es zu einer ungewöhnlichen Häufung opportunistischer Infektionen und der seltenen Krebsform Kaposi- Sarkom bei homosexuellen Männern und Drogenabhängigen gekommen. Die Patienten wiesen außerdem eine reduzierte Zahl an CD4⁺ T- Zellen auf. 1983 und 1984 wurde von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander der Erreger dieser Erkrankung isoliert [5] [39]. Seit 1986 wird das Virus einheitlich als HIV (human immunodeficiency virus = humanes Immunschwäche- Virus) bezeichnet [21].

Obwohl HIV und AIDS erst in den 80er Jahren beschrieben wurden, war das Virus vermutlich schon in den 70er Jahren in Afrika relativ verbreitet. In eingefrorenen Serumproben von Patienten mit unerklärlichen Immunerkrankungen aus dieser Zeit konnte HIV detektiert werden. Die früheste bisher charakterisierte HIV- Infektion wurde anhand von Analysen einer eingefrorenen Serumprobe aus dem Jahr 1959 nachgewiesen [161].

Es gibt zwei Hauptgruppen von HIV, HIV-1 und HIV-2 [52]. HIV-2 kommt hauptsächlich in Westafrika und Indien vor, während HIV-1 weltweit verbreitet ist [11] [124]. HIV-1 gilt als virulenter. HIV-2 wird mit einer geringeren Effizienz als HIV-1 übertragen und die Latenzzeit, bis es zum Ausbruch von AIDS kommt, ist bei HIV-2 in der Regel länger [67].

Beide Viren wurden vermutlich von Affen, die der natürliche Wirt der Viren sind, auf den Menschen übertragen. Für HIV-1 waren die Überträger wahrscheinlich Schimpansen (*Pan troglodytes*) und für HIV-2 Mangaben (*Cercocebus atys*) [40] [41].

Ende des Jahres 2008 waren laut WHO (world health organisation = Weltgesundheitsorganisation) ungefähr 33,4 Millionen Menschen weltweit mit HIV infiziert [154]. Etwa 2,7 Millionen Menschen hatten sich 2008 neu mit HIV infiziert und 2 Millionen waren an den Folgen der Infektion gestorben.

2.1.1. Aufbau von HIV

HIV ist ein Retrovirus, das zur Gattung der Lentiviren gehört. Lentiviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie auch ruhende, sich nicht teilende Zellen infizieren können.

HIV- Partikel sind kugelförmig und haben einen Durchmesser von etwa 100 nm [59]. Wie alle Retroviren besitzen sie ein diploides RNA Genom und sind von einer Lipid-doppelschicht, die sich von der Zellmembran der Wirtszelle ableitet, umgeben (Abb.: 2.1).

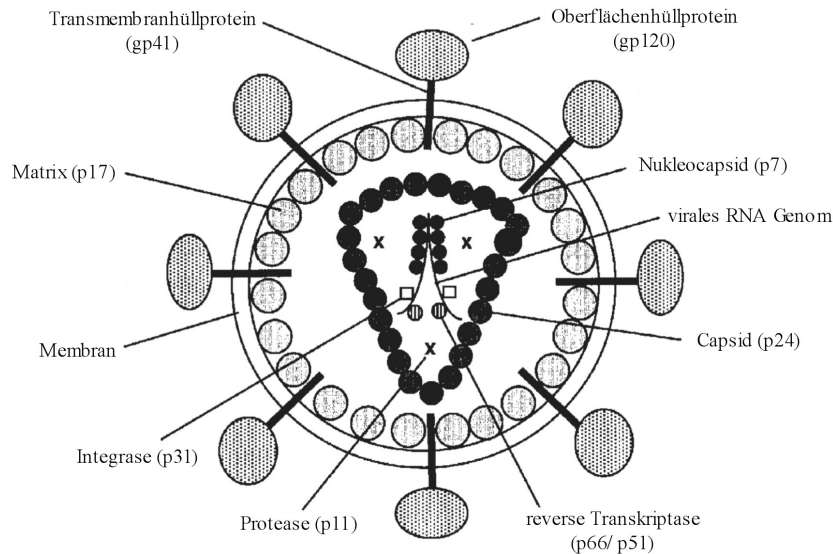


Abbildung 2.1.: Schematischer Aufbau eines HIV- Partikels. Abbildung verändert aus [36]

In dieser Membran befinden sich ca. 72 Hüllprotein- Komplexe [160]. Diese bestehen aus Trimeren des Transmembranproteins gp41 und des Oberflächenproteins gp120. Sie sind für die Erkennung der Zielzelle und die Fusion mit ihr nötig (Kapitel 2.1.3).

Die Hüllmembran wird von dem Matrixprotein p17 ausgekleidet [44]. Im Inneren des HIV- Partikels befindet sich das kegelförmige Viruscapsid, das aus dem Protein p24 aufgebaut ist. Das Capsid enthält zwei Kopien des viralen RNA Genoms, einige für die Virusvermehrung essentielle Proteine und tRNA Moleküle, die als Startoligonukleotide für das Umschreiben der viralen RNA in DNA (reverse Transkription) nötig sind. Zu den Proteinen gehören die Enzyme reverse Transkriptase (p66/ p51), Protease (p11) und Integrase (p31). Das virale Genom selbst wird von einem Nukleocapsid aus dem Protein p7 umgeben.

2. Einleitung

Das Genom von HIV ist etwa 9,2 kb groß und codiert für neun Gene (*gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpr* und *nef*). Es hat, wie eukaryotische mRNAs, einen Poly-Adenylschwanz.

Gag steht für gruppenspezifisches Antigen (group-specific antigen) und codiert das Vorläuferprotein Pr55^{Gag}, das von der viralen Protease in Matrixprotein p17, Capsid p24, Nukleocapsid p7, p6 und die beiden Zwischenpeptide p1 und p2 gespalten wird. Die Transkription des *gag* Gens wird von der 5' LTR (long terminal repeat), die eine TATA-Box und eine Bindestelle für Tat enthält, gestartet. Das Transkriptions-Transaktivatorprotein Tat (transcriptional transactivator protein) ist für die Initiation der Transkription von der 5' LTR sehr wichtig.

Vom *pol* Gen (polymerase) werden die viralen Enzyme Protease (p11), reverse Transkriptase (Heterodimer aus p66 und p51) und Integrase (p31) codiert. Das *pol* Gen hat keinen eigenen Promotor, sondern wird gemeinsam mit dem *gag* Gen von der 5' LTR aus transkribiert, wobei durch ein seltenes Rasterverschiebungsereignis ein Stopcodon übersprungen wird. Es entsteht ein längeres Vorläuferprotein Pr160^{GagPol}. Dadurch wird sichergestellt, dass die viralen Enzyme, von denen weniger Kopien als von den Strukturproteinen des Virus benötigt werden, seltener synthetisiert werden.

Das *env* Gen (envelope = Hüllprotein) codiert das Vorläuferprotein gp160. Dieses wird cotranslational in die Membran des rauen ER (Endoplasmatischen Retikulums) eingefügt, in ER und Golgi glykosyliert und trimerisiert. Während des Transports zur Plasmamembran wird es in die beiden, durch Disulfidbrücken verbundenen, aktiven Hüllproteine gp41 und gp120 gespalten [84] [135].

2.1.2. Replikationszyklus

HIV kann Zellen, die einen CD4 Rezeptor auf der Zelloberfläche haben, infizieren, also z.B. T-Helferzellen, Makrophagen und dendritische Zellen [34]. Die Infektion der Zelle beginnt mit der Bindung des Virus an Rezeptoren der Wirtszelle und die anschließende Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran (A in Abb.: 2.2). Diese Prozesse werden im Einzelnen in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Dabei gelangt das Viruscapsid in das Cytoplasma der Wirtszelle, wo es abgebaut wird [20] [116].

Als nächstes wird der reverse Transkriptase-Komplex gebildet. Bei diesem Vorgang wird das aus einzelsträngiger RNA bestehende, virale Genom in doppelsträngige DNA umgeschrieben (B in Abb.: 2.2). Ein virales tRNA Molekül, das im Capsid des Virus enthalten war, dient dabei als Startoligonukleotid für die Synthese des ersten DNA-Stranges [48].

2. Einleitung

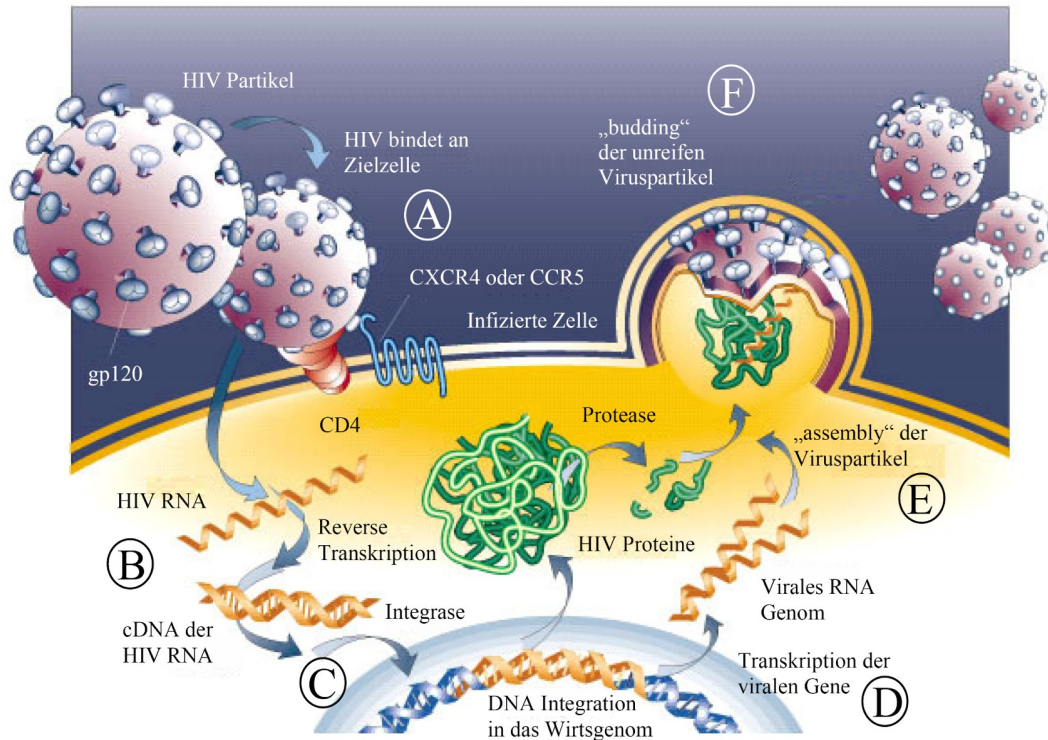


Abbildung 2.2.: Replikationszyklus von HIV. Ein HIV- Partikel bindet an den CD4 Rezeptor und einen Corezeptor (CXCR4 oder CCR5) auf der Oberfläche der Wirtszelle, wodurch die Fusion der viralen Membran mit der Wirtszellmembran ausgelöst wird (A). Im Cytoplasma der Wirtszelle wird das virale RNA Genom durch die reverse Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben (B), in den Zellkern transportiert und durch die Integrase in das Wirtszellgenom integriert (C). Die viralen Gene werden transkribiert und die virale RNA ins Cytoplasma transportiert (D), wo sie translatiert wird und die entstehenden Proteine durch die virale Protease prozessiert werden (E). Gemeinsam mit viraler RNA werden die viralen Proteine in neu entstehende Viruspartikel verpackt, die von der Wirtszellmembran abknospen (F). Abbildung verändert aus [151]

2. Einleitung

Die RNA wird dann durch die RNaseH- Aktivität des reverse Transkriptase- Komplexes abgebaut und der zweite, zum ersten komplementäre DNA Strang wird synthetisiert.

Die doppelsträngige DNA wird in den Zellkern der Wirtszelle transportiert und durch das virale Enzym Integrase in das Wirtszellgenom integriert (C in Abb.: 2.2) [13]. Das in das Wirtszellgenom integrierte virale Genom (Provirus) verhält sich wie zelluläre DNA und wird bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben.

Die Expression der viralen Gene wird von der 5' LTR des viralen Genoms initiiert [36]. Für diesen Prozess spielen das virale Protein Tat und zelluläre Faktoren eine wichtige Rolle. Bei der Transkription des viralen Genoms entstehen Transkripte, die das komplette virale Genom umfassen, aber auch kurze RNAs. Diese Transkripte werden im Zellkern zum Teil einfach oder mehrfach gespleißt und schließlich ins Cytoplasma der Wirtszelle transportiert (D in Abb.: 2.2). Das virale Rev Protein (regulator of expression of viral proteins = Regulator der Expression viraler Proteine) sorgt dafür, dass auch ungespleißte oder nur teilweise gespleißte RNAs ins Cytoplasma transportiert werden [120]. Im Cytoplasma werden die viralen Gene an Ribosomen der Wirtszelle translatiert.

Die gag- Vorläuferproteine binden an die Cytoplasmamembran der Wirtszelle, welche die Hüllproteinkomplexe schon enthält [35]. Dadurch wird die Bildung neuer Viruspartikel initiiert (E in Abb.: 2.2). In jedes entstehende Virus werden zwei vollständige Kopien des viralen Genoms verpackt [8]. Diese beiden RNAs sind über ein Dimerisierungssignal nahe dem 5' Ende dimerisiert. Für die Verpackung der RNA in das neu entstehende Viruspartikel ist das Verpackungssignal (ψ - Signal) am 5'- Ende des *gag*- Gens wichtig. Die noch unreifen Viruspartikel knospen dann von der Wirtszelle ab (F in Abb.: 2.2). In den Viren werden die Vorläuferproteine für gag und pol Proteine durch die virale Protease gespalten, so dass reife, infektiöse Viren entstehen [15].

2.1.3. Fusion von HIV mit einer Zielzelle

Für die Bindung eines HIV- Partikels an seine Zielzelle und die anschließende Fusion mit der Zellmembran sind die Hüllproteine (envelope Proteine) des Virus, gp41 und gp120, essentiell. Diese Proteine werden in Form eines Vorläuferproteins, gp160, vom *env* Gen des Virus codiert. Nach der Translation wird dieses Vorläuferprotein proteolytisch in die beiden aktiven Hüllproteine gp41 und gp120 gespalten. Diese beiden Proteine sind nichtkovalent miteinander verbunden [54]. Gp41, das für den eigentlichen Fusionsprozess wichtig ist, ist ein Transmembranprotein in der Membran des Virus. Gp120, das für

2. Einleitung

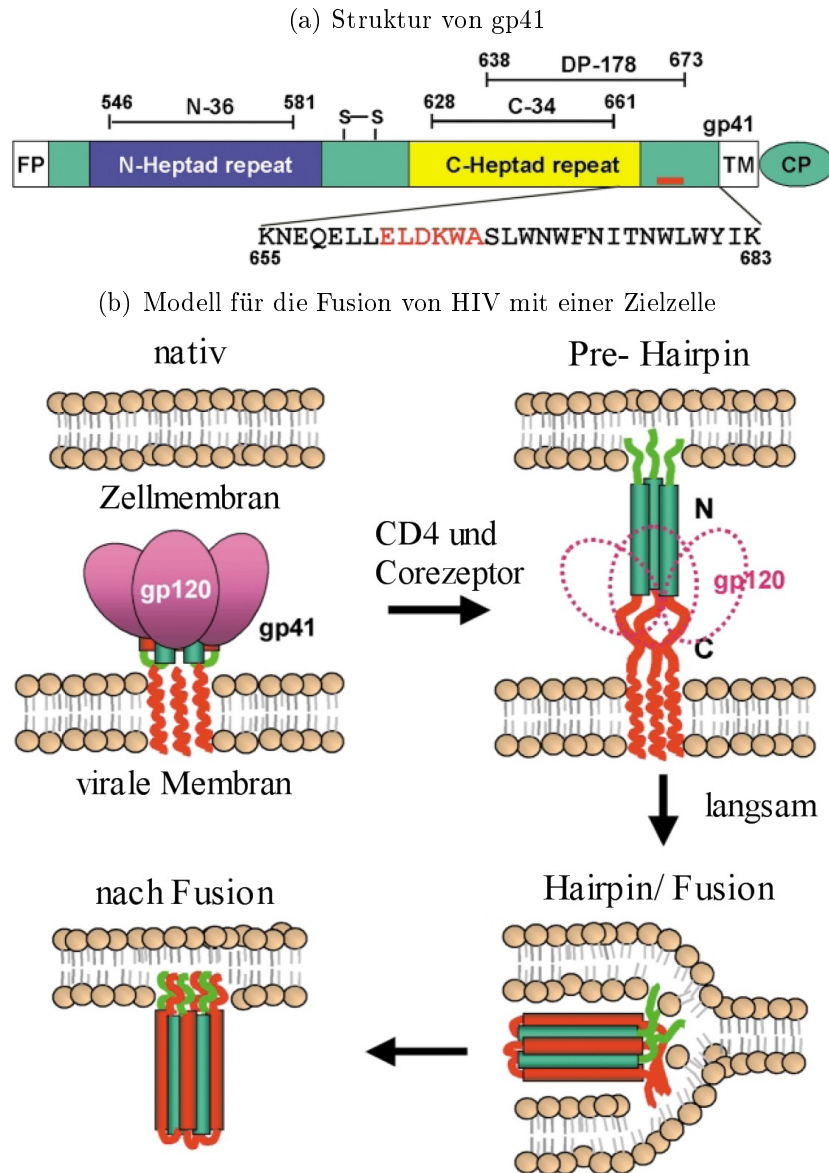


Abbildung 2.3.: Fusion von HIV mit einer Zielzelle. (A) Struktur von gp41. FB = Fusionspeptid, TM = Transmembrandomäne, CP = cytoplasmatischer Teil. Die Nummern geben die Aminosäureposition in der Sequenz des HIV Isolats HXB2 (NCBI Code AAB50262) an. In der Aminosäuresequenz liegt, rot eingezeichnet, das Epitop, das von 2F5 erkannt wird. Die Position von drei inhibitorischen Peptiden, die den Eintritt von HIV in eine Wirtszelle hemmen und aus der N- oder C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz stammen (N-36, C-34, DP-178), sind ebenfalls eingezeichnet. (B) Modell für die Fusion von HIV mit einer Zielzelle. Beschreibung der einzelnen Komponenten im Text. Abbildungen verändert aus [4].

2. Einleitung

die Erkennung der Zielzelle verantwortlich ist, ist ein Oberflächenprotein (Abb.: 2.3(b)) [4][29].

Der Eintritt von HIV beginnt mit der Bindung von gp120 an den CD4 Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzelle und an einen Corezeptor (Abb.: 2.2). Dieser Corezeptor ist entweder CXCR4 oder CCR5, die beide zur Familie der sieben- Transmembranhelix-Chemokinrezeptoren gehören [7]. Die Bindung von gp120 an die beiden Rezeptoren auf der Wirtszelle führt zu Konformationsänderungen in gp120. Dadurch wird gp41, das vorher fast vollständig von gp120 verdeckt wurde, exponiert [152].

Gp41 besteht aus einer Ektodomäne, einer Transmembrandomäne und einem cytoplasmatischen Teil (Abb.: 2.3(a)). Die Ektodomäne ist aus Fusionspeptid, N- terminaler „heptad repeat“ Sequenz und C- terminaler „heptad repeat“ Sequenz aufgebaut.

Im nächsten Schritt des Fusionsprozesses wird das Fusionspeptid von gp41 in die Membran der Zielzelle eingefügt, so dass ein Übergangszustand („Pre- Hairpin“) gebildet wird [20] [38] [64] [155]. Dabei werden die beiden „heptad repeat“ Sequenzen von gp41 (C und N in Abbildung 2.3(b)) exponiert. Diese beiden Domänen des Proteins bilden dann zusammen eine superspiralisierte α - Helix („Hairpin“, Sechs- Helix- Bündel), wodurch Virus- und Wirtszellmembran in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und miteinander fusionieren [60] [94].

2.1.4. HIV- Therapie

Seit 1987 Retrovir als erstes HIV- Medikament auf den Markt kam, sind bis heute insgesamt 25 HIV- Medikamente durch die FDA (Food and Drug Administration) zugelassen worden. Angriffspunkte für Medikamente gegen HIV sind vor allem die drei viralen Enzyme, reverse Transkriptase, Integrase und Protease. Diese drei Enzyme sind gute Ziele für HIV- Medikamente, da sie einerseits essentiell für die Replikation des Virus sind, aber andererseits keine für die Zelle wichtige Aufgabe haben. Eine weitere Möglichkeit ist es, den Eintritt des Virus in die Zelle zu hemmen. Hierfür gibt es momentan zwei zugelassene Wirkstoffe. Maraviroc ist ein Corezeptor- Blocker, der die Interaktion von HIV mit dem CCR5 Rezeptor inhibiert. Enfuvirtide (auch T20 oder C36 genannt) ist ein Peptid, das von der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41 abgeleitet ist, und die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran der Zielzelle inhibiert.

Im Folgenden soll etwas näher auf Fusionsinhibitoren in der HIV- Therapie eingegangen werden, da dieses Wirkprinzip auch für den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen

2. Einleitung

gentherapeutischen Ansatz der HIV- Infektion eingesetzt wurde. Fusionsinhibitoren verhindern die Fusion von HIV mit der Zielzelle. Dazu können sie entweder an gp120 oder an gp41 binden und so deren Struktur stabilisieren. Die für die Fusion nötigen Konformationsänderungen und die Bildung der superspiralisierten α - Helix sind dann nicht mehr möglich.

Die Fusion der viralen Membran mit der Zellmembran kann durch kurze Peptide inhibiert werden [20] [65] [153]. Peptide, die aus einer der beiden „heptad repeat“ Sequenzen von gp41 stammen, können, während diese beiden Domänen des Proteins im „Pre- Hairpin“ Übergangszustand exponiert werden, an die jeweils andere Sequenz binden. Dadurch wird der Übergangszustand stabilisiert und die superspiralisierte α - Helix kann nicht gebildet werden.

Beispiele für inhibitorische Peptide, die aus der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41 stammen, sind C-34 und T20. Das inhibitorische Peptid N-36 ist aus der N-terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41 abgeleitet. Die Lage dieser Peptide in der Aminosäuresequenz von gp41 ist in Abbildung 2.3(a) eingezeichnet.

T20 ist 36 Aminosäuren lang. Es ist ein effektiver Fusionsinhibitor gegen verschiedene Laborstämme und primäre Isolate von HIV-1, sowohl *in vitro* [153] als auch *in vivo* [70]. *In vitro* wirkt es dabei bei Konzentrationen von weniger als 2 ng/ ml gegen HIV-1 Stämme, wohingegen es gegen HIV-2 Isolate weit weniger wirksam ist.

Allerdings hat T20 eine kurze Halbwertszeit, so dass es bei klinischer Anwendung täglich injiziert werden muss. Die stärkste Reduktion der Viruslast (um 1,6 log- Stufen) wurde in einer Studie an 72 mit HIV infizierten Erwachsenen bei einer zweimal täglichen subcutanen Injektion von je 100 mg erreicht [71]. Ein Problem bei der klinischen Anwendung von T20 ist auch, dass es schnell zur Entstehung und Selektion von resistenten Viren kommt [150] und dass das Peptid nicht oral bioverfügbar ist.

2.2. Gentherapie von HIV

Bei der *ex vivo*, somatischen Gentherapie werden dem Patienten Zellen entnommen. Diese Zellen werden *ex vivo* expandiert und genetisch modifiziert. Danach werden sie dem Patienten reinfundiert. Da körpereigene Zellen verwendet werden, kommt es zu keiner Immunreaktion der Patienten gegen die Zellen [104]. Es ist allerdings möglich, dass das Transgen- Produkt immunogen ist. Mit diesem Prinzip konnten Langzeit- Genmarkierungen der Blutzellen von etwa 10 % erreicht werden [1].

2. Einleitung

Die Gentherapie der HIV- Infektion könnte gegenüber der konventionellen Therapie (HAART = hochaktive antiretrovirale Therapie) also den Vorteil haben, dass eine langfristige Expression des therapeutischen Gens mit wenigen Applikationen erreicht werden kann.

Für die somatische Gentherapie von HIV gibt es zwei Strategien. Eine Möglichkeit ist es, in die Zielzellen der HIV- Infektion ein Gen einzubringen, das mit HIV infizierte Zellen tötet. Dies kann über die tat- abhängige Expression der Thymidinkinase des Herpes Simplex Virus (Suizidgen) [17] oder die Expression einer Caspase, die spezifisch durch die HIV Protease aktiviert wird, [143] erfolgen. In beiden Fällen geht die infizierte Zelle in Apoptose.

Bei dem anderen Ansatz werden antivirale Gene in den Zielzellen der HIV- Infektion exprimiert („intrazelluläre Immunisierung“) [3]. Die Zellen werden dadurch vor einer Infektion mit HIV geschützt. Im menschlichen Körper gibt es mehr als 10^{11} mögliche Zielzellen für HIV. In der Praxis ist es nicht möglich, alle diese Zellen *ex vivo* genetisch zu modifizieren. Die Zellen, die das antivirale Gen exprimieren, sollten daher einen Selektionsvorteil gegenüber nicht modifizierten Zellen haben [86].

Die antiviralen Wirkstoffe können, entsprechend ihres Eingreifens in den Replikationszyklus von HIV, in drei Klassen eingeteilt werden. Antivirale Wirkstoffe der ersten Klasse verhindern die Infektion der Zelle. Sie können die Rezeptorbindung, den Fusionsprozess, die reverse Transkription oder die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom verhindern. Wirkstoffe der beiden anderen Klassen inhibieren die späteren Schritte des Replikationszyklus von HIV, so dass keine infektiösen HIV- Partikel freigesetzt werden. Bei Wirkstoffen dieser beiden Klassen ist das virale Genom aber als Provirus in das Wirtszellgenom integriert [147].

2.2.1. Vektoren

Vektoren, die in der somatischen Gentherapie verwendet werden, sind am häufigsten von Gammaretroviren, Lentiviren, Adenoviren oder Adeno- assoziierten Viren abgeleitet. Lentivirale Vektoren haben gegenüber gammaretroviralen den Vorteil, dass sie auch ruhende, sich nicht teilende Zellen infizieren können [85] [107]. Der Präintegrationskomplex gammaretroviraler Vektoren kann nicht in den Zellkern transportiert werden, sondern benötigt die Auflösung der Kernmembran während der Mitose, damit das Provirus ins Wirtszellgenom integriert werden kann [123]. Für lentivirale Vektoren gibt es

2. Einleitung

allerdings bislang keine stabilen Verpackungszelllinien, was die Produktion lentiviraler Vektoren für klinische Studien erschwert.

Zur Herstellung der, in dieser Arbeit beschriebenen, lentiviralen Gentransfervektoren werden Systeme, die auf dem „drei Plasmidsystem“ beruhen, verwendet [107]. Auf einem Plasmid werden die Hüllproteine des Virus codiert, auf dem zweiten die übrigen für die Virusvermehrung nötigen Gene und auf dem dritten das Transgen (therapeutisches Gen). Die drei Plasmide werden in Säugerzellen transferiert. Nur das Plasmid mit dem Transgen enthält ein virales Verpackungssignal. Dadurch wird nur das Transgen in die entstehenden Viruspartikel verpackt. Die Viruspartikel sind replikationsinkompetent, da ihnen die übrigen Gene, die für die Virusvermehrung nötig sind, fehlen.

Von dem verwendeten Hüllprotein hängt ab, welche Zielzellen transduziert werden können. Die Viren können mit einer Vielzahl verschiedener Hüllproteine pseudotypisiert werden. Der Tropismus des Virus wird dann von dem jeweiligen Hüllprotein bestimmt.

2.2.2. Zielzellen

Als Zielzellen der somatischen Gentherapie der HIV- Infektion werden entweder Zellen, die potentiell von HIV infiziert werden können, oder deren Vorläuferzellen verwendet. In der Praxis werden meist T- Zellen oder hämatopoetische Stammzellen benutzt. Für beide Zellarten gilt, dass sie leicht isoliert, *ex vivo* kultiviert und mit lentiviralen und gammaretroviralen Vektoren transduziert werden können. Die Vor- und Nachteile beider Zellarten sind in der Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Stammzellen können in alle Zellen der Hämatopoese differenzieren. Sie bieten daher den Vorteil, dass das gesamte Spektrum an Zielzellen von HIV geschützt werden kann. Die dazu nötige Zellzahl ist niedriger als bei T- Zellen. Außerdem ist die Langzeit- Genmarkierung höher als bei T- Zellen [147]. Die Verwendung von Stammzellen ist aber auch mit höheren Risiken verbunden. Die gammaretroviralen Vektoren integrieren zufällig in das Wirtszellgenom, wodurch es zu Mutationen kommt. Diese Insertionsmutagenese kann dazu führen, dass ein Zellklon stark expandiert und so Leukämien entstehen [18] [146]. Für T- Zellen wurde dieses Phänomen bisher nicht beschrieben [6]. In einem syngenem Mausmodell wurde auch gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen gegenüber reifen T- Zellen ein höheres Risiko der Transformation nach Transduktion mit gammaretroviralen Vektoren zeigen [109]. Ein weiterer Nachteil ist, dass der Patient vor der Transplantation mit Stammzellen mit einem Chemotherapeutikum wie Busulfan behandelt werden muss.

Tabelle 2.1.: Vorteile und Nachteile von T- Zellen und Stammzellen in der somatischen Gentherapie. Tabelle verändert aus [147]

Zielzelle	T- Zelle	hämatopoetische Stammzelle
Konditionierung nötig	nicht routinemäßig	ja
Risiko der Insertionsmutagenese und Leukämie	nicht beschrieben	beschrieben für gammaretrovirale Vektoren
Regenerationskapazität	mittel	hoch
Regeneration des T- Zell- Repertoirs	nicht möglich	möglich
Schutz von Makrophagen für eine signifikante Markierung nötige Zelldosis	nein > 10^{10}	ja 10^8
Langzeit- Genmarkierung, die momentan ohne Selektion erreicht werden kann	bis 1 %	bis 10 %

2.2.3. C- Peptide in der Gentherapie von HIV

Wenn Zielzellen von HIV eine membrangebundene Form von T20 (maC36) exprimieren, sind sie *in vitro* vor einer Infektion mit HIV geschützt [58]. Das Konstrukt, ein gammaretroviraler Vektor, der für maC36 codiert, wurde in der Folge optimiert, um die Entstehung von resistenten Viren und Immunreaktionen gegen das Peptid zu vermeiden. Das resultierende Peptid, maC46, besteht aus dem Signalpeptid des LNGFR (low-affinity nerve growth factor), 46 Aminosäuren aus der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41 (C46), einem Linker (eine kurze Sequenz des Immunoglobulins G2) und der Transmembrandomäne aus humanem tCD34 [30]. Der gammaretrovirale Vektor M87o codiert das maC46 Peptid (Abb. 2.4). Er wurde *in vitro* gegen eine Vielzahl von Laborstämmen und primären HIV- Isolaten sowohl in T- Zelllinien als auch in primären humanen T- Zellen getestet. MaC46 schützt dabei die Zellen vor einer Infektion mit allen bisher getesteten HIV- Stämmen und verleiht den Zellen einen starken Selektionsvorteil gegenüber nicht- modifizierten Zellen. Das führt dazu, dass *in vitro* in einer gemischten Kultur nach Infektion mit HIV alle nicht modifizierten Zellen sterben und sich die maC46 exprimierenden Zellen auf 100 % anreichern [30].

Eines der Probleme einer passiven Immuntherapie mit T20 ist, dass sich sehr schnell resistente Virussubpopulationen entwickeln [150]. Daher wird T20 in der Klinik nur in einer Kombinationstherapie mit anderen antiretroviralen Medikamenten eingesetzt.

2. Einleitung

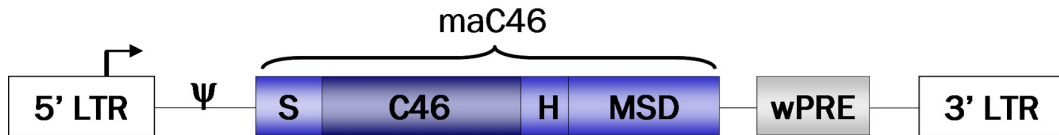


Abbildung 2.4.: Schematischer Aufbau des gammaretroviralen Vektors M87o. M87o ist ein gammaretroviraler Vektor, der den HIV Eintrittsinhibitor maC46 codiert.

Das C46 Peptid unterscheidet sich von T20 durch 10 zusätzliche Aminosäuren am N- Terminus. Diese 10 Aminosäuren interagieren mit einer sehr stark konservierten Region in der N- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41. Mutationen in diesem Bereich der N- terminalen „heptad repeat“ Sequenz reduzieren die Fitness der dabei entstehenden Virusvarianten stark. Daher ist es sehr schwierig maC46 resistente HIV- Stämme zu generieren [55]. MaC46 wirkt auch gegen T20 resistente HIV- Stämme.

Im Jahr 2004 wurde eine klinische Studie Phase I/II mit M87o durchgeführt [142]. Dazu wurden T- Lymphozyten von 10 HIV positiven Patienten mit sehr fortgeschrittenem Krankheitsverlauf (Ausbruch von AIDS, $CD4^+$ Zellzahlen niedriger als $200/\mu l$, Viruslast über 5000 RNA Kopien/ ml, mehrfachresistente Viren) isoliert und *ex vivo* mit dem gammaretroviralen Vektor M87o transduziert. Anschließend wurden die transduzierten Zellen den Patienten reinfundiert. Es kam dabei zu keinen schwerwiegenden Komplikationen. Die Therapie war sicher und wurde gut vertragen. Nach der Infusion der genmodifizierten Zellen konnte ein leichter, transienter Anstieg der $CD4^+$ Zellzahlen beobachtet werden. Allerdings war der Anteil der genmodifizierten Zellen sehr niedrig und dementsprechend war der therapeutischen Nutzen für die Patienten auch nicht vorhanden bzw. sehr gering. *In vivo* kam es entgegen der Ergebnisse in Zellkulturexperimenten zu keiner Anreicherung der genmodifizierten Zellen. Gründe für die mangelnde Repopulierung der Patienten mit genmodifizierten T- Zellen könnten in einer geschädigten Lymphknotenstruktur der AIDS Patienten oder in einem Verlust der Repopulierungskapazität der Zellen durch die *ex vivo* Stimulierung liegen. Außerdem konnten für einige Patienten nur sehr geringe Zahlen an $CD4^+$ Zellen isoliert werden. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der reinfundierten Zellzahl und der Langzeitgenmarkierung im Blut festgestellt werden [142]. Es könnte aber auch sein, dass die Zellen *in vivo* das Transgen herunterreguliert haben oder der Selektionsdruck in den Patienten generell nicht hoch genug für eine Selektion der genmodifizierten Zellen war. Ein weiteres Problem ist, dass T- Zellen in einem HIV infizierten Patienten nicht nur direkt durch das Virus, sondern auch indirekt durch Bystanderapoptose oder eine Aktivierung des Immunsystems sterben. Dadurch sterben auch benachbarte nicht infizierte Zellen.

2. Einleitung

In der Folge wurde das maC46 Peptid in einen lentiviralen SIN Vektor umkloniert. In SIN (selbst inaktivierenden) Vektoren sind Promotor und Enhancer Sequenzen in der 3' LTR (long terminal repeat = lange terminale Sequenzwiederholung) deletiert [76] [158]. Die Expression des Transgens wird in diesen Vektoren von einem internen Promotor getrieben. Für SIN Vektoren wird angenommen, dass das Risiko der Transformation durch Insertionsmutagenese niedriger ist als für konventionelle LTR getriebene Vektoren, wobei lentivirale SIN Vektoren in bisherigen Studien noch einmal sicherer sind als gammaretrovirale SIN Vektoren [100] [101]. Die Verwendung eines lentiviralen SIN Vektors zur Expression von maC46 sollte also eine klinische Anwendung sicherer machen. Da Lentiviren im Gegensatz zu Gammaretroviren sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infizieren können, ist es möglich z.B. ruhende CD34⁺ Stammzellen sehr effektiv mit lentiviralen Vektoren zu transduzieren [99] [98] [125]. Zur leichteren Detektion wurde an das intrazelluläre Ende der Transmembrandomäne des lentiviralen maC46 Vektors die GFP codierende Sequenz fusioniert. Der resultierende lentivirale Vektor (LV-maC46-GFP) wurde für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente verwendet. Membrangebundene, inhibitorische Peptide haben den Nachteil, dass nur die Zelle, die das Peptid auf ihrer Oberfläche trägt, vor einer HIV Infektion geschützt ist. Nachbarzellen ohne das Peptid können weiterhin infiziert werden. Bei löslichen Peptiden, wie T20 oder einer sezernierten Variante des C46 Peptids dagegen sind auch Nachbarzellen, die das Peptid nicht selber exprimieren, geschützt. Dieses Phänomen wird als Bystander Effekt bezeichnet. Außerdem bietet eine Gentherapie mit sezernierten C- Peptiden den weiteren Vorteil, dass ein breiteres Spektrum an Zielzellen genutzt werden kann, als dies für membrangebundene Peptide der Fall ist. Bei einer Gentherapie mit einem membrangebundenen Eintrittsinhibitor müssen die Zielzellen von HIV selbst oder deren Vorläuferzellen modifiziert werden. Als Produzentenzelle eines sezernierten Eintrittsinhibitors dagegen könnten beispielsweise B- Zellen oder Leberzellen, die aufgrund ihrer natürlichen Funktion im Körper Peptide gut sezernieren sollten, verwendet werden. Dabei könnten diese Zellen nach Transduktion mit viralen Vektoren C- Peptide in Blut und Lymphe sekretieren, die die Zielzellen der HIV- Infektion vor einer Infektion schützen. In der Arbeitsgruppe von Laer wurde daher eine sezernierte Variante des C46 Peptids entwickelt (iSAVE = in vivo sezernierter antiviraler Eintrittsinhibitor) [31]. Dabei stellt sich das Problem, dass das C46 Peptid alleine zu kurz für eine effiziente Sekretion durch eukaryotische Zellen ist [111]. Dieses Problem kann umgangen werden, wenn das C46 Peptid als Concatamer mit einer internen, zellulären Furinschnittstelle exprimiert wird (Abb. 2.5). Nach Transduktion von T- Zelllinien oder primären, humanen T- Lympho-

2. Einleitung

zyten mit einem gammaretroviralen Vektor, der iSAVE codiert, kann selbst bei einer niedrigen Transduktionseffizienz die Infektion der gesamten Kultur mit HIV inhibiert werden [31].

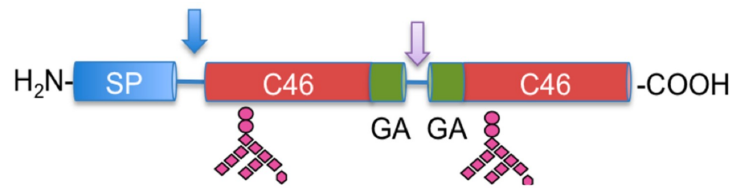


Abbildung 2.5.: Schematischer Aufbau von iSAVE.

2.3. Tiermodelle in der HIV- Forschung

Tiermodelle werden in der HIV- Forschung eingesetzt, um die Verbreitung und Pathogenität des Virus zu untersuchen und um Impfstoffe und neue Medikamente gegen HIV zu entwickeln und vor der Anwendung am Patienten auf Wirksamkeit und Toxizität zu testen. Die einzigen Tiere, die mit HIV-1 infiziert werden können sind Schimpansen, Gibbonaffen und Kaninchen. Bei diesen Tieren kommt es aber nicht zu AIDS- ähnlichen Krankheitssymptomen [43]. Zusätzlich sind in geringem Maße Makaken mit HIV-2 infizierbar.

2.3.1. Affenmodelle

Eine Spezies, die in der HIV- Forschung als Tiermodell verwendet wird, sind Schimpansen. Kurz nach der Infektion kommt es bei den Schimpansen zu einer starken Immunreaktion, in deren Verlauf Antikörper gegen virale Proteine und später auch neutralisierende Antikörper gebildet werden [2] [37] [108]. Bei den infizierten Schimpansen kommt es zu keiner Immunsuppression und nicht zum Ausbruch von AIDS.

Die Verwendung von Schimpansen als Versuchstiere führt zu verschiedenen Problemen. Zunächst sind dies sicherlich ethische Limitationen. Es steht aber generell auch nur eine begrenzte Anzahl an Schimpansen für Tierversuche zur Verfügung, da die Zucht zeitaufwendig ist. Außerdem sind die Pflege und Unterbringung der Tiere mit praktischen Schwierigkeiten, hohen Kosten und Sicherheitsproblemen verbunden.

Bei der Infektion von Gibbonaffen mit HIV gilt hinsichtlich der Infektion und dem Fehlen von Krankheitssymptomen das gleiche wie für Schimpansen [88]. Aber auch bei diesem Modell treten die oben beschriebenen Limitationen auf.

2. Einleitung

HIV-1 und HIV-2 sind eng verwandt mit SIV (Affen- Immunschwäche- Virus). Es gibt verschiedene Typen von SIV, die unterschiedliche Affenarten in Afrika natürlicherweise infizieren [12] [121]. In seinen natürlichen Wirten verursacht SIV kein Krankheitsbild. Wenn allerdings Rhesusmakaken mit SIV infiziert werden, kommt es zu einer AIDS-ähnlichen Krankheit [27] [42] [129]. Daher kann die Infektion von Rhesusmakaken mit SIV als Modellsystem für die HIV- Infektion verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit ist es, Rhesusmakaken mit SHIV zu infizieren. SHIV sind SI- Viren, die die Hüllproteine eines HIV- Isolats exprimieren. Experimente mit Rhesusmakaken haben aber ähnliche Probleme und Limitationen wie die mit Schimpansen.

2.3.2. Mausmodelle

Ein aussagefähiges murines Tiermodell der humanen HIV- Infektion würde die beschriebenen Probleme der Experimente in Affen umgehen. Allerdings können Mäuse nicht mit HIV infiziert werden. HIV repliziert auch *in vitro* nicht in murinen Zellen [102]. Für die Replikation von HIV in murinen Zellen gibt es Restriktionen auf verschiedenen Ebenen im Replikationszyklus von HIV.

Das erste Hindernis ist der Eintritt des Virus in die Zellen. Die viralen Hüllproteine binden nicht an den murinen CD4 Rezeptor [80]. Aber auch eine Expression des humanen CD4 Rezeptors gemeinsam mit einem der beiden humanen Chemokinrezeptoren CXCR4 oder CCR5 in den Zellen transgener Mäuse führt nur zu einem geringen Anteil infizierter Zellen und keiner detektierbaren Virusproduktion [14] [127]. Weitere Restriktionen der Virusreplikation liegen auf der Ebene der Transkription und vermutlich auch noch in späteren Schritten.

Eine Möglichkeit für ein Mausmodell der HIV- Infektion besteht darin, dass transgene Mäuse verwendet werden, die humanes CD4 und humanes CCR5 exprimieren. Diese Mäuse können mit HIV- pseudotypisierten Viren, die ein Markergen wie GFP enthalten, infiziert werden [130]. In diesem Modellsystem könnten frühe Schritte der Virusreplikation, wie der Eintritt in die Zelle, untersucht werden und es könnten neue Wirkstoffe getestet werden, die in diesem Schritt der Virusreplikation angreifen. Das Problem des Mausmodellsystems ist aber, dass nur ein geringer Teil der murinen Zellen von den Viren transduziert wird.

Ähnliche Versuche den Wirtsorganismus an das HI- Virus anzupassen wurden auch in Ratten unternommen. Genau wie Mäuse können auch Ratten natürlicherweise nicht mit HIV infiziert werden. Allerdings repliziert HIV *in vitro* auf einigen Ratten- Zelllinien oder

2. Einleitung

Ratten- Makrophagen, die humanes CD4 und humanes CCR5 exprimieren [69] [68]. In der Arbeitsgruppe von Oliver Keppler wurde dies ausgenutzt, indem transgene Ratten erzeugt wurden, die sukzessive mit immer mehr für die Virusreplikation nötigen humanen Faktoren ausgestattet sind [47] [96]. Allerdings ist auch in dreifachtransgenen Ratten, die neben humanem CD4 und humanem CCR5 auch das humane Tat- interagierende Protein Cyclin T1 exprimieren, die Virusreplikation immer noch limitiert. Das lässt vermuten, dass es noch weitere humane Faktoren gibt, die für eine effiziente Virusreplikation nötig sind und in diese dreifachtransgenen Tiere eingekreuzt werden müssten.

Anstelle den Wirtsorganismus anzupassen, so dass ein Wildtyp- HIV- Stamm darin replizieren kann, wurden auch Versuche unternommen das Virus so weit zu verändern, dass es auf murinen Zellen repliziert. Wenn der gp120 codierende Teil des HIV Hüllproteins gegen gp80, das Hüllprotein des murinen Leukämievirus MLV, ausgetauscht wird, können mit dem entstandenen chimären Virus Mauszellen infiziert werden [119]. In diesem Mausmodell sind die beiden reverse Transkriptase Inhibitoren Abacavir und Zalcitabine getestet worden [51]. Es ist also möglich neue HIV- Medikamente *in vivo* in Mäusen, die mit diesem chimären Virus infiziert werden, hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zu testen. Allerdings kann in diesem Modell nicht der Eintritt des Virus untersucht bzw. inhibiert werden.

Eine weitere Alternative zu transgenen Nagern, in denen versucht wird, die für die Virusreplikation nötigen, humanen Komponenten genetisch zu ergänzen, oder zu Virusstämmen, die so verändert werden, dass sie murine Zellen infizieren können, sind humanisierte Mausmodelle. In diesen Modellen (Xenograftmodelle) werden immundefizienten Mäusen humane Zellen oder Gewebe transplantiert. Die humanen Zellen der Mäuse können dann mit HIV infiziert werden.

2.3.2.1. Entwicklung humanisierter Mausmodelle und Mausstämme

Erste Versuche humane hämatopoetische Zellen in immundefiziente Mäuse zu transplantieren, wurden in Nacktmäusen ($Foxn1^{nu}$ Mutation) durchgeführt. Nacktmäuse werden schon seit längerem verwendet, um humane Tumore zu transplantieren und nach Krebsmedikamenten zu suchen [46]. Die Mutation im *Foxn1* Gen (forkhead box N1) verursacht zum einen Haarlosigkeit und zum anderen eine verminderte Thymusentwicklung, wodurch die Tiere keine reifen T- Zellen ausbilden können. Dies führt allerdings auch nach Einkreuzen zweier weiterer Mutationen ($Lyst^{bg}$ (beige) und Btk^{xid} (xid)) nur zu sehr mäßiger Repopulierung der Tiere mit humanen Zellen [23].

2. Einleitung

Erste Erfolge in der Repopulierung von Mäusen mit humanen hämatopoetischen Zellen wurden nach der Entdeckung der $Prkdc^{scid}$ Mutation in CB17 Mäusen im Jahr 1983 erzielt [10]. Eine Mutation im Gen für die DNA- abhängige Proteinkinase $Prkdc$ führt in diesen Tieren zu einer schweren Immundefizienz, die im Phänotyp dem von Patienten mit SCID (severe combined immunodeficiency = schwere kombinierte Immundefizienz) ähnelt. Mäuse mit dieser Mutation werden daher als SCID Mäuse (auch CB-17- $scid$ oder $Prkdc^{scid}$ Mäuse) bezeichnet. Die $Prkdc$ Kinase spielt eine wichtige Rolle in der Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen und in der V(D)J- Rekombination von T- Zellrezeptoren und Immunglobulinen [75] [97]. Mutationen in $Prkdc$ führen zu einem Fehlen von reifen B- und T- Zellen in SCID Mäusen. SCID Mäuse können mit humanen PBMC [103], fetaler Leber [93] oder hämatopoetischen Stammzellen [81] repopuliert werden. Allerdings ist auch in diesen Modellen die Repopulierung mit humanen Zellen noch gering, was zum Teil auf eine „Leakiness“ der Mutation zurückzuführen ist. Mit zunehmendem Alter kann es in SCID Mäusen trotz der Mutation zu einer spontanen Rekombination von B- und T- Zellrezeptoren und somit zur Bildung einiger reifer B- und T- Zellen kommen. Desweiteren haben SCID Mäuse ein hohes Level an angeborener Immunität und NK- Zellfunktion, was das Wachstum der humanen Zellen inhibiert.

In der Folge wurde die SCID Mutation in verschiedene andere Mausstämmen eingekreuzt, um eben diesen Limitationen entgegen zu wirken. Ein sehr vielversprechender Mausstamm, der dabei generiert wurde, sind die NOD/SCID Mäuse [134]. Die Rückkreuzung der SCID Mutation auf den NOD Hintergrund (non-obese diabetic), führt zu einer verminderten NK- Zellaktivität und zusätzlichen Defekten im angeborenen Immunsystem verglichen mit herkömmlichen SCID Mäusen. Allerdings entwickeln NOD/SCID Mäuse häufig in einem Alter von etwa einem halben Jahr Thymome. Dies und die in diesem Stamm verbleibende Restaktivität der NK- Zellen und des angeborenen Immunsystems limitiert die Humanisierung der NOD/SCID Mäuse weiterhin.

Eine letzte wichtige Mutation, die zwischen 1995 und 1999 von vier verschiedenen Gruppen in unterschiedliche Mausstämmen eingeführt wurde, ist der Knockout der IL-2 Rezeptor γ - Kette [16] [28] [110] [63]. Die IL-2 Rezeptor γ - Kette, auch als gemeinsame Cytokinrezeptor- Kette bezeichnet, ist Bestandteil der Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 [137]. Ein Fehlen der IL-2 Rezeptor γ - Kette verhindert unter anderem komplett die Bildung von NK- Zellen und führt zu schweren Defekten in der B- und T- Zellentwicklung und im angeborenem Immunsystem. Die X- gekoppelte SCID Erkrankung beim Menschen wird durch Mutationen im IL-2 Rezeptor γ - Kette Gen hervorgerufen [141]. Zwei wichtige Stämme, in die die Mutation der IL-2 Rezeptor γ - Kette

2. Einleitung

eingeführt wurde, sind die NOD/SCID/ γ - Kette Knockout- Mäuse (NOG- Mäuse) und die Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse. Rag-2 steht für rekombinationsaktiviertes Gen 2 (recombination activated gene 2). Bei einer Mutation von Rag-2 kann die V(D)J-Rekombination von T- Zellrezeptoren und Immunoglobulinen nicht stattfinden, so dass keine reifen B- und T- Zellen gebildet werden können. Transplantationsmodelle mit diesen beiden Stämmen, die zum Teil auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, werden im Detail in den nächsten drei Kapiteln beschrieben.

2.3.2.2. Transplantation von T- Zellen in immundefiziente Mäuse (T-Zellmausmodell)

Es ist möglich immundefiziente Mäuse mit humanen T- Zellen zu repopulieren [115] [77]. Dieses T- Zellmausmodell wurde auch in der HIV- Forschung verwendet. Perez und Kollegen haben beispielsweise eine Mutation in das *CCR5* Gen eingebracht. Nach der Transplantation von NOG- Mäusen mit einer Mischung aus humanen Zinkfinger-modifizierten CD4⁺ T- Zellen, bei denen das *CCR5* Gen mutiert wurde, und ruhenden autologen PBMC konnten in Blut und Milz der Tiere humane T- Zellen nachgewiesen werden. Parallel wurden den Tieren entweder PHA- stimulierte nicht infizierte oder HIV infizierte PBMC transplantiert. Im Serum der infizierten Tiere replizierte das Virus und es kam zu einer Anreicherung der Zellen mit CCR5 Deletion in den HIV- infizierten Tieren [115]. Auch Kumar und Kollegen verwendeten ein ähnliches Modell, um die antivirale Wirksamkeit einer siRNA gegen humanes CCR5 und die beiden viralen Gene *Tat* und *Vif in vivo* zu zeigen. Dabei kam es in HIV infizierten Tieren zu einem Verlust der humanen CD4⁺ T- Zellen, der durch die siRNA Behandlung verhindert werden konnte [77].

Der Nachteil an diesem T- Zellmausmodell ist, dass die Mäuse kein komplettes humanes Immunsystem haben, so dass nur der Einfluss einzelner Zelltypen (hauptsächlich T- Helferzellen) auf die Virusreplikation getestet werden kann. Dadurch kann zwar die Wirksamkeit von neuen HIV Medikamenten *in vivo* getestet werden, aber es ist nicht möglich Wechselwirkungen des Virus mit dem Immunsystem oder die Immunreaktion gegen das Virus zu untersuchen. Außerdem sind alle Experimente in diesem Modell auf eine relativ kurze Zeitspanne limitiert, da es in den Mäusen nach Transplantation zu einer xenogenen Proliferation der humanen T- Zellen kommt und die Tiere eine GvHD (Graft versus Host Disease = Transplantat gegen Wirt- Krankheit) entwickeln.

2.3.2.3. Transplantation hämatopoetischer Stammzellen in immundefiziente Mäuse (HIS- Mausmodell)

Mäuse mit einem größeren Spektrum an humanen Immunzellen können erzeugt werden, wenn immundefiziente Mäuse mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen repopuliert werden (HIS- Mäuse = humanes Immunsystem- Mäuse). Dazu werden die Mäuse zunächst sublethal bestrahlt, um im Knochenmark der Tiere Nischen für ein optimales Wachstum für die humanen Stammzellen zu schaffen. Sowohl erwachsene [133] oder neugeborene NOG- Mäuse [62] als auch neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse [139] [45] können als Rezipienten verwendet werden und entwickeln unter anderem humane, reife CD4⁺ T- Zellen. Andere Zelltypen, die in den Tieren nach der Transplantation nachgewiesen werden können, sind neben hämatopoetischen Stammzellen auch cytotoxische T- Zellen, B- Zellen, dendritische Zellen und Monozyten. Ein weiterer Vorteil des HIS- Mausmodells ist, dass die sich entwickelnden humanen Lymphozyten in der Maus im Laufe ihrer Differenzierung der Negativselektion untergehen, so dass autoreaktive Zellen sterben [114]. Dadurch entwickeln die Mäuse keine GvHD und die humanen Zellen können über einen längeren Zeitraum *in vivo* verfolgt werden.

Es gibt verschiedene Faktoren, die den Erfolg der Repopulierung von HIS- Mäusen mit humanen Immunzellen beeinflussen. Ein wichtiger Faktor ist sicherlich die Quelle der humanen CD34⁺ Blutstammzellen. Es ist möglich die CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut [139], peripherem Blut erwachsener Spender nach G-CSF Behandlung dieser [133], direkt aus dem Knochenmark oder aus fetaler Leber zu isolieren [45].

Insgesamt wurden allerdings nur sehr wenige Studien durchgeführt, in denen mehrere Stämme oder Entwicklungsstadien von Mäusen, die Quelle der humanen Stammzellen oder verschiedene Transplantationsrouten direkt miteinander hinsichtlich ihrer Repopulierungsfähigkeit im HIS- Modell verglichen wurden. Es ist daher schwierig zu sagen, welches optimale Konditionen sind, um eine gute und reproduzierbare Repopulierung der Mäuse mit humanen CD4⁺ T- Zellen zu erzielen.

CD34 Präparationen aus Nabelschnurblut enthalten aber scheinbar im Vergleich zu anderen CD34⁺ Zellquellen einen relativ hohen Anteil an „echten“ Stammzellen. Um Mäuse erfolgreich mit humanen Blutstammzellen aus Nabelschnurblut zu repopulieren werden 10⁴ bis 10⁵ CD34⁺ Zellen transplantiert [139] [62] [148], während in vergleichbaren Experimenten dagegen etwa 10 mal mehr CD34⁺ Zellen aus fetaler Leber oder dem Blut G-CSF mobilisierter Spender nötig sind [45] [78] [133] [159].

Förderlich für die T- Zellentwicklung scheint außerdem ein junges Alter der Tiere zu sein [45]. Grund dafür könnte ein in älteren Tieren stärker zurückgebildeter Thymus im

2. Einleitung

Vergleich zu neugeborenen immundefizienten Mäusen oder ein in neugeborenen Mäusen schwächer entwickeltes angeborenes Immunsystem sein.

Ein letzter wichtiger Faktor ist die Wahl des Mausstammes. NOG- Mäuse sind auf der einen Seite etwas immundefizienter als Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse, da sie zusätzliche Defekte z.B. in den Makrophagen haben. Allerdings sind sie auch deutlich sensitiver gegenüber Bestrahlung, was bei tendenziell besserer Repopulierung zu einer höheren bestrahlungsassoziierten Mortalität führt.

2.3.2.4. BLT Modell

Das BLT (bone marrow/liver/thymus) Modell verwendet drei verschiedene humane Komponenten, nämlich CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen aus fetaler Leber und Stücke von fetaler Leber und fetalem Thymus. Die humanen Gewebestücke werden den immundefizienten Mäusen (NOD/SCID oder NOG) hierbei unter die Nierenkapsel transplantiert. Die Tiere werden danach sublethal bestrahlt und mit autologen humanen Blutstammzellen aus fetaler Leber repopuliert. Die humanen Blutstammzellen differenzieren dabei *in vivo* sowohl in B- und T- Zellen als auch Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen [95]. Die humanen Zellen können nicht nur im Blut, sondern auch in anderen Organen wie Milz, Lymphknoten, Knochenmark, Leber, „gut“ assoziiertem lymphatischem Gewebe (GALT) und den implantierten humanen Gewebestücken gefunden werden.

In zwei Studien wurden BLT Mäuse mit humanen CD34⁺ Stammzellen repopuliert, die eine shRNA bzw. siRNA gegen CCR5 exprimierten [131] [73]. Die Menge an CCR5⁺ T-Zellen wurde dadurch *in vivo* deutlich reduziert. Daraufhin wurden in einer Studie T-Lymphozyten der Mäuse isoliert und *ex vivo* mit HIV infiziert, während in der anderen die Mäuse direkt mit HIV infiziert wurden. In beiden Fällen konnte die Virusreplikation durch den CCR5 Knockdown inhibiert werden.

2.4. Zielsetzung

Zur Behandlung HIV- positiver Patienten wird heute in der Regel eine Kombinations-therapie aus verschiedenen antiviralen Substanzen (HAART) eingesetzt. Obwohl die Virusreplikation damit relativ erfolgreich inhibiert und eine Rekonstitution des Immun-systems erzielt werden können, ist die Therapie durch die Toxizität der Medikamente, die Entwicklung resistenter Viren und die hohen Therapiekosten limitiert. Eine Alternative dazu stellt die Gentherapie der HIV- Infektion mit C- Peptiden dar.

In einer klinischen Studie der Phase I/II wurde im Jahr 2004 bereits ein gammare-troviraler Vektor, der das membrangebundene inhibitorische Peptid maC46 exprimiert, getestet. Die genmodifizierten Zellen akkumulierten sich *in vivo* aber nicht. Der Anteil der Zellen, die vor der HIV- Infektion geschützt waren, war dadurch *in vivo* sehr gering, so dass es nicht zu dem erwarteten therapeutischen Effekt kam.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein lentiviraler Vektor, der maC46 codiert, *in vivo* in einem Tiermodell getestet werden. Dazu sollten zwei humanisierte Mausmodelle für die Gentherapie der HIV- Infektion etabliert werden (T- Zellmausmodell und HIS- Mausmo-dell). Für das T- Zellmausmodell werden humane reife $CD4^+$ T- Zellen in NOG- Mäuse transplantiert. Die Zellen werden entweder vor der Transplantation *in vitro* oder danach *in vivo* mit HIV infiziert. Im HIS- Mausmodell dagegen werden neugeborene Rag-2/ γ -Kette Doppelknockout- Mäuse mit humanen $CD34^+$ Blutstammzellen repopuliert. In beiden Modellen sollte die antivirale Wirksamkeit von maC46 *in vivo* getestet werden. Außerdem sollen beide Modelle verglichen werden, um zu sehen, welches Modell besser für die *in vivo* Testung einer Gentherapie der HIV- Infektion geeignet ist.

Der Nachteil von maC46 ist, dass nur die Zelle, die das Peptid exprimiert, vor der Infektion mit HIV geschützt ist. Nicht genetisch modifizierte Nachbarzellen können wei-terhin infiziert werden. Bei einem sekretierbaren Prinzip, wie einem löslichen Peptid, sind dagegen auch nicht infizierte Nachbarzellen geschützt (Bystander Effekt). In der Arbeitsgruppe von Laer wurde in einer anderen Arbeit eine sekretierte Variante des C46 Peptids entwickelt (iSAVE). Sowohl ein gammaretroviraler als auch ein lentiviraler Vek-tor, die das iSAVE Peptid codieren, sollten für die Transduktion primärer, humaner T- Zellen verwendet werden. Nach der Transplantation dieser Zellen in NOG- Mäuse sollten die Serumkonzentrationen des iSAVE Peptides bestimmt und mit der *in vitro* IC_{50} , die im niedrigen nanomolaren Bereich liegt, verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden Grundchemikalien von Applichem (Darmstadt), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Serva (Heidelberg) bezogen.

Alle nötigen Plastikmaterialien (wie z.B. Pipetten, Zellkulturschalen, Mikropipettenspitzen usw.), sowie Filtersysteme (\varnothing 0,22 μm , 0,45 μm) wurden von Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhäusen), Biozym (Oldendorf), Schleicher & Schull (Dassel), Becton Dickinson (Heidelberg), Millipore (Eschborn) und Nalgene (Rochester, NY, USA) bezogen.

3.1.1. Chemikalien, Medien, Puffer und Lösungen

Lösungen und Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt (Filtration durch eine Millipore-Anlage von Millipore Water Systems, Eschborn). Puffer und Nährmedien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 2 bar sterilisiert, bei Hitzeinstabilität steril filtriert oder bereits steril bezogen. Lagerung war bei 4°C, soweit nicht anders angegeben.

- Ammoniumpersulfat (APS)
10 % in H₂O
- Ampicillin- Stammlösung
100 mg/ ml in H₂O
Lagerung bei -20°C
- BSA (Rinderserumalbumin)
Sigma, Deisenhofen
- 2,5 mM CaCl₂
Sigma, Deisenhofen

3. Material und Methoden

- 25 mM Chloroquin
Sigma, Deisenhofen
- DMSO (Dimethylsulfoxid)
Serva, Heidelberg
Lagerung bei Raumtemperatur
- DNA- Laufpuffer
0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylene, 15 % Ficoll Typ 400 in H₂O
Lagerung bei Raumtemperatur
- Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM)
Bio Whittaker, Belgien
- Einbettmedium für konfokale Mikroskopie
ProLong Gold antifade reagent, Molecular Probes-Invitrogen, Karlsruhe
Lagerung bei -20°C
- Enfluran (Ethrane)
Abbott, Wiesbaden
Lagerung bei Raumtemperatur
- Ethidiumbromidlösung
1 % (w/v) Ethidiumbromid in H₂O
- FACS- Puffer
PBS, 1 % (v/v) FCS, 0,1 % NaN₃
- FCS (Fötale Kälberserum)
PAA Laboratories, Österreich
- Ficoll („human Pancoll“)
Biotech GmbH
Lagerung bei Raumtemperatur
- Einfriermedium für Zellkultur
90 % FCS, 10 % DMSO
- Flebogamma (5 % Infusionslösung)
Grifols, Langen
- 1,5 % Formaldehyd in PBS
Biomedicals, Inc., Ohio, USA
- Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)
Sigma, Deisenhofen

3. Material und Methoden

- Heparin- Natrium 25.00- ratiopharm[®]
Ratiopharm, Ulm
- HEPES- Puffer (2 ×)
1,5 mM Na₂HPO₄
- Humanes AB- Serum
PAA Laboratories, Pasching, Österreich
- Interleukin-2 (Proleukin[®] S)
Novartis, Nürnberg
gelöst in PBS 0,1 % BSA und eingestellt auf 1×10^4 U/ml
Lagerung bei -20°C oder kurzzeitig bei 4°C
- LB- Medium
10 g Trypton/ Pepton aus Casein, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl mit H₂O auf 1000 ml auffüllen
- L-Glutamin (100 ×)
Bio Whittaker, Belgien
- MACS- Puffer
PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA
- MPBST
5 % Milchpulver in PBST
- Natriumdodecylsulfat (SDS)
10 % in in H₂O
Lagerung bei Raumtemperatur
- NP40- Lösung
5 % (w/v) NP40 in H₂O
Lagerung bei Raumtemperatur
- PBS (Dulbecco´s Phosphate buffered saline) (1 ×)
PAA Laboratories, Pasching, Österreich oder PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Österreich
- PBS (Dulbecco´s Phosphate buffered saline) (10 ×)
Bio Whittaker, Belgien
- PBST
100 ml 10 × PBS, 1 ml Tween-20, auf 1000 ml mit H₂O auffüllen
- Penicillin / Streptomycin-Lösung (100x)
PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3. Material und Methoden

- Proteinprobenpuffer
60 % (v/v) Glycerin, 18 % (w/v) SDS, 0,3 % (v/v) Bromphenolblau, 600 mM Tris-HCl, 12 % (v/v) β - Mercaptoethanol
- Retronektin- Lösung
2,5 mg in 1 ml H₂O aufgenommen, mit PBS auf 50 μ g/ ml eingestellt und steril-
filtriert
Lagerung bei -20°C oder kurzzeitig bei 4°C
- Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) Medium
Bio Whittaker, Belgien
- 20 % (w/v) Saccharose
in PBS
- Sammelgelpuffer
30,25 g Tris mit HCl auf pH 6,8 einstellen mit H₂O auf 500 ml auffüllen
- SDS- Elektrophorese- Laufpuffer 10 \times
151 g Tris, 720 g Glycin mit H₂O auf 5 l auffüllen
- SDS- Elektrophorese- Laufpuffer
100 ml SDS- Elektrophorese- Laufpuffer 10 \times , 10 ml 10 % SDS- Lösung, ad 1 l
H₂O
- TAE (50 \times)
Tris 1220 g, Essigsäure 285,5 g, EDTA (0,5 M) 500 ml, mit H₂O auf 5 l auffüllen
und pH auf 8,0 einstellen
- Trenngelpuffer
91 g Tris mit HCl auf pH 8,8 einstellen, mit H₂O auf 500 ml auffüllen
- Trypsin, 0,25 % / EDTA 1mM
Invitrogen, Karlsruhe
- Westernblot- Transferpuffer
20 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) 10 \times SDS- Elektrophorese- Laufpuffer
- X-Vivo 15 Medium
Bio Whittaker, Belgien
- Zell- Lysepuffer
50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 2 % (v/v) Aproti-
nin, 2 mM EDTA pH 8,0, 50 mM Natriumfluorid, 10 mM Natriumpyrophosphat,
10 % (v/v) Glycerol, 1 mM Natriumvanadat, 2 mM Pefabloc[®] SC in H₂O
Lagerung bei -20°C

3.1.2. Zellen und Anzuchtsmedien

Die für die Medien verwendeten Cytokine wurden mit Ausnahme von IL-2 von der Firma tebo- bio (USA) bezogen.

293T

Humane, embryonale Nierenepithelzelllinie [113]

293T- Zellen sind ein Derivat von 293- Zellen und enthalten das T- Antigen von SV40.

→ DMEM mit 10 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin (D-10)

TZM-bl

Humane Fibroblastenzelllinie [26][118][150]

Abgeleitet von der HeLa- Zelllinie, TZM-bl Zellen exprimieren stabil CD4, CXCR4 und CCR5. Außerdem tragen sie ein Luziferase- und ein β - Galaktosidasegen unter Kontrolle einer HIV- LTR

→ DMEM mit 10 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin (D-10)

PM-1

Humane T- Zelllinie [87]

PM-1 stammen von der Zelllinie HUT87 ab und exprimieren die beiden humanen Chemokininrezeptoren CXCR4 und CCR5.

→ RPMI 1640 mit 5 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin (R-5)

PM-1_M87o

Humane T- Zelllinie [30]

PM-1 stammen von der Zelllinie HUT87 ab und exprimieren die beiden humanen Chemokininrezeptoren CXCR4 und CCR5.

PM-1_M87o sind PM-1 Zellen, die stabil mit M218 transduziert sind, so dass sie maC46 exprimieren.

→ RPMI 1640 mit 5 % FCS, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin (R-5)

Primäre, humane Lymphozyten

Isoliert aus dem peripheren Blut gesunder Spender. Dazu wurden Buffy Coats verwendet, die vom Blutspendedienst Hessen- Thüringen zur Verfügung gestellt wurden.

→ X- Vivo 15 mit 5 % humanem AB- Serum, 2 % Glutamin, 1 % Penicillin/ Streptomycin, 100 Units IL-2/ ml

Humane CD34⁺ Blutstammzellen

Isoliert aus humanem Nabelschnurblut. Das Nabelschnurblut wurde freundlicherweise von den Hebammen der Geburtsstation des Universitätsklinikums Frankfurt nach Einwilligung der Eltern aus der Nabelschnur gesunder Entbindungen entnommen und zur Verfügung gestellt.

→ X- Vivo 15 Medium mit 1 % BSA, 2 % Glutamin, 60 ng/ ml humanem IL-3, 100 ng/ ml humanem TPO, 300 ng/ ml humanem SCF, 300 ng/ ml humanem Flt3- Ligand

3.1.3. Mausstämme

Die Mäuse wurden entsprechend den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) gehalten.

- Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse
Zuchtpaare dieses Stammes wurden freundlicherweise von Dr Markus Manz (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona) zur Verfügung gestellt [139].
- NOD/SCID/ γ - Kette Knockout- Mäuse (NOG- Mäuse)
NOG- Mäuse wurden über Charles River Laboratories Jaxmice, USA bezogen (Stock Nummer 05557).

3.1.4. Antikörper

2F5

Humaner monoklonaler Antikörper, der an das Epitop ELDKWA in der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41 bindet[105].

Polymun, Wien, Österreich

1 μ g in 10 ml MPBST pro Membran für Western Blot, 0,1 μ g pro Färbung für FACS basierten Nachweis von iSAVE Peptide

Ziege- α human- PE

Antikörper aus der Ziege, der den Fc- Teil humaner IgG- Antikörper erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE = FL-2 im FACS) gekoppelt ist.

Dianova, Hamburg

0,5 μ l pro FACS- Färbung

Ziege- α human- HRPO

Antikörper aus der Ziege, der den Fc- Teil humaner IgG- Antikörper erkennt und mit der Meerrettich- Peroxidase (HRPO) gekoppelt ist.

Dianova, Hamburg

1:10.000 verdünnt für Western Blot

TriTest

Mischung aus FITC- konjugierten α - human CD4, PE - konjugierten α - human CD8 und PerCP- konjugierten α - human CD3 Antikörpern

Becton Dickinson, Heidelberg

6 μ l pro FACS- Färbung

PE- konjugierter α - human CD4 Antikörper

Antikörper aus der Maus, der humanes CD4 erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE = FL-2 im FACS) gekoppelt ist.

Becton Dickinson, Heidelberg

8 μ l pro FACS- Färbung

PerCP- konjugierter α - human CD8 Antikörper

Antikörper aus der Maus, der humanes CD8 erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff PerCP (FL-3 im FACS) gekoppelt ist.

Becton Dickinson, Heidelberg

10 μ l pro FACS- Färbung

APC- konjugierter α - human CD45 Antikörper

Antikörper aus der Maus, der humanes CD45 erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC (FL-4 im FACS) gekoppelt ist.

Becton Dickinson, Heidelberg

8 μ l pro FACS- Färbung

PE- gekoppelter α - p24 Antikörper

Humaner monoklonaler Antikörper, der das HIV Protein p24 erkennt und mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt ist.

Beckman Coulter, Fullerton, USA

5 μ l pro FACS- Färbung

2.4G2

Monoklonaler Antikörper aus der Ratte, der an murine Fc- Rezeptoren (CD16/ CD32) bindet.

BioXcell, West Lebanon, USA

1 μg pro FACS- Färbung

3.1.5. Peptide und Enzyme

Retronektin

Takara Bio Inc., USA

T20

T20 ist 36 Aminosäuren lang und stammt aus der C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41. Die Aminosäuresequenz lautet: YTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELL **ELDK-WASLWNWF**. Das Epitop, das von 2F5 gebunden wird, ist orange markiert.

Das Peptid wurde von der Firma Roche Laboratories Inc. (Nutly, USA) bezogen. Es wird dort unter dem Namen Fuzeon[®] (Enfuvirtid) vertrieben. Das Peptid wurde in Aqua dest. gelöst, auf eine Konzentration von 4,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1 mM) eingestellt und bei -80°C gelagert.

C46

C46 enthält 46 Aminosäuren aus dem C- terminalen „heptad repeat“ Sequenz von gp41. Der Sequenz aus gp41 folgen 6 Aminosäuren einer Furinschnittstelle. Die Aminosäuresequenz lautet: WMEWDREINNYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDKWASLWN-WFRSRAKR.

Das Peptid wurde von der Firma Thermo Fisher Scientific (Ulm) synthetisiert. Es wurde in einer 1:1 Mischung aus DMSO und H_2O gelöst, auf eine Konzentration von 250 μM eingestellt und bei -80°C gelagert.

Fc-IL-7 Fusionsprotein

H06-112-3A, hu Fc g1 Hinge g2 GS-L2 hu DI-IL7 (PNDS), Konzentration: 4,06 mg/ ml [133]

DNA Restriktionsendonukleasen

New England Biolabs, Schwalbach

3.1.6. Vektoren

Karten der verwendeten Plasmide können im Anhang gefunden werden.

M5

Lentiviraler Vektor, der das Hüllprotein von VSV codiert.

[157]

M118

Lentiviraler Vektor, der das Hüllprotein des HIV-1 Isolats JRFL codiert.

Matthias Dittmar, Universitätsklinikum Heidelberg

M334

Lentiviraler Vektor, der GagPol von HIV-1 enthält.

[107]

M420 = LV-GFP

Lentiviraler Vektor, der GFP codiert.

[25]

M579

Retroviraler Vektor, der GagPol von MLV enthält.

Christopher Baum, Medizinische Hochschule Hannover und Tsanan Giroglou, AG von Laer, Frankfurt am Main

M589 = LV-maC46-GFP

Lentiviraler Vektor, der ein Fusionsprotein aus maC46 und GFP codiert.

[74]

M620

Retroviraler Vektor, der das galv- Hüllprotein des Gibbon ape leukemia Virus codiert.

Roland Zahn, AG von Laer, Frankfurt am Main

M918 = RV-iSAVE

Gammaretroviraler Vektor, der ein sekretiertes C46 Peptid (iSAVE) codiert.

[31]

T42 = LV-iSAVE

Lentiviraler Vektor, der ein sekretiertes C46 Peptid (iSAVE) codiert.

Jörg Kahle, AG von Laer & Vision7 GmbH, Frankfurt am Main

3.1.7. Verwendete Kits

- Nukleobond AX Maxiprep Kit von Machery & Nagel, Düren
- FIX & PERM von Caltag-Laboratories, Hamburg
- Calcium Phosphat Transfection Kit von Sigma, Deisenhofen
- CD34 Progenitor Cell Isolation Kit von Miltenyi
- Cobas AmpliPrep/ Cobas TaqMan HIV-1 Test, v2.0, Roche

3.1.8. Geräte

- Analysewaage von Kern, Albstadt
- Ausschwingzentrifuge Megafuge 1.0R von Heraeus, Hanau
- Autoklav HAST 4-5-6 E von Zirbus Technology, Bad Grund
- Brutschrank für Zellkulturen, Cytoperm von Heraeus, Hanau
- Durchflusszytometer: FACSCalibur mit der Software CellQuestPro von BD, Heidelberg
- Fluoreszenzmikroskop Eclipse TE300 von Nikon, Düsseldorf
- Heizblock von Techne, England
- Konfokales Mikroskop Leica TCS SL mit der Leica LCS- Software, Leica Microsystems, Wetzlar
- Kühlzentrifuge Beckman Avanti J20 von Beckman, München
- Kühlzentrifuge Rottina 48R von Hettich, Tuttlingen
- Magnet-Separator MPC-1 von Dynal, Hamburg
- Mikroskop von Leica, Bensheim
- pH- Meter Mettler Toledo M220 von Mettler, Gießen
- Pipetten von Gilson, Middleton, USA
- Pipettierhilfe Pipetboy acu von Integra Biosciences, Fernwald
- Schüttler TH25 von Edmund Bühler, Tübingen
- Schüttelinkubator von Heraeus, Hanau
- Sterilbank für Zellkulturen HERAsafe HS12 von Heraeus, Hanau
- Sterilbank für Zellkulturen, Microflow von Nunc, Wiesbaden Biebrich
- Tischzentrifuge Rotina 48R von Hettich Moco 20, Tuttlingen
- Vortex Genie 2 von Bender und Hobein, Schweiz
- Wasserbad von GFL, Burgwedel
- Zellzählgerät, Casy TT von Schärfe System, Reutlingen

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Präparation von Plasmid- DNA

Plasmid- DNA wurde aus *Escherichia Coli* mit Hilfe des Nucleobond AX Maxiprep Kits von Macherey & Nagel nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA wurde dabei im letzten Schritt in H₂O eluiert.

3.2.1.2. Restriktionsverdau von DNA

Plasmid- DNA wurde nach der Präparation durch Verdau mit Restriktionsendonukleasen auf ihre Identität hin überprüft. Dazu wurden 0,5- 1 μ g Plasmid- DNA mit 5- 10 Units der Restriktionsendonuklease der Firma NEB in einem 20 μ l Reaktionsansatz gemischt. Es wurde ein vom Hersteller empfohlener Puffer hinzugefügt und die Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Fragmente wurden durch Agarose- Gelelektrophorese analysiert.

3.2.1.3. Agarose- Gelelektrophorese

DNA- Fragmente wurden durch Agarose- Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Dazu wurde 1 %ige Agaroselösung in TAE- Puffer durch Erhitzen verflüssigt. Der flüssigen Agaroselösung wurde Ethidiumbromid zugesetzt (2 μ g/ml) und die Lösung wurde in eine Gießform gegossen. Es wurde ein Kamm eingesetzt, um Taschen zu formen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde der Kamm entfernt und das Gel wurde in eine mit TAE- Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die DNA- Proben wurden mit 6 \times DNA- Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur späteren Größenabschätzung der DNA- Fragmente wurden auch gekaufte Größenmarker (100 bp, 1 kb) mit DNA- Fragmenten bekannter Größe aufgetragen.

Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für 20- 30 Minuten. Danach wurde das Gel unter UV- Licht ($\lambda = 366$ nm) analysiert. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der dabei in die DNA interkalierte, so dass die Banden im UV- Licht sichtbar wurden.

3.2.1.4. Bestimmung der HIV- RNA Kopien im Serum von infizierten Mäusen mittels RT- PCR

Die Viruslast (HIV- RNA Kopien) im Serum infizierter Mäuse wurde mittels RT- PCR bestimmt. Das Mausserum wurde in humanem Serum verdünnt, so dass das Endvolumen 1,1 ml betrug. Üblicherweise musste das Mausserum 1:200 bis 1:10 verdünnt werden. Das humane Serum wurde vorher bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert und durch einen 0,45 µm Filter filtriert. Die verdünnten Mausseren wurden für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert. Die RNA Isolation und RT- PCR wurden vollautomatisch mit dem AmpliPre Cobas Taqman System von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Detektionsgrenze des Systems lag dabei bei 40 Kopien pro ml Probe. Je nach Verdünnung lag die Detektionsgrenze im Mausserum daher bei 400 bis 8000 Kopien pro ml.

3.2.2. Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1. Lyse von Zellen

Damit Zellen im Western Blot hinsichtlich der iSAVE Expression untersucht werden konnten, mussten sie zunächst lysiert werden. Dafür wurden die Zellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 8000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in kaltem Lysepuffer resuspendiert (10⁶ Zellen in 50 µl). Die Reaktionsansätze wurden 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Proben alle 5 Minuten gemischt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten bei 13000 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Analyse im Western Blot bei -20°C gelagert.

3.2.2.2. Deglykosylierung von Zellkulturüberständen und Zelllysaten

Das iSAVE Protein enthält N- Glykosylierungen. N- glykosylierte Proteine geben, durch Unterschiede in der Größe des Glykans, im Western Blot eine breite, diffuse Bande. Zellkulturüberständen und Zelllysaten wurden daher mit Hilfe des Enzyms PNGaseF (New England Biolabs) deglykosyliert, um eine scharfe und klare Bande zu erhalten. Die PNGaseF schneidet alle Klassen von Asparagin (N)- gebundenen Oligosacchariden zwischen der Asparagin- Seitenkette und dem ersten N- Acetylglukosamin- Rest des Zuckerbaums.

3. Material und Methoden

Zur Deglykosylierung wurden 50 μl Zelllysate oder Zellkulturüberstand über Nacht mit 0,3 μl PNGaseF (2 U/ μl) bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 3 \times Proteinprobenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

3.2.2.3. SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Proteine wurden durch Gelelektrophorese auf SDS- Polyacrylamid- Gelen der Größe nach aufgetrennt. Das dabei verwendete anionische Detergenz SDS bindet an die Proteine und verleiht diesen eine negative Ladung. Die negativ geladenen Proteine wandern nach Anlegen einer Spannung im Polyacrylamid- Gel zur positiven Elektrode und werden der Größe nach aufgetrennt. Es wurde eine diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli durchgeführt [79]. Dabei wurden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und dann im Trenngel der Größe nach aufgetrennt.

Zum Gießen der Gele wurde eine Gießapparatur der Firma Bio- Rad benutzt. Die Glasplatten (mit 1mm Abstandshaltern) wurden in die Apparatur eingespannt und die Gellösung für das 16 %ige Trenngel wurde zwischen die Platten eingefüllt. Für das Trenngel wurden 2,1 ml H₂O, 5,3 ml 30 % entgastes Acrylamide/ Bis, 2,5 ml Trenngelpuffer, 0,1 ml 10 % SDS, 5 μl TEMED und 50 μl 10 %iges APS gemischt. Das Trenngel wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet und für 30 Minuten inkubiert. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Trenngel mit H₂O gespült und mit dem Sammelgel überschichtet. Die Sammelgellösung wurde durch Mischen von 6,1 ml H₂O, 1,3 ml 30 % entgastes Acrylamide/ Bis, 2,5 ml Sammelgelpuffer, 0,1 ml 10 % SDS, 10 μl TEMED und 50 μl 10 %iges APS hergestellt. In das Sammelgel wurde ein Kamm eingeführt, um die Geltaschen zu bilden. Das Gel wurde nun wiederum für 30 Minuten inkubiert, um ein Polymerisieren des Sammelgels zu erreichen. Danach wurde der Kamm entfernt und das Gel wurde mit H₂O gespült.

Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer gesetzt und diese wurde mit Laufpuffer bis zur Oberkante des Gels befüllt. Die Taschen des Gels wurden mit Laufpuffer gespült, um nicht polymerisierte Reste des Acrylamids zu entfernen. Danach wurden die Proben bzw. ein Proteinmarker in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Proben waren zuvor mit 3 \times Proteinprobenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht worden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von zunächst 150 V für 15- 30 Minuten und anschließend bei 180 V für weitere 45- 60 Minuten.

3.2.2.4. Elektro- Blotting (Western Blot)

Die in der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennten Proteine wurden im nächsten Schritt auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde eine Semi Dry Apparatur der Firma Bio- Rad verwendet.

Die Membran und zwei Filterpapiere wurden in der Größe des Gels zurecht geschnitten. Die Membran wurde zunächst mit Wasser und anschließend in Transferpuffer gespült. Die Filterpapiere wurden in Transferpuffer eingeweicht. Auf die Anode der Blot- Aparatur wurde zunächst ein Filterpapier und darauf die Membran gelegt. Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten entfernt, das Sammelgel wurde verworfen und das Trenngel luftblasenfrei auf die Membran aufgelegt. Das Gel wurde mit dem zweiten Filterpapier bedeckt. Anschließend wurde die Kathode aufgesetzt und der Deckel geschlossen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 30 Minuten bei einer konstanten Spannung von 15 Volt.

3.2.2.5. Immundetektion durch Chemilumineszenz

Die C- Peptide auf der Membran wurden schließlich spezifisch mit dem 2F5- Antikörper und einem anti- human Sekundärantikörper, der mit der Meerrettich- Peroxidase gekoppelt war, gefärbt. Die Membran wurde zunächst für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5 % Milchpulver in PBST (MPBST) auf einer Wippe inkubiert, um unspezifische Bindestellen auf der Membran abzusättigen. Der Primärantikörper (2F5, 1 μg) wurde in MPBST verdünnt. Die Membran wurde in 10 ml der Antikörperverdünnung für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf einer Wippe inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 Mal mit je 30 ml PBST gewaschen. Der Ansatz wurde dafür jeweils für 5 Minuten auf der Wippe inkubiert. Danach wurden 10 ml der Sekundärantikörperverdünnung (Ziege- anti- human- HRPO, 1:10.000 verdünnt in MPBST) auf die Membran gegeben und diese wurde eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Die Membran wurde danach 5 Mal für jeweils 5 Minuten mit 30 ml PBST gewaschen.

Für die Detektion der Meerrettich- Peroxidase wurde das ECL PlusTM Western Blot Detection Kit der Firma Amersham verwendet. Dabei wird ein Substrat von der Meerrettich- Peroxidase umgesetzt, wobei Licht emittiert wird. Es wurden 1,5 ml Lösung 1 und 37,5 μl Lösung 2 gemischt. Diese Mischung wurde auf die Membran aufgebracht und für 5 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Membran abgetropft, zwischen zwei Plastikhüllen eingebracht und in eine HypercassetteTM- Filmkassette eingelegt. In

3. Material und Methoden

der Dukelkammer wurden HyperfilmTM ECL- Filme auf die Membran für unterschiedliche Zeitspannen aufgelegt. Die Filme wurden anschließend in der Entwicklermaschine entwickelt.

3.2.2.6. p24- ELISA

Die p24- Konzentration in Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest = Enzyme Linked Immunosorbent Assay) bestimmt. Dazu wurden 180 μ l Zellkulturüberstand zur Inaktivierung mit 20 μ l 5 %iger NP40- Lösung gemischt. Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C eingefroren. Die Proben wurden schließlich mit dem p24- ELISA- Kit der Firma Innogenetics nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.3. Zellkultur

3.2.3.1. Kultivierung von Zellen

Die verwendeten Zellen wurden in Inkubatoren bei 37°C , 90- 95 % Luftfeuchtigkeit und mit 5 % CO_2 gehalten.

Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt oder die Zellen wurden bei 70- 80 %iger Bedeckung der Kulturflasche passagiert. Dazu wurde bei adherenten Zellen das Medium entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 2- 6 ml Trypsin (je nach Größe der verwendeten Kulturflasche) zugegeben, um die Zellen von der Unterlage abzulösen, und das Trypsin wurde nach wenigen Sekunden wieder entfernt. Es wurde gewarten, bis sich die Zellen durch Klopfen gegen die Kulturflasche von der Unterlage ablösten. Die Zellen wurden dann in Medium resuspendiert und ein Teil ($1/3$ bis $1/10$) der Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt.

Bei Suspensionszellen wurde nach leichtem Resuspendieren der Zellen ein Teil der Zellsuspension entfernt und frisches Medium in die Kulturflasche hinzugefügt.

3.2.3.2. Zellzahlbestimmung

Das Zählen von Zellen erfolgte mit dem Zellzählgerät Casy TT von Schärfe System. Dazu wurden 10 bis 100 μ l der Zellsuspension in 10 ml Casyton verdünnt und in einem zelltypabhängigen Programm gemessen. Das Gerät gab die Zellzahl pro ml und die Viabilität der Zellen an.

3.2.3.3. Produktion von gammaretroviralen oder lentiviralen Vektoren durch transiente Transfektion

Zur Herstellung der für den Gentransfer benötigten Viruspartikel wurde die Säugerzelllinie 293T verwendet. Die Zellen wurden mit DNA, die alle für die Virusvermehrung essentiellen Gene und das Transgen enthielt, transfiziert. Aus Sicherheitsaspekten (um zu vermeiden, dass replikationskompetente Viren gebildet werden) waren die benötigten Gene auf drei Plasmide verteilt. Ein Plasmid enthielt das Hüllprotein- Gen, das zweite die übrigen für die Virusvermehrung nötigen Gene (z.B. für Reverse Transkriptase, Integrase, Capsidproteine) und das dritte das Transgen. Nur auf dem dritten Plasmid befanden sich virale Verpackungssignale, so dass nur das Transgen in die gebildeten Viruspartikel verpackt werden konnte. Replikationskompetente Viren können nur dann gebildet werden, wenn durch Rekombinationsereignisse ein Plasmid entsteht, das nach dem viralen Verpackungssignal das Hüllprotein- Gen und die übrigen für die Virusvermehrung nötigen Gene enthält. Die Entstehung eines solchen Plasmids durch homologe Rekombination ist sehr unwahrscheinlich, da die Sequenzhomologien zwischen den verwendeten Plasmiden gering waren.

In der hier beschriebenen Methode wurden in die humane, embryonale Nierenepithelzelllinie 293T durch transiente Transfektion mit Calciumphosphat die drei benötigten Plasmide (gammaretroviraler oder lentiviraler Vektor mit dem Transgen, GagPol Plasmid und Env Plasmid) eingebracht. Einen Tag vor der Transfektion wurden 7×10^6 Zellen in 10 ml D10- Medium in 10 cm Petrischalen ausplattiert. Direkt vor der Transfektion wurde dieses Medium entfernt und durch 8 ml frisches D10- Medium, das 25 μ M Chloroquin (50 μ l der Chloroquinstantlösung wurden zu 50 ml Medium gegeben) enthielt, ersetzt. In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 7,5 μ g gammaretroviraler oder lentiviraler Vektor mit dem Transgen, 12,5 μ g GagPol Plasmid und 1 μ g Env Plasmid gemischt. Mit H₂O wurde auf 450 μ l aufgefüllt und es wurden 50 μ l 2,5 M CaCl₂ zugegeben. Diese Mischung wurde tropfenweise zu 500 μ l 2 \times HEPES Puffer in einem 15 ml Reaktionsgefäß gegeben, wobei mit einer Pasteurpipette Blasen erzeugt wurden. Die Mischung wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6- 16 Stunden wurde das Medium, das Chloroquin und die DNA-Präzipitation enthielt, von den Zellen entfernt und durch 6 ml frisches D10- Medium ersetzt. Bei gammaretroviralen Verpackungen wurde 24, 36, 42 und 48 Stunden nach der Transfektion der Überstand abgenommen und durch 5- 6 ml frisches D10- Medium ersetzt, bei lentiviralen Verpackungen nur 24 und 48 Stunden nach der Transfektion. Die Überstände wurden durch 0,45 μ m Filtereinheiten sterilfiltriert, um Zelltrümmer und tote

Zellen zu entfernen, und bei 4°C (bzw. dauerhaft bei -80°C) gelagert.

3.2.3.4. Aufkonzentrieren lentiviraler Überstände

Lentivirale Überstände wurden über einen Dichtegradient in der Ultrazentrifuge aufkonzentriert. 30 ml Überstand wurden in ein steriles Zentrifugenröhrchen gefüllt. Der Überstand wurde vorsichtig mit 5 ml 20 %iger Saccharose (in PBS gelöst) unterschichtet. Die Röhrchen wurden zwei Stunden bei 25000 UpM und 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (Rotor: SW 32 Ti Rotor von Beckmann, München). Die Viruspartikel hatten eine so große Dichte, dass sie während der Zentrifugation sedimentierten. Der Überstand wurde danach dekantiert und die Viren wurden im 500 µl PBS pro Zentrifugenröhrchen aufgenommen. Die Viren wurden für 4 bis 16 Stunden bei 4°C auf dem Kippschüttler gelöst. Die aufkonzentrierten Virusüberstände wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.3.5. Titration von gammaretroviralen und lentiviralen Vektoren

Um die Menge an infektiösen Partikeln in einem, wie oben beschrieben, produzierten gammaretroviralen oder lentiviralen Überstand zu bestimmen, wurde die Suspensionszelllinie PM-1 mit dem Überstand transduziert und anschließend die Menge an transduzierten Zellen durch FACS- Messung bestimmt. Der Nachweis im FACS- Gerät erfolgte entweder direkt, wenn der verwendete Vektor GFP enthielt, oder bei Vektoren ohne GFP indirekt nach Antikörperfärbung.

Für die Titration wurden 2×10^5 Zellen in 500 µl R5- Medium pro Vertiefung einer 24-Loch- Mikrotiterplatte ausplattiert. Es wurden unterschiedliche Mengen an Virusüberstand zugegeben (zwischen 0 und 500 µl) und die Mikrotiterplatten wurden 1 Stunde bei 2000 UpM und 31°C zentrifugiert. Nach 2- 3 Tagen wurden die Zellen resuspendiert und in FACS- Röhrchen überführt. Die Zellen wurden mit FACS- Puffer gewaschen, für Vektoren, die GFP enthielten, in 200 µl FACS- Puffer aufgenommen und in Bezug auf ihre Fluoreszenz im FACS analysiert. Bei Vektoren ohne GFP mussten die Zellen vor der FACS- Analyse mit Antikörpern gefärbt werden, wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben ist. Mit der folgenden Formel konnte aus dem Anteil der transduzierten Zellen (im FACS fluoreszierend) der Titer des Überstands berechnet werden:

$$\text{Titer [infektiöse Einheiten/ ml]} = (\text{transduzierte Zellen [\%]} / 100) \times \text{ausgesäte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Der Verdünnungsfaktor gab dabei den Faktor an mit dem die eingesetzte Menge an Überstand multipliziert werden musste, um auf 1000 zu kommen.

3.2.3.6. Transduktion von Zelllinien mit lentiviralen Vektoren

Humane Zelllinien wurden mit, wie in Kapitel 3.2.3.3 beschrieben hergestellten, lentiviralen Partikeln transduziert. Dazu wurden die Zellen gezählt und $2 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml Medium pro Vertiefung einer 24- Loch- Mikrotiterplatte ausgesät. Zu den Zellen wurde eine entsprechende Menge an lentiviralem Überstand (MOI 1 bis 10) gegeben und die Zellen wurden für drei Tage unter Standard- Zellkulturbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann resuspendiert, in FACS- Röhren überführt und wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, hinsichtlich der Expression des Transgens GFP oder RFP untersucht.

3.2.3.7. Isolation von humanen CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut

Humane, embryonale Blutstammzellen wurden aus Nabelschnurblut isoliert. Das Blut wurde auf der Entbindungsstation des Universitätsklinikums Frankfurt am Main in Entnahmebeutel (Poches Prelevement Placentair 150 ml CPD) der Firma Maco Pharma gesammelt. Das Blut wurde bei Raumtemperatur gelagert und sollte bei der Aufarbeitung nicht älter als 48 Stunden sein. Zunächst wurden die mononukleären Zellen des Bluts über einen Dichtegradienten isoliert. Dazu wurden 30 ml Blut in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und es wurde auf ein Volumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt. In frischen 50 ml Reaktionsgefäßen wurden 25 ml Ficoll vorgelegt. Dieser wurde vorsichtig mit 25 ml des verdünnten Bluts überschichtet. Die Gradienten wurden 30 Minuten bei 2000 UpM ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die mononukleären Zellen in der weißlichen Interphase zwischen dem Ficoll (unten) und dem verdünnten Plasma (oben). Die Interphase wurde vorsichtig mit einer Pipette entnommen und in ein frisches 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Interphasen aus zwei Gradienten wurden vereinigt, das Volumen wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellsedimente aus zwei Reaktionsgefäßen wurden vereinigt und in 50 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt, 10 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert und in MACS- Puffer resuspendiert. Die CD34⁺ Zellen wurden über ein Positivselektionskit isoliert. Die Zellen haben dabei an einen α CD34- Antikörper gebunden. Der Antikörper band an magnetische Partikel, so dass die CD34⁺ Zellen in einem magnetischen Feld von den übrigen im Reaktionsansatz vorhandenen Zellen getrennt werden konnten. Es wurde das Direkt CD34 Progenitor Cell Isolation Kit der Firma Miltenyi in Verbindung mit Säulen (LS Columns) der gleichen Firma verwendet. Vor und nach der Aufreinigung wurden FACS- Proben entnommen, die mit einem Antikörper gegen humanes CD34 gefärbt

und im FACS analysiert wurden (Kapitel 3.2.5).

3.2.3.8. Kultur und Transduktion von humanen CD34⁺ Blutstammzellen

Humane CD34⁺ Zellen wurden in X- Vivo 15 Medium, das 1 % BSA, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin enthielt, kultiviert. Zusätzlich wurde das Medium mit den für das Überleben und die Teilung von Blutstammzellen wichtigen Cytokinen IL-3, TPO, SCF und Flt3- Ligand supplementiert (Endkonzentrationen im Medium 30ng/ ml, 100 ng/ ml, 300 ng/ ml, 300 ng/ ml). Die Zellen wurden nach der Isolierung entweder direkt transduziert oder eingefroren und wieder aufgetaut und transduziert, sobald neugeborene Mäuse für die Transplantation vorhanden waren.

Frisch isolierte CD34⁺ Zellen wurden in Medium mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro ml resuspendiert und je nach Zellzahl in Vertiefungen von 24- oder 6- Loch- Mikrotiterplatten ausgesät. Zu den Zellen wurde ein lentiviraler Überstand, der maC46-GFP codierende Partikel enthielt, gegeben und die Zellen wurden über Nacht oder mindestens 6 Stunden unter Standard- Zellkulturbedingungen kultiviert. Im Falle von eingefrorenen CD34⁺ Zellen wurden die Zellen zunächst nach dem Auftauen über Nacht kultiviert, bevor sie transduziert wurden.

6 bis 16 Stunden nach der Zugabe der lentiviralen Partikel wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und gezählt. Die transduzierten Zellen wurden direkt in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert oder sofern keine neugeborenen Tiere verfügbar waren, eingefroren. In jedem Fall wurde ein kleiner Teil der Zellen in frischem Medium aufgenommen in eine Vertiefung einer 24- Loch- Mikrotiterplatte gegeben und für 2- 3 Tage weiter kultiviert. Diese Zellen wurden dann mit einem Antikörper gegen humanes CD34 gefärbt und hinsichtlich ihrer CD34 und Transgenexpression durchflusszytometrisch untersucht.

3.2.3.9. Isolation von humanen CD4⁺ T- Zellen aus Blut

Humane T- Zellen wurden aus dem Blut gesunder Spender isoliert. Dazu wurden Buffy Coats von hessischen Blutspendedienst bezogen. Zunächst wurden die PBMC (peripheral blood mononucleated cells) über einen Dichtegradienten isoliert. Das Blut wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und mit 25 ml der Blut/ PBS- Verdünnung wurden 25 ml Pancoll vorsichtig überschichtet. Die Gradienten wurden für 45 Minuten bei 2000 UpM bei Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC befanden sich danach in der Interphase zwischen Pancoll und Serum. Im Zellpellet waren die Erythrozyten und

3. Material und Methoden

Granulozyten. Die Interphase wurde mit einer 5 ml Pipette entnommen und die PBMC wurden zweimal mit PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen 5 Minuten bei 1600 UpM zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden in 50 ml frischem PBS resuspendiert. Schließlich wurden die Zellen gezählt.

CD8⁺ Zellen wurden mit Hilfe von magnetischen Partikeln der Firma Miltenyi depletiert. Für die Depletion wurden die Zellen in MACS- Puffer resuspendiert ($1 \cdot 10^7$ Zellen in 80 μ l). Während der Depletion wurden alle Puffer kalt verwendet, um eine unspezifische Bindung der Zellen an die magnetischen Partikel zu verhindern. Zu den Zellen wurden die CD8- Depletionsbeads gegeben (20 μ l Beads zu $1 \cdot 10^7$ Zellen). Der Reaktionsansatz wurde gemischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden 4 ml kalter MACS- Puffer zugegeben, der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 1600 UpM zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 500 μ l kaltem MACS- Puffer resuspendiert. Für die Depletion wurde eine LD (cell depletion) Säule der Firma Miltenyi verwendet. Die Säule wurde 2 Stunden bei -20°C vorgekühlt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Die MidiMACS Separationseinheit wurde an dem MACS MultiStand befestigt und die LD Säule wurde eingefügt. Die Säule wurde mit 2 ml MACS- Puffer äquilibriert. Anschließend wurden die Zellen ohne Luftblasen auf die Säule gegeben. Der Durchfluss enthielt dabei die CD8- depletierten PBMC und wurde aufgefangen. Die Säule wurde zweimal mit je 2 ml MACS- Puffer gewaschen, der Durchfluss wurde wiederum aufgefangen und mit dem ersten vereinigt. Die CD8- depletierten PBMC wurden gezählt. Um den Erfolg der Depletion zu überprüfen, wurde eine Probe vor und eine nach Depletion mit einem Tritest Antikörpercocktail (α CD3, α CD8, α CD4) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die in der Probe verbleibenden T-Zellen waren üblicherweise nahezu ausschließlich CD4 positiv.

3.2.3.10. Kultur und Transduktion von humanen CD4⁺ T- Zellen

CD8- depletierte PBMC wurden mit α CD3/ α CD28 beschichteten magnetischen Partikel und IL-2 stimuliert. Am Tag der Isolierung (Tag 0) wurden die Zellen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ ml in X-Vivo15- Medium (supplementiert mit 5 % humanem AB-Serum, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin) aufgenommen. Es wurden α CD3/ α CD28 beschichteten magnetischen Partikel (3 pro Zelle) und 100 Units IL-2/ ml hinzugefügt und die Zellen wurden in Vertiefungen einer 6- Loch- Mikrotiterplatte gegeben. Sollten die Zellen mit lentiviralen Vektoren transduziert werden, wurde das entsprechende Volumen des lentiviralen Überstandes auch an Tag 0 mit zu den Zellen gegeben. An Tag 1 wurden 100 Units IL-2/ ml zu den Zellen hinzugefügt. An Tag 3

3. Material und Methoden

wurden die Zellen gewaschen, um den lentiviralen Überstand zu entfernen, in frischem Medium mit 100 Units IL-2/ ml resuspendiert und weiter bis Tag 5 kultiviert. An Tag 5 wurden die magnetischen Partikel entfernt und die Zellen wurden gezählt. Die Zellen wurden gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, um die Transduktionseffizienz und den Anteil an CD4⁺ Zellen in der Kultur zu bestimmen.

Sollten die Zellen mit gammaretroviralen Partikeln transduziert werden, mussten die Zellen vor der Transduktion stimuliert werden. Daher wurden die Zellen zunächst an Tag 0 wie oben beschrieben in Kultur genommen, es wurde allerdings kein Virus hinzugefügt. An Tag 4 wurden die magnetischen Partikel entfernt. Die Zellen wurden an Tag 4 und 5 jeweils auf mit Retronektin beschichteten und mit gammaretroviralen Viruspartikeln beladenen Platten ausgesät und transduziert. An Tag 7 wurden die Zellen gesammelt, gezählt und nach Bestimmung der Transduktionseffizienz für weitere Versuche verwendet.

3.2.3.11. Beladen von retronektinbeschichteten Zellkulturplatten mit gammaretroviralen Partikeln

Für die Transduktion von T- Zellen mit Retronektin wurden unbeschichtete (non-tissue-culture) 6- Loch- Mikrotiterplatten der Firma BD verwendet. Pro Vertiefung wurden 1000 μ l Retronektin (Konzentration 50 μ g/ ml) eingesetzt und die Platten wurden 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Retronektin wurde nach der Verwendung im Kühlschrank gelagert und konnte bis zu viermal benutzt werden. Nach dem Entfernen des Retronektins wurden die Platten mit 2 % BSA in PBS (1000 μ l) für 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, einmal mit HBSS und einmal mit PBS gewaschen. In jede Vertiefung wurden dann 3 ml gammaretroviraler Überstand (Kapitel 3.2.3.3) gegeben und die Platten wurden 30 Minuten bei 2400 UpM und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann entfernt und es wurde zwei weitere Mal Überstand hinzugegeben und die Platten wurden zentrifugiert. Nach dem dritten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand wieder verworfen, es wurden in eine Vertiefung einer 6- Loch- Mikrotiterplatten $3 \cdot 10^6$ Zellen in 3 ml X-Vivo15- Medium (supplementiert mit 5 % humanem AB- Serum, 2 % Glutamin und 1 % Penicillin/ Streptomycin) mit 100 Units IL-2/ ml ausgesät. Anschließend wurden die Platten im Brutschrank unter Standardbedingungen kultiviert.

3.2.3.12. Anzucht von HIV- Stocks

Humane PBMC wurden, wie in Abschnitt 3.2.3.9 beschrieben, aus Buffy Coats isoliert. Die PBMC wurden mit PHA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen gesammelt einmal mit Medium gewaschen und gezählt. $2 \cdot 10^7$ Zellen wurden pro Infektion eingesetzt und in ein 15 ml Reaktionsgefäß transferiert. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 1600 UpM zentrifugiert und in 500 bis 1000 μl des entsprechenden Virusisolsats resuspendiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden pro Reaktion 10 ml Medium hinzugefügt und 5 Minuten bei 1600 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 10 ml Medium mit 100 Units IL-2 pro ml und 2 μg Polybren pro ml resuspendiert. Jeweils zwei Reaktionsansätze wurden vereinigt und in einer T75- Zellkulturflasche für 3 Tage inkubiert. Nach 3 Tagen wurden 25 ml Medium (mit 100 Units IL-2 pro ml und 2 μg Polybren pro ml) hinzugefügt. Die Zellen wurden alle 2 bis 3 Tage unter dem Mikroskop auf die Bildung von Syncytien hin untersucht und es wurde Zellkulturüberstand (180 μl Zellkulturüberstand + 20 μl 5 % iges NP40) für p24- ELISA gesammelt. Wenn Syncytien beobachtet werden konnten und die p24- Konzentration im Zellkulturüberstand 2500 pg/ml überstieg, wurden die Zellen noch für 2 Tage weiter kultiviert. Danach wurde der Überstand gesammelt und für 10 Minuten bei 2000 UpM zentrifugiert, um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde durch einen 0,45 μm Filter filtriert. Der Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

3.2.3.13. Titration von HIV- Stocks

HIV- Stocks wurden auf TZM-bl Zellen titriert. Die Zellen enthalten ein β - Galaktosidasegen unter Kontrolle eines Tat- abhängigen Promotors. Einen Tag vor der Infektion wurden $3,5 \cdot 10^3$ Zellen in 100 μl D10- Medium pro Vertiefung einer 96- Loch- Mikrotitrierplatte ausgesät und über Nacht unter Standardzellkulturbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde serielle Verdünnungen des Virusstocks hergestellt. 100 μl der jeweiligen Verdünnung wurde auf die Zellen gegeben. Jede Probe wurde dabei in Triplicaten angefertigt. Als Negativkontrolle wurden 100 μl D10- Medium verwendet. Die Zellen wurden für 2 bis 3 Tage unter Standardzellkulturbedingungen weiter kultiviert.

Für die β - Galaktosidasefärbung wurde der Überstand der Zellen vorsichtig entfernt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und schließlich mit 100 μl einer 1:1 Aceton/ Methanol- Mischung (-20°C) fixiert. Nach nicht mehr als 5 Minuten wurde diese entfernt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des PBS wurde 100 μl

3. Material und Methoden

X-Gal Substratlösung (100x X-Gal [0,5 mg/ml] verdünnt in 3 mM Kalium- Ferrocyanat, 3 mM Kalium- Ferricyanat, 1 mM MgCl₂ in PBS) zugegeben und die Platten wurden für 2 bis 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die blau gefärbten Zellen (= infizierte Zellen) im Mikroskop ausgezählt. Dabei wurden nur Ansätze verwendet, die höchstens 100 gefärbte Zellen enthielten. Der Virustiter wurde mit der folgenden Formel berechnet: Titer (infektiöse Partikel/ ml) = Anzahl blau gefärbter Zellen × Verdünnungsfaktor

3.2.3.14. Infektion von Zellen mit HIV

Humane CD4⁺ T- Zellen wurden mit HIV-1_{D117/II} infiziert. Dazu wurden die Zellen (1*10⁶ Zellen/ ml) in frischem Medium mit 100 Units IL-2/ ml in 6- Loch- Mikrotiterplatten ausgesät. Zu den Zellen wurde ein entsprechendes Volumen des Virus (etwa 80 infektiöse Partikel auf 5*10⁶ Zellen) gegeben und die Zellen wurden über Nacht unter Standardzellkulturbedingungen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gesammelt, einmal mit PBS gewaschen und entweder in frischem Medium mit 100 Units IL-2/ ml für *in vitro* Experimente ausgesät oder direkt in NOG- Mäuse transplantiert.

3.2.4. Tierexperimente

3.2.4.1. Tierhaltungsbedingungen

Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt. NOD/SCID/ γ - Kette Knockout- Mäuse (NOG- Mäuse) wurden über Charles River bzw. Jackson Mice bezogen. Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse wurden freundlicherweise von Dr Markus Manz (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona) zur Verfügung gestellt. Beide Stämme wurden in der Tierhaltungsanlage des Georg-Speyer-Hauses weiter gezüchtet und nach den Richtlinien der FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations) gehalten. Die Zucht erfolgte in Filterdeckelkäfigen, die Tiere wurden während des Experiments in individuell belüfteten Käfigen (individually ventilated cage = IVC) gehalten. HIV- infizierte Tiere saßen in einem separaten Tierraum in einem S3/ L3- Labor. Alle Tierhaltungsräume wurden nur nach Anlegen von Schutzkleidung, OP- Gesichtsmaske, Handschuhen und Überschuhen betreten. Die Raumtemperatur betrug konstant 22°C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 % bis 60 %. Der Lichtrhythmus folgte einem wechselnden Hell- Dunkel- Intervall von 12 Stunden. Die Lichtmenge betrug 300 Lux. Die Tiere wurden mit einer Standarddiät

3. Material und Methoden

der Firma ssniff (Soest) und Leitungswasser versorgt und der allgemeine Gesundheitszustand wurde täglich durch den Experimentator, das Tierpflegepersonal, sowie durch veterinärmedizinische Kontrollen überwacht.

3.2.4.2. Repopulierung von Mäusen mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen

Neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse wurden mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen repopuliert. Dabei wurden nur maximal 2 Tage alte Tiere verwendet. Die Mäuse wurden zunächst sublethal bestrahlt. Die Tiere erhielten zweimal eine Dosis von je 2 Gy durch eine Cs- Strahlenquelle (BIOBEAM 2000) mit einem Abstand von etwa 3- 4 Stunden dazwischen. 4- 6 Stunden nach der zweiten Bestrahlung wurden die Tiere intrahepatisch mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen transplantiert. Dabei wurden pro Tier zwischen 10^5 und 10^6 Zellen in 25 μ l PBS gespritzt. Für die Transplantation wurde eine Hamilton Spritze mit einer 30- Gauge Nadel verwendet.

Ein Teil der Tiere wurde, startend zwei Wochen nach der Transplantation der humanen Blutstammzellen, wöchentlich mit einem Fc-IL-7 Fusionsprotein behandelt. Die Tiere wurden mit steigenden Mengen an Fc-IL-7 Fusionsprotein (jeweils in 200 μ l PBS verdünnt) intraperitoneal injiziert. Dabei wurden die folgenden Mengen verwendet:

- Woche 2 + 3 nach Transplantation \rightarrow 2 μ g pro Tier
- Woche 4 bis 7 nach Transplantation \rightarrow 5 μ g pro Tier
- ab Woche 8 nach Transplantation \rightarrow 10 μ g pro Tier

3.2.4.3. Repopulierung von Mäusen mit humanen CD4⁺ T- Zellen

Zur Repopulierung von Mäusen mit humanen CD4⁺ T- Zellen wurden adulte NOD/SCID/ γ - Kette Knockout (NOG)- Mäuse verwendet. Humane T- Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.3.9 und 3.2.3.10 beschrieben isoliert und transduziert. Am Tag fünf nach Isolation wurden die Zellen entweder mit HIV_{D117/II} infiziert und am nächsten Tag transplantiert (Infektion vor Transplantation) oder direkt in NOG- Mäuse transplantiert (Infektion nach Transplantation). Pro Tier wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ Zellen in 300 μ l PBS intraperitoneal gespritzt.

3.2.4.4. Infektion von humanisierten Mäusen mit HIV

Humanisierte Mäuse wurden mit HIV_{D117/II} oder HIV_{NL43} infiziert. Dazu wurden die Tiere unter Narkose mit dem jeweiligen Virusstock intraperitoneal injiziert. Die Injektion

erfolgte mittels Sicherheitskanülen (Braunülen), so dass das Virus nicht über eine Kanüle injiziert werden musste.

3.2.4.5. Entnahme von Blut

Den Mäusen wurde Blut entweder aus der Schwanzvene entnommen oder durch Herzpunktion, wenn die Maus getötet werden sollte.

Bei der Entnahme aus der Schwanzvene wurde der Schwanz zuerst mit einer Wärmelampe erwärmt, es wurde dann mit einem Skalpell in die Schwanzvene geschnitten und das Blut wurde mit Kapillaren, die mit EDTA beschichtet waren, (Microvette® CB 300 von Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Auf diese Art wurden 50- 100 μ l Blut entnommen. Für die Herzpunktion wurde die Maus mit Enfluran betäubt und das Herz wurde mit einer Spritze mit Nadel punktiert. Dabei konnte bis zu 1 ml Blut entnommen werden. Die Spritze und das Reaktionsgefäß, in dem das Blut bis zur weiteren Verwendung gelagert wurde, wurden vorher mit Heparin gespült. Dadurch wurde verhindert, dass das Blut gerinnt.

3.2.4.6. Tötung und Sektion von Tieren

Tiere wurden mit Enfluran betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Je nach Experiment wurden unterschiedliche Organe für spätere Analysen entnommen. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert und das Fell wurde mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Zunächst wurde das Fell durch einen Schnitt von caudal nach cranial entfernt ohne die Bauchdecke zu beschädigen. Sofern vorhanden wurden nun die Leistenlymphknoten entfernt und in ein Reaktionsgefäß mit PBS überführt. Die Bauchdecke wurde geöffnet und lymphatische Organe (mesenterische Lymphknoten, Milz) wurden entfernt. Der Thymus wurde nach Öffnen des Brustkorbes entnommen. Schließlich wurden Femur und Tibia der Hinterbeine isoliert.

Aus Lymphknoten, Milz und Thymus wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt, indem die Organe mit dem Stempel einer Spritze durch ein Zellsieb gedrückt wurden. Für die Knochen wurden beide Enden abgeschnitten und das Knochenmark wurden mit einer Spritze mit Kanüle ausgespült. Das Knochenmark wurde dann durch auf und ab pipettieren vereinzelt und durch ein Zellsieb filtriert. Eine entsprechende Menge der Einzelzellsuspensionen wurde für FACS- Färbungen eingesetzt.

3.2.5. FACS

3.2.5.1. Färbung von Zellen

Für eine FACS- Färbung wurden 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden entweder direkt gefärbt, wobei der verwendete Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt war, oder indirekt, wobei der erste Antikörper, der selbst keinen Fluoreszenzfarbstoff trug, durch einen zweiten, fluoreszenzfarbstoffmarkierten erkannt wurde.

Die Zellen wurden in ein FACS- Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 1500 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Bei einer direkten Färbung wurden zu den Zellen 0,5 bis 1 μg jedes Antikörpers gegeben, der Reaktionsansatz wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert, die Zellen wurden anschließend dreimal mit FACS- Puffer gewaschen und für die FACS- Messung in 200 μl FACS- Puffer oder 200 μl 1,5 %iges Formaldehyd in PBS zur Fixierung aufgenommen. Bei einer indirekten Färbung wurde nach der Inkubation des ersten Antikörpers zweimal mit FACS- Puffer gewaschen und dann der zweite Antikörper zugegeben, der wiederum 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubierte. Danach wurde dreimal mit FACS- Puffer gewaschen und die Zellen wurden für die FACS- Messung auch in 200 μl FACS- Puffer oder 200 μl 1,5 %iges Formaldehyd in PBS zur Fixierung aufgenommen.

3.2.5.2. Färbung von Leukozyten in Blut und Organen von Mäusen und Lyse der Erythrozyten

Wenn Leukozyten aus dem Blut angefärbt und im FACS analysiert werden sollten, störten die Erythrozyten bei der Messung. Daher wurden diese aus der Probe durch Lyse mit der BD- Lyselösung entfernt.

Zu 50 μl gut gemischtem Blut in einem FACS- Röhrchen wurden 1 μg des monoklonalen Antikörpers 2.4G2, der an murine Fc- Rezeptoren bindet, gegeben und die Reaktionsansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden 0,5- 1 μg jedes Antikörpers hinzugegeben, es wurde gemischt und die Reaktionsansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die $10\times$ BD- Lyselösung wurde 1:10 in H_2O verdünnt. Es wurden 1 ml $1\times$ BD- Lyselösung zugegeben, es wurde sofort gemischt und die Reaktionsansätze wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden 10 Minuten bei 1500 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es wurde noch zweimal mit FACS- Puffer gewaschen und die Zellen wurden schließlich in 200 μl FACS- Puffer oder 200 μl 1,5 %iges Formaldehyd in PBS zur Fixierung aufgenommen.

3.2.5.3. Intrazelluläre Färbung

Um iSAVE Peptide oder p24 in Zellen nachzuweisen, wurde eine intrazelluläre Färbung mit dem FIX & PERM Kit der Firma Caltag angewendet.

Für jede Färbung wurden 1×10^5 bis 3×10^6 Zellen eingesetzt. Vor der Zugabe von Medium A und Medium B wurden die Zellen jeweils 5 Minuten bei 1500 UpM zentrifugiert und die Pellets mussten vollständig von Flüssigkeit befreit werden. Zur Fixierung wurden die Zellen in 50 μl Medium A resuspendiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit FACS- Puffer gewaschen und in 50 μl Medium B, das den jeweiligen Antikörper ($\alpha\text{p24- PE}$ oder 2F5- PE) enthielt, resuspendiert. Die Ansätze wurden 20 Minuten bei Raumtemperatur oder 1 Stunde bei 4°C im Dunklen inkubiert, dreimal mit FACS- Puffer gewaschen und in 200 μl FACS- Puffer für die FACS- Messung aufgenommen.

3.2.5.4. FACS basierter Nachweis für iSAVE Peptide

Die iSAVE Konzentration in Mausserum wurde mit einer kompetitiven FACS- Färbung bestimmt. Der Nachweis beruht darauf, dass das iSAVE- haltige Mausserum mit einer definierten Menge an 2F5- Antikörper inkubiert wird. Diese Mischung wird dann verwendet, um PM-1 Zellen, die maC46 exprimieren, zu färben. Dabei ist das Färbesignal um so geringer, je weniger freier 2F5- Antikörper vorhanden ist, also je höher die iSAVE Konzentration ist.

In der Praxis wurden für jede Probe 30 μl Mausserum mit 0,1 μg 2F5 in PBS in einem Gesamtvolumen von 70 μl gemischt. Als Standart wurde ein synthetisches C46 Peptid in bekannten Konzentrationen eingesetzt. Das C46 Peptid wurde zunächst seriell verdünnt (immer 1:1) und mit ebenfalls 30 μl Mausserum pro Probe mit 0,1 μg 2F5 in einem Gesamtvolumen von 70 μl eingesetzt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden zu jeder Probe 2×10^5 Zellen in 50 μl FACS- Puffer zugegeben und die Proben wurden wiederum 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Proben wurden einmal mit FACS- Puffer gewaschen und es wurden 0,5 μl Sekundärantikörper (Ziege $\alpha\text{human- PE}$) zugegeben. Nach 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurden die Proben zweimal gewaschen und schließlich in 150 μl FACS- Puffer für die FACS- Messung aufgenommen.

3.2.5.5. FACS- Messungen

Im Durchflusscytometer (FACS) können Zellen aufgrund ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz charakterisiert werden.

3. Material und Methoden

Die Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit vereinzelt, so dass sie einzeln einen Laser passieren. Die verschiedenen Bestandteile des optischen Systems des FACS- Gerätes können unterschiedliche Komponenten des Licht nach dem Auftreffen auf eine Zelle registrieren. Ein Teil des Lichts wird nach vorne gesteuert (FSC) und gibt eine Aussage über die Größe der Zelle, während das seitlich gesteuerte Licht (SSC) Informationen über die innere Beschaffenheit der Zelle (Granularität) gibt. Wenn die Zelle, wie oben beschrieben, mit Fluoreszenzfarbstoff- markierten Antikörpern gefärbt wurde, werden diese Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach Anregung durch einen Laser Licht unterschiedlicher Wellenlängen. Bei dem hier verwendeten FACS- Gerät (FACSCalibur von BD) konnten bis zu vier unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig verwendet werden.

Für eine Messung wurden die Zellen wie oben beschrieben vorbereitet und gefärbt. Es wurden 5000 bis 10000 Zellen einer bestimmten Population (z.B. Lymphozyten) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm CellQuestPro oder FlowJo.

3.2.6. Konfokale Mikroskopie

Im konfokalen Mikroskop wurde die Lokalisation von p24 in HIV infizierten Zellkulturen untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst wie in Kapitel 3.2.5.3 beschrieben intrazellulär mit einem PE gekoppeltem Antikörper gegen das virale p24 Protein gefärbt. Ein Teil der Zellen exprimierte zusätzlich noch GFP. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe einer Cytospin für 2 Minuten bei 800 UpM auf Deckgläschen aufzentrifugiert. Die Deckgläschen wurden mit einem Einbettmedium auf Objektträgern fixiert. Anschließend wurden die Präparate im konfokalen Mikroskop hinsichtlich der GFP und p24 Lokalisation in den Zellen untersucht.

4. Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte ein lentiviraler Vektor (LV-maC46-GFP), der eine membrangebundene Variante (maC46) des C46 Peptids codierte, *in vivo* hinsichtlich seiner antiviralen Wirksamkeit untersucht werden. Desweiteren sollten ein gammaretroviraler (RV-iSAVE) und ein lentiviraler Vektor (LV-iSAVE), die beide ein sezerniertes C46 Peptid (iSAVE) codieren, hinsichtlich ihrer *in vivo* Expression getestet werden. Ein Problem bei Tiermodellen für die HIV- Infektion ist, dass nur wenige Tierarten wie z.B. Schimpansen erfolgreich mit HIV infiziert werden können. Aber auch diese Versuch sind durch ethische Bedenken, hohe Kosten, eine mangelnde Verfügbarkeit von Tieren und geeigneten Versuchseinrichtungen weiter limitiert. Daher sollten hier humanisierte Mausmodelle für die Gentherapie der HIV- Infektion etabliert werden. In diesen sollte dann der antivirale Effekt von maC46 und iSAVE getestet werden. Es wurden zwei verschiedene Modelle verwendet. Zum einen wurden immundefiziente Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen repopuliert, so dass Mäuse mit einem humanem Immunsystem erzeugt wurden (HIS- Mäuse = humanes Immunsystem- Mäuse). In einem zweiten Ansatz wurden NOD/SCID/ γ - Kette Knockout- Mäuse (NOG- Mäuse) mit humanen T- Zellen repopuliert (T- Zellmausmodell).

4.1. Testung von LV-maC46-GFP *in vitro*

Zunächst wurde der lentivirale Vektor, der die membrangebundene Variante des C46 Peptids fusioniert mit GFP (LV-maC46-GFP) codiert, in der T- Zelllinie PM-1 und in primären humanen T- Zellen getestet, um zu sehen, ob die genmodifizierten Zellen *in vitro* vor einer Infektion mit HIV geschützt sind und ob sie einen Selektionsvorteil gegenüber den nicht modifizierten Zellen haben. Desweiteren wurde die Lokalisation des HI- Virus in maC46-GFP/ p24 doppelpositiven Zellen untersucht.

4.1.1. Selektion von maC46- exprimierenden PM-1 Zellen *in vitro*

Die T- Zelllinie PM-1 wurde mit LV-maC46-GFP mit einer MOI von 10 transduziert. Die resultierende Kultur (98,5 % maC46-GFP⁺) wurde mit nativen PM-1 Zellen verdünnt, so dass 16,5 % maC46-GFP⁺ Zellen erreicht wurden. Eine Hälfte dieser Kultur wurde mit HIV_{D117/II} infiziert, während die andere Hälfte nicht infiziert blieb. Nach der Infektion wurden die Zellen in regelmäßigen Abständen intrazellulär auf p24 gefärbt und durchflusszytometrisch hinsichtlich ihres p24 und GFP Signals untersucht. In der nicht infizierten Kultur blieb der Anteil der maC46-GFP⁺ Zellen stabil. Dagegen kam es in der infizierten Kultur zu einer klaren Selektion der maC46-GFP⁺ Zellen beginnend ab Tag 8 nach Infektion, so dass nach 14 Tagen nur noch maC46-GFP exprimierende Zellen übrig waren (Abb. 4.1(a)).

Im Zeitverlauf konnte in der infizierten Kultur ein steigender Anteil an p24⁺ Zellen beobachtet werden. An Tag 10 nach Infektion waren alle Zellen positiv für p24 (Abb. 4.1(c)). In den maC46-GFP⁻ Zellen war dies vermutlich ein Zeichen für eine produktive Infektion mit HIV. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten allerdings auch 56,7 % der Zellen maC46-GFP und sollten auf Grund dessen eigentlich vor einer Infektion mit HIV geschützt sein. Somit stellte sich die Frage, warum Zellen doppelt positiv für maC46-GFP und p24 sein konnten. Dieses Phänomen war auch nur transient, so dass an Tag 14 nach Infektion nur noch etwa 13 % der Zellen p24 positiv waren, während alle Zellen maC46-GFP exprimierten.

4.1.2. HIV wird auf der Oberfläche von maC46- exprimierenden Zellen gefangen, kann aber nicht in diese eindringen

Um zu sehen, ob diese p24/ maC46-GFP doppelt positiven Zellen produktiv mit HIV infiziert waren, wurde die Lokalisation des p24- Proteins in diesen Zellen im konfokalen Mikroskop untersucht. Dazu wurden Zellen an Tag 10 nach Infektion intrazellulär mit einem PE konjugierten Antikörper gegen p24 gefärbt, auf Objektträger aufgebracht und im konfokalen Mikroskop analysiert. Nicht infizierte Kulturen zeigten auch hier wie im FACS (Abb. 4.1(b)) kein p24 Signal. Dagegen konnte in der infizierten Kultur für alle Zellen eine p24 Färbung beobachtet werden. In GFP⁻ Zellen konnten intrazellulär große Mengen an p24 detektiert werden, was auf eine produktive Infektion der Zellen mit HIV hindeutet. Im Gegensatz dazu war in den maC46-GFP⁺ Zellen das p24 Signal

4. Ergebnisse

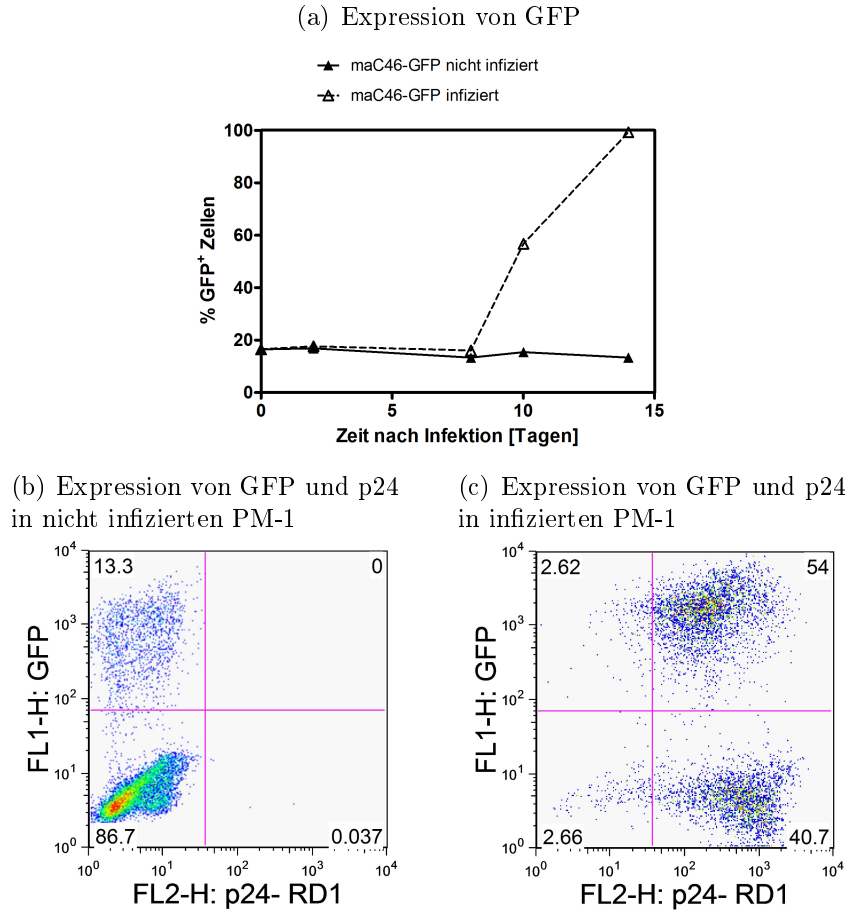


Abbildung 4.1.: Selektionsvorteil von maC46-GFP exprimierenden PM-1 Zellen nach Infektion mit HIV. PM-1 Zellen wurden mit LV-maC46-GFP transduziert. Die Zellen wurden mit untransduzierten Zellen gemischt, so dass eine Kultur mit etwa 16 % GFP⁺ Zellen erzielt wurde. Eine Hälfte der Kultur wurde mit HIV_{D117/II} infiziert. Sowohl die infizierte als auch die nicht infizierte Kultur wurden in der Folge intrazellulär auf p24 gefärbt und hinsichtlich ihrer p24 und GFP Expression durchflusszytometrisch untersucht. Expression von GFP im Zeitverlauf (A); Expression von GFP und p24 an Tag 10 in der nicht infizierten (B) bzw. der infizierten (C) Kultur

4. Ergebnisse

ausschließlich auf der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 4.2). Dies spricht gegen eine produktive Infektion der Zellen. Vielmehr scheinen durch die Hemmung des Viruseintritts gebundene Viren auf der Zelloberfläche zu akkumulieren.

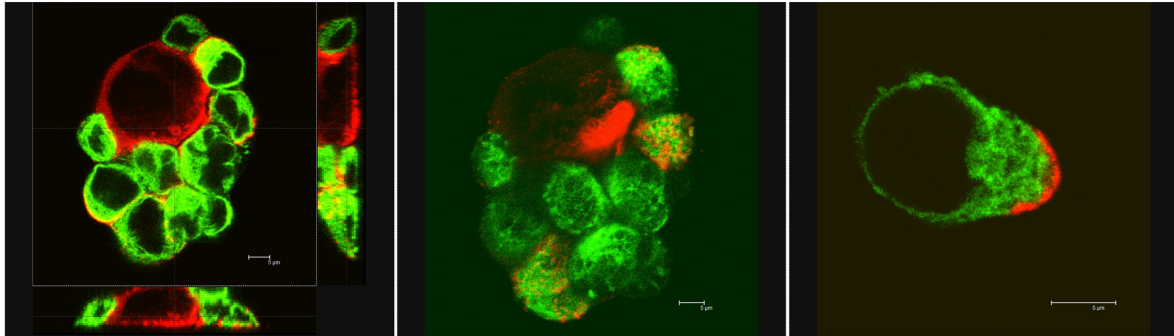


Abbildung 4.2.: Lokalisation von p24 in p24/ GFP doppelpositiven Zellen. HIV infizierte PM-1_maC46-GFP Kulturen aus Abbildung 4.1 wurden an Tag 10 nach der Infektion intrazellulär auf p24 gefärbt, auf Objektträger aufgebracht und im konfokalen Mikroskop hinsichtlich ihrer p24 und GFP Lokalisation untersucht. In maC46-GFP⁺ Zellen war das p24 Signal ausschließlich auf der Zelloberfläche zu finden, wohingegen GFP negative Zellen intrazellulär positiv für p24 waren. Rot = p24; grün = GFP.

Mit einer weiteren Methode wurde bestätigt, dass sich auf maC46 exprimierenden T-Zellen das Virus ansammelt. Dazu wurden eine maC46 exprimierende T-Zelllinie oder native Zellen mit HIV pseudotypisierten Vektorpartikeln inkubiert, nach 5 Stunden gewaschen und intrazellulär gegen p24 gefärbt. Hierbei konnten nur maC46 exprimierende nicht aber native T-Zellen mit dem α p24 Antikörper angefärbt werden (Abb. 4.3).

4.1.3. Selektion von maC46-GFP exprimierenden primären, humanen T-Zellen

Als nächstes wurde untersucht, ob maC46-GFP auch zu einem Selektionsvorteil in HIV infizierten Kulturen primärer humaner T-Zellen führt. Dazu wurden humane mononukleäre Zellen aus dem Blut gesunder Spender isoliert, die CD8⁺ Zellen depletiert und die verbleibenden, vorwiegend CD4 positiven Zellen mit α CD3- und α CD28- beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 stimuliert und mit lentiviralen Vektoren transduziert. Neben LV-maC46-GFP wurde als Negativkontrolle ein lentiviraler Vektor, der ausschließlich für GFP codiert (LV-GFP) verwendet. Die Zellen wurden hierbei zu 80 % (LV-maC46-GFP) bzw. 57 % (LV-GFP) transduziert. An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen mit nicht transduzierten CD8 depletierten T-Zellen verdünnt, um Kulturen mit etwa 10 % GFP⁺ Zellen zu erzeugen (9,5 % für LV-maC46-GFP und

4. Ergebnisse

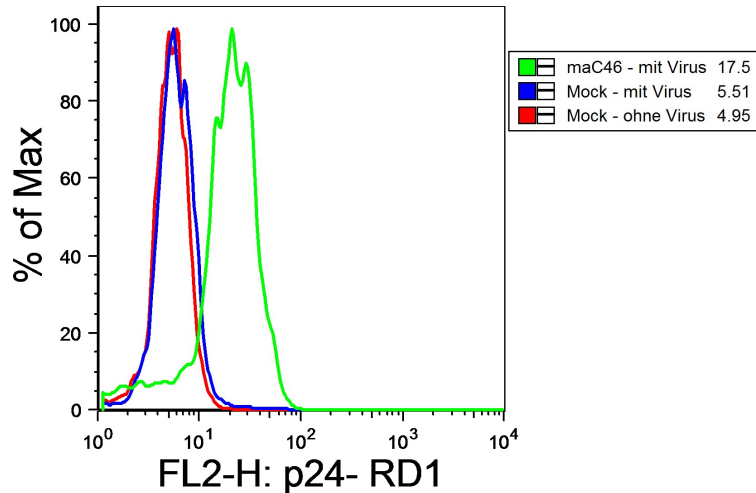


Abbildung 4.3.: Bindung von HIV pseudotypisierten Viren an maC46 exprimierende T- Zellen. Eine $CD4^+$ / $CCR5^+$ T- Zelllinie (A3) wurde zu über 95 % mit LV-maC46 transduziert. maC46 exprimierende Zellen oder native Zellen wurden mit HIV pseudotypisierten Vektorpartikeln inkubiert. Nach fünf Stunden wurden die Zellen gewaschen, intrazellulär auf p24 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

12,1 % für LV-GFP). Eine Hälfte der Kultur wurde dann jeweils mit HIV_{D117/II}, einem dualtropen, primären HIV Isolat, infiziert, während die andere Hälfte nicht infiziert blieb. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und in Triplikaten in frischem Medium ausgesät. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 31 Tagen regelmäßig auf die Expression von CD4 und GFP durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.4).

In beiden nicht infizierten Kontrollansätzen blieb der Anteil an $CD4^+$ T- Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum hoch (an Tag 31 86 % für LV-maC46-GFP und 77 % für LV-GFP). Für die beiden infizierten Kulturen kam es zu einem deutlichen Abfall der $CD4^+$ Zellen (Abb. 4.4(a)). Die infizierte LV-maC46-GFP Kultur stabilisierte sich bei etwa 50 % $CD4^+$ Zellen, während in der infizierten LV-GFP Kultur die $CD4^+$ Zellen nahezu komplett verloren gingen, so dass an Tag 31 fast nur noch $CD4^-$ Zellen in der Kultur vorhanden waren. Parallel dazu kam es in der infizierten LV-maC46-GFP Kultur zu einer klaren Selektion der Transgenpositiven Zellen, sowohl was den Anteil dieser (Abb. 4.4(b)) als auch was die Expressionsstärke des Transgens (Abb. 4.4(c)) anging. In allen drei anderen Kulturen blieb der Anteil der transgenpositiven Zellen relativ stabil bzw. nahm leicht ab.

4. Ergebnisse

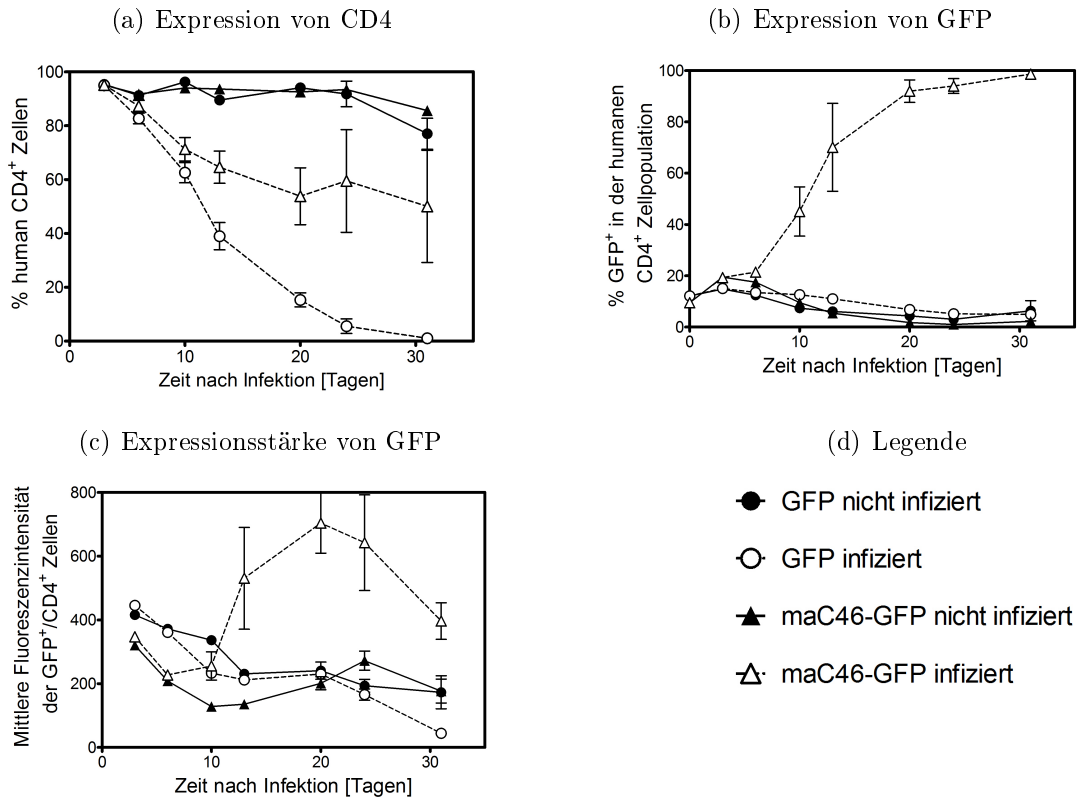


Abbildung 4.4.: Selektionsvorteil von maC46-GFP exprimierenden, primären humanen T-Zellen nach Infektion mit HIV. Humane CD8 depletierte PBMC wurden entweder mit LV-GFP (●) oder mit LV-maC46-GFP (▲) transduziert. An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen so mit nicht-transduzierten Zellen verdünnt, dass Mischungen mit 10 % GFP⁺ erzielt wurden. Diese Kulturen mit dem HIV Stamm D117/II infiziert und in Triplikaten für 31 nach der Infektion verfolgt. (A) Expression von CD4; (B) Expression von GFP innerhalb der CD4⁺ Zellen; (C) Expressionsstärke von GFP innerhalb der CD4⁺ Zellen.

4.2. Humanes Immunsystem- Mausmodell

Für das humane Immunsystem- Mausmodell (HIS- Mausmodell) wurden neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen repopuliert. Dazu wurden die CD34⁺ Zellen aus Nabelschnurblut aufgereinigt, mit lentiviralen Vektoren transduziert und in neugeborene, sublethal bestrahlte Mäuse intrahepatisch transplantiert. Der Vorteil an diesem Modell ist, dass die Mäuse in der Folge nicht nur humane CD4⁺ T- Zellen, sondern ein breites Spektrum an humanen Immunzellen, bilden (z.B. T- Helferzellen, cytotoxische T- Zellen, B- Zellen, dendritische Zellen, Monozyten [139]). Außerdem entwickeln die Tiere in diesem Modell keine GvHD (Graft versus Host Disease), da die humanen T- Zellen in diesem Modell über den murinen Thymus reifen und dabei gegen autoreaktive Zellen selektioniert wird. Im Gegensatz dazu kommt es im T- Zellmodell (Kapitel 4.3) zu einer Xenoreaktivität der transplantierten humanen Zellen gegen die Empfängermaus, die die Beobachtungszeit der Tiere limitiert.

4.2.1. Entwicklung humaner CD4⁺ T- Zellen

In einem humanisierten Mausmodell für die HIV- Infektion ist es entscheidend, dass sich in den Mäusen eine stabile Population an humanen CD4⁺ Zellen, den Zielzellen von HIV, entwickelt, damit die Tiere erfolgreich mit HIV infiziert werden können. Zunächst sollte daher untersucht werden, ob und in welchem Maße HIS- Mäuse die Entwicklung humaner CD4⁺ T- Zellen aus Stammzellen ermöglichen.

Um den zeitlichen Verlauf der humanen Tymopoese zu verfolgen, wurden Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation analysiert. Eine HIS- Maus wurde früh, 8 Wochen, nach Transplantation getötet und verschiedene hämatopoetische Organe (Blut, Thymus und Lymphknoten) wurden hinsichtlich der Menge an humanen Immunzellen, die sich in diesen Organen gebildet hatten, untersucht (Abb. 4.5). Der größte Anteil humaner CD43⁺ Leukozyten konnte im Thymus mit über 80 % detektiert werden (Abb. 4.5(a)). Im Blut waren es mit etwa 16 % deutlich weniger (Abb. 4.5(d)) und im Lymphknoten waren nahezu keine humanen CD43⁺ Zellen vorhanden (Abb. 4.5(f)). CD43 wird auf allen Leukozyten außer B- Zellen exprimiert. Innerhalb der human CD43⁺ Thymozyten waren gut die Hälfte der Zellen CD3⁺ T- Zellen (Abb. 4.5(b)), die wiederum beinahe alle doppelpositiv für humanes CD4 und humanes CD8 waren, also einen unreifen Phänotyp zeigten (Abb. 4.5(c)). Dementsprechend konnten im Blut keine humanen CD3⁺ T- Zellen gefunden werden (Abb. 4.5(e)).

4. Ergebnisse

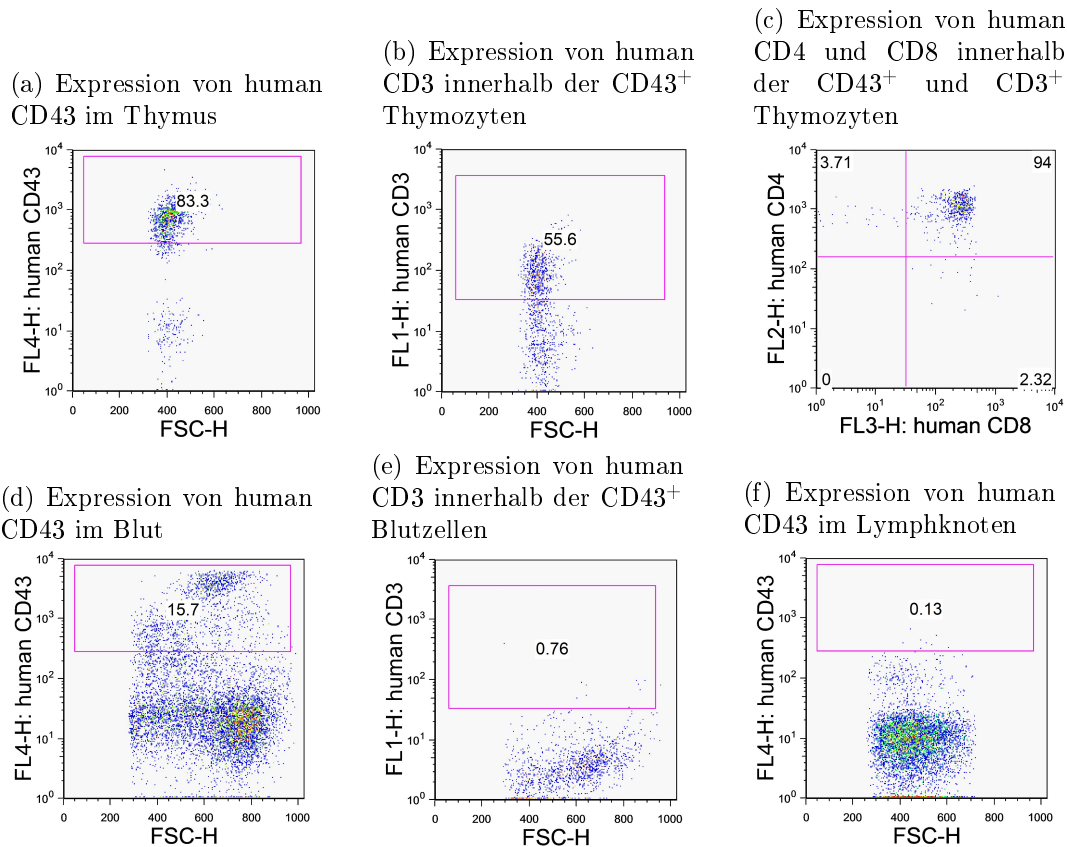


Abbildung 4.5.: HIS- Maus 8 Wochen nach Transplantation humaner Blutstammzellen. Humane CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut wurden in neugeborene Rag-2/ γ -Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert. 8 Wochen nach Transplantation wurde eine Maus getötet. Zellen aus Blut, Thymus und Lymphknoten wurden mit Antikörpern gegen humane Oberflächenrezeptoren (CD43, CD3, CD4, CD8) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Expression von human CD43 in Thymus (A), Blut (D) und Lymphknoten (F); Expression von human CD3 in den human CD43⁺ Zellen in Thymus (B) und Blut (E); Expression von human CD4 und CD8 innerhalb der human CD43 und CD3 positiven Zellen im Thymus (C).

Für eine weitere HIS- Maus wurden spät, 6 Monate, nach der Transplantation Blut, Thymus, Milz und Lymphknoten auf das Vorhandensein humaner Immunzellen hin analysiert (Abb. 4.6).

Auch hier bestand der Thymus wieder wie schon bei dem Tier, das früh nach Transplantation analysiert worden war, nahezu ausschließlich aus humanen Zellen (Abb. 4.6(a)). Im Lymphknoten dieser Maus waren ebenfalls der Großteil der Zellen humane CD45⁺ Leukozyten (Abb. 4.6(g)), während in Blut und Milz mit etwa 17 % bzw. 48 % deutlich weniger humane Zellen gefunden werden konnten (Abb. 4.6(c) und 4.6(e)). CD45 ist ein Marker, der auf allen humanen Leukozyten exprimiert wird. Innerhalb der humanen Thymozyten konnten neben CD4/ CD8 doppelpositiven T- Zellen auch einfachpositive

4. Ergebnisse

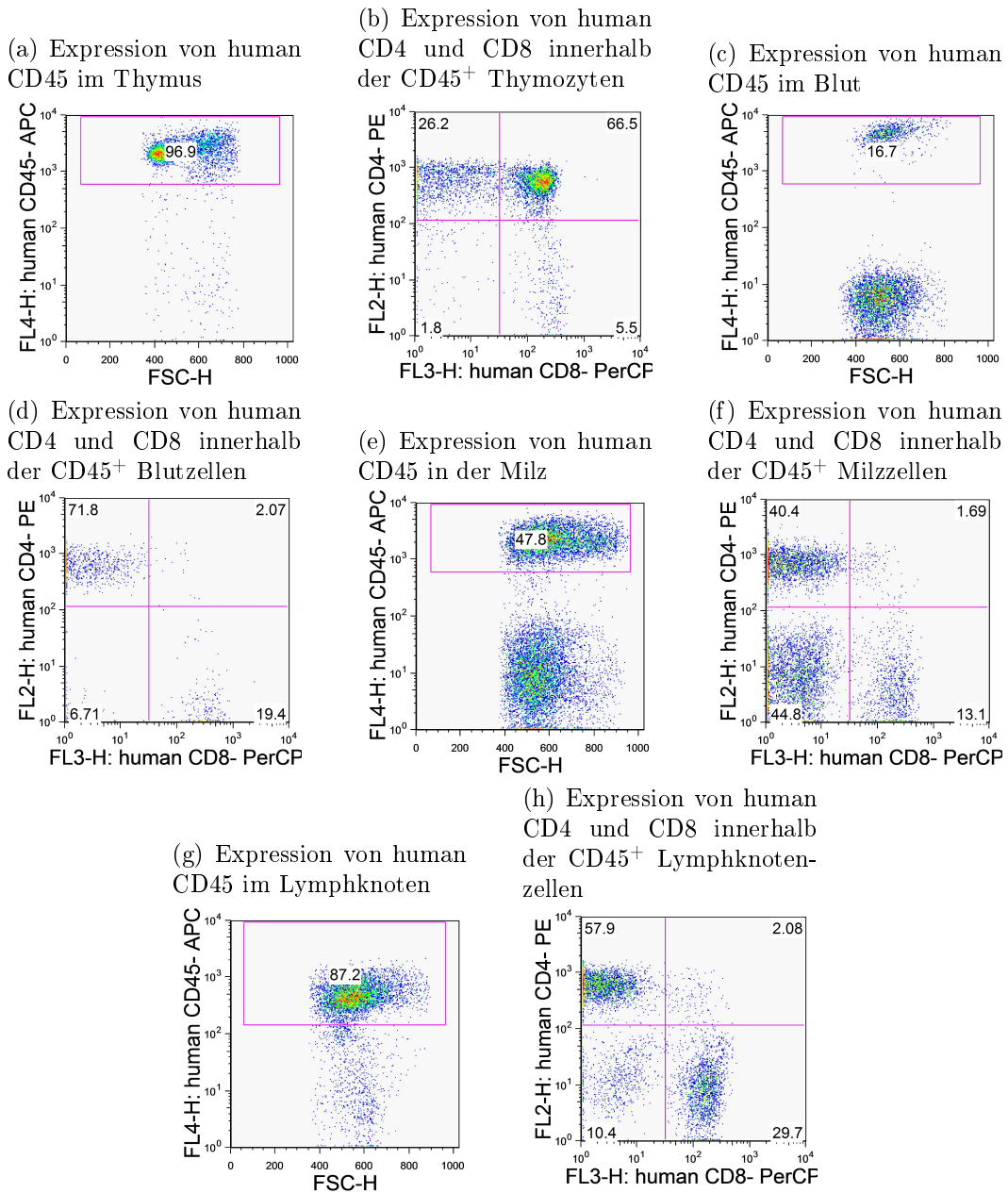


Abbildung 4.6.: HIS- Maus 6 Monate nach Transplantation humaner Blutstammzellen. Humane CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut wurden in neugeborene Rag-2/ γ -Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert. 6 Monate nach Transplantation wurde eine Maus getötet. Zellen aus Blut, Milz, Thymus und Lymphknoten wurden mit Antikörpern gegen humane Oberflächenrezeptoren (CD45, CD4, CD8) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Expression von human CD45 in Thymus (A), Blut (C), Milz (E) und Lymphknoten (G); Expression von human CD4 und CD8 innerhalb der human CD45⁺ Zellen in Thymus (B), Blut (D), Milz (F) und Lymphknoten (H).

4. Ergebnisse

T- Zellen nachgewiesen werden, etwa 26 % für CD4 und 6 % für CD8 (Abb. 4.6(b)). Auch in Blut, Milz und Lymphknoten waren einfachpositive T- Zellen vorhanden, wobei in allen drei Organen wie schon im Thymus mehr CD4⁺ als CD8⁺ T- Zellen detektiert werden konnten (Abb. 4.6(d), 4.6(f) und 4.6(h)). In der Peripherie konnten im Gegensatz zum Thymus keine doppelpositiven, unreifen T- Zellen gefunden werden.

Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse haben einen Defekt in der Entwicklung reifer B- und T- Zellen, wodurch Thymus und Lymphknoten nur sehr rudimentär ausgebildet und kaum sichtbar sind. HIS- Mäuse entwickelten nach Repopulierung mit humanen Lymphozyten einen deutlich sichtbaren Thymus und zum Teil auch Lymphknoten. Abbildung 4.7 zeigt exemplarisch Bilder der Thymi von zwei HIS- Mäusen 19 bzw. 29 Wochen nach Transplantation der humanen Blutstammzellen.

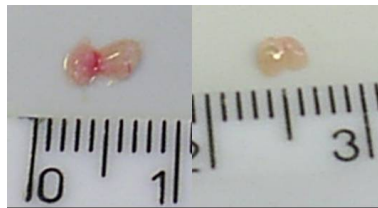


Abbildung 4.7.: Exemplarische Fotos der Thymi von HIS- Mäusen. Humane CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut wurden in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout-Mäuse transplantiert. 19 (links) bzw. 29 Wochen nach Transplantation (rechts) wurden Mäuse geopfert. Der Thymus der Mäuse wurde präpariert und fotografiert. In nicht transplantierten Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse entsprechenden Alters ist der Thymus auf Grund des T- Zelldefekts deutlich kleiner und kaum sichtbar.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass HIS- Mäuse nach der Repopulierung mit humanen CD34⁺ Blutstammzellen humane, reife CD4⁺ T- Lymphozyten ausbilden, was eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Infektion der Mäuse mit HIV war. Allerdings benötigt die Ausbildung humaner T- Lymphozyten mehr als 2 Monate.

4.2.2. Repopulierung von HIS- Mäusen mit LV-maC46-GFP transduzierten CD34⁺ Zellen

Im nächsten Schritt wurden die humanen CD34⁺ Zellen vor der Transplantation mit dem lentiviralen Vektor LV-maC46-GFP transduziert. Die Zellen wurden etwa 6 Stunden nach der Transduktion transplantiert. Ein kleiner Teil der Zellen wurde dabei *in vitro* in Kultur behalten und für einige Tage weiter kultiviert, um später die Transduktionseffizienz messen zu können. Abbildung 4.8 zeigt die Transduktionseffizienz für zwei

4. Ergebnisse

CD34 Präparationen nach Transduktion mit LV-maC46-GFP. Die Abbildung 4.8(c) zeigt außerdem den Anteil der humanes CD34 exprimierenden Zellen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass es sich nicht um die CD34 Expression im Transplantat handelte, sondern um die der Zellen nach 4- 7 Tagen *in vitro* Kultur. Ein hoher Anteil der Population zeigte CD34 Expression, also Stammzellcharakter (Abb. 4.8(c)). Da die Zellen direkt nach der Aufreinigung zu über 95 % CD34⁺ waren, sollte im Transplantat (nach nur etwa 6 Stunden *in vitro* Kultur) auch ein sehr hoher Anteil an Stammzellen enthalten gewesen sein.

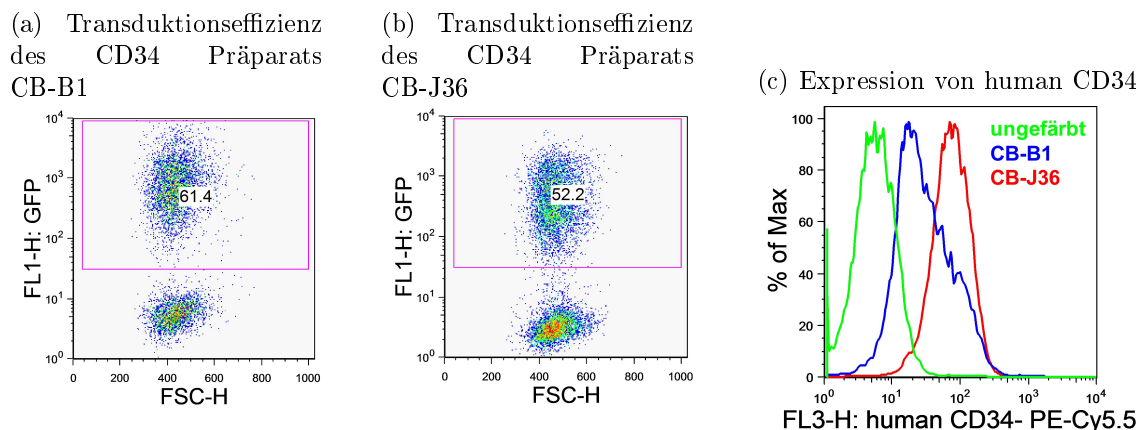


Abbildung 4.8.: CD34 Präparate nach Transduktion mit LV-maC46-GFP. Humane CD34⁺ Blutstammzellen wurden aus humanem Nabelschnurblut aufgereinigt und mit LV-maC46-GFP transduziert. Die Zellen wurden etwa 6 Stunden nach der Transduktion in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert. Ein kleiner Teil der Zellen wurde in Kultur behalten, nach wenigen Tagen mit einem Antikörper gegen humanes CD34 gefärbt und druchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer GFP und human CD34 Expression untersucht. Transduktionseffizienz des CD34 Präparats CB-B1 (A) und CB-J36 (B); Expression von human CD34 in beiden Präparationen (C).

Abbildung 4.9 zeigt die Repopulierung mit humanen Lymphozyten der Mäuse, die mit den in Abbildung 4.8 gezeigten, transduzierten CD34⁺ Zellpräparationen transplantiert wurden. Die Transduktionseffizienz für CB-J34 (CB für Cord Blood) ist nicht gezeigt, war aber mit den beiden anderen Transplantaten CB-B1 und CB-J36 vergleichbar. Mit dem CD34 Präparat CB-B1 wurde eine Maus (AD-CB-B1-w), mit CB-J34 zwei Mäuse (AD-CB-J34-m und AD-CB-J34-w) und mit CB-J36 4 Mäuse (AE-CB-J36-m1, -m2, -w1 und -w2) transplantiert. Die Mäuse AD-CB-B1-w, AD-CB-J34-m und AD-CB-J34-w stammten aus einem Wurf und die übrigen 4 Tiere aus einem zweiten. 12 bis 14 Wochen nach der Transplantation wurde den Tieren Blut entnommen und auf die Repopulierung mit humanen CD45⁺ Leukozyten, CD4⁺ T- Zellen und die Expression der Transgens

4. Ergebnisse

maC46-GFP hin untersucht (Abb. 4.9).

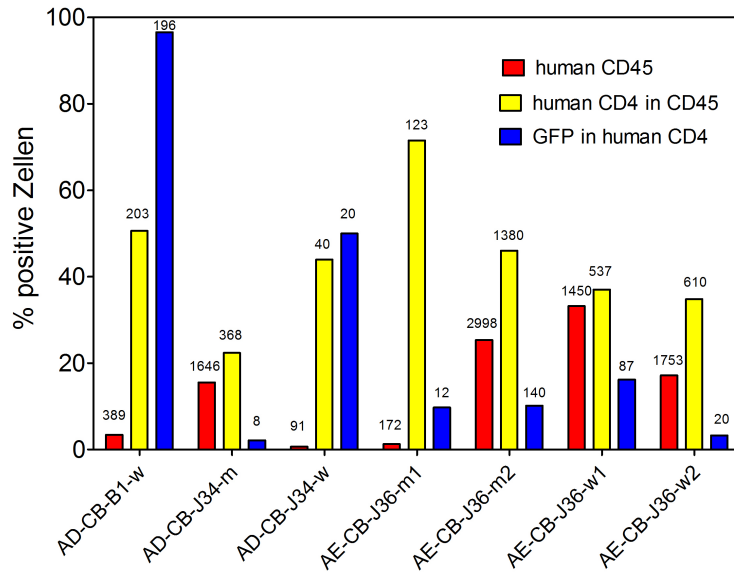


Abbildung 4.9.: Expression von human CD45, human CD4 und maC46-GFP im Blut von HIS- Mäusen. Humane CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut wurden mit LV-maC46-GFP transduziert und in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert. 12 bis 14 Wochen nach der Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen, mit Antikörpern gegen humane Oberflächenmarker (CD45 und CD4) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Grafik zeigt den Anteil human CD45⁺ Zellen im Blut der Mäuse (■), den der human CD4⁺ Zellen innerhalb der CD45⁺ Population (■) und den der maC46-GFP⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ Population (■).

Im Blut aller 7 Mäuse konnten humane Lymphozyten detektiert werden (rote Balken in Abb. 4.9). Allerdings variierte der Anteil der humanen Zellen sehr stark (von unter 1 bis über 30 %). Dieses Phänomen wurde auch in weiteren Experimenten im HIS-Mausmodell beobachtet. Innerhalb der humanen CD45⁺ Leukozytem wurden zwischen 22 und 72 % humane CD4⁺ T- Zellen gefunden (gelbe Balken in Abb. 4.9). Obwohl die Transduktionseffizienz für alle drei Transplantate vergleichbar gewesen war (50- 60 %), schwankte der Anteil an genmodifizierten Zellen innerhalb der humanen CD4⁺ T- Zellen im Blut der Mäuse sehr stark (2- 97 %, blaue Balken in Abb. 4.9). Auch für Tiere aus dem gleichen Wurf, die mit der selben CD34 Präparation transplantiert worden waren, wurden sehr unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Humanisierung erzielt (z.B. Maus AD-CB-J34-m verglichen mit AD-CB-J34-w oder AE-CB-J36-m1 verglichen mit AE-CB-J36-w1). Dies spricht für eine oligoklonale Repopulierung.

4.2.3. Infektion mit HIV

Die Tiere AD-CB-B1-w, AE-CB-J36-m1 und AE-CB-J36-m2 wurden 12- 14 Wochen nach der Transplantation der humanen Zellen mit HIV_{D117/II} infiziert, während die beiden Mäuse AE-CB-J36-w1 und AE-CB-J36-w2 als Kontrolle nicht infiziert blieben. Das Tier AD-CB-J34-m musste mit 14 Wochen auf Grund eines Infekts getötet werden und das Tier AD-CB-J34-w wurde aus dem weiteren Versuch ausgeschlossen, da die Humanisierung hier sehr niedrig war (unter 1 % im peripheren Blut).

Abbildung 4.10 zeigt noch einmal exemplarisch die Humanisierung für jeweils eine Maus aus der infizierten (AD-CB-B1-w) bzw. der nicht infizierten Gruppe (AE-CB-J36-w2) vor der HIV- Infektion. In beiden Tieren war deutlich eine Population an humanen CD4⁺ T- Lymphozyten sichtbar (Abb. 4.10(b) und 4.10(d)).

Für die beiden nicht infizierten Tiere blieb diese CD4⁺ Zellpopulation, genau wie auch die humanen Zellen generell, über einen Zeitraum von mehreren Wochen konstant, während es für alle drei infizierten Tiere zu einer Depletion der humanen CD4⁺ T- Zellen kam (Abb. 4.11(b)). Zu späteren Zeitpunkten waren in den infizierten Mäusen auch keine humanen CD4⁺ Zellen mehr zu finden (Abb. 4.11(c)). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in allen anderen Infektionsversuchen mit HIS- Mäusen beobachtet.

Parallel mit der Depletion der CD4⁺ T- Zellen konnte HIV- RNA im Serum der Mäuse detektiert werden (Abb. 4.11(d)). Es kam also zu einer produktiven Replikation von HIV in den humanisierten HIS- Mäusen als Folge derer die humanen CD4⁺ T- Zellen in den Tieren depletiert wurden. Nach dem Verlust der humanen CD4⁺ T- Zellen ging auch die Virusreplikation wieder zurück.

Trotz der Replikation von HIV in HIS- Mäusen und der daraus resultierenden Depletion von CD4⁺ T- Zellen, konnte in keiner Maus eine eindeutige Anreicherung der genmodifizierten, maC46-GFP exprimierenden Zellen beobachtet werden. Allerdings zeigten die Tiere auch keine T- Zellhomeostase. Es kam nach der Depletion der CD4⁺ T- Zellen nicht wieder zu einer Repopulierung der Tiere durch Proliferation der verbleibenden CD4⁺ T- Zellen.

4. Ergebnisse

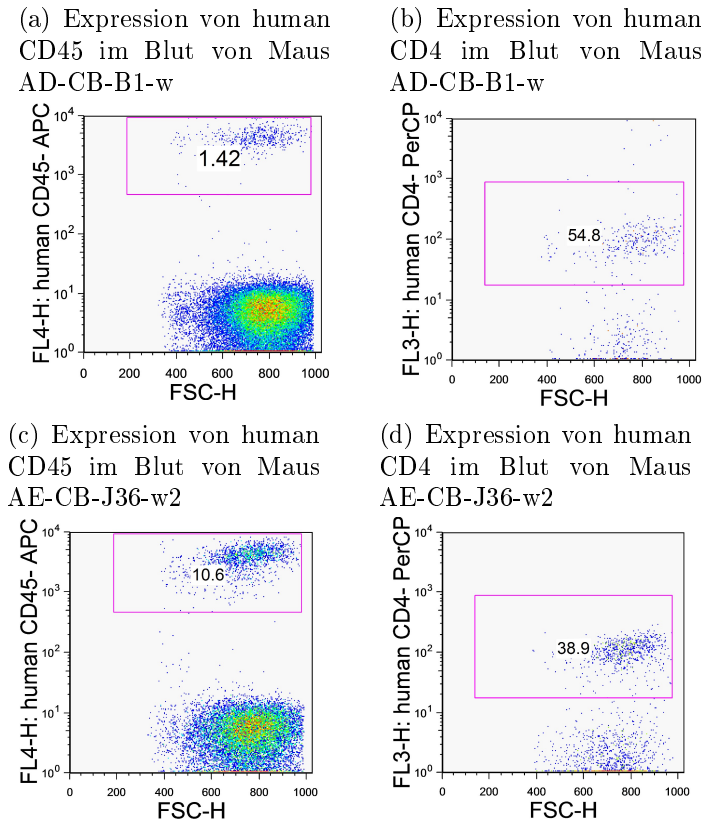


Abbildung 4.10.: Expression von human CD45 und human CD4 im Blut von HIS-Mäusen vor HIV Infektion. HIS- Mäuse wurden durch Transplantation von humanen CD34⁺ Blutstammzellen in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse erzeugt. 12 bis 14 Wochen nach der Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen, mit Antikörpern gegen humanes CD45 und CD4 gefärbt und druchflusszytometrisch untersucht. Expression von human CD45 im Blut (A) und (C); Expression von human CD4 innerhalb der humanen Leukozytenpopulation im Blut (B); Viruslast im Serum der Tiere (D).

4. Ergebnisse

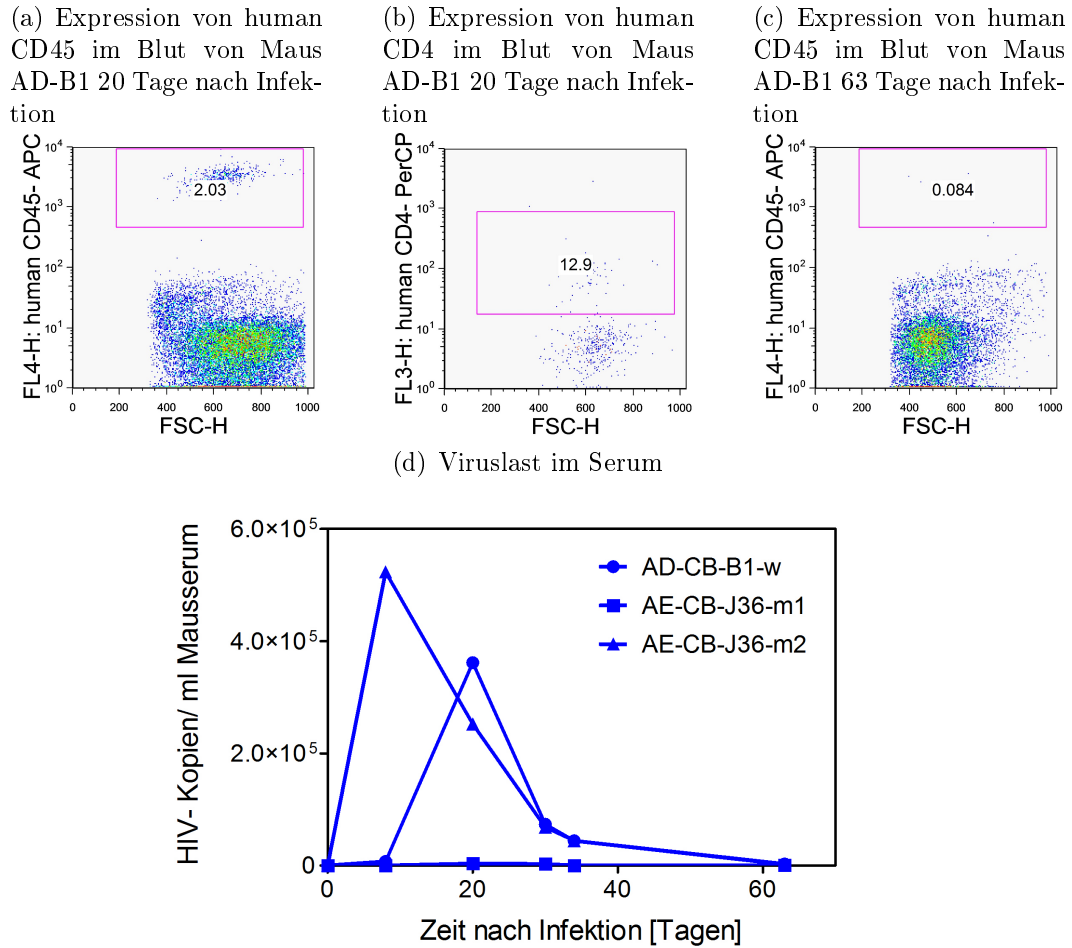


Abbildung 4.11.: Expression von human CD45 und human CD4 im Blut einer HIS-Maus nach HIV Infektion. HIS- Mäuse wurden mit HIV_{D117/II} infiziert. Nach der Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen, mit Antikörpern gegen humanes CD45 und CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Expression von human CD45 im Blut 20 bzw. 63 Tage nach Infektion (A) und (C); Expression von human CD4 innerhalb der humanen Leukozytenpopulation im Blut (B) und (D).

4.2.4. Einfluss von IL-7 auf die Repopulierung von HIS- Mäusen mit humanen Lymphozyten

IL-7 ist ein für die T- Zellentwicklung wichtiges Cytokin [32] [144] [145]. Es wurde beschrieben, dass die wöchentliche Injektion eines Fc-IL-7 Fusionsproteins die Entwicklung von humanen T- Zellen in erwachsenen NOG Mäusen nach Transplantation mit hämatopoetischen Stammzellen fördert [133]. Daher wurde in einem nächsten Experiment (Abb. 4.12) untersucht, ob Fc-IL-7 auch einen positiven Einfluss auf die Humanisierung von neugeborenen Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäusen mit humanen CD34⁺ Zellen hat. Dabei war insbesondere interessant, ob sich die Menge an humanen CD4⁺ T- Zellen im Blut der Tiere durch eine Behandlung dieser mit dem Fc-IL-7 Fusionsprotein unterschied. Für die Studie von Shultz und Kollegen wurden die Blutstammzellen aus dem peripheren Blut gesunder Spender nach Mobilisierung mit G-SCF isoliert. Dies stellt einen wesentlichen Unterschied zu den hier beschriebenen Experimenten dar. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse mit Blutstammzellen aus Nabelschnurblut repopuliert. Auf der einen Seite sind zwar weniger Stammzellen aus Nabelschnurblut im Vergleich zu peripheren Stammzellen nötig, um Tiere erfolgreich zu repopulieren, aber die Menge an Stammzellen, die aus einer Nabelschnur gewonnen werden kann, ist natürlich auch stark limitiert. Daher konnten die im Folgenden beschriebenen Tiere nicht alle mit dem gleichen Stammzellpräparat repopuliert werden.

Drei Würfe neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse (insgesamt 14 Tiere) wurden mit humanen CD34⁺ Zellen transplantiert. Eine Hälfte der Tiere (n = 8) wurde startend zwei Wochen nach der Transplantation der humanen Stammzellen wöchentlich intraperitoneal mit Fc-IL-7 injiziert, während die andere Hälfte der Tiere (n = 6) unbehandelt blieb. 12 bis 16 Wochen nach der Transplantation wurde untersucht, ob humane Leukozyten und CD4⁺ T- Zellen vorhanden waren.

Abbildung 4.12 zeigt, dass der Anteil an humanen Zellen in diesem Experiment allgemein gering war. Es konnte allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen Fc-IL-7 behandelten Tieren (blaue Quadrate in Abb. 4.12 und unbehandelten Tieren (rote Kreise in Abb. 4.12) festgestellt werden, sowohl den Anteil der humanen CD45⁺ Leukozyten als auch den der humanen CD4⁺ T- Zellen innerhalb der humanen Leukozytenpopulation betreffend. Allerdings gab es auch in diesem Experiment wieder starke Schwankungen in der Repopulierung der Tiere, so dass eine endgültige Bewertung des Einflusses von Fc-IL-7 schwierig bleibt.

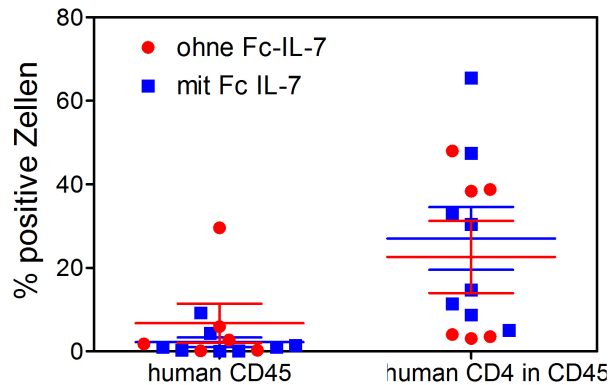


Abbildung 4.12.: Expression von human CD45 und human CD4 im Blut von HIS-Mäusen mit und ohne Fc-IL-7 Behandlung. Humane CD34⁺ Blutstammzellen aus Nabelschnurblut wurden mit LV-maC46-GFP transduziert und in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse transplantiert. Startend zwei Wochen nach der Transplantation wurde eine Hälfte der Tiere wöchentlich mit einem Fc-IL-7 Fusionsprotein intraperitoneal injiziert. 12 bis 16 Wochen nach der Transplantation wurde den Mäusen Blut entnommen, mit Antikörpern gegen humane Oberflächenmarker (CD45 und CD4) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Grafik zeigt den Anteil human CD45⁺ Zellen und den der human CD4⁺ Zellen innerhalb der CD45⁺ Population mit (■) und ohne Fc-IL-7 Behandlung (●).

4.3. T- Zellmausmodell

Im T- Zellmausmodell wurden humane, primäre T- Zellen in immundefekte NOD/SCID/ γ -Kette Knockout- Mäuse (NOG- Mäuse) transplantiert. Dazu wurden humane PBMC aus dem peripheren Blut gesunder Spender isoliert, die CD8⁺ T- Zellen depletiert, die verbleibenden Zellen mit α CD3-/ α CD28- beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 in Kultur genommen und mit lentiviralen Vektoren transduziert. An Tag 5 nach Isolation wurden die Zellen hinsichtlich ihrer Transduktionseffizienz durchflusszytometrisch untersucht. Danach wurden die Zellen entweder *in vitro* mit HIV_{D117/II} infiziert und am nächsten Tag transplantiert (Abschnitt 4.3.1.1) oder die Tiere wurden mit nicht infizierten Zellen repopuliert und nach zwei Wochen mit HIV_{D117/II} durch intraperitoneale Injektion infiziert (Abschnitt 4.3.1.2).

Der Nachteil dieses Modells gegenüber dem HIS- Mausmodell (Kapitel 4.2) ist, dass im T- Zellmausmodell nur T- Zellen transplantiert werden. Es sind hier also keine anderen Arten von Immunzellen in den Tieren zu finden, die eventuell auch einen Einfluss auf den Infektionsverlauf haben könnten und eine Situation, die der in einem HIV- infizierten Patienten näher ist, schaffen könnten. Da humane, reife Immunzellen in die Tiere

transplantiert werden, die nicht über den Thymus der Mäuse selektioniert worden sind, kommt es zu einer Xenoreaktivität der Zellen gegen die Mäuse (GvHD). Diese Xenoreaktivität limitiert die Beobachtungszeit im T- Zellmausmodell auf 6- 7 Wochen nach Transplantation der humanen Zellen.

4.3.1. Test der antiviralen Wirksamkeit von maC46 im T-Zellmausmodell

4.3.1.1. Infektion mit HIV_{D117/II} vor Transplantation

In einem ersten Experiment wurden humane, primäre CD4⁺ T- Zellen mit LV-GFP oder mit LV-maC46-GFP transduziert und an Tag 5 nach Transduktion auf die Transgenexpression hin untersucht (Abb. 4.14). Die Transduktionseffizienz lag bei 12 bzw. 19 % und war für beide Ansätze somit in einem vergleichbaren Bereich, in dem von nur einer Integration pro Zelle auszugehen war. Vor der Transduktion waren die CD8⁺ Zellen depletiert worden. Die Effizienz der Depletion war sehr hoch, so dass in der Kultur nach der Aufreinigung deutlich unter 1 % CD8⁺ Zellen enthalten waren (Abb. 4.13). Üblicherweise waren im Transplantat nahezu ausschließlich CD4⁺ T- Zellen enthalten. Fünf Tage nach der Transduktion wurde jeweils die Hälfte der Kultur *in vitro* mit HIV_{D117/II} infiziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen und in NOG- Mäuse injiziert. Für die beiden Gruppen LV-maC46-GFP und LV-GFP wurden jeweils 4 Tiere mit infizierten Zellen und 5 Tiere mit nicht infizierten Zellen transplantiert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 34 Tagen nach Transplantation/ Infektion beobachtet. Gegen Ende des Versuchszeitraums zeigten die Tiere Anzeichen einer schweren GvHD (Gewichtsverlust, entzündete Augen, schuppige Haut) und mussten daher an Tag 34 getötet werden.

In den Tieren, die mit nicht infizierten Zellen transplantiert worden waren, kam es im Verlauf der Zeit zu einem stetigen Anstieg der Gesamtmenge an humanen CD4⁺ T- Zellen innerhalb der weißen Blutzellen, so dass zu Versuchsende 56 bzw. 75 % aller Zellen humane CD4⁺ T- Zellen waren (Abb. 4.15(a)). Die mit infizierten Zellen transplantierten Mäuse zeigten dagegen nur eine anfängliche Repopulierung auf unter 1 % humane CD4⁺ T- Zellen (im Durchschnitt 0,47 % für LV-maC46-GFP bzw. 0,28 % für LV-GFP) bis etwa zwei Wochen nach Transplantation (Abb. 4.15(a)). Danach blieben die CD4⁺ T- Zellen konstant bzw. nahmen leicht ab (an Tag 34 0,47 % für LV-maC46-GFP und 0,11 % für LV-GFP). Unterschiede zwischen den beiden infizierten Gruppen waren allerdings sehr gering und erreichten keine Signifikanz.

4. Ergebnisse

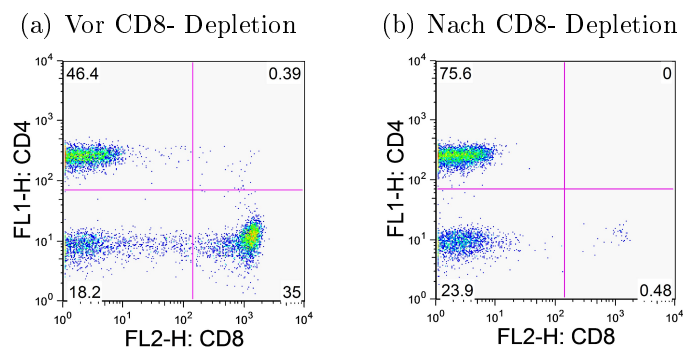


Abbildung 4.13.: Expression von CD4 und CD8 vor und nach CD8- Depletion in humanen PBMC. Humane PBMC wurden aus Buffy Coats isoliert und $CD8^+$ Zellen wurden mit Miltenyi Beads depletiert. Vor und nach der Depletion wurde ein Aliquod der Zellen mit Antikörpern gegen human CD3, CD4 und CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Expression von CD4 und CD8 innerhalb der $CD3^+$ Population vor (A) und nach der Aufreinigung (B).

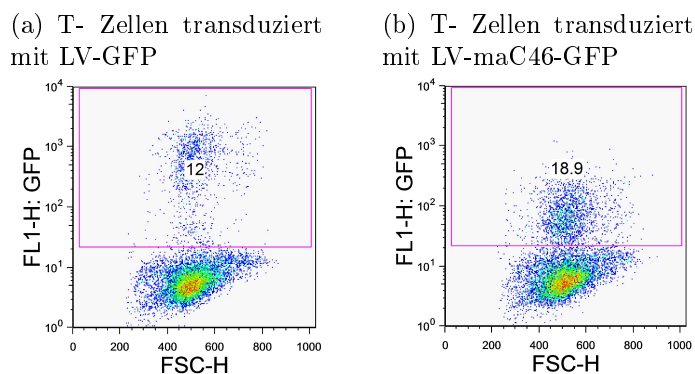


Abbildung 4.14.: Transplantat für T- Zellmausmodell. Humane PBMC wurden aus Buffy Coats isoliert und $CD8^+$ Zellen wurden mit Miltenyi Beads depletiert. Die Zellen wurden danach mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ - beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 in Kultur genommen und an Tag 0 mit LV-maC46-GFP oder LV-GFP transduziert. An Tag 5 wurden die T- Zellen hinsichtlich ihrer GFP Expression durchflusszytometrisch untersucht. Transduktionseffizienz für T- Zellen transduziert mit LV-GFP (A) bzw. LV-maC46-GFP (B).

4. Ergebnisse

Der Anteil an genmodifizierten GFP⁺ Zellen blieb für die infizierte und die nicht infizierte LV-GFP Gruppe und die nicht infizierte LV-maC46-GFP Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum nahezu konstant (Abb. 4.15(b)). Im Gegensatz dazu kam es für die infizierte LV-maC46-GFP Gruppe zunächst zu einer klaren Zunahme der maC46-GFP exprimierenden CD4⁺ T- Zellen (60 % ± 13 % an Tag 20). An Tag 14 und 20 waren die Unterschiede der Transgenexpression innerhalb der CD4⁺ T- Zellen zwischen der infizierten LV-maC46-GFP Gruppe und den drei anderen Gruppen signifikant (ungepaarter, zweiseitiger T- Test, LV-maC46-GFP infiziert gegen nicht infiziert p- Wert 0,0102 bzw. 0,0061). In der Folge (Tag 27 und 34) nahm der Anteil der GFP⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺ T- Lymphozyten wieder leicht ab (39 % ± 11 % an Tag 27 und 38 % ± 14% an Tag 34). An Tag 27 und 34 waren die Unterschiede der Transgenexpression innerhalb der CD4⁺ T- Zellen zwischen infizierter und nicht infizierter LV-maC46-GFP Gruppe nicht mehr signifikant (p- Wert 0,1 bzw. 0,14).

Die CD4⁺ T- Zell- Depletion in allen mit infizierten Zellen transplantierten Mäusen und die Anreicherung der maC46-GFP⁺ CD4⁺ T- Zellen wurden offensichtlich durch eine produktive Replikation von HIV in den Mäusen hervorgerufen. Im Serum dieser 8 Tiere konnte mit einer RT-PCR ein Anstieg der HIV RNA detektiert werden (Abb. 4.15(c)). An Tag 14 wurden Maximalwerte mit etwa 10⁵ HIV RNA Kopien pro ml Mausserum erreicht. Danach kam es bis Versuchsende wieder zu einer Abnahme der HIV Genome im Serum (10³- 10⁴ Kopien/ ml). Im Gegensatz dazu konnte im Serum von nicht infizierten Kontrollmäusen keine HIV RNA nachgewiesen werden. Es konnten allerdings keine Unterschiede in der Viruslast im Serum der Tiere zwischen den beiden Transgenen GFP und maC46-GFP beobachtet werden.

Der Nachteil in diesem Experiment ist, dass sich in den infizierten Tieren zu keinem Zeitpunkt eine stabile Population an CD4⁺ T- Zellen etablieren konnte. In allen infizierten Tieren blieben die humanen CD4⁺ T- Zellen unter 1 % der gesamten Leukozyten im Blut der Maus. Daher sollte im nächsten Schritt getestet werden, ob es auch möglich ist, die Tiere nach der Repopulierung mit humanen T- Zellen durch intraperitoneale Injektion des Virus zu infizieren. Ein weiterer Vorteil bei dieser Änderung wäre, dass die HIV Infektion nicht *in vitro*, sondern *in vivo* erfolgt, also das Modell einen Schritt weniger artifiziell wird.

4. Ergebnisse

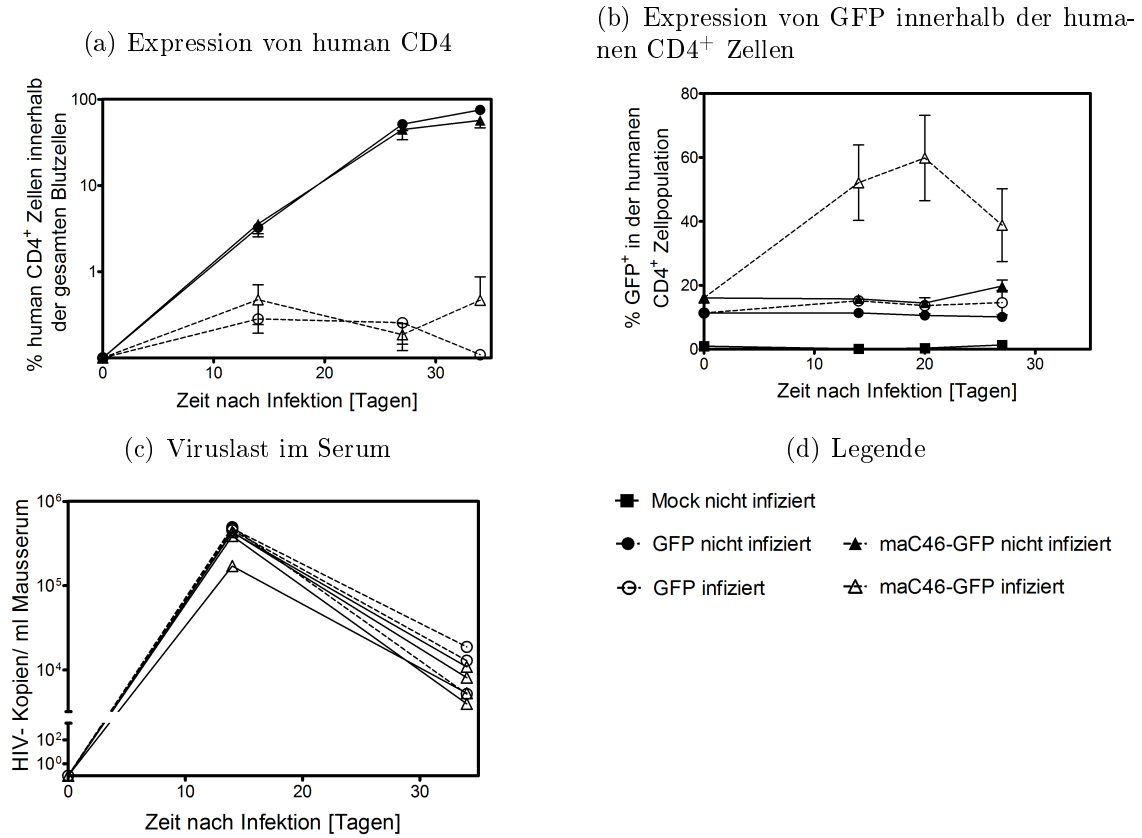


Abbildung 4.15.: Überlebensvorteil von maC46-GFP exprimierenden humanen T-Zellen in humanisierten Mäusen. Humane CD8 depletierte PBMC wurden entweder mit LV-GFP (●) oder mit LV-maC46-GFP (▲) transduziert. An Tag 5 wurden die Kulturen mit dem HIV Stamm D117/II infiziert und über Nacht inkubiert. An Tag 6 wurden die Zellen gewaschen und intraperitoneal in adulte NOG- Mäuse transplantiert. Wöchentlich, startend zwei Wochen nach der Transplantation, wurde den Mäusen Blut entnommen. Das Serum wurde in einer RT-PCR hinsichtlich der Anzahl an HIV- RNA Genomen untersucht. Die Blutzellen wurden auf human CD4 und human CD45 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die jeweiligen Gruppen bestanden aus 4 (infizierte Tiere) bzw. 5 Mäusen (nicht infizierte Tiere). Expression von human CD4 innerhalb der gesamten Blutzellen (A); Expression von GFP innerhalb der human CD4⁺ Zellen (B); Anzahl an HIV- RNA Kopien im Serum der Mäuse (C).

4.3.1.2. Infektion mit HIV_{D117/II} nach Transplantation

Im nächsten Experiment wurden alle Mäuse mit nicht infizierten humanen CD4⁺ T-Zellen transplantiert. Die Zellen waren zuvor mit LV-maC46-GFP oder LV-GFP transduziert (Transduktionseffizienz 61 bzw. 25 %) und mit nicht-transduzierten humanen CD4⁺ T-Zellen auf ungefähr 12 % GFP⁺ Zellen eingestellt worden. Das Transplantat enthielt etwa 80 % CD4⁺ Zellen. Zwei Wochen nach der Transplantation der humanen Zellen wurde die Hälfte der Tiere durch intraperitoneale Injektion mit HIV_{D117/II} infiziert. Die Tiere wurden für 34 bzw. 35 Tage nach der Infektion beobachtet und wöchentlich hinsichtlich der Repopulierung mit humanen CD4⁺ T-Zellen und der Transgenexpression untersucht (Abb. 4.16). Für dieses Experiment wurden 4 Tiere für die infizierte maC46-GFP Gruppe und jeweils 5 für die drei anderen Gruppen vorbereitet. Für die infizierte maC46-GFP Gruppe starben zwei Tiere zwischen der zweiten und dritten Blutentnahme und ein weiteres Tier zwischen der dritten Blutentnahme und der Endanalyse, so dass nicht für die komplette Gruppe Daten für die dritte Blutentnahme und die Endanalyse gewonnen werden konnten.

Vor der Infektion mit HIV_{D117/II} zeigten alle Tiere eine vergleichbare Repopulierung mit humanen CD4⁺ T-Zellen (zwischen 5,8 und 26,5 % der gesamten Zellen im Blut). Auch die Transgenexpression innerhalb der humanen CD4⁺ T-Zellen war zwischen den infizierten und den nicht infizierten Gruppen jeweils vergleichbar. Nach der Infektion nahmen in den nicht infizierten Tieren die humanen CD4⁺ T-Zellen kontinuierlich zu, wie es auch schon im vorangegangenen Experiment (Abb. 4.15(a)) beobachtet werden konnte. In den infizierten Tieren dagegen kam es zu einer Depletion der humanen CD4⁺ T-Zellen, wobei wiederum keine Unterschiede zwischen LV-GFP und LV-maC46-GFP beobachtet werden konnten (Abb. 4.16(a)).

Parallel kam es in den infizierten LV-maC46-GFP Mäusen auch wieder zu einer Zunahme der transgenexprimierenden Zellen innerhalb der CD4⁺ Zellen (Abb. 4.16(b)). Alle drei anderen Gruppen zeigten dagegen eine gleichbleibende oder leicht abnehmende Transgenexpression.

4.3.1.3. Infektion mit HIV_{NL43} nach Transplantation

Für alle bisher beschriebenen Experimente wurde der HIV-Stamm D117/II verwendet. HIV_{D117/II} ist ein primäres, dualtropes Isolat, das sehr pathogen ist und besonders gut auf primären Zellen repliziert. In einem nächsten Experiment sollte nun untersucht werden, ob die Anreicherung von maC46 exprimierenden CD4⁺ T-Zellen, die mit HIV_{D117/II}

4. Ergebnisse

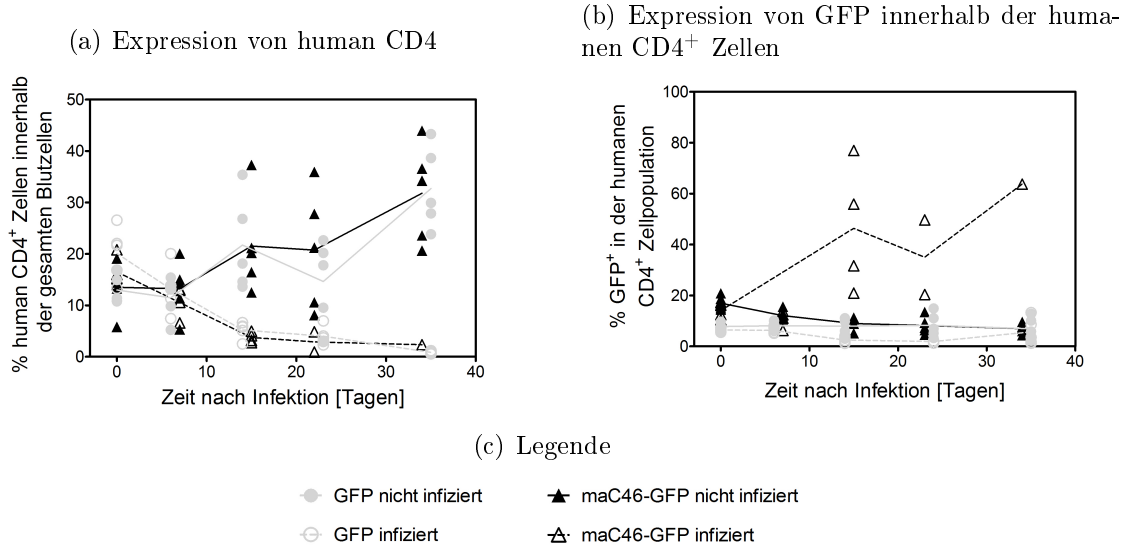


Abbildung 4.16.: Überlebensvorteil von maC46-GFP exprimierenden humanen T-Zellen in humanisierten Mäusen. Humane CD8 depletierte PBMC wurden entweder mit LV-GFP (●) oder mit LV-maC46-GFP (▲) transduziert. An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen so mit nicht-transduzierten Zellen verdünnt, so dass Mischungen mit 10 % GFP⁺ Zellen erzielt wurden. Diese Mischungen wurden intraperitoneal in adulte NOG-Mäuse transplantiert. Zwei Wochen danach wurde eine Hälfte der Mäuse mit HIV_{D117/II} infiziert, während die andere als Kontrolle nicht infiziert blieb. Nach der Infektion wurde den Mäusen wöchentlich Blut entnommen, die Blutzellen wurden auf human CD4 und human CD45 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die jeweiligen Gruppen bestanden aus 5 Mäusen. Expression von human CD4 innerhalb der gesamten Blutzellen (A); Expression von GFP innerhalb der human CD4⁺ Zellen (B).

im T-Zellmausmodell gezeigt werden konnte, auch mit einem anderen HIV-Stamm bestätigt werden konnte. Dafür wurde hier der Stamm NL43 ausgewählt. HIV_{NL43} ist ein zellkulturadaptierter CXCR4-troper Stamm.

Der Überschuss an LV-maC46-GFP und Mock-transduzierten Zellen aus dem in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen Experiment wurde aufgetaut, die LV-maC46-GFP-transduzierten Zellen wurden mit Mock-transduzierten Zellen auf 10 % GFP⁺ Zellen eingestellt und in 12 erwachsene NOG-Mäuse transplantiert. Zwei Wochen nach der Transplantation der humanen T-Zellen wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion mit verschiedenen Dosen an HIV_{NL43} infiziert. Dabei wurden für jede der fünf Virusmengen zwei Tiere bereitgestellt, während zwei weitere Tiere als Negativkontrolle nicht infiziert blieben. Die Tiere wurden für einen Zeitraum von 41 Tagen nach Infektion hinsichtlich der Menge an humanen CD4⁺ T-Zellen und der maC46-GFP-Expression in diesen im Blut beobachtet (Abb. 4.17).

4. Ergebnisse

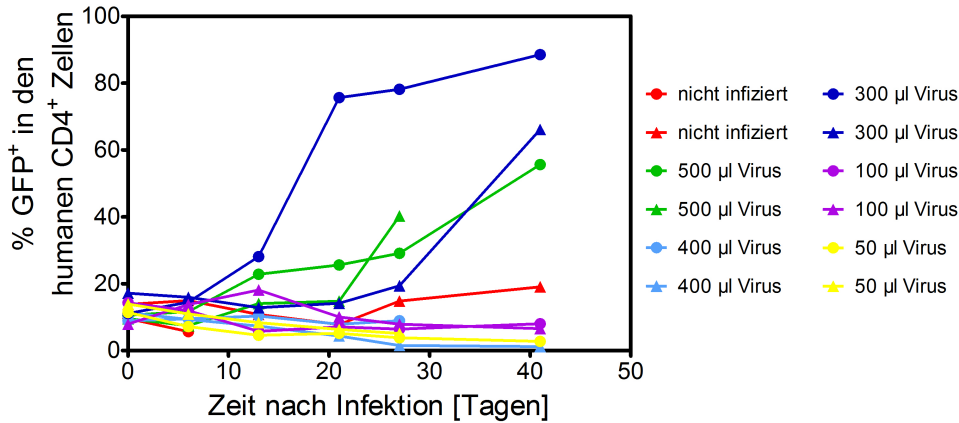


Abbildung 4.17.: Überlebensvorteil von maC46-GFP exprimierenden humanen T-Zellen in humanisierten Mäusen. Humane CD8 depletierte PBMC wurden mit LV-maC46-GFP transduziert. An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen so mit nicht-transduzierten Zellen verdünnt, dass Mischungen mit 10 % GFP⁺ Zellen erzielt wurden. Diese Mischungen wurden intraperitoneal in adulte NOG-Mäuse transplantiert. Zwei Wochen danach wurde jeweils zwei Mäuse pro Gruppe mit verschiedenen Dosen an HIV_{NL43} infiziert. Zwei Tiere blieben als Kontrolle nicht infiziert. Nach der Infektion wurde den Mäusen wöchentlich Blut entnommen und die Blutzellen wurden auf human CD4 und human CD45 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Grafik zeigt die Expression von maC46-GFP innerhalb der human CD4⁺ Zellen im Verlauf der Zeit.

Eines der beiden nicht infizierten Tiere starb kurz nach der Infektion, so dass es nur bis Tag 6 nach der Infektion nachverfolgt werden konnte. In der anderen nicht infizierten Maus blieb der Anteil an maC46-GFP⁺ CD4⁺ T-Zellen über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstant (rot in Abb. 4.17). Auch alle Tiere, die mit niedrigen Virusdosen infiziert wurden (50 µl und 100 µl), verhielten sich ähnlich (gelb und lila in Abb. 4.17). Für alle Tiere aus der 500 µl und der 300 µl Gruppe dagegen kam es zu einer klaren Anreicherung der maC46-GFP exprimierenden Zellen innerhalb der humanen CD4⁺ T-Zellen (grün und dunkelblau in Abb. 4.17), wobei auch hier ein Tier aus der 500 µl Gruppe vor Versuchsende getötet werden musste und daher nur bis Tag 27 nach Infektion untersucht werden konnte.

Eine zu niedrige Virusdosis reichte also nicht für eine produktive Infektion der Tiere und damit nicht für eine Selektion der transgen positiven Zellen aus, während mehr Virus zu einer produktiven Infektion führte. Unerwartet dagegen war das Fehlen einer Anreicherung der maC46-GFP exprimierenden Zellen in der 400 µl Gruppe (hellblau in Abb. 4.17). Nachdem schon 300 µl ausreichend für eine produktive Infektion der Tiere und eine Selektion der transgen positiven Zellen waren, wäre dies auch für die

nächsthöhere Virusmenge zu erwarten gewesen. Allerdings waren in diesem Experiment die Gruppengrößen mit nur zwei Tieren pro Gruppe sehr klein. Das Fehlen der Selektion in der 400 μ l Gruppe könnte daher durch eine in diesem Bereich limitierende Virusmenge erklärt werden. Es könnten zusätzlich auch noch andere Faktoren wie eine nicht ganz perfekte Injektion des Virus (z.B. mehr subcutan als interperitoneal) eine Rolle spielen.

4.3.2. Test der Expression von iSAVE im T- Zellmausmodell

Membrangebundenes C46 Peptid schützt Zellen sehr effizient vor einer Infektion mit HIV [30]. Dies konnte auch in den vorangegangenen Kapiteln sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in einem humanisierten Mausmodell gezeigt werden. maC46 hat allerdings den Nachteil, dass nur die modifizierten Zellen selber vor einer HIV Infektion geschützt sind, während benachbarte nicht modifizierte Zellen weiterhin infiziert werden können. Daher wurde in der Arbeitsgruppe von Laer ein gammaretroviraler Vektor (RV-iSAVE), der eine sezernierte Variante des C46 Peptids (iSAVE) codiert, entwickelt [31]. Die antivirale Wirksamkeit dieses Peptids wurde *in vitro* sowohl in T- Zelllinien als auch in primären humanen T- Zellen für verschiedene HIV Isolate gezeigt [31]. Hier sollte nun in den folgenden Experimenten untersucht werden, ob im humanisierten T- Zellmausmodell therapeutisch wirksame iSAVE Konzentrationen im Serum der Mäuse erzeugt werden können. Dabei wurde sowohl ein gammaretrovirale (RV-iSAVE) als auch ein lentivirale Vektor (LV-iSAVE) verwendet.

4.3.2.1. Expression von iSAVE durch einen gammaretroviralen Vektor

Zunächst wurden humane primäre CD4⁺ T- Zellen mit RV-iSAVE transduziert. An Tag 7 nach der Transduktion wurden die Zellen hinsichtlich ihrer iSAVE Expression durchflusszytometrisch untersucht. Etwa 30 % der Zellen exprimierten iSAVE. Diese Zellen oder Mock transduzierte Zellen wurden in erwachsene NOG- Mäuse transplantiert. 7 Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere getötet. Im Lysat der Milzzellen der RV-iSAVE Maus konnte im Western Blot spezifische das C46 Dimer detektiert werden (Abb. 4.18).

Zellen aus Blut und Milz der RV-iSAVE Maus und aus der Milz der Mockmaus wurden *in vitro* mit α CD3-/ α CD28- beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 restimuliert. Nach 5 Tagen wurden sowohl der Überstand der Zellen als auch diese selbst im Western Blot auf C46 Peptide hin untersucht. Wie schon direkt nach der Isolation der Zellen konnte auch nach einer *in vitro* Stimulierung in den Milzzellen der RV-iSAVE

4. Ergebnisse

Maus das C46 Dimer detektiert werden. Im Überstand der Zellen konnte nach der *in vitro* Stimulierung allerdings kein sekretiertes iSAVE Peptid nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine für diese Nachweismethode zu geringe Sekretion des Peptids hindeuten.



Abbildung 4.18.: Expression von iSAVE in humanen T- Zellen *in vivo* und *in vitro* nach Reisolation der Zellen. Humane CD8 depletierte PBMC wurden mit RV-iSAVE transduziert oder blieben nicht transduziert. An Tag 7 nach der Transduktion wurden die Zellen intraperitoneal in jeweils eine adulte NOG- Mäuse transplantiert. 7 Wochen nach der Transplantation wurden die beiden Tiere getötet und Milzzellen beider Tiere wurden für einen Western Blot lysiert. Gleichzeitig wurden Zellen aus Blut und Milz *in vitro* mit α CD3- / α CD28-beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 in Kultur genommen. Nach 5 Tagen wurden Zellkulturüberstände dieser *in vitro* Kulturen gesammelt und wiederum Lysate hergestellt. Lysate und Überstände wurden deglykosyliert und im Western Blot mittels 2F5 Antikörper auf das Vorhandensein von C46 Peptiden hin untersucht.

Die Detektion von iSAVE Peptid im Serum der Mäuse mittels Western Blot war nicht möglich. Zum einen ist der Western Blot für das iSAVE Peptid nicht sensitiv genug, um geringe Peptidkonzentrationen im Serum der Tiere nachzuweisen, zum anderen ist es generell schwierig Serum der humanisierten Mäuse im Western Blot zu untersuchen. Mausserum machte im Western Blot einen sehr starken Hintergrund, so dass es unter diesen Bedingungen nur möglich sein sollte das iSAVE Peptid zu detektieren, wenn sehr große Mengen an Peptid vorhanden sind.

Um die Menge an iSAVE Peptid im Serum der Tiere zu quantifizieren, wurde daher ein FACS basierter Nachweis etabliert. Sowohl iSAVE Peptide als auch maC46 enthalten ein Epitop für den 2F5 Antikörper. Das zu untersuchende Mausserum wurde zunächst mit einer definierten Menge an 2F5 vorinkubiert. Dabei band das in der Probe enthaltene iSAVE Peptid an den 2F5 und die Menge an freiem 2F5 wurde um so stärker reduziert, je mehr iSAVE Peptid in der Probe enthalten war. Mit der 2F5/ iSAVE Mischung wurde dann eine maC46 exprimierende Zelllinie gefärbt. Im letzten Schritt wurde der an die Zellen gebundene 2F5 Antikörper mit einem fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper detektiert und die Zellen wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dabei wurden die

4. Ergebnisse

Zellen um so stärker gefärbt, je niedriger die iSAVE Konzentration in der Probe war. Abbildung 4.19 zeigt schematisch das Prinzip dieser Kompetitionsfärbung.

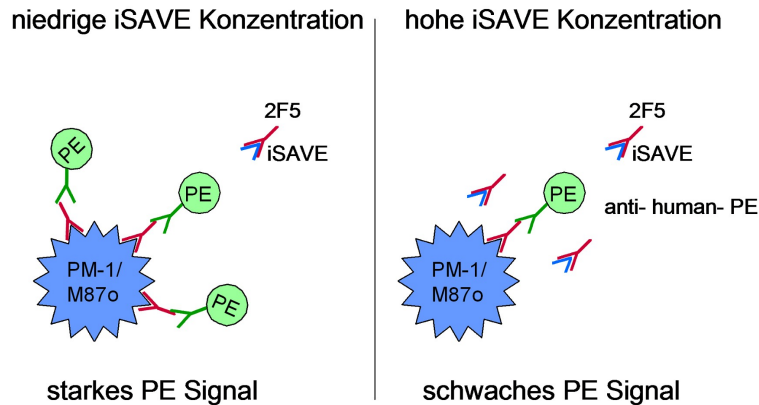


Abbildung 4.19.: FACS basierter Nachweis zur Quantifizierung von iSAVE Peptiden im Mausserum. iSAVE enthaltendes Mausserum wurde mit 2F5 Antikörper vorinkubiert. Mit dieser Mischung wurde eine maC46 exprimierende Zelllinie gefärbt. Dabei war die Menge an freiem 2F5 in der Probe und damit auch das Färbesignal der Indikatorzellen um so höher, je niedriger die iSAVE Konzentration in der Probe war.

Dieser FACS Nachweis für iSAVE Peptid wurde mit Serum der RV-iSAVE Maus durchgeführt. Das Serum der RV-iSAVE Maus führte zu einer eindeutigen Reduktion der Färbung der Indikatorzellen im Vergleich zum Serum einer Mockmaus (Abb. 4.20). Im Serum der mit RV-iSAVE transduzierten T- Zellen transplantierten Maus wurde also *in vivo* das Peptid sekretiert. Als Positivkontrolle wurde in diesem Versuch in das Serum einer Mock transplantierten Maus T20, ein C36 Peptid, gemischt. Dies führte zu einer vollständigen Unterdrückung der Färbung der Indikatorzelllinie.

4. Ergebnisse

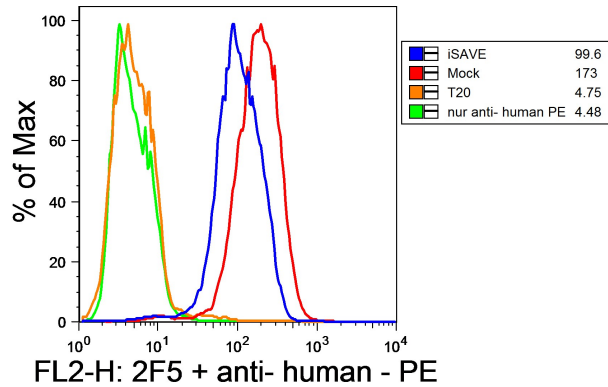


Abbildung 4.20.: Expression von iSAVE im Serum einer mit RV-iSAVE transduzierten T- Zellen transplantierten Maus. Erwachsene NOG- Mäuse wurden mit RV-iSAVE oder Mock transduzierten humanen T- Zellen transplantiert. 7 Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere getötet. Das Serum der Tiere wurde in einem FACS basiertem Nachweis für iSAVE Peptide untersucht. Als Positivkontrolle wurde T20 in das Serum der Mock Maus gemischt.

4.3.2.2. Expression von iSAVE durch einen lentiviralen Vektor

Für das nächste Experiment wurde ein lentiviraler Vektor, der iSAVE codiert, verwendet (LV-iSAVE). Der lentivirale Vektor hat den Vorteil, dass nicht nur sich teilende Zellen, wie das für gammaretrovirale Vektoren der Fall ist, sondern auch ruhende Zellen transduziert werden können.

Humane CD4⁺ T- Zellen wurden mit LV-iSAVE transduziert. An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen intrazellulär mit einem PE- gekoppeltem 2F5 Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Zellen exprimierten zu 78,5 % das iSAVE Peptid (Abb. 4.21(b)). Die transduzierten Zellen wurden 1:1 mit Mock transduzierten Zellen gemischt und in erwachsene NOG- Mäuse transplantiert.

Einer mit LV-iSAVE transduzierten T- Zellen transplantierten Maus wurde zwei, drei und vier Wochen nach der Transplantation Blut entnommen. Das Serum wurde präpariert und in dem oben beschriebenen FACS basiertem Nachweis auf die iSAVE Konzentration hin untersucht. Für alle drei Zeitpunkte konnte eine deutliche Reduktion der Färbung in Vergleich zu Serum einer nicht transplantierten Maus beobachtet werden (Abb. 4.22).

Durch Vergleich der mittleren Fluoreszenzintensität der Indikatorzellen nach Färbung mit den Testseren bzw. bekannten Konzentrationen eines synthetisch hergestellten C46 Peptids, konnte die iSAVE Konzentration im Serum der transplantierten Mäuse abgeschätzt werden. Die iSAVE Konzentration im Mausserum lag bei etwa 80 bis 120 nM.

4. Ergebnisse

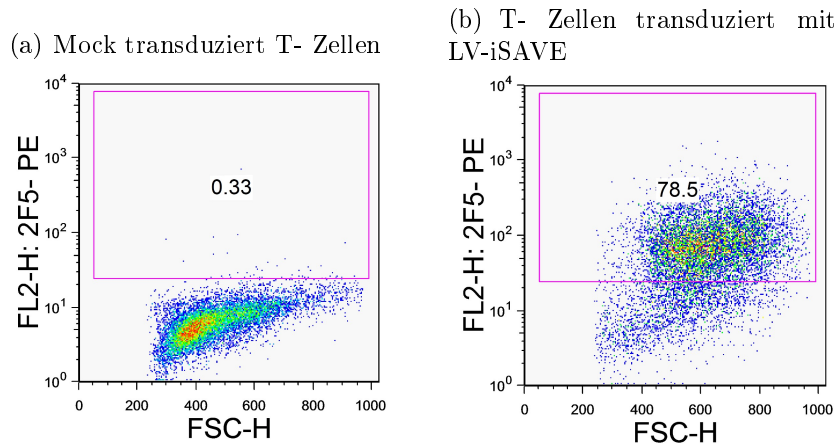


Abbildung 4.21.: LV-iSAVE transduzierte humane T- Zellen. Humane PBMC wurden aus Buffy Coats isoliert und $CD8^+$ Zellen wurden mit Miltenyi Beads depletiert. Die Zellen wurden danach mit $\alpha CD3$ -/ $\alpha CD28$ - beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 in Kultur genommen und mit LV-iSAVE transduziert. An Tag 5 wurden die T- Zellen hinsichtlich ihrer iSAVE Expression durchflusszytometrisch untersucht. Transduktionseffizienz für Mock transduzierte T- Zellen (A) bzw. LV-iSAVE transduzierte (B).

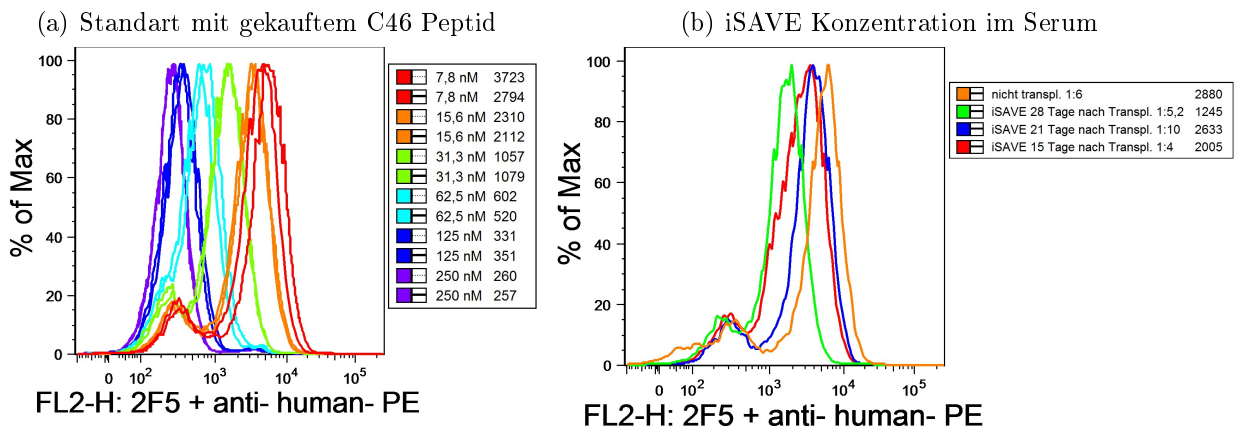


Abbildung 4.22.: Expression von iSAVE im Serum einer mit LV-iSAVE transduzierten T- Zellen transplantierten Maus. Erwachsene NOG- Mäuse wurden mit LV-iSAVE transduzierten humanen T- Zellen transplantiert. Regelmäßig nach der Transplantation wurde den Tieren Blut entnommen. Das Serum der Tiere wurde in einem FACS basiertem Nachweis für iSAVE Peptide untersucht (B). Dabei wurden als Standard bekannte Konzentrationen eines synthetisch hergestellten iSAVE Peptides eingesetzt, um die Peptidkonzentrationen *in vivo* abschätzen zu können (A). Die Graphen geben jeweils zusätzlich die mittlere Fluoreszenzintensität der Population an.

5. Diskussion

Mit dem gammaretroviralen Vektor (M87o), der das membrangebundene inhibitorische Peptid maC46 codiert, wurden 2004 in einer klinischen Studie der Phase I/II CD4⁺ T-Zellen von 10 HIV-positiven Patienten transduziert [142]. Die genmodifizierten Zellen wurden anschließend den Patienten reinfundiert. *In vitro* haben maC46 exprimierende Zellen nach Infektion einer gemischten Kultur mit HIV einen klaren Selektionsvorteil gegenüber nicht-modifizierten Zellen [30]. Ziel dieser klinischen Studie war es, dass sich durch diesen Effekt die genmodifizierten T-Zellen im Patienten anreichern. Dadurch sollte sich eine HIV-resistente CD4⁺ T-Zellpopulation ausbilden, die die Funktionalität des Immunsystems aufrecht erhalten kann. Allerdings exprimierte in den Patienten nach der Therapie nur ein kleiner Teil der Zellen das therapeutische Gen und es kam zu keiner Anreicherung der genmodifizierten Zellen. Dadurch konnte auch kein therapeutischer Nutzen beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein lentiviraler Vektor (LV-maC46-GFP), der für maC46 codiert, verwendet. Dieser Vektor wurde sowohl *in vitro* in einer T-Zelllinie und in primären humanen CD4⁺ T-Zellen als auch *in vivo* in zwei humanisierten Mausmodellen hinsichtlich seiner antiviralen Wirksamkeit untersucht. Desweiteren wurden ein gammaretroviraler und ein lentiviraler Vektor, die für eine sezernierte Variante des C46 Peptids (iSAVE) codieren, in einem humanisierten Mausmodell hinsichtlich der iSAVE Serumkonzentrationen untersucht. iSAVE stellt eine Weiterentwicklung des maC46 Peptids dar, da nicht nur die genmodifizierten Zellen selbst, sondern auch Nachbarzellen, die kein Peptid exprimieren, vor einer Infektion mit HIV geschützt sind [31].

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- MaC46 hemmte den Eintritt von HIV in T-Zellen.
- Sowohl eine LV-maC46-GFP transduzierte T-Zelllinie als auch primäre humane CD4⁺ T-Helferzellen hatten dadurch *in vitro* nach Infektion mit HIV einen klaren Selektionsvorteil gegenüber nicht-modifizierten Zellen.

- HI- Viren und HIV pseudotypisierte lentivirale Partikel wurden auf der Oberfläche von maC46 exprimierenden Zellen gebunden, konnten dabei aber nicht in die Zelle eindringen.
- HIS- Mäuse entwickelten nach Transplantation mit humanen Blutstammzellen CD4⁺ T- Zellen, die maC46 exprimierten, und konnten produktiv mit HIV infiziert werden. Eine Selektion der genmodifizierten Zellen *in vivo* konnte in diesem Modell aber nicht nachgewiesen werden.
- Nach Repopulieren von NOG- Mäusen mit genmodifizierten humanen T- Zellen und Infektion der Zellen bzw. der Mäuse mit HIV kam es zu einem selektiven Überleben der maC46- exprimierenden CD4⁺ T- Zellen *in vivo*.
- NOG- Mäuse konnten mit humanen T- Zellen, die iSAVE exprimierten, repopuliert werden. Im Serum der Tiere wurden therapeutisch wirksame iSAVE Konzentrationen nachgewiesen.

5.1. LV-maC46-GFP *in vitro*

5.1.1. Selektion von maC46- exprimierenden Zellen *in vitro*

Ein wichtiges Kriterium für die Wahl eines antiviralen Gens für einen Gentherapieansatz der HIV- Infektion ist neben der Tatsache, dass sich keine Resistenzmutationen gegen das Transgen entwickeln sollten, dass das therapeutische Genprodukt einen starken antiviralen Effekt vermittelt. C- Peptiden werden bereits in Form einer passiven Immunotherapie für die HIV- Therapie klinisch eingesetzt. Dazu wird das C36- Peptid T20 (Enfuvirtide, Fuzeon[®]) verwendet [70] [82] [19]. Bei einer Therapie mit T20 kommt es allerdings sehr schnell zur Bildung resistenter Virusvarianten [122]. Dies wird durch eine N- terminale Verlängerung des C36- Peptids um 10 Aminosäuren deutlich erschwert (C46) [55].

Somit stellt sich für den in dieser Arbeit verwendeten lentiviralen Vektor LV-maC46-GFP vorrangig die Frage nach der antiviralen Wirksamkeit. Membrangebundene C46- Peptide vermitteln einen sehr starken antiviralen Effekt und inhibieren, abhängig von der Expression der Peptide auf der Zelloberfläche, den viralen Lebenszyklus bis zu 1000 fach [56]. Ein starker antiviraler Effekt eines zellgebundenen antiviralen Faktors wird in der Praxis aber vermutlich alleine nicht ausreichen, um den klinischen Erfolg einer Gentherapie gegen die HIV- Infektion zu gewährleisten. Die Anzahl der möglichen Zielzellen für HIV im menschlichen Körper liegt bei etwa 10^{11} . In der Praxis kann nur ein sehr

kleiner Anteil dieser Zellpopulation *ex vivo* modifiziert werden. Daher sollte die intrazelluläre Immunisierung der Zelle idealerweise einen Selektionsvorteil gegenüber nicht-modifizierten Zellen verschaffen. Dadurch könnte ein anfangs geringer Anteil an genetisch modifizierten Zellen mit der Zeit ansteigen und einen dauerhaften therapeutischen Effekt vermitteln [86].

Antivirale Gene können je nachdem an welchem Schritt des viralen Lebenszyklus sie eingreifen in drei Klassen unterteilt werden [147]. Dabei verhindern nur Wirkstoffe der Klasse I die Integration der viralen Erbinformation in das Wirtszellgenom und somit die Entstehung latent infizierter Zellen. maC46 gehört der Klasse I an.

In einer Studie wurde maC46 mit zwei anderen Gentherapieansätzen, einer shRNA gegen Tat und Rev und einer RNA Antisense- Sequenz gegen das virale Hüllprotein (beides Gene der Klasse II), verglichen. All diese Ansätze sind oder waren in klinischen Testungen. Dabei konnte, obwohl alle drei Ansätze die Virusreplikation inhibierten, nur maC46 in T-Zelllinien zu einer Selektion genmodifizierter Zellen führen [74]. Auch in der vorliegenden Arbeit hatten maC46 exprimierende PM-1 Zellen nach Infektion mit HIV einen klaren Selektionsvorteil gegenüber nicht- modifizierten Zellen. Die Expression von maC46 auf primären T- Zellen ist generell niedriger als auf Zelllinien [30]. Daher war es, insbesondere in Hinblick auf eine klinische Anwendung, interessant zu sehen, dass auch primäre CD4⁺ T- Zellen nach Transduktion mit LV-maC46-GFP einen Überlebensvorteil gegenüber nicht- modifizierten Zellen hatten. Dieser starke Selektionsvorteil LV-maC46-GFP transduzierter Zellen war analog zu früheren Experimenten mit dem gammaretroviralen Vektor M87o [30].

5.1.2. HIV wird auf der Oberfläche von maC46- exprimierenden Zellen gefangen, kann aber nicht in diese eindringen

Trotz des starken antiviralen Effekts von maC46 und der daraus resultierenden Selektion von maC46- exprimierenden Zellen nach Infektion mit HIV, konnten auch maC46⁺ Zellen während dieser Selektion positiv für das virale Protein p24 gefärbt werden. Im Verlauf der Selektion werden alle nicht- modifizierten Zellen mit HIV infiziert und setzten große Mengen an Virus frei. Allerdings konnte klar gezeigt werden, dass maC46 exprimierende Zellen dabei nicht infiziert werden. Das Virus wird lediglich auf der Zelloberfläche der Zellen gebunden. Dabei wurde das Virus nicht gleichmäßig über die gesamte Zelloberfläche der maC46⁺ Zellen verteilt beobachtet, sondern die Viren sammelten sich auf einer Seite bzw. in Clustern auf der Zelloberfläche an („Capping“).

Diese Konzentration des Virus auf eine Seite der Zelle hängt vermutlich mit einer Polarisation der Verteilung der für den HIV- Eintritt nötigen Rezeptoren zusammen. Ein ähnliches Phänomen kann bei der Bildung von virologischen Synapsen beobachtet werden. Die virologische Synapse spielt eine wichtige Rolle bei der Zell zu Zell Übertragung des Virus [66]. Die Übertragung des Virus von Zelle zu Zelle ist effizienter als die Infektion durch zellfreie Viruspartikel [117] [126]. Außerdem kann das Virus dadurch vermutlich einer Inaktivierung durch neutralisierende Antikörper und das Komplementsystem entgehen [66]. In den hier beschriebenen Experimenten konnte allerdings keine verstärkte Übertragung von viralen Partikeln von maC46- exprimierenden, mit Virus beladenen Zellen auf nicht- modifizierte Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

5.2. Humanisierte Mausmodelle

Ein *in vitro* Zellkultursystem unterscheidet sich durch viele Faktoren von der Situation im HIV- infizierten Patienten und kann nur eine sehr stark vereinfachte Situation abbilden. Daher könnte die Untersuchung der antiviralen Effizienz von maC46 in einem Tiermodell als Bindeglied zwischen der Zellkultur und dem Patienten wichtige Hinweise dafür geben, warum es in einem Fall zur Selektion der maC46- exprimierenden Zellen kommt, dies aber *in vivo* in einer klinischen Studie mit M870 nicht der Fall war [142].

5.2.1. Testung von LV-maC46-GFP im HIS (humanes Immunsystem)- Mausmodell

Immundefiziente Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse konnten nach Transplantation mit LV-maC46-GFP transduzierten humanen hämatopoetischen Blutstammzellen mit einem humanen Immunsystem repopuliert werden. Für die Testung einer Gentherapie für die HIV- Infektion war es insbesondere entscheidend, dass die Tiere reife humane CD4⁺ T- Helferzellen entwickelten. Diese T- Zellen wurden über den Thymus der Tiere *de novo* aus den transplantierten Stammzellen gebildet. Dabei konnte insofern eine normale T- Zellentwicklung beobachtet werden, als dass die Zellen im Thymus reiften und dabei zunächst unreife, CD4/CD8- doppelpositive Zellen gefunden wurden. Erst zu späteren Zeitpunkten wurden sowohl in Thymus als auch in andern lymphatischen Organen (Blut, Milz, Lymphknoten) reife einfachpositive T- Zellen gefunden. Unter diesen Zellen waren sowohl CD4⁺ T- Helferzellen als auch CD8⁺ cytotoxische T- Zellen. Diese Beobachtungen stimmen mit der bekannten Entwicklung von T- Zellen im Menschen überein.

5. Diskussion

Auch andere Gruppen haben unter ähnlichen Bedingungen die Entwicklung reifer T-Zellen in humanisierten Mäusen beobachtet [139] [45]. Dabei waren die im murinen Thymus gereiften humanen T-Zellen funktionell oder konnten zumindest einen Teil ihrer Immunfunktionen erfüllen. So führt z.B. die Infektion repopulierter HIS-Mäuse mit moderaten Dosen an Epstein-Barr-Virus (EBV) zu einer T-Zell-Immunantwort, die das Virus kontrollieren kann [139]. Nach der Transplantation von adulten NOG-Mäusen mit humanen Blutstammzellen aus Nabelschnurblut entwickeln sich die humanen T-Zellen in einem ähnlichen Verlauf wie in dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Transplantationsmodell neugeborener Rag-2/ γ -Kette Doppelknockout-Mäuse [156]. In der Studie von Yahata und Kollegen wurden in den Mäusen polyklonale T-Zellen nachgewiesen, die nach Isolation *in vitro* als Reaktion auf PHA, IL-2 oder Alloantigene proliferierten.

Ein Problem in der Transplantation von immundefizienten Mäusen mit humanen Stammzellen ist die große Variabilität in der Repopulierung der Tiere mit humanen Immunzellen, insbesondere mit reifen T-Zellen. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dieses Phänomen beobachtet werden. Dies tritt nicht nur auf, wenn verschiedene Transplantate und Würfe von Mäusen, die eventuell geringfügig unterschiedlich behandelt wurden (Alter der Tiere, Abstand zwischen Bestrahlung und Transplantation, transplantierte Zellzahl und Qualität des Transplantats) verglichen werden, sondern auch innerhalb eines Wurfes, wobei alle Tiere das gleiche Transplantat erhielten (vgl. z.B. Maus AE-m1 mit den übrigen 3 Tieren aus Wurf AE in Abb. 4.9). Auch der Anteil der Transgen-exprimierenden Zellen innerhalb der humanen CD4⁺ Zellen war mit 2- 97 % für die in Abbildung 4.9 gezeigten Tiere sehr variabel. Die Transduktionseffizienz aller drei in diesem Experiment verwendeten Transplantate war mit 50- 60 % in einem ähnlichem Rahmen gewesen. Das spricht für eine oligoklonale Repopulierung der Tiere mit humanen Zellen. Die transplantierte Zellzahl und der Anteil „echter“ Stammzellen waren in diesen Experimenten vermutlich limitierend.

Ein Faktor, der sich vorteilhaft auf die Entwicklung humaner, funktioneller T-Zellen auswirkt, ist die Cotransplantation von humanem fetalem Thymus- und Lebergewebestücken unter die Nierenkapsel [95]. Dabei ist die Variabilität in der T-Zellentwicklung gering und die sich entwickelnden T-Zellen sind funktional. Ein Grund dafür könnte sein, dass die humanen T-Zellen auf humanen Stromazellen reifen und nicht wie im klassischen HIS-Mausmodell auf murinen Zellen. Allerdings limitieren die Verfügbarkeit von humanen Föten und damit verbundene ethische Schwierigkeiten diese Experimente in der Praxis.

5. Diskussion

Für die vorliegende Arbeit wurde als eine leicht verfügbare Quelle für humane Blutstammzellen Nabelschnurblut gewählt. In anderen Studien wurde gezeigt, dass hämatopoetische Stammzellen von Neugeborenen oder Föten ein größeres Repopulierungspotential haben als adulte [140] und dass Nabelschnurblut eine bessere Quelle für hämatopoetische Stammzellen ist als Knochenmark oder mobilisierte Zellen aus peripherem Blut [72] [53]. Allerdings ist im Falle von Nabelschnurblut die für Experimente zur Verfügung stehende Zellzahl eines Spenders stark limitierend. Etwa 0,27 % der im Nabelschnurblut enthaltenen mononukleären Zellen sind CD34⁺ [9]. Bei ungefähr 2×10^8 mononukleären Zellen in 35 ml Nabelschnurblut entspricht das $5,4 \times 10^5$ CD34⁺ Zellen in 35 ml Blut [9]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass für die Repopulierung von neugeborenen HIS- Mäusen mit Nabelschnurblut etwa 10^4 bis 10^5 CD34⁺ Zellen nötig sind [139] [62] [148]. In den meisten Studien in diesem Modell wurden native Zellen direkt nach der Aufreinigung transplantiert. Für den in dieser Arbeit verfolgten Gentherapieansatz war es allerdings nötig die Zellen *in vitro* zu kultivieren und transduzieren. Es ist schwierig während der *in vitro* Kultur eine Differenzierung der Stammzellen und somit einen Verlust der Repopulierungsfähigkeit der Zellen vollständig zu verhindern [50]. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit 5- 10 mal mehr CD34⁺ Zellen transplantiert, als dies in vergleichbaren Transplantationsmodellen der Fall war.

Die in der vorliegenden Arbeit repopulierten Mäuse konnten produktiv mit HIV infiziert werden. Im Serum der Tiere wurden große Mengen an HI- Virus ($\approx 10^5$ HIV- Kopien/ ml Serum) nachgewiesen. Dies war in nicht- humanisierten Kontrolltieren, die mit gleicher Virusmenge inokuliert wurden, nicht der Fall. Es kam in den humanisierten Mäusen also zu einer produktiven Replikation des Virus. Parallel mit der Virusreplikation wurden die humanen CD4⁺ Zellen depletiert. Mit der Depletion der humanen T- Helferzellen wurden die Zielzellen für das Virus eliminiert und es kam wieder zu einem Abfall der Viruslast im Serum der Tiere. Dieser Verlauf der Virusreplikation und der CD4⁺ Zellzahlen kann analog auch im Patienten in der akuten Phase nach Neuinfektion mit HIV beobachtet werden. Im Patienten kommt es aber nach wenigen Wochen zu einer Kontrolle des Virus durch das Immunsystem. Dabei steigen die T- Helferzahlen wieder an [112].

In den hier vorgestellten Experimenten kam es während der Depletion der CD4⁺ T- Zellen der HIS- Mäuse zu keiner Anreicherung der maC46- exprimierenden Zellen, wie dies *in vitro* beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu konnten andere in einem ähnlichen Mausmodell einen antiviralen Effekt einer Therapie mit siRNAs gegen CCR5 und die beiden viralen Proteine Vif und Tat verzeichnen [77]. Dabei handelte es sich allerdings nicht um einen Gentherapieansatz, sondern die siRNA wurden vor und nach

der Infektion den Tieren injiziert wurde. Auch bekannte HIV- Medikamente, die sich bereits in klinischer Anwendung befinden, wurden erfolgreich in HIS- Mausmodellen getestet, um den prinzipiellen Nutzen dieser Modelle für präklinische Effizienztestungen neuer HIV- Medikamente zu evaluieren.

Die Effizienz einer Gentherapie der HIV- Infektion im HIS- Mausmodell nachzuweisen ist allerdings deutlich schwieriger. In der vorliegenden Arbeit konnte, auch nach Rückgang der Viruslast im Serum der Tiere, keine Rückkehr der $CD4^+$ T- Zellen beobachtet werden. Die Repopulierung eines lymphopenischen Wirts mit T- Zellen erfolgt vorrangig durch homeostatische Expansion der verbleibenden peripheren T- Lymphozyten [90]. In einem jungen Individuum findet zusätzlich noch eine *de novo* Thymopoese statt. Allerdings nimmt mit zunehmendem Alter des Organismus die Thymusgröße ab und T- Zellen können nicht mehr in dem Maße über den Thymus aus Blutstammzellen neu generiert werden, wie das in einem jungen Organismus der Fall ist [136] [138].

Generell versteht man unter Homeostase den physiologischen Zustand bzw. die Aufrechterhaltung dessen. Im Bezug auf die T- Zellen bedeutet dies, dass sowohl Anzahl als auch Art bzw. Repertoire der T- Zellen konstant gehalten wird [57].

Insgesamt deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die T- Zellhomeostase in den hier beschriebenen HIS- Mäusen gestört ist. Weitere Hinweise dafür liefern im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuche, in denen Zellen aus Thymus bzw. peripheren lymphatischen Organen einer mit humanen T- Zellen repopulierten Maus in neugeborene Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse transferiert wurden. Dabei konnten in keinem der sekundären Empfänger T- Zellen im Blut nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse wurden auch durch andere Studien bestätigt [91]. Legrand und Kollegen haben gezeigt, dass periphere T- Zellen in HIS- Mäusen hohe Fluktuationsraten haben [83].

IL-7 ist ein Cytokin, das für die T- Zellhomeostase eine wichtige Rolle spielt und die Lebensspanne von T- Zellen reguliert [128]. Shultz und Kollegen injizierten in einer Studie erwachsene NOG- Mäuse nach der Transplantation mit humanen Blutstammzellen wöchentlich intravenös mit einem Fc-IL-7 Fusionsprotein [133]. Dabei konnte die T- Zellmenge im peripheren Blut der Tiere im Vergleich zu repopulierten NOG- Mäusen, die kein Fc-IL-7 erhalten hatten, um einen Faktor von etwa 3 gesteigert werden. In der vorliegenden Arbeit hatte eine wöchentliche Injektion dieses Fc-IL-7 Fusionsproteins keinen positiven Einfluss auf die Repopulierung von neugeborenen Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäusen mit humanen T- Zellen. Das könnte an der wegen des Alters

der Tiere nötigen, veränderten Applikationsform (intraperitoneal statt intravenös) liegen. Allerdings war die Variabilität in der Repopulierung der Tiere in diesem Experiment relativ groß und die Repopulierung mit humanen Zellen gering, so dass es schwierig ist, eine klare Aussage zu treffen.

Ein wichtiger Grund für die mangelnde T- Zellhomeostase in HIS- Mäusen ist sicherlich der Mangel an sekundären lymphoiden Strukturen in diesen Tieren. HIS- Mäuse bilden nach Transplantation mit humanen Blutstammzellen vereinzelt Lymphknoten aus. Die Lymphknoten sind dabei nicht in allen Tieren in gleichem Ausmaß zu finden und sind sowohl in Anzahl als auch in Größe geringer als in Wildtypmäusen. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. In der Milz und im Thymus von repopulierten HIS- Mäusen können humane Immunzellen detektiert werden [139]. In histologischen Schnitten dieser Organe können Strukturen beobachtet werden, wie sie auch in den Organen von Wildtyptieren zu finden sind (z.B. Keimzentren in der Milz oder Ausbildung von Cortex und Mark im Thymus), und die für eine funktionelle Interaktion der humanen Immunzellen untereinander und mit murinen Stromazellen sprechen. Diese Strukturen sind im Gegensatz zu Milz und Thymus in weit geringerem Maße für mesenterische Lymphknoten vorhanden bzw. fehlen für periphere Lymphknoten und darmassoziiertes lymphoides Gewebe [83] [89] [132]. Gründe für die mangelhafte Entwicklung von Lymphknoten in diesen Tieren liegen wahrscheinlich im defekten IL-7 Signalweg. Für die Bildung von Lymphknoten spielen Lymphotoxin- exprimierende „Inducer“ Zellen (LTi) eine wichtige Rolle. LTi Zellen sind hämatopoetische Zellen, die IL-7 Rezeptor α und CD4, aber kein CD3 exprimieren ($CD45^+ CD4^+ CD3^-$) [22]. Diese Zellen induzieren auch die Bildung von Peyer- Plaques [33]. Die Funktionalität der LTi Zellen in Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse ist stark beeinträchtigt, wodurch ein Großteil der Lymphknoten nicht ausgebildet werden kann. Eine Lösung für die mangelnde Lymphknotenentwicklung in HIS- Mäusen nach Transplantation mit humanen Blutstammzellen könnte in der Verwendung von Rag-2/IL-2 Rezeptor β - Kette Doppelknockout- Mäuse anstelle der Rag-2/ γ - Kette Doppelknockout- Mäuse liegen [91]. Rag-2/IL-2 Rezeptor β - Kette Doppelknockout- Mäuse haben zwar auch einen Defekt in der Entwicklung von reifen B- und T- und NK- zellen, sollten aber normale Lymphknotenstrukturen anlegen. Eine Alternative könnte darin bestehen synthetische lymphoid- ähnliche Strukturen, bestehend aus humanen Stromazellen, die in Matrix eingebettet sind, parallel mit den humanen Blutstammzellen zu transplantieren [132].

Ein weiterer Faktor, der sowohl die humane Thymopoese als auch die Homeostase der humanen T- Zellen verbessern sollte, ist das Einkreuzen von humanen MHC- Molekülen

der Klasse I (HLA-A/B/C) und Klasse II (HLA-DP/DQ/DR). Die sich entwickelnden humanen T- Zellen würden dabei im Thymus Signale von humanen anstelle von murinen MHC- Molekülen bekommen. Ähnlich wie im BLT Modell, wo humane fetale Gewebestücke als Thymusersatz dienen und wichtige Organe für die T- Zellentwicklung darstellen, könnten human MHC transgene Tiere im HIS- Mausmodell die T- Zellentwicklung fördern.

5.2.2. Testung von LV-maC46-GFP im T- Zellmausmodell

Im T- Zellmausmodell werden im Gegensatz zum HIS- Mausmodell nur humane, reife T- Zellen transplantiert. Daher entfällt hier die im HIS- Mausmodell beobachtete starke Variabilität der Repopulierung mit reifen T- Zellen. Im T- Zellmausmodell konnten reproduzierbar im Blut aller Tiere nach der Transplantation humane T- Zellen nachgewiesen werden. Dabei kam es zu einer stetigen xenoreaktiven Expansion der Zellen *in vivo*, so dass die Tiere eine GvHD ausbildeten und etwa 6 Wochen nach der Transplantation der humanen Zellen getötet werden mussten. Zu diesem Zeitpunkt waren ein Großteil aller Zellen im Blut der Tiere humane T- Zellen.

In den Tieren, die mit HIV infizierten T- Zellen transplantiert wurden bzw. die direkt durch Injektion des Virus mit HIV infiziert wurden, konnte wie auch schon in den HIV-infizierten Tieren im HIS- Mausmodell eine produktive Replikation des Virus beobachtet werden. Es kam auch hier parallel zu einer Depletion der humanen CD4⁺ T- Helferzellen. Dadurch sank der Anteil der CD4⁺ T- Zellen in den infizierten Tieren auf unter 1 % der Gesamtzellen im peripheren Blut, während er für die nicht infizierten Tiere auf bis zu 84 % aller Zellen im peripheren Blut anstieg.

Im T- Zellmausmodell kam es aber zusätzlich im Gegensatz zum HIS- Mausmodell zu einem selektiven Überleben der maC46-GFP exprimierenden CD4⁺ Zellen. Für die mit lediglich GFP exprimierenden Zellen transplantierten Tiere, sowohl für infizierte als auch für nicht infizierte, dagegen blieb der Anteil der transgenpositiven CD4⁺ T- Zellen relativ konstant. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit 2 gammaretroviralen Vektoren, die beide maC46 codierten, beobachtet (Daten nicht gezeigt). Man kann für all diese Experimente allerdings nicht von einer richtigen Anreicherung der maC46 exprimierenden Zellen sprechen, wie dies in Zellkultursystemen beobachtet werden konnte, sondern lediglich von einem selektiven Überleben der Zellen. Dieses selektive Überleben der maC46 exprimierenden Zellen war nur transient, zumindest in einigen Experimenten, so dass mit zunehmender Versuchsdauer auch die maC46 exprimierenden Zellen depletiert wurden.

5. Diskussion

Auch im T- Zellmausmodell scheinen die humanen T- Zellen nicht in der Lage zu sein homeostatisch zu proliferieren. Die nicht modifizierten Zellen werden hier vom HI- Virus infiziert und sterben. Die verbleibenden maC46 exprimierenden Zellen sind allerdings nicht in der Lage zu expandieren und die Maus wieder komplett zu repopulieren. Vermutlich spielt hierbei auch die HIV Infektion eine Rolle, indem das Virus die Expansion der Zellen hemmt und auch nicht- infizierte Zellen z.B. durch Bystander Apoptose sterben. Verbesserungen für das Modell könnten hier ähnlich wie im HIS- Mausmodell das Einbringen von Faktoren (humane MHC- Moleküle, humane Cytokine) sein, die für die T- Zellhomeostase wichtig sind.

Ein Faktor, der hierbei einen Einfluss auf die Repopulierungsfähigkeit der humanen T- Zellen haben könnte, ist die *ex vivo* Stimulierung der Zellen. Eine Stimulierung der Zellen ist auf der einen Seite nötig, um sie effizient transduzieren zu können, aber führt auf der anderen Seite auch zu einer Differenzierung der Zellen. Für die hier beschriebenen Experimente wurden die humanen T- Zellen mit α CD3/ α CD28 beschichteten magnetischen Partikel und IL-2 in einem ähnlichen Protokoll, wie es auch in der klinischen Studie mit maC46 verwendet wurde, stimuliert. Eine solche Stimulierung führt vorrangig zu einer Expansion von Gedächtniszellen.

Eine weitere Limitation dieses Modells ist die sehr begrenzte Beobachtungszeit, da die Tiere etwa 6 Wochen nach der Transplantation der humanen Zellen eine GvHD entwickeln. Verbesserung des Modells könnten hier in dem Knockout von murinen MHC- Molekülen liegen. Dadurch sollte die Xenoreaktivität der humanen T- Zellen vermindert werden [132]. Eine weitere Möglichkeit wäre es humane regulatorische T- Zellen (Tregs) zu cotransplantieren. Eine gemeinsame Transplantation von humanen Tregs und PBMC in SCID- Mäuse kann eine GvHD verhindern [149].

Trotz der oben genannten Limitationen konnten auch in anderen Studien Transplantationsmodelle wie das hier beschriebene T- Zellmausmodell erfolgreich für Effizienztestung antiviraler Komponenten verwendet werden. Kumar und Kollegen haben eine Kombination aus siRNAs gegen CCR5, Tat und Vif getestet [77]. In einer anderen Studie wurden sowohl ein neuer CCR5 Inhibitor (AK602) als auch ddI (Didanosin, Videx[®]), ein bereits in der Klinik eingesetzter Nukleosid- Analoga RT- Hemmer, untersucht [106].

5.2.3. Limitationen der beiden verwendeten Mausmodelle und Vergleich mit der klinischen Studie

Wie bereits in den vorausgegangenen beiden Kapiteln diskutiert, haben beide in dieser Arbeit verwendeten humanisierten Mausmodelle Limitationen. Die Wichtigsten sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Tabelle 5.1.: Limitationen der beiden in dieser Arbeit verwendeten Mausmodelle.

	HIS- Mausmodell	T- Zellmausmodell
humane Zellen in der Maus	komplettes Immunsystem	T- Zellen
GvHD	–	+
Beobachtungsdauer	mindestens 1 Jahr	etwa 6 Wochen
Lymphknoten	+–	–
Variabilität in der Repopulierung	stark	gering
T- Zellhomeostase	–	–

Beide Modelle werden in der HIV- Forschung eingesetzt, zum einen um neue oder bereits in der Klinik eingesetzte Medikamente und Therapien auf ihre antivirale Effizienz hin zu testen und zum anderen um mehr über das Virus selbst zu erfahren. Je nach Fragestellung kann die Wahl des einen oder anderen Modells vorteilhaft sein. Das T-Zellmausmodell ist weniger komplex als das HIS- Mausmodell und liegt näher an einem *in vitro* Zellkultursystem. Es kann allerdings relativ leicht verwendet werden, um schnell mit statistisch signifikanten Gruppengrößen neue antivirale Substanzen in präklinischen Studien zu testen. Mäuse im HIS- Mausmodell zu erzeugen, die eine ausreichende Menge an humanen T- Zellen ausbilden, ist dagegen wesentlich zeitaufwändiger und mit mehr Schwierigkeiten verbunden (Quelle der humanen Blutstammzellen, *de novo* Reifung von T- Zellen über den Thymus, Variabilität in der Repopulierung).

In der vorliegenden Arbeit konnte im HIS- Mausmodell keine Anreicherung der maC46-exprimierenden Zellen beobachtet werden, während es im T- Zellmausmodell zu einem selektiven Überleben dieser Zellen innerhalb der CD4⁺ T- Zellen kam. Auch in der klinischen Studie mit maC46 transduzierten T- Zellen konnte keine Anreicherung der maC46- exprimierenden Zellen beobachtet werden. Ein Teil der Faktoren, die in den beiden hier vorgestellten Mausmodellen die Anreicherung der humanen T- Zellen limitiert hat, trifft sicherlich auch auf die Patienten zu. Alle 10 Patienten der Studie wa-

ren in einem sehr fortgeschrittenem Stadium der Krankheit (lange Infektionsgeschichte, Ausbruch von AIDS, niedrige CD4 Zellzahl, hohe Viruslast). Dementsprechend war die Lymphknotenstruktur der Patienten vermutlich stark geschädigt, was eine Migration der reinfundierten T- Zellen in diese und die homeostatische Proliferation der Zellen erschwert. Auch hier mussten die Zellen *in vitro* mit α CD3/ α CD28 beschichteten magnetischen Partikeln und IL-2 stimuliert werden, um sie effizient mit dem gammaretroviralen Vektor transduzieren zu können.

Eine Gentherapie der HIV- Infektion ist daher vermutlich am effizientesten in Patienten in einem frühen Stadium nach Infektion, wenn zum einen die Lymphknotenstruktur des Patienten noch intakt ist und zum anderen genügend große Zahlen an nicht infizierten CD4⁺ T- Zellen isoliert werden können. Eine Alternative zur T- Zellgentherapie wäre eine Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen. Dies sollte in jungen Menschen, in denen der Thymus noch intakt ist und somit die Neubildung von T- Zellen aus Stammzellen mit Reifung der Zellen im Thymus vollständig möglich ist, besonders effektiv sein. Im Moment werden Patienten für eine weitere klinische Studie mit M87o rekrutiert. Dabei sollen AIDS/Lymphom- Patienten mit M87o transduzierten Stammzellen behandelt werden.

Dass das Konzept der Gentherapie der HIV- Infektion prinzipiell funktionieren kann, hat kürzlich eine Studie von Hütter und Kollegen gezeigt [61]. Dabei wurde ein AIDS/Lymphom- Patient, der eine allogene Stammzelltransplantation benötigte, mit hämatopoetischen Stammzellen einer Spenders mit CCR5 Δ 32 Deletion transplantiert. Der Patient hatte 20 Monate nach der Transplantation trotz Absetzen von HAART kein nachweisbares Virus im Blut oder im Gewebe.

5.3. iSAVE Peptid als Weiterentwicklung des maC46 Peptids

Eine wesentliche Limitation des Gentherapieansatzes mit maC46 ist, dass nur die genmodifizierte Zelle selbst vor einer Infektion mit HIV geschützt ist. Nicht- modifizierte Nachbarzellen werden allerdings weiterhin infiziert. Ein sekretierter Fusionsinhibitor dagegen könnte auch diese Zellen schützen. Das bezeichnet man als „bystander effect“. Außerdem ist die Wahl der Zielzelle einer Gentherapie mit einem sezernierten Fusionsinhibitor nicht auf die Zielzellen von HIV beschränkt. Es können zum Beispiel auch Zelltypen wie B- Zellen, Leberzellen oder Endothelzellen als Produzentenzellen dienen.

In der vorliegenden Arbeit konnten Mäuse mit humanen T- Zellen, die entweder mit RV-iSAVE oder LV-iSAVE transduziert worden waren, repopuliert werden. Im Serum der Tiere wurden iSAVE Konzentrationen im Bereich von 100 nM gemessen. iSAVE hat *in vitro* eine IC_{50} von etwa 25 nM [31]. Die *in vivo* erreichten iSAVE Konzentrationen sind also etwa 4 mal höher als *in vitro* therapeutisch wirksame Konzentrationen. Die *in vivo* beobachteten iSAVE Konzentrationen könnten daher in einem therapeutisch wirksamen Bereich liegen.

Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass iSAVE als Concatamer bestehend aus zwei C46 Peptiden mit einer Furinschnittstelle synthetisiert wird. Dieses Dimer ist nicht antiviral wirksam. Erst nach proteolytischer Spaltung der Furinschnittstelle werden C46 Monomere gebildet, die antiviral wirksam sind. Die kompetitive Färbung, mit der iSAVE im Serum der Tiere nachgewiesen wurde, kann allerdings nicht zwischen Monomer und Dimer unterscheiden. Daher bleibt offen, wie hoch die Serumkonzentrationen an antiviral aktivem iSAVE- Monomer sind.

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Verteilung des Peptids im Organismus. Die T20 Konzentration im Serum eines Patienten sollte während der Behandlung bei $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ liegen [24]. Das entspricht etwa 450 nM. Das ist ungefähr 4,5 mal so hoch wie die in den hier beschriebenen Mausexperimenten gemessene Konzentration an iSAVE im Serum der Tiere. Allerdings kann vermutet werden, dass lokale iSAVE Konzentrationen an den Hauptreplikationsorten von HIV höher sein könnten. Andere Studien in der Arbeitsgruppe von Laer haben gezeigt, dass die Expression gammaretroviraler und lentiviraler Vektoren in T- Zellen stark aktivierungsabhängig ist. Die Expression aktivierter T- Zellen ist deutlich höher als die ruhender Zellen. HIV infiziert vorrangig aktivierte Zellen, so dass sich die Hauptzielzellen für eine Infektion lokal in einem Milieu höherer Peptidkonzentrationen befinden sollten.

5.4. Ausblick

Eine Gentherapie mit C- Peptiden als HIV- Eintrittsinhibitor stellt eine erfolgsversprechende Alternative zur konventionellen HAART- Therapie da. Ein sekretiertes Peptid (iSAVE) hat dabei gegenüber der membrangebundenen Variante (maC46) entscheidende Vorteile (Bystander- Effekt, breites Spektrum an Zielzellen). Allerdings sind vor einer klinischen Anwendung dieses Prinzips noch weitere Optimierungen nötig.

Ein Faktor, der für den Erfolg einer Therapie mit iSAVE entscheidend ist, ist die Menge an antiviral aktivem C46 Peptid, das von den Zellen sekretiert wird. Es gibt momentan

5. Diskussion

in der Arbeitsgruppe von Laer verschiedene Ansätze dies zu verbessern. Eine Möglichkeit ist es ein C46 Peptid über eine Furinschnittstelle an ein gut sekretiertes Trägerprotein zu koppeln. Eine andere ist anstelle des C46 Dimers, welches proteolytisch gespalten werden muss, lediglich ein Monomer zu verwenden. Eine effiziente Sekretion des Peptids könnte dabei durch ein verlängertes Signalpeptid gewährleistet werden. Aber auch die Anwendung von Zielzellen, die sich besonders gut für die Sekretion von Peptiden eignen (B- Zellen, Leberzellen), sollte untersucht werden.

Eine weitere Modifikation des Therapieansatzes, die momentan getestet wird, sind Adeno-assoziierte Vektoren (AAV) anstelle der bislang verwendeten gammaretroviralen und lentiviralen Vektoren. AAVs können, auch wenn sie nicht ins Wirtszellgenom integrieren, sondern lediglich episomal vorliegen, eine langfristige und stabile Transgenexpression vermitteln. Außerdem können AAVs direkt systemisch oder lokal (z.B. Muskel) injiziert werden und das Transgen kann dann durch Leber- bzw. Muskelzellen exprimiert werden. Dabei würde zum einen das Risiko von Genotoxizität vermindert und zum anderen eine einfache, kostengünstige Anwendungsmöglichkeit gewährleistet werden.

Literaturverzeichnis

- [1] AIUTI, A., VAI, S., MORTELLARO, A., CASORATI, G., FICARA, F., ANDOLFI, G., FERRARI, G., TABUCCHI, A., CARLUCCI, F., OCHS, H. D., NOTARANGELO, L. D., RONCAROLO, M. G., AND BORDIGNON, C. Immune reconstitution in ADA-SCID after PBL gene therapy and discontinuation of enzyme replacement. *Nat Med* 8, 5 (May 2002), 423–425. Comment.
- [2] ALTER, H. J., EICHBERG, J. W., MASUR, H., SAXINGER, W. C., GALLO, R., MACHER, A. M., LANE, H. C., AND FAUCI, A. S. Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science* 226, 4674 (Nov 1984), 549–552.
- [3] BALTIMORE, D. Gene therapy. Intracellular immunization. *Nature* 335 (1988), 395–396.
- [4] BARBATO, G., BIANCHI, E., INGALLINELLA, P., HURNI, W. H., MILLER, M. D., CILIBERTO, G., CORTESE, R., BAZZO, R., SHIVER, J. W., AND PESSI, A. Structural analysis of the epitope of the anti-HIV antibody 2F5 sheds light into its mechanism of neutralization and HIV fusion. *J Mol Biol* 330, 5 (Jul 2003), 1101–1115.
- [5] 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., AND MONTAGNIER, L. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 4599 (May 1983), 868–871.
- [6] BAUM, C., DULLMANN, J., LI, Z., FEHSE, B., MEYER, J., WILLIAMS, D. A., AND VON KALLE, C. Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells. *Blood* 101, 6 (Mar 2003), 2099–2114.
- [7] BERGER, E. A., MURPHY, P. M., AND FARBER, J. M. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 17 (1999), 657–700.

- [8] BERKOWITZ, R., FISHER, J., AND GOFF, S. P. RNA packaging. *Curr Top Microbiol Immunol* 214 (1996), 177–218.
- [9] BERNARD, D., PEAKMAN, M., AND HAYDAY, A. C. Establishing humanized mice using stem cells: maximizing the potential. *Clin. Exp. Immunol.* 152 (Jun 2008), 406–414.
- [10] BOSMA, G. C., CUSTER, R. P., AND BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 5900 (Feb 1983), 527–530.
- [11] BRATTEGAARD, K., KOUADIO, J., ADOM, M. L., DOORLY, R., GEORGE, J. R., AND DE COCK, K. M. Rapid and simple screening and supplemental testing for HIV-1 and HIV-2 infections in west Africa. *AIDS* 7, 6 (Jun 1993), 883–885.
- [12] BROUSSARD, S. R., STAPRANS, S. I., WHITE, R., WHITEHEAD, E. M., FEINBERG, M. B., AND ALLAN, J. S. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in naturally infected African green monkeys without inducing immunologic or neurologic disease. *J Virol* 75, 5 (Mar 2001), 2262–2275.
- [13] BROWN, H. E., CHEN, H., AND ENGELMAN, A. Structure-based mutagenesis of the human immunodeficiency virus type 1 DNA attachment site: effects on integration and cDNA synthesis. *J Virol* 73, 11 (Nov 1999), 9011–9020.
- [14] BROWNING, J., HORNER, J. W., PETTOELLO-MANTOVANI, M., RAKER, C., YURASOV, S., DEPINHO, R. A., AND GOLDSTEIN, H. Mice transgenic for human CD4 and CCR5 are susceptible to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 26 (Dec 1997), 14637–14641.
- [15] BUKRINSKAYA, A. G. HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol* 149, 6 (Jun 2004), 1067–1082.
- [16] CAO, X., SHORES, E. W., HU-LI, J., ANVER, M. R., KELSALL, B. L., RUSSELL, S. M., DRAGO, J., NOGUCHI, M., GRINBERG, A., AND BLOOM, E. T. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 2 (Mar 1995), 223–238.
- [17] CARUSO, M., SALOMON, B., ZHANG, S., BRISSON, E., CLAVEL, F., LOWY, I., AND KLATZMANN, D. Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus-thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology* 206, 1 (Jan 1995), 495–503.
- [18] CAVAZZANA-CALVO, M., HACEIN-BEY, S., DE SAINT BASILE, G., GROSS, F., YVON, E., NUSBAUM, P., SELZ, F., HUE, C., CERTAIN, S., CASANOVA, J. L.,

- BOUSSO, P., DEIST, F. L., AND FISCHER, A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288, 5466 (Apr 2000), 669–672. Clinical Trial.
- [19] CERVIA, J. S., AND SMITH, M. A. Enfuvirtide (T-20): a novel human immunodeficiency virus type 1 fusion inhibitor. *Clin. Infect. Dis.* 37 (Oct 2003), 1102–1106.
- [20] CHAN, D. C., AND KIM, P. S. HIV entry and its inhibition. *Cell* 93, 5 (May 1998), 681–684.
- [21] COFFIN, J., HAASE, A., LEVY, J. A., MONTAGNIER, L., OROSZLAN, S., TEICH, N., TEMIN, H., TOYOSHIMA, K., VARMUS, H., AND VOGT, P. What to call the AIDS virus? *Nature* 321, 6065 (May 1986), 10. Letter.
- [22] CUPEDO, T., AND MEBIUS, R. E. Cellular interactions in lymph node development. *J. Immunol.* 174 (Jan 2005), 21–25.
- [23] DAO, M. A., SHAH, A. J., CROOKS, G. M., AND NOLTA, J. A. Engraftment and retroviral marking of CD34+ and CD34+CD38- human hematopoietic progenitors assessed in immune-deficient mice. *Blood* 91 (Feb 1998), 1243–1255.
- [24] DE REQUENA, D. G., BONORA, S., CASTAGNA, A., HASSON, H., MARUCCO, D. A., D'AVOLIO, A., SCIANDRA, M., TRENTINI, L., CALCAGNO, A., LAZZARIN, A., AND DI PERRI, G. Pharmacokinetic and pharmacodynamic determinants of early virological response to enfuvirtide-based regimens in HIV-positive patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (Aug 2008), 384–387.
- [25] DEMAISON, C., PARSLEY, K., BROUNS, G., SCHERR, M., BATTMER, K., KINNON, C., GREZ, M., AND THRASHER, A. J. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13, 7 (May 2002), 803–813.
- [26] DERDEYN, C. A., DECKER, J. M., SFAKIANOS, J. N., WU, X., O'BRIEN, W. A., RATNER, L., KAPPES, J. C., SHAW, G. M., AND HUNTER, E. Sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to the fusion inhibitor T-20 is modulated by coreceptor specificity defined by the V3 loop of gp120. *J. Virol.* 74 (Sep 2000), 8358–8367.
- [27] DESROSIERS, R. C., AND LETVIN, N. L. Animal models for acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Infect Dis* 9, 3 (May 1987), 438–446.

- [28] DI SANTO, J. P., KÜHN, R., AND MÜLLER, W. Common cytokine receptor gamma chain (gamma c)-dependent cytokines: understanding in vivo functions by gene targeting. *Immunol. Rev.* 148 (Dec 1995), 19–34.
- [29] ECKERT, D. M., AND KIM, P. S. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70 (2001), 777–810.
- [30] EGELHOFER, M., BRANDENBURG, G., MARTINIUS, H., SCHULT-DIETRICH, P., MELIKYAN, G., KUNERT, R., BAUM, C., CHOI, I., ALEXANDROV, A., AND VON LAER, D. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol* 78, 2 (Jan 2004), 568–575.
- [31] EGERER, L., VOLK, A., KAHLE, J., KIMPEL, J., BRAUER, F., HERMANN, F. G., AND VON LAER, D. Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Molecular Therapie submitted* (2010).
- [32] EL KASSAR, N., LUCAS, P. J., KLUG, D. B., ZAMISCH, M., MERCHANT, M., BARE, C. V., CHOUDHURY, B., SHARROW, S. O., RICHIE, E., MACKALL, C. L., AND GRESS, R. E. A dose effect of IL-7 on thymocyte development. *Blood* 104 (Sep 2004), 1419–1427.
- [33] FINKE, D., ACHA-ORBEA, H., MATTIS, A., LIPP, M., AND KRAEHENBUHL, J. CD4+CD3- cells induce Peyer’s patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by CXCR5. *Immunity* 17 (Sep 2002), 363–373.
- [34] FISHER, R. A., BERTONIS, J. M., MEIER, W., JOHNSON, V. A., COSTOPOULOS, D. S., LIU, T., TIZARD, R., WALKER, B. D., HIRSCH, M. S., AND SCHOOLEY, R. T. HIV infection is blocked in vitro by recombinant soluble CD4. *Nature* 331, 6151 (Jan 1988), 76–78.
- [35] FREED, E. O. HIV-1 gag proteins: diverse functions in the virus life cycle. *Virology* 251, 1 (Nov 1998), 1–15.
- [36] FREED, E. O. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Genet* 26, 1-6 (Nov 2001), 13–33.
- [37] FULTZ, P. N., McCLURE, H. M., SWENSON, R. B., McGRATH, C. R., BRODIE, A., GETCHELL, J. P., JENSEN, F. C., ANDERSON, D. C., BRODERSON, J. R., AND FRANCIS, D. P. Persistent infection of chimpanzees with human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus: a potential model for acquired immunodeficiency syndrome. *J Virol* 58, 1 (Apr 1986), 116–124.
- [38] FURUTA, R. A., WILD, C. T., WENG, Y., AND WEISS, C. D. Capture of an early fusion-active conformation of HIV-1 gp41. *Nat Struct Biol* 5, 4 (Apr 1998), 276–279.

- [39] GALLO, R. C., SALAHUDDIN, S. Z., POPOVIC, M., SHEARER, G. M., KAPLAN, M., HAYNES, B. F., PALKER, T. J., REDFIELD, R., OLESKE, J., AND SAFAI, B. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224, 4648 (May 1984), 500–503.
- [40] GAO, F., BAILES, E., ROBERTSON, D. L., CHEN, Y., RODENBURG, C. M., MICHAEL, S. F., CUMMINS, L. B., ARTHUR, L. O., PEETERS, M., SHAW, G. M., SHARP, P. M., AND HAHN, B. H. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 6718 (Feb 1999), 436–441.
- [41] GAO, F., YUE, L., WHITE, A. T., PAPPAS, P. G., BARCHUE, J., HANSON, A. P., GREENE, B. M., SHARP, P. M., SHAW, G. M., AND HAHN, B. H. Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 6386 (Aug 1992), 495–499.
- [42] GARDNER, M. B., LUCIW, P., LERCHE, N., AND MARX, P. Nonhuman primate retrovirus isolates and AIDS. *Adv Vet Sci Comp Med* 32 (1988), 171–226.
- [43] GARDNER, M. B., AND LUCIW, P. A. Animal models of AIDS. *FASEB J* 3, 14 (Dec 1989), 2593–2606.
- [44] GELDERBLUM, H. R., HAUSMANN, E. H., OZEL, M., PAULI, G., AND KOCH, M. A. Fine structure of human immunodeficiency virus (HIV) and immunolocalization of structural proteins. *Virology* 156, 1 (Jan 1987), 171–176.
- [45] GIMENO, R., WEIJER, K., VOORDOUW, A., UITTENBOGAART, C. H., LEGRAND, N., ALVES, N. L., WIJNANDS, E., BLOM, B., AND SPITS, H. Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 104, 13 (Dec 2004), 3886–3893.
- [46] GIOVANELLA, B. C., AND FOGH, J. The nude mouse in cancer research. *Adv. Cancer Res.* 44 (1985), 69–120.
- [47] GOFFINET, C., ALLESPACH, I., AND KEPPLER, O. T. HIV-susceptible transgenic rats allow rapid preclinical testing of antiviral compounds targeting virus entry or reverse transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104 (Jan 2007), 1015–1020.
- [48] GOTTE, M., LI, X., AND WAINBERG, M. A. HIV-1 reverse transcription: a brief overview focused on structure-function relationships among molecules involved in initiation of the reaction. *Arch Biochem Biophys* 365, 2 (May 1999), 199–210.
- [49] GOTTLIEB, M. S., SCHROFF, R., SCHANKER, H. M., WEISMAN, J. D., FAN, P. T., WOLF, R. A., AND SAXON, A. *Pneumocystis carinii* pneumonia and

- mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* 305, 24 (Dec 1981), 1425–1431. Case Reports.
- [50] GUENECHEA, G., SEGOVIA, J. C., ALBELLA, B., LAMANA, M., RAMIREZ, M., REGIDOR, C., FERNANDEZ, M. N., AND BUEREN, J. A. Delayed engraftment of nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice transplanted with ex vivo-expanded human CD34(+) cord blood cells. *Blood* 93 (Feb 1999), 1097–1105.
- [51] HADAS, E., BORJABAD, A., CHAO, W., SAINI, M., ICHIYAMA, K., POTASH, M. J., AND VOLSKY, D. J. Testing antiretroviral drug efficacy in conventional mice infected with chimeric HIV-1. *AIDS* 21 (May 2007), 905–909.
- [52] HAHN, B. H., KONG, L. I., LEE, S. W., KUMAR, P., TAYLOR, M. E., ARYA, S. K., AND SHAW, G. M. Relation of HTLV-4 to simian and human immunodeficiency-associated viruses. *Nature* 330, 6144 (Nov 1987), 184–186.
- [53] HAO, Q. L., SHAH, A. J., THIEMANN, F. T., SMOGORZEWSKA, E. M., AND CROOKS, G. M. A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86 (Nov 1995), 3745–3753.
- [54] HART, T. K., KIRSH, R., ELLENS, H., SWEET, R. W., LAMBERT, D. M., PETTEWAY, S. R. J., LEARY, J., AND BUGELSKI, P. J. Binding of soluble CD4 proteins to human immunodeficiency virus type 1 and infected cells induces release of envelope glycoprotein gp120. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6 (Mar 1991), 2189–2193.
- [55] HERMANN, F. G., EGERER, L., BRAUER, F., GERUM, C., SCHWALBE, H., DIETRICH, U., AND VON LAER, D. Mutations in gp120 contribute to the resistance of human immunodeficiency virus type 1 to membrane-anchored C-peptide maC46. *J. Virol.* 83 (May 2009), 4844–4853.
- [56] HERMANN, F. G., MARTINIUS, H., EGELHOFER, M., GIROGLOU, T., TONN, T., ROTH, S. D., ZAHN, R., SCHULT-DIETRICH, P., ALEXANDROV, A., DIETRICH, U., BAUM, C., AND VON LAER, D. Protein scaffold and expression level determine antiviral activity of membrane-anchored antiviral peptides. *Hum. Gene Ther.* 20 (Apr 2009), 325–336.
- [57] HICKMAN, S. P., AND TURKA, L. A. Homeostatic T cell proliferation as a barrier to T cell tolerance. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 360 (Sep 2005), 1713–1721.

- [58] HILDINGER, M., DITTMAR, M. T., SCHULT-DIETRICH, P., FEHSE, B., SCHNIERLE, B. S., THALER, S., STIEGLER, G., WELKER, R., AND VON LAER, D. Membrane-anchored peptide inhibits human immunodeficiency virus entry. *J Virol* 75, 6 (Mar 2001), 3038–3042.
- [59] HOGLUND, S., OFVERSTEDT, L. G., NILSSON, A., LUNDQUIST, P., GELDERBLOM, H., OZEL, M., AND SKOGLUND, U. Spatial visualization of the maturing HIV-1 core and its linkage to the envelope. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 1 (Jan 1992), 1–7.
- [60] HUGHSON, F. M. Enveloped viruses: a common mode of membrane fusion? *Curr Biol* 7, 9 (Sep 1997), 565–569.
- [61] HUTTER, G., NOWAK, D., MOSSNER, M., GANEPOLA, S., MUSSIG, A., ALLERS, K., SCHNEIDER, T., HOFMANN, J., KUCHERER, C., BLAU, O., BLAU, I. W., HOFMANN, W. K., AND THIEL, E. Long-term control of HIV by CCR5 Delta32/Delta32 stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 360 (Feb 2009), 692–698.
- [62] ISHIKAWA, F., YASUKAWA, M., LYONS, B., YOSHIDA, S., MIYAMOTO, T., YOSHIMOTO, G., WATANABE, T., AKASHI, K., SHULTZ, L. D., AND HARADA, M. Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor gamma chain(null) mice. *Blood* 106 (Sep 2005), 1565–1573.
- [63] JACOBS, H., KRIMPENFORT, P., HAKS, M., ALLEN, J., BLOM, B., DEMOLLIERE, C., KRUISBEEK, A., SPITS, H., AND BERNS, A. PIM1 reconstitutes thymus cellularity in interleukin 7- and common gamma chain-mutant mice and permits thymocyte maturation in Rag- but not CD3gamma-deficient mice. *J. Exp. Med.* 190 (Oct 1999), 1059–1068.
- [64] JIANG, S., LIN, K., AND LU, M. A conformation-specific monoclonal antibody reacting with fusion-active gp41 from the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *J Virol* 72, 12 (Dec 1998), 10213–10217.
- [65] JIANG, S., LIN, K., STRICK, N., AND NEURATH, A. R. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* 365, 6442 (Sep 1993), 113. Letter.
- [66] JOLLY, C., AND SATTENTAU, Q. J. Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* 5 (Sep 2004), 643–650.
- [67] KANKI, P. J., TRAVERS, K. U., MBOUP, S., HSIEH, C. C., MARLINK, R. G., GUEYE-NDIAYE, A., SIBY, T., THIOR, I., HERNANDEZ-AVILA, M., AND SANKALE, J. L. Slower heterosexual spread of HIV-2 than HIV-1. *Lancet* 343, 8903 (Apr 1994), 943–946.

- [68] KEPPLER, O. T., WELTE, F. J., NGO, T. A., CHIN, P. S., PATTON, K. S., TSOU, C. L., ABBEY, N. W., SHARKEY, M. E., GRANT, R. M., YOU, Y., SCARBOROUGH, J. D., ELLMEIER, W., LITTMAN, D. R., STEVENSON, M., CHARO, I. F., HERNDIER, B. G., SPECK, R. F., AND GOLDSMITH, M. A. Progress toward a human CD4/CCR5 transgenic rat model for de novo infection by human immunodeficiency virus type 1. *J. Exp. Med.* 195 (Mar 2002), 719–736.
- [69] KEPPLER, O. T., YONEMOTO, W., WELTE, F. J., PATTON, K. S., IACOVIDES, D., ATCHISON, R. E., NGO, T., HIRSCHBERG, D. L., SPECK, R. F., AND GOLDSMITH, M. A. Susceptibility of rat-derived cells to replication by human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 75 (Sep 2001), 8063–8073.
- [70] KILBY, J. M., HOPKINS, S., VENETTA, T. M., DIMASSIMO, B., CLOUD, G. A., LEE, J. Y., ALLDREDGE, L., HUNTER, E., LAMBERT, D., BOLOGNESI, D., MATTHEWS, T., JOHNSON, M. R., NOWAK, M. A., SHAW, G. M., AND SAAG, M. S. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat Med* 4, 11 (Nov 1998), 1302–1307. Clinical Trial.
- [71] KILBY, J. M., LALEZARI, J. P., ERON, J. J., CARLSON, M., COHEN, C., ARDUINO, R. C., GOODGAME, J. C., GALLANT, J. E., VOLBERDING, P., MURPHY, R. L., VALENTINE, F., SAAG, M. S., NELSON, E. L., SISTA, P. R., AND DUSEK, A. The safety, plasma pharmacokinetics, and antiviral activity of subcutaneous enfuvirtide (T-20), a peptide inhibitor of gp41-mediated virus fusion, in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* 18, 10 (Jul 2002), 685–693. Clinical Trial.
- [72] KIM, D. K., FUJIKI, Y., FUKUSHIMA, T., EMA, H., SHIBUYA, A., AND NAKAUCHI, H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. *Stem Cells* 17 (1999), 286–294.
- [73] KIM, S. S., PEER, D., KUMAR, P., SUBRAMANYA, S., WU, H., ASTHANA, D., HABIRO, K., YANG, Y. G., MANJUNATH, N., SHIMAOKA, M., AND SHANKAR, P. RNAi-mediated CCR5 Silencing by LFA-1-targeted Nanoparticles Prevents HIV Infection in BLT Mice. *Mol. Ther.* (Dec 2009).
- [74] KIMPEL, J., BRAUN, S. E., QIU, G., WONG, F. E., CONOLLE, M., SCHMITZ, J. E., BRENDDEL, C., HUMEAU, L. M., DROPULIC, B., ROSSI, J. J., BERGER, A., VON LAER, D., AND JOHNSON, R. P. Survival of the Fittest: Positive Selection

- of CD4+ T cells Expressing a Membrane-bound Fusion Inhibitor following HIV-1 Infection. *PLOS One submitted* (2010).
- [75] KIRCHGESSNER, C. U., PATIL, C. K., EVANS, J. W., CUOMO, C. A., FRIED, L. M., CARTER, T., OETTINGER, M. A., AND BROWN, J. M. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science* 267 (Feb 1995), 1178–1183.
- [76] KRAUNUS, J., SCHAUMANN, D. H., MEYER, J., MODLICH, U., FEHSE, B., BRANDENBURG, G., VON LAER, D., KLUMP, H., SCHAMBACH, A., BOHNE, J., AND BAUM, C. Self-inactivating retroviral vectors with improved RNA processing. *Gene Ther.* 11 (Nov 2004), 1568–1578.
- [77] KUMAR, P., BAN, H. S., KIM, S. S., WU, H., PEARSON, T., GREINER, D. L., LAOUAR, A., YAO, J., HARIDAS, V., HABIRO, K., YANG, Y. G., JEONG, J. H., LEE, K. Y., KIM, Y. H., KIM, S. W., PEIPP, M., FEY, G. H., MANJUNATH, N., SHULTZ, L. D., LEE, S. K., AND SHANKAR, P. T cell-specific siRNA delivery suppresses HIV-1 infection in humanized mice. *Cell* 134 (Aug 2008), 577–586.
- [78] KURUVILLA, J. G., TROYER, R. M., DEVI, S., AND AKKINA, R. Dengue virus infection and immune response in humanized RAG2(-/-)gamma(c)(-/-) (RAG-hu) mice. *Virology* 369 (Dec 2007), 143–152.
- [79] LAEMMLI, U. K., BEGUIN, F., AND GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J. Mol. Biol.* 47 (Jan 1970), 69–85.
- [80] LANDAU, N. R., WARTON, M., AND LITTMAN, D. R. The envelope glycoprotein of the human immunodeficiency virus binds to the immunoglobulin-like domain of CD4. *Nature* 334, 6178 (Jul 1988), 159–162.
- [81] LAPIDOT, T., PFLUMIO, F., DOEDENS, M., MURDOCH, B., WILLIAMS, D. E., AND DICK, J. E. Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255 (Feb 1992), 1137–1141.
- [82] LAZZARIN, A., CLOTET, B., COOPER, D., REYNES, J., ARASTEH, K., NELSON, M., KATLAMA, C., STELLBRINK, H. J., DELFRAISSY, J. F., LANGE, J., HUSON, L., DEMASI, R., WAT, C., DELEHANTY, J., DROBNES, C., AND SALGO, M. Efficacy of enfuvirtide in patients infected with drug-resistant HIV-1 in Europe and Australia. *N. Engl. J. Med.* 348 (May 2003), 2186–2195.
- [83] LEGRAND, N., WEIJER, K., AND SPITS, H. Experimental models to study development and function of the human immune system in vivo. *J. Immunol.* 176 (Feb 2006), 2053–2058.

- [84] LEONARD, C. K., SPELLMAN, M. W., RIDDLE, L., HARRIS, R. J., THOMAS, J. N., AND GREGORY, T. J. Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 265, 18 (Jun 1990), 10373–10382.
- [85] LEWIS, P. F., AND EMERMAN, M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J Virol* 68, 1 (Jan 1994), 510–516.
- [86] LUND, O., LUND, O. S., GRAM, G., NIELSEN, S. D., SCHONNING, K., NIELSEN, J. O., HANSEN, J. E., AND MOSEKILDE, E. Gene therapy of T helper cells in HIV infection: mathematical model of the criteria for clinical effect. *Bull Math Biol* 59, 4 (Jul 1997), 725–745.
- [87] LUSSO, P., COCCHI, F., BALOTTA, C., MARKHAM, P. D., LOUIE, A., FARCI, P., PAL, R., GALLO, R. C., AND REITZ, M. S. J. Growth of macrophage-tropic and primary human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) isolates in a unique CD4+ T-cell clone (PM1): failure to downregulate CD4 and to interfere with cell-line-tropic HIV-1. *J Virol* 69, 6 (Jun 1995), 3712–3720.
- [88] LUSSO, P., MARKHAM, P. D., RANKI, A., EARL, P., MOSS, B., DORNER, F., GALLO, R. C., AND KROHN, K. J. Cell-mediated immune response toward viral envelope and core antigens in gibbon apes (*Hylobates lar*) chronically infected with human immunodeficiency virus-1. *J Immunol* 141, 7 (Oct 1988), 2467–2473.
- [89] MACCHIARINI, F., MANZ, M. G., PALUCKA, A. K., AND SHULTZ, L. D. Humanized mice: are we there yet? *J. Exp. Med.* 202 (Nov 2005), 1307–1311.
- [90] MACKALL, C. L., AND GRESS, R. E. Pathways of T-cell regeneration in mice and humans: implications for bone marrow transplantation and immunotherapy. *Immunol. Rev.* 157 (Jun 1997), 61–72.
- [91] MANZ, M. G. Human-hemato-lymphoid-system mice: opportunities and challenges. *Immunity* 26 (May 2007), 537–541.
- [92] MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H. W., AND CUNNINGHAM-RUNDLES, S. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 305, 24 (Dec 1981), 1431–1438.

- [93] MCCUNE, J. M., NAMIKAWA, R., KANESHIMA, H., SHULTZ, L. D., LIEBERMAN, M., AND WEISSMAN, I. L. The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241, 4873 (Sep 1988), 1632–1639.
- [94] MELIKYAN, G. B., MARKOSYAN, R. M., HEMMATI, H., DELMEDICO, M. K., LAMBERT, D. M., AND COHEN, F. S. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol* 151, 2 (Oct 2000), 413–423.
- [95] MELKUS, M. W., ESTES, J. D., PADGETT-THOMAS, A., GATLIN, J., DENTON, P. W., OTHIENO, F. A., WEGE, A. K., HAASE, A. T., AND GARCIA, J. V. Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1. *Nat. Med.* 12 (Nov 2006), 1316–1322.
- [96] MICHEL, N., GOFFINET, C., GANTER, K., ALLESPACH, I., KEWALRAMANI, V. N., SAIFUDDIN, M., LITTMAN, D. R., GREENE, W. C., GOLDSMITH, M. A., AND KEPPLER, O. T. Human cyclin T1 expression ameliorates a T-cell-specific transcriptional limitation for HIV in transgenic rats, but is not sufficient for a spreading infection of prototypic R5 HIV-1 strains ex vivo. *Retrovirology* 6 (2009), 2.
- [97] MILLER, R. D., HOGG, J., OZAKI, J. H., GELL, D., JACKSON, S. P., AND RIBLET, R. Gene for the catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the scid locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (Nov 1995), 10792–10795.
- [98] MIYOSHI, H. Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. *Methods Mol. Biol.* 246 (2004), 429–438.
- [99] MIYOSHI, H., SMITH, K. A., MOSIER, D. E., VERMA, I. M., AND TORBETT, B. E. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science* 283 (Jan 1999), 682–686.
- [100] MODLICH, U., NAVARRO, S., ZYCHLINSKI, D., MAETZIG, T., KNOESS, S., BRUGMAN, M. H., SCHAMBACH, A., CHARRIER, S., GALY, A., THRASHER, A. J., BUEREN, J., AND BAUM, C. Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol. Ther.* 17 (Nov 2009), 1919–1928.
- [101] MONTINI, E., CESANA, D., SCHMIDT, M., SANVITO, F., BARTHOLOMAE, C. C., RANZANI, M., BENEDECENTI, F., SERGI, L. S., AMBROSI, A., PONZONI, M.,

- DOGLIONI, C., DI SERIO, C., VON KALLE, C., AND NALDINI, L. The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J. Clin. Invest.* 119 (Apr 2009), 964–975.
- [102] MORROW, W. J., WHARTON, M., LAU, D., AND LEVY, J. A. Small animals are not susceptible to human immunodeficiency virus infection. *J Gen Virol* 68 (Pt 8) (Aug 1987), 2253–2257.
- [103] MOSIER, D. E., GULIZIA, R. J., BAIRD, S. M., AND WILSON, D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335, 6187 (Sep 1988), 256–259.
- [104] MULLIGAN, R. C. The basic science of gene therapy. *Science* 260, 5110 (May 1993), 926–932.
- [105] MUSTER, T., STEINDL, F., PURTSCHER, M., TRKOLA, A., KLIMA, A., HIMMLER, G., RUKER, F., AND KATINGER, H. A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 67, 11 (Nov 1993), 6642–6647.
- [106] NAKATA, H., MAEDA, K., MIYAKAWA, T., SHIBAYAMA, S., MATSUO, M., TAKAOKA, Y., ITO, M., KOYANAGI, Y., AND MITSUYA, H. Potent anti-R5 human immunodeficiency virus type 1 effects of a CCR5 antagonist, AK602/ONO4128/GW873140, in a novel human peripheral blood mononuclear cell nonobese diabetic-SCID, interleukin-2 receptor gamma-chain-knocked-out AIDS mouse model. *J. Virol.* 79 (Feb 2005), 2087–2096.
- [107] NALDINI, L., BLOMER, U., GALLAY, P., ORY, D., MULLIGAN, R., GAGE, F. H., VERMA, I. M., AND TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 5259 (Apr 1996), 263–267.
- [108] NARA, P. L., ROBEY, W. G., ARTHUR, L. O., ASHER, D. M., WOLFF, A. V., GIBBS, C. J. J., GAJDUSEK, D. C., AND FISCHINGER, P. J. Persistent infection of chimpanzees with human immunodeficiency virus: serological responses and properties of reisolated viruses. *J Virol* 61, 10 (Oct 1987), 3173–3180.
- [109] NEWRZELA, S., CORNILS, K., LI, Z., BAUM, C., BRUGMAN, M. H., HARTMANN, M., MEYER, J., HARTMANN, S., HANSMANN, M. L., FEHSE, B., AND VON LAER, D. Resistance of mature T cells to oncogene transformation. *Blood* 112 (Sep 2008), 2278–2286.

- [110] OHBO, K., TAKASAWA, N., ISHII, N., TANAKA, N., NAKAMURA, M., AND SUGAMURA, K. Functional analysis of the human interleukin 2 receptor gamma chain gene promoter. *J. Biol. Chem.* 270 (Mar 1995), 7479–7486.
- [111] OKUN, M. M., ESKRIDGE, E. M., AND SHIELDS, D. Truncations of a secretory protein define minimum lengths required for binding to signal recognition particle and translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* 265 (May 1990), 7478–7484.
- [112] PANTALEO, G., GRAZIOSI, C., AND FAUCI, A. S. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328 (Feb 1993), 327–335.
- [113] PEAR, W. S., NOLAN, G. P., SCOTT, M. L., AND BALTIMORE, D. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 18 (Sep 1993), 8392–8396.
- [114] PEARSON, T., SHULTZ, L. D., MILLER, D., KING, M., LANING, J., FODOR, W., CUTHBERT, A., BURZENSKI, L., GOTT, B., LYONS, B., FOREMAN, O., ROSINI, A. A., AND GREINER, D. L. Non-obese diabetic-recombination activating gene-1 (NOD-Rag1 null) interleukin (IL)-2 receptor common gamma chain (IL2r gamma null) null mice: a radioresistant model for human lymphohaematopoietic engraftment. *Clin. Exp. Immunol.* 154 (Nov 2008), 270–284.
- [115] PEREZ, E. E., WANG, J., MILLER, J. C., JOUVENOT, Y., KIM, K. A., LIU, O., WANG, N., LEE, G., BARTSEVICH, V. V., LEE, Y. L., GUSCHIN, D. Y., RUPNIEWSKI, I., WAITE, A. J., CARPENITO, C., CARROLL, R. G., ORANGE, J. S., URNOV, F. D., REBAR, E. J., ANDO, D., GREGORY, P. D., RILEY, J. L., HOLMES, M. C., AND JUNE, C. H. Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26 (Jul 2008), 808–816.
- [116] PEREZ, L. G., O'DONNELL, M. A., AND STEPHENS, E. B. The transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 induces syncytium formation in the absence of the receptor binding glycoprotein. *J Virol* 66, 7 (Jul 1992), 4134–4143.
- [117] PHILLIPS, D. M. The role of cell-to-cell transmission in HIV infection. *AIDS* 8 (Jun 1994), 719–731.
- [118] PLATT, E. J., WEHRLY, K., KUHMANN, S. E., CHESEBRO, B., AND KABAT, D. Effects of CCR5 and CD4 cell surface concentrations on infections by macro-

- phagotropic isolates of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.* 72 (Apr 1998), 2855–2864.
- [119] POTASH, M. J., CHAO, W., BENTSMAN, G., PARIS, N., SAINI, M., NITKIEWICZ, J., BELEM, P., SHARER, L., BROOKS, A. I., AND VOLSKY, D. J. A mouse model for study of systemic HIV-1 infection, antiviral immune responses, and neuroinvasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 (Mar 2005), 3760–3765.
- [120] PTAK, R. G. HIV-1 regulatory proteins: targets for novel drug development. *Expert Opin Investig Drugs* 11, 8 (Aug 2002), 1099–1115.
- [121] REY-CUILLE, M. A., BERTHIER, J. L., BOMSEL-DEMONTOY, M. C., CHADUC, Y., MONTAGNIER, L., HOVANESSIAN, A. G., AND CHAKRABARTI, L. A. Simian immunodeficiency virus replicates to high levels in sooty mangabeys without inducing disease. *J Virol* 72, 5 (May 1998), 3872–3886.
- [122] RIMSKY, L. T., SHUGARS, D. C., AND MATTHEWS, T. J. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 resistance to gp41-derived inhibitory peptides. *J. Virol.* 72 (Feb 1998), 986–993.
- [123] ROE, T., REYNOLDS, T. C., YU, G., AND BROWN, P. O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J.* 12 (May 1993), 2099–2108.
- [124] RUBSAMEN-WAIGMANN, H., MANIAR, J., GERTE, S., BREDE, H. D., DIETRICH, U., MAHAMBRE, G., AND PFUTZNER, A. High proportion of HIV-2 and HIV-1/2 double-reactive sera in two Indian states, Maharashtra and Goa: first appearance of an HIV-2 epidemic along with an HIV-1 epidemic outside of Africa. *Zentralbl Bakteriolog* 280, 3 (Jan 1994), 398–402.
- [125] SANTONI DE SIO, F., AND NALDINI, L. Short-term culture of human CD34+ cells for lentiviral gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 506 (2009), 59–70.
- [126] SATO, H., ORENSTEIN, J., DIMITROV, D., AND MARTIN, M. Cell-to-cell spread of HIV-1 occurs within minutes and may not involve the participation of virus particles. *Virology* 186 (Feb 1992), 712–724.
- [127] SAWADA, S., GOWRISHANKAR, K., KITAMURA, R., SUZUKI, M., SUZUKI, G., TAHARA, S., AND KOITO, A. Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T cell line-tropic HIV-1 receptors. *J Exp Med* 187, 9 (May 1998), 1439–1449.
- [128] SCHLUNS, K. S., KIEPER, W. C., JAMESON, S. C., AND LEFRANCOIS, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 1 (Nov 2000), 426–432.

- [129] SCHNEIDER, J., AND HUNSMANN, G. Simian lentiviruses—the SIV group. *AIDS* 2, 1 (Feb 1988), 1–9.
- [130] SCHULE, S., STEIDL, S., PANITZ, S., COULIBALY, C., KALINKE, U., CICHUTEK, K., AND SCHWEIZER, M. Selective gene transfer to T lymphocytes using coreceptor-specific [MLV(HIV)] pseudotype vectors in a transgenic mouse model. *Virology* 351, 1 (Jul 2006), 237–247. JOURNAL ARTICLE.
- [131] SHIMIZU, S., HONG, P., ARUMUGAM, B., POKOMO, L., BOYER, J., KOIZUMI, N., KITTIPONGDAJA, P., CHEN, A., BRISTOL, G., GALIC, Z., ZACK, J. A., YANG, O., CHEN, I. S., LEE, B., AND AN, D. S. A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood* (Dec 2009).
- [132] SHULTZ, L. D., ISHIKAWA, F., AND GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat. Rev. Immunol.* 7 (Feb 2007), 118–130.
- [133] SHULTZ, L. D., LYONS, B. L., BURZENSKI, L. M., GOTT, B., CHEN, X., CHALEFF, S., KOTB, M., GILLIES, S. D., KING, M., MANGADA, J., GREINER, D. L., AND HANDGRETINGER, R. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J. Immunol.* 174 (May 2005), 6477–6489.
- [134] SHULTZ, L. D., SCHWEITZER, P. A., CHRISTIANSON, S. W., GOTT, B., SCHWEITZER, I. B., TENNENT, B., MCKENNA, S., MOBRAATEN, L., RAJAN, T. V., AND GREINER, D. L. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J. Immunol.* 154 (Jan 1995), 180–191.
- [135] STEIN, B. S., AND ENGLEMAN, E. G. Intracellular processing of the gp160 HIV-1 envelope precursor. Endoproteolytic cleavage occurs in a cis or medial compartment of the Golgi complex. *J Biol Chem* 265, 5 (Feb 1990), 2640–2649.
- [136] STEINMANN, G. G. Changes in the human thymus during aging. *Curr Top Pathol* 75 (1986), 43–88.
- [137] SUGAMURA, K., ASAO, H., KONDO, M., TANAKA, N., ISHII, N., OHBO, K., NAKAMURA, M., AND TAKESHITA, T. The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu. Rev. Immunol.* 14 (1996), 179–205.
- [138] TOUGH, D. F., AND SPRENT, J. Turnover of naive- and memory-phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 179 (Apr 1994), 1127–1135.

- [139] TRAGGIAI, E., CHICHA, L., MAZZUCHELLI, L., BRONZ, L., PIFFARETTI, J.-C., LANZAVECCHIA, A., AND MANZ, M. G. Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304, 5667 (Apr 2004), 104–107.
- [140] UEDA, T., YOSHIDA, M., YOSHINO, H., KOBAYASHI, K., KAWAHATA, M., EBIHARA, Y., ITO, M., ASANO, S., NAKAHATA, T., AND TSUJI, K. Hematopoietic capability of CD34+ cord blood cells: a comparison with CD34+ adult bone marrow cells. *Int. J. Hematol.* 73 (Jun 2001), 457–462.
- [141] URIBE, L., AND WEINBERG, K. I. X-linked SCID and other defects of cytokine pathways. *Semin. Hematol.* 35 (Oct 1998), 299–309.
- [142] VAN LUNZEN, J., GLAUNSINGER, T., STAHRM, I., VON BAEHR, V., BAUM, C., SCHILZ, A., KUEHLCKE, K., NAUNDORF, S., MARTINIUS, H., HERMANN, F., GIROGLOU, T., NEWRZELA, S., MÜLLER, I., BRAUER, F., BRANDENBURG, G., ALEXANDROV, A., AND VON LAER, D. Transfer of autologous gene-modified T cells in HIV-infected patients with advanced immunodeficiency and drug-resistant virus. *Mol. Ther.* 15 (May 2007), 1024–1033.
- [143] VOCERO-AKBANI, A. M., HEYDEN, N. V., LISSY, N. A., RATNER, L., AND DOWDY, S. F. Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* 5, 1 (Jan 1999), 29–33.
- [144] VON FREEDEN-JEFFRY, U., SOLVASON, N., HOWARD, M., AND MURRAY, R. The earliest T lineage-committed cells depend on IL-7 for Bcl-2 expression and normal cell cycle progression. *Immunity* 7 (Jul 1997), 147–154.
- [145] VON FREEDEN-JEFFRY, U., VIEIRA, P., LUCIAN, L. A., MCNEIL, T., BURDACH, S. E., AND MURRAY, R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J. Exp. Med.* 181 (Apr 1995), 1519–1526.
- [146] VON KALLE, C., FEHSE, B., LAYH-SCHMITT, G., SCHMIDT, M., KELLY, P., AND BAUM, C. Stem cell clonality and genotoxicity in hematopoietic cells: gene activation side effects should be avoidable. *Semin Hematol* 41, 4 (Oct 2004), 303–318.
- [147] VON LAER, D., HASSELMANN, S., AND HASSELMANN, K. Gene therapy for HIV infection: what does it need to make it work? *J Gene Med* 8, 6 (Jun 2006), 658–667.
- [148] WATANABE, S., OHTA, S., YAJIMA, M., TERASHIMA, K., ITO, M., MUGISHIMA, H., FUJIWARA, S., SHIMIZU, K., HONDA, M., SHIMIZU, N., AND YAMAMOTO,

- N. Humanized NOD/SCID/IL2Rgamma(null) mice transplanted with hematopoietic stem cells under nonmyeloablative conditions show prolonged life spans and allow detailed analysis of human immunodeficiency virus type 1 pathogenesis. *J. Virol.* 81 (Dec 2007), 13259–13264.
- [149] WATANABE, T., MASUYAMA, J., SOHMA, Y., INAZAWA, H., HORIE, K., KOJIMA, K., UEMURA, Y., AOKI, Y., KAGA, S., MINOTA, S., TANAKA, T., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, T., AND SERIZAWA, I. CD52 is a novel costimulatory molecule for induction of CD4+ regulatory T cells. *Clin. Immunol.* 120 (Sep 2006), 247–259.
- [150] WEI, X., DECKER, J. M., LIU, H., ZHANG, Z., ARANI, R. B., KILBY, J. M., SAAG, M. S., WU, X., SHAW, G. M., AND KAPPES, J. C. Emergence of resistant human immunodeficiency virus type 1 in patients receiving fusion inhibitor (T-20) monotherapy. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 6 (Jun 2002), 1896–1905.
- [151] WEISS, R. A. Gulliver’s travels in HIVland. *Nature* 410, 6831 (Apr 2001), 963–967.
- [152] WEISSENHORN, W., WHARTON, S. A., CALDER, L. J., EARL, P. L., MOSS, B., ALIPRANDIS, E., SKEHEL, J. J., AND WILEY, D. C. The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO J* 15, 7 (Apr 1996), 1507–1514.
- [153] WILD, C. T., SHUGARS, D. C., GREENWELL, T. K., MCDANAL, C. B., AND MATTHEWS, T. J. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 21 (Oct 1994), 9770–9774.
- [154] WORLD HEALTH ORGANISATION. <http://www.who.int>, 2008.
- [155] WYATT, R., KWONG, P. D., DESJARDINS, E., SWEET, R. W., ROBINSON, J., HENDRICKSON, W. A., AND SODROSKI, J. G. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393, 6686 (Jun 1998), 705–711.
- [156] YAHATA, T., ANDO, K., NAKAMURA, Y., UHEYAMA, Y., SHIMAMURA, K., TAMAOKI, N., KATO, S., AND HOTTA, T. Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in nonobese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J. Immunol.* 169 (Jul 2002), 204–209.
- [157] YEE, J. K., MIYANOHARA, A., LAPORTE, P., BOUIC, K., BURNS, J. C., AND FRIEDMANN, T. A general method for the generation of high-titer, pantropic retroviral vectors: highly efficient infection of primary hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (Sep 1994), 9564–9568.

Literaturverzeichnis

- [158] YU, S. F., VON RUDEN, T., KANTOFF, P. W., GARBER, C., SEIBERG, M., RUTHER, U., ANDERSON, W. F., WAGNER, E. F., AND GILBOA, E. Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 10 (May 1986), 3194–3198.
- [159] ZHANG, L., KOVALEV, G. I., AND SU, L. HIV-1 infection and pathogenesis in a novel humanized mouse model. *Blood* 109 (Apr 2007), 2978–2981.
- [160] ZHU, P., CHERTOVA, E., BESS, J. J., LIFSON, J. D., ARTHUR, L. O., LIU, J., TAYLOR, K. A., AND ROUX, K. H. Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 26 (Dec 2003), 15812–15817.
- [161] ZHU, T., KORBER, B. T., NAHMIAS, A. J., HOOPER, E., SHARP, P. M., AND HO, D. D. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature* 391, 6667 (Feb 1998), 594–597. Historical Article.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

AAV	Adeno- assoziiertes Virus
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BLT	bone marrow/liver/thymus
BSA	Bovines Serumalbumin
CB	Cord Blood = Nabelschnurblut
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EBV	Epstein- Barr- Virus
eGFP	enhanced green fluorescent protein
env	Hüllprotein (envelope)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein- Isothiocyanat
Foxn1	forkhead box N1
gag	Gruppenspezifisches Antigen
GALT	'gut' (Darm) assoziiertes lymphoides Gewebe
GM-CSF	granulocyte macrophage colony- stimulating factor
GvHD	Graft versus Host Disease
HAART	hochaktive antiretrovirale Therapie
HIS	human immune system = humanes Immunsystem
HRPO	Meerrettich- Peroxidase (horseradish peroxidase)

Abkürzungsverzeichnis

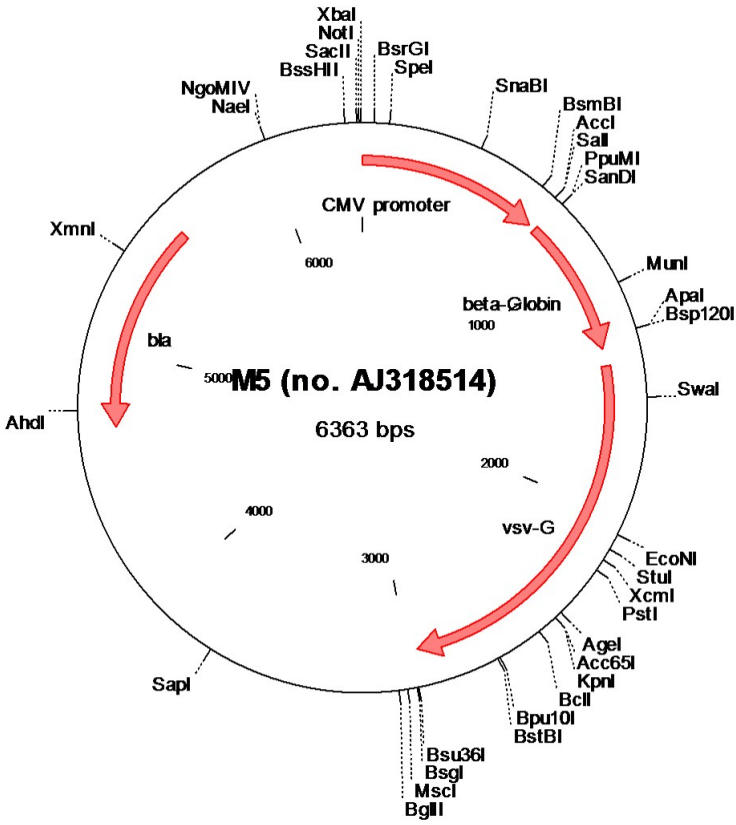
IC ₅₀	Inhibitory Concentration ₅₀ = Inhibitorische Konzentration ₅₀
IL	Interleucin
iSAVE	in vivo sezernierter antiviraler Eintrittsinhibitor
IVC	Individuell ventilierter Käfig (individually ventilated cage)
LTi Zellen	Lymphotoxin- exprimierende 'Inducer' Zellen
LTR	lange terminale Sequenzwiederholungen (long terminal repeat)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLV	murines Leukämievirus
MOI	Multiplicity of infection
NK- Zelle	natürliche Killerzelle
NOD	non-obese diabetic
NOG	NOD/SCID/ γ - Kette Knockout
PBMC	peripheral blood mononucleated cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
PHA	Phytohämagglutinin
Prkdc	protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide
Rag-2	Recombination activated gene 2
RT	Reverse Transkriptase
SCF	Stem Cell Factor
SCID	severe combined immunodeficiency = schwere kombinierte Immundefizienz
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
shRNA	short hairpin RNA
SIN Vector	self inactivating Vector
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPO	Thrombopoietin
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt

VSV Vesikuläres Stomatitisvirus

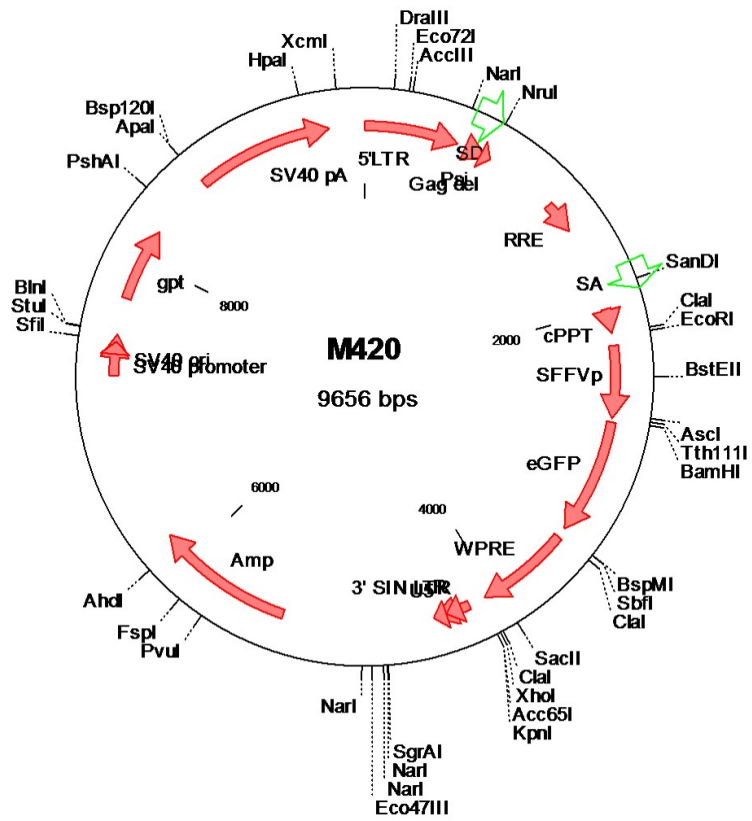
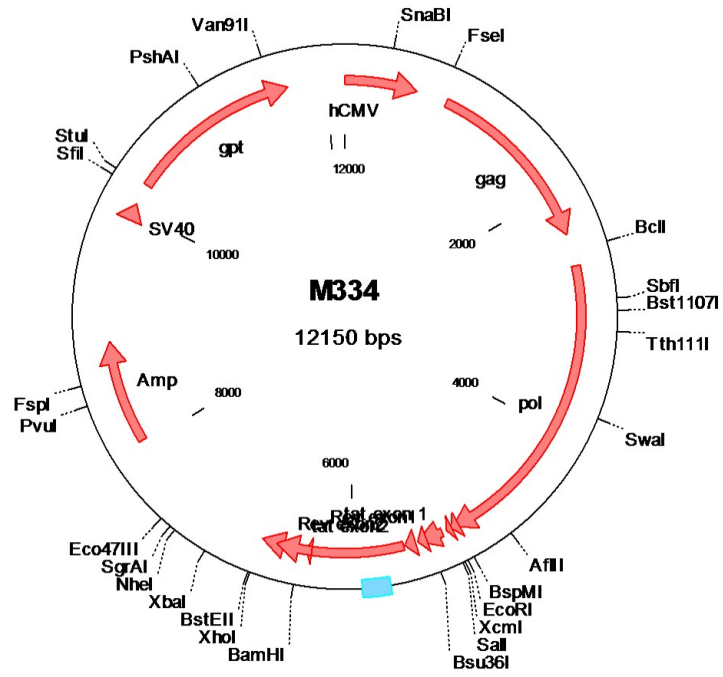
Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

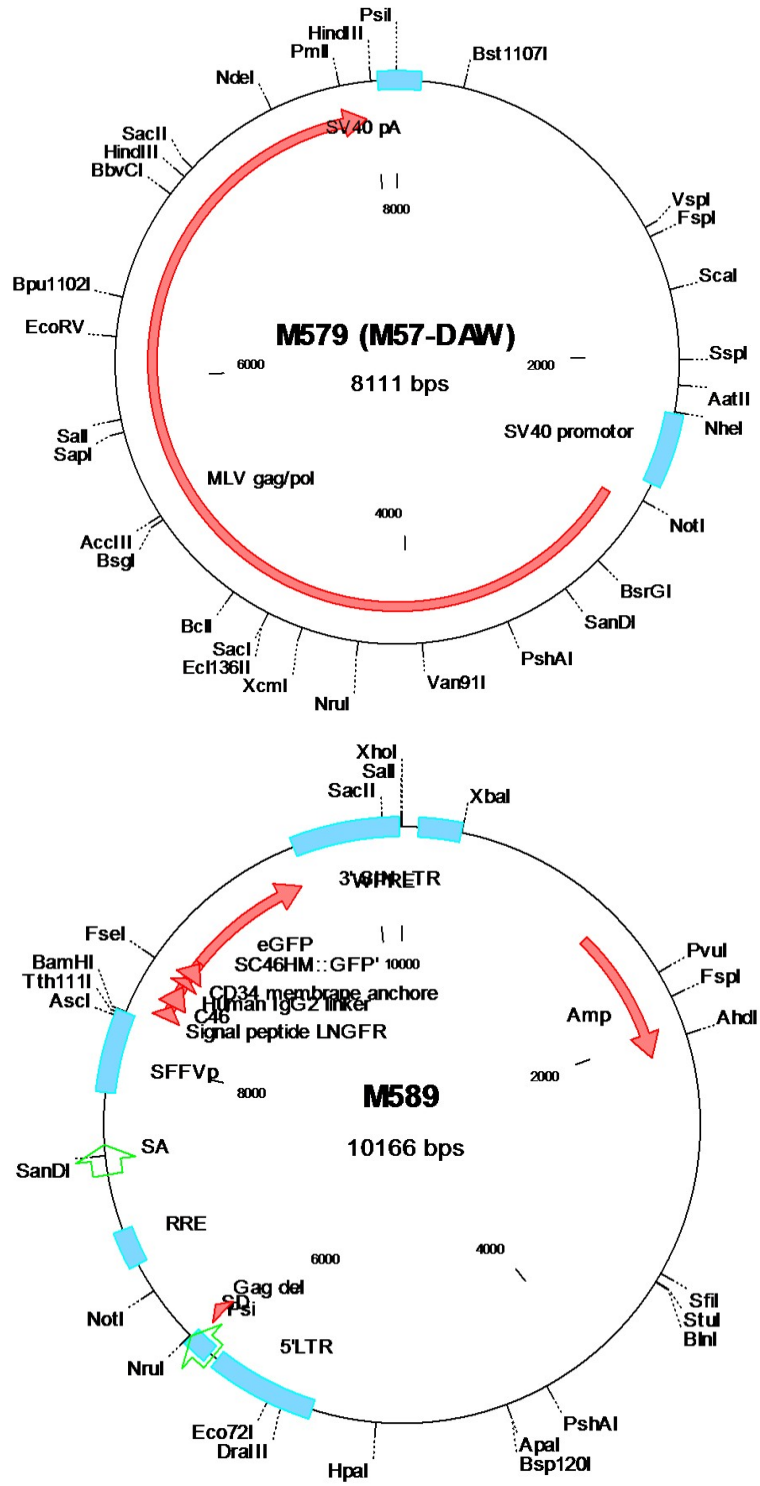
A. Plasmidkarte



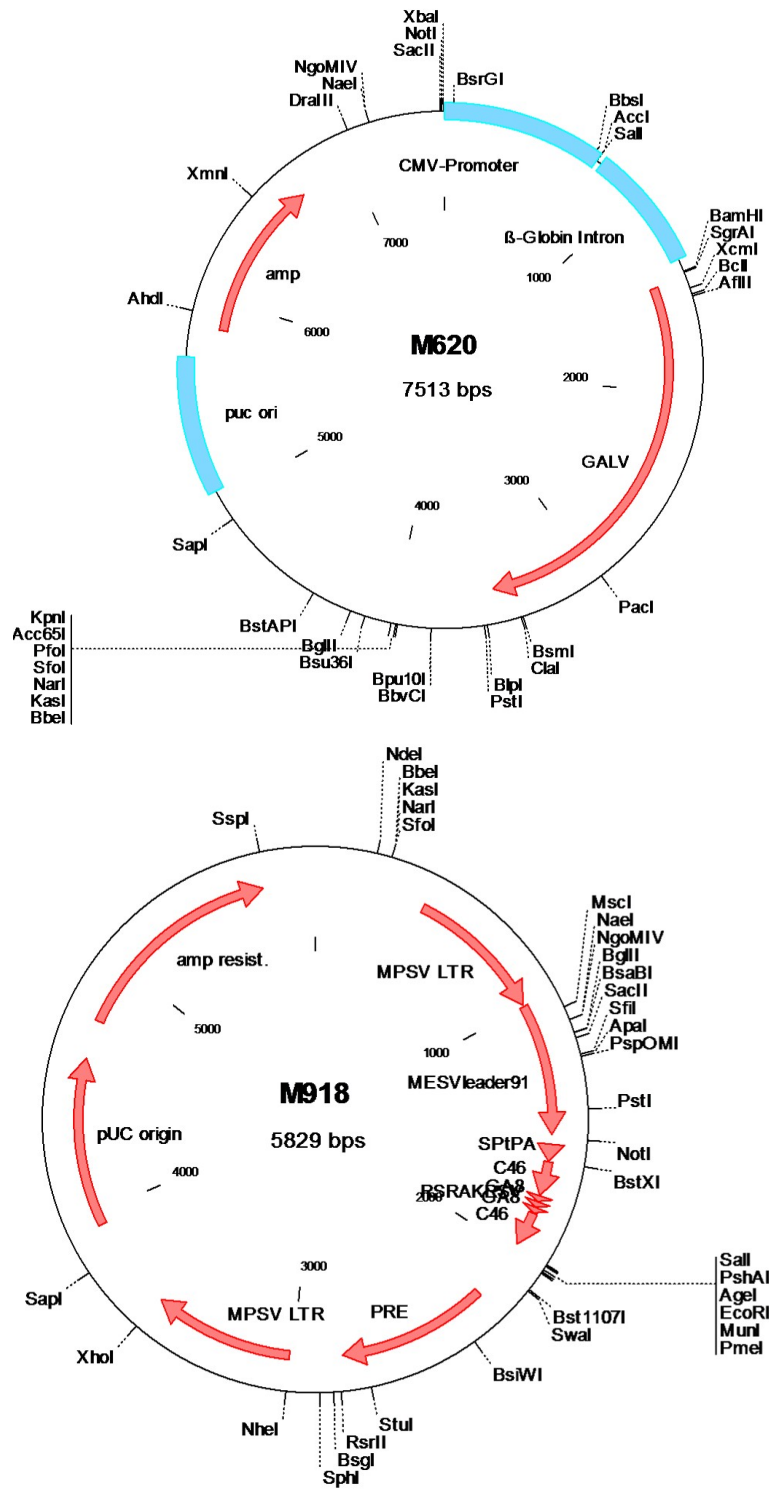
A. Plasmidkarten



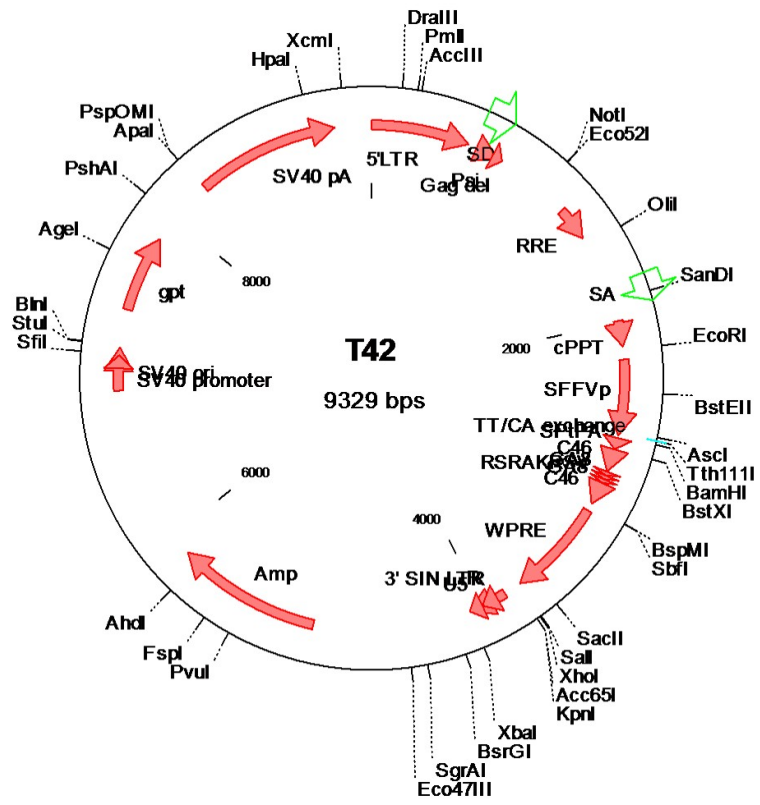
A. Plasmidkarten



A. Plasmidkarten



A. Plasmidkarte



B. Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Vorträge

B.1. Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Kimpel, J., Braun, S. E., Qiu, G., Wong, F. E., Conolle, M., Schmitz, J. E., Brendel, C., Humeau, L. M., Dropulic, B., Rossi, J. J., Berger, A., von Laer, D. and Johnson, R. P. Survival of the Fittest: Positive Selection of CD4⁺ T cells Expressing a Membrane-bound Fusion Inhibitor following HIV-1 Infection. *PLOS One submitted* (2010).

Egerer, L., Volk, A., Kahle, J., Kimpel, J., Brauer, F., Hermann, F. G., and von Laer, D. Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. *Molecular Therapie submitted* (2010).

B.2. Vorträge

Kimpel, J., Newrzela, S., Pahujani, S. und D. von Laer. The neutralizing antibody C2F5 as a secretable fusion inhibitor for gene therapy of HIV infection. 3rd European Congress of Virology (17. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie), Nürnberg, Deutschland, 01-05.09.2007.

Humanized mouse models for efficacy testing of a gene therapy approach for AIDS. Forschergruppe: Validierung humanisierter Maussysteme zur präklinischen Testung, 1. Workshop, Paul-Ehrlich-Institut Langen, Deutschland, 16.11.2007.

Gene Therapy of HIV infection, humanized mouse models. Transatlantic Gene Therapy Consortium, San Diego, USA, 31.05.2009.

Kimpel, J., Egerer, L., Kahle, J., Brauer, F., Volk, A., Hartmann, M., Hermann, F.G., Newrzela, S. und D. von Laer. Membrane-anchored and secreted C peptides as HIV entry inhibitors. 4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italien, 07-11.04.2010.

C. Lebenslauf

Alexandra Janine Kimpel

Geburtsdatum: 5.11.1982

Geburtsort: Hanau

Anschrift: Galvanistraße 15, 60486 Frankfurt am Main

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1988 - 06/1992 Grunschule Gründau- Rothenbergen

09/1992 - 06/2001 Grimmelshausen- Gymnasium Gelnhausen

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife Abitur

Studium

10/2001 - 08/2006 Studium der Biologie an der Johann-Wolfgang-Goethe Universität, Frankfurt am Main

Hauptfächer: Mikrobiologie, Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie

Abschluss: Diplom-Biologin

09/2005 - 08/2006 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Dorothee von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main

Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur *in vivo* Produktion eines rekombinanten Antikörpers durch Leukozyten im Mausmodell

Promotion

- Seit 10/2006** Doktorandin in der Arbeitsgruppe Prof. Dorothee von Laer, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main
- 10/2006 - 09/2009** Stipendium Graduiertenkolleg 1172 Erforschung, Entwicklung und Sicherheit von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln „Biologicals“
- 09/2008 - 03/2010** Studentische Sprecherin des Graduiertenkollegs 1172 Erforschung, Entwicklung und Sicherheit von biotechnologisch hergestellten Arzneimitteln „Biologicals“
- 06/2009 - 08/2009** Auslandsaufenthalt, Caltech, Pasadena, USA, Labor Prof. David Baltimore
- 10/2009 - 03/2010** Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main, Abteilung für angewandte Virologie und Gentherapie
- Seit 04/2010** Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der medizinischen Universität Innsbruck, Sektion Virologie

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Doktorarbeit mit dem Titel „Analyse der Wirksamkeit einer Gentherapie der HIV- Infektion im humanisierten Mausmodell“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Frankfurt am Main, im Mai 2010

(Janine Kimpel)